



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

HIDROXIAPATITA DEFICIENTE EM CÁLCIO ASSOCIADA A BMP
PARA TRATAMENTO DE DEFEITO CRÍTICO EM ULNA DE *Gallus*
gallus domesticus

LETÍCIA GUTIERREZ DE GUTIERREZ

Porto Alegre, 2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

HIDROXIAPATITA DEFICIENTE EM CÁLCIO ASSOCIADA A BMP
PARA TRATAMENTO DE DEFEITO CRÍTICO EM ULNA DE *Gallus*
gallus domesticus

Autor: Letícia Gutierrez de
Gutierrez

Dissertação apresentada como
requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre em Ciências
Veterinárias na área de Morfologia,
Cirurgia e Patologia Animal

Orientador: Prof. Dr. Marcelo
Meller Alievi

Porto Alegre, 2017

Letícia Gutierrez de Gutierrez

HIDROXIAPATITA DEFICIENTE EM CÁLCIO ASSOCIADA A BMP
PARA TRATAMENTO DE DEFEITO CRÍTICO EM ULNA DE *Gallus*
gallus domesticus

Aprovada em

APROVADO POR:

Prof. Dr. Marcelo Meller Alievi (UFRGS)
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Cristiano Gomes (UFRGS)

Prof. Dr. Luís Alberto dos Santos (UFRGS)

Prof. Dr. Márcio Poletto Ferreira (UFRGS)

DEDICATÓRIA

A minha família que sempre acreditou em mim, sacrificando-se em prol de minhas conquistas e proporcionando-me uma educação de qualidade. In memoria, ao meu irmão, Nicolás Pedro Gutierrez, que nos cuida lá do outro plano, zelando para que sejamos felizes.

AGRADECIMENTOS

A minha família, por sempre me incentivar em todas escolhas e decisões, em especial a “Doña” Martha, minha mãe, que nunca mediu esforços; aos meus irmãos; mano Claudito, pelas dicas de vida e por ter me dado a benção de ser tia do amado Gabriel e da maravilhosa afilhadinha Manu. A mana Carola, meu exemplo e que agora me deu o prazer de ser dinda da linda Giovaninha. Ao mano Nico, que certamente está orgulhoso da sua mana mais nova; gordinho, esse mestrado é para ti, que me ensinou que a vida é muito mais que um título. Ao meu pai, que me incentivou a “entrar” nesse “mundo”. Gratidão é pouco, amo vocês (ALICERCE). A quem mais me aguentou nesses anos e que teve o papel, não somente de me orientar, como também de me dar conselhos, “tipo pai”; meu querido orientador Prof. Dr. Marcelo Meller Alievi, pessoa que admiro e tenho um carinho imenso. E que desde o 2º semestre da graduação tenho como exemplo, tanto como profissional, como pessoa. “Sor Alievi”, sem palavras, somente gratidão por tudo que fez por mim durante esses quase 10 anos, eternamente grata. Aos manos “SOTVETeanos” por toda a ajuda durante essa caminhada, não somente durante esses dois anos e muito menos somente dentro da instituição: Alinão, Simonão, Kauê, Bê, Lucão, Alê, Vêro, Manu, Miu, Ruivo, Ned, Aires, Paula e em especial a Mari, que desde a graduação esteve ao meu lado até o presente momento, vivendo intensamente com as “popós”; obrigada, sem vocês seria impossível. A Dr. Mônica B. Thürmer e ao Prof. Dr. Luís Alberto L. dos Santos, pela confiança em testar o cimento ósseo elaborado pelo “LABIOMAT”, e ao técnico Wilbur, pelas horas de ensaio biomecânico. Ao Prof. Dr. Emerson A. Contesini pelo empréstimo do aparelho de bisturi ultrassônico. Aos funcionários do HCV, professores, estagiárias (fisio) técnicos, residentes, diretoria, recepção, SAME, limpeza; enfim, todos que contribuíram para minha educação, seja acadêmica, ou para vida. Ao pessoal do bloco de ensino, funcionários Dr. Lú, Vanessa, Fábio e, em especial, Marquinhos, por nos ajudar a cuidar das galinhas. Ao Setor de Imagem, Mari, Lú, Jaques, Charlene, Zang e Prof. Dr. Márcio Poletto. Ao Setor de Patologia pelas amostras analisadas, colega Fernando e Prof. Dr. Luciana Sonne. Aos animais que proporcionaram esse experimento e outros. Aos amigos de batucadas (blocos Turu, Laje, Não Mexe) e a super Camila, sem vocês seria muito mais difícil. Ao ensino gratuito, público e de qualidade que me foi proporcionado por conta de um governo livre e que prezava pela educação de forma pública. E por fim, ao CNPq pela bolsa de mestrado. OBRIGADA GENTE LINDA.

RESUMO

Fraturas cominutivas com grandes perdas ósseas são comuns em animais silvestres, sendo de maior prevalência em aves, devido a traumas, com a crescente urbanização e desmatamento. Um dos problemas para o tratamento dessas fraturas nesses animais é a dificuldade do uso de enxertia autógena, devido os locais de coleta não oferecerem material suficiente e pela alta taxa de morbidade. Assim, a engenharia de biomateriais vem desenvolvendo diversos dispositivos com a intenção de auxiliar nesse tratamento. O uso de cimento ósseo é crescente nesse meio, e tem como objetivo a recuperação e reintrodução do animal a seu habitat. O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso do cimento ósseo de hidroxiapatita deficiente em cálcio (HAD) associado ou não a proteína morfogenética óssea (BMP), para o tratamento do defeito crítico (DC) diafisário em ulna de galinhas domésticas. Foram utilizadas 32 aves, separadas em 4 grupos de 8 animais, sendo: controle negativo (GCN), controle positivo (GCP), cimento de HAD (GHAD) e cimento HAD associado a BMP (GHAD+BMP). Todos os animais passaram pelos procedimentos de ostectomia e a fixação dos fragmentos por meio da colocação de um pino intramedular de 1,5mm de forma retrógada, e acompanhados por período de 60 dias. Foram realizados exames radiográficos, análise histopatológica e biomecânica das ulnas. O presente trabalho demonstrou que não houve diferença significativa de consolidação entre os grupos com e sem BMP, porém o HAD+BMP apresentou-se mais eficiente para DC em galinhas na avaliação histopatológica, levando a resposta osteoindutora, por parte do cimento, e osteogênica, pela proteína.

Palavras-chave: cimento ósseo, osteocondutora, osteogênica, osteointegração e biomecânica

ABSTRACT

Comminuted fractures with great bone loss are common in wild animals, being more present in birds due to trauma related to growing urbanization and deforestation. One of the problems of the treatment of these kinds of fractures in these animals is the difficulty of using autogenous grafting because collection places do not offer enough material and also because of the high morbidity rate. Therefore, biomaterials engineering has been developing several devices intending to help on this treatment. Therewith, the use of bone cement is increasing in this environment, and has as its goal the recovery and reintroduction of the animal to its habitat. The objective of this work was to evaluate the use of calcium deficient hydroxyapatite bone cement (HAD) for the treatment of diaphysialcritical defect (DC) in ulna of domestic hens. Thirty-two birds were used, divided in four groups of eight animals, being: negative control (GCN), positive control (GCP), HAD cement (GHAD) and HAD cement associated with bone morphogenetic protein (GHAD + BMP). All animals went through the procedure of osteotomy and fixation of the fragments by placing a 1.5mm intramedullary pin in a retrograde way, and assisted for a period of 60 postoperative days. Radiographic examinations, histopathological and biomechanical analysis of the ulna were performed. The present paper demonstrated that there was not a significant consolidation measure between the groups with no BMP, however HAD + BMP presented more efficient results for DC in hens in the histopathological evaluation, leading to an osteoinductive response by cement and osteogenic by the protein.

Keywords: bone cement, osteoconductive, osteogenic, osseointegration and biomechanics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Ilustração do ensaio biomecânico de três pontos A) Flexão em uma barra bi apoiada. B) Ilustração prática de flexão de três pontos em ulna de galinha.	18
Figura 2 –	Imagem radiográfica médio-lateral de 60 dias de quatro animais que foram utilizados o cimento ósseo de hidroxiapatita deficiente em cálcio associado a BMP-2.....	53
Figura 3 –	Imagem radiográfica médio-lateral do defeito ósseo de cada animal do GCN aos 60 dias. A) GCN1. B) GCN2. C) GCN3. D) GCN4. E) GCN5. F) GCN6. G) GCN7. H) GCN8.....	54
Figura 4 –	A) Galinha do GHAD+BMP, apresentando falha do implante aos 60 dias B) Galinha do GHAD+BMP aos 60 dias, apresentando imagem radiográfica compatível com reabsorção e não integração cimento/osso receptor C) Animal do GHAD+BMP em que ocorreu falha no cimento ósseo, porém apresentando reação e crescimento ósseo no local da falha D) falha no cimento ósseo em galinha do GHAD, porém apresentando aparente reação endosteal do osso receptor com o cimento ósseo	55
Figura 5 –	Imagem histopatológica demonstrando a reação tecidual dos animais submetidos ao uso do cimento ósseo associado a BMP, onde os símbolos são: (círculo) matriz óssea mineralizada, (seta para baixo) formação de novo osso (matriz óssea não mineralizada), (triângulo) cimento ósseo de hidroxiapatita deficiente em cálcio não absorvido (material amorfo).....	56

CAPÍTULO 1

- Figura 1 –
- A) Medição do comprimento do defeito crítico de 2cm na ulna. B) Osteotomia com bisturi ultrassônico. C) Hidratação por 10 minutos do cimento ósseo de HAD. D) osso pós osteotomia. E) Colocação do pino de forma retrógrada. F) Fragmento ósseo pós osteotomia e cimento de HAD. G) Defeito crítico (GCN). H) Cimento ósseo de hidroxiapatita deficiente em cálcio implantado. I) Colocação de 1 μ L de BMP na interface proximal..... 36
- Figura 2 –
- A) Máquina de ensaios Instron modelo 3369. B) Ulna contralateral posicionada no teste de três pontos. C) Momento de flexão..... 37
- Figura 3 –
- Histopatológico dos grupos estudados: A) GHAD+BMP, acentuada proliferação de matriz óssea organizada, múltiplas áreas de formação de matriz cartilaginosa, além de acentuada proliferação de tecido conjuntivo fibroso e presença de osteoclastos. B) GHAD, proliferação de tecido conjuntivo moderado, com matriz óssea não mineralizada, presença de osteoclastos e tecido cartilaginoso moderado. C) GCP, acentuada proliferação de osteoblastos e de matriz óssea. D) GCN, proliferação de tecido conjuntivo fibroso multifocal, além de discreto infiltrado inflamatório composto por linfócitos e ocasionais heterófilos 41

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 1

Tabela 1 –	Escore para avaliação radiográfica proposto por Ehrhart et al. (2005) e adaptado para avaliação do uso do cimento ósseo de hidroxiapatita deficiente em cálcio associado a BMP-2 para tratamento de defeito crítico ósseo de 2cm em ulna de galinhas.....	38
Tabela 2 –	Tabela comparativa do escore entre os grupos e entre os tempos.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FAVET	Faculdade de Veterinária
UFRGS	Universidade Federal do Rio grande do Sul
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
kg	quilograma
m	metro
PO	pós-operatório
BMP	proteína morfogenética óssea
GCN	grupo controle negativo
GCP	grupo controle positivo
GHAD	grupo cimento de hidroxiapatita deficiente em cálcio
GHAD+BMP	grupo cimento de hidroxiapatita deficiente em cálcio associado a BMP
α -TCP	alfa trifosfato de cálcio
β -TCP	beta trifosfato de cálcio
CFC	cimento de fosfato de cálcio
mg	miligrama
IM	intramuscular
%	porcentagem
NaCl	cloreto de sódio
mm	milímetro
SID	uma vez ao dia
VO	via oral
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
HE	hematoxilina eosina
cm	centímetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
	2.1 Sistema ósseo das aves.....	16
	2.2 Biomecânica óssea e ensaio de flexão.....	17
	2.3 Biomateriais.....	19
	2.3.1 Cimento de Fosfato Tricálcico (TCP).....	21
	2.3.2 Sistema de cimento de Alfa Fosfato Tricálcico (α -TCP).....	22
	2.4 Proteína óssea morfogenética (BMP)	23
	2.5 Defeito crítico.....	24
3	OBJETIVOS	25
4	JUSTIFICATIVA	26
5	RELEVÂNCIA CLÍNICA	27
6	HIPÓTESE	28
7	CAPÍTULO 1	29
	RESUMO.....	30
	ABSTRACT	31
	INTRODUÇÃO	32
	MATERIAL E MÉTODOS	34
	RESULTADOS.....	38
	DISCUSSÃO.....	42
	CONCLUSÃO.....	48
	REFERÊNCIAS.....	49
7	DISCUSSÃO	51
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
	ANEXO A - Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	66

1 INTRODUÇÃO

Fratura em aves é um dos maiores problemas na clínica de animais silvestres, pois sua anatomia é desfavorável no sentido de fragilidade cortical, além de possuírem ossos pneumáticos e terem o canal medular largo, assim, apresentam alta prevalência de fraturas múltiplas ou cominutivas. Normalmente, por conta da gravidade e dificuldade em se obter sucesso no tratamento nesse tipo de fratura, a única opção acaba sendo a amputação do membro afetado ou, em se tratando de animal de vida livre, a eutanásia. Em mamíferos existem estudos demonstrando a possibilidade de preservação do membro com a utilização de próteses metálicas, aloimplantes, combinação de ambos, ou a substituição por cimento ósseo.

Procedimentos cirúrgicos que envolvam o uso de cimentos ósseos têm como objetivo a restauração da função estrutural do osso de forma que possibilite a volta da função do mesmo sem prejuízos. É extremamente importante que o enxerto tenha o poder de ser osteoindutor, osteocondutor e que contenha propriedades osteogênicas.

O uso de enxerto autógeno sempre será o preferido na área médica, visto suas qualidades e vantagens; porém, essa manobra muitas vezes acaba sendo preterida, pois a técnica apresenta a desvantagem do aumento da morbidade, dor e aumento dos tempos cirúrgico e anestésico. Em aves, normalmente não é possível obter quantidade suficiente de osso autógeno para a reconstrução completa de uma grande falha óssea. É necessária a utilização de aloimplantes preservados. Entretanto, existe o risco de reação imune ou transmissão de doenças, além da necessidade da formação de banco de ossos, o que aumenta os custos e demanda espaço apropriado para o seu armazenamento.

A engenharia de biomateriais vem crescendo em larga escala, e com isso a fabricação de diversos substitutos ósseos vem sendo desenvolvida. Os biomateriais são classificados em quatro categorias baseadas em suas atividades biológicas e químicas *in vivo*, que são as biotoleráveis, bioinertes, bioativos e bioabsorvíveis. Dentro dos bioativos estão as cerâmicas, que tem como objetivo a formação de reação tecidual, e se possível ligação íntima entre a cerâmica e os tecidos adjacentes.

As cerâmicas de fosfato de cálcio apresentam vastos estudos na área médica, mostrando sua biocompatibilidade dentre estas se destacam os cimentos de fosfato de cálcio (CFC). O CFC é preparado misturando-se um sal de fosfato de cálcio com água (ou solução aquosa) para que se forme uma pasta que possa reagir à temperatura

ambiente ou corporal a fim de dar lugar a um precipitado que contenha um ou mais fosfatos de cálcio e dê pega por meio do intercruzamento dos cristais deste precipitado. Esta forma um emaranhado que proporciona resistência mecânica ao sistema. Por conta da sua biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade vêm sendo amplamente utilizado na medicina; e por serem materiais que endurecem ou pegam no sítio de implantação são usados principalmente em ortopedia.

Existem alguns tipos de sistemas de CFC com a combinação de alguns fosfatos, como o fosfato tricálcico e fosfato dicálcico, a combinação de β - fosfato tricálcico (β -TCP) e fosfato monocálcico e o α - fosfato tricálcico (α -TCP) como constituinte reativo.

Os CFCs contendo fosfatos tricálcicos β e α são cimentos ósseos que tem como objetivo final a formação de hidroxiapatita, sendo que o β -TCP que pode hidrolisar-se à hidroxiapatita por meio da ação dos fluidos corporais, ou o α -TCP que apresenta na sua fase de pega uma hidroxiapatita deficiente em cálcio, similar à hidroxiapatita biológica. Existem diversos estudos demonstrando a eficácia e o poder osteocondutor desses cimentos, porém em aves ainda são escassos.

Em odontologia humana existem diversos estudos referentes ao uso de proteína morfogenética óssea (BMP) para o tratamento de falha óssea em maxila e mandíbula. As BMPs são proteínas que tem o poder de induzir a formação de osso heterotópico. Essas proteínas são capazes de converter células tronco mesenquimais pluripotentes em linhagens osteoblásticas, assim formando osso. A adição das BMPs em cimentos ósseos absorvíveis visa melhorar a resposta imunológica ao implante e a osteogênese.

Em veterinária ainda permanece a dificuldade na classificação de defeito crítico ósseo por conta da diversidade de espécies. Desta forma, existem poucos estudos relatando o defeito crítico em aves, tendo a sua grande maioria como modelo experimental pombos. Conforme Parket et al. (2008), os defeitos críticos são caracterizados como o menor comprimento ósseo que não cicatriza espontaneamente durante o tempo de vida do animal em um osso e uma espécie específica. Anderson et al.(1999) recomendam que um defeito adequado, para a avaliação de materiais de enxertia ou implantes, deve ser crítico e os modelos animais utilizados devem ser adultos.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o cimento ósseo de hidroxiapatita deficiente em cálcio, projetado a partir da biocerâmica absorvível de cimento de alfa fosfato tricálcico (α -TCP), associado ou não a proteína morfogenética óssea

recombinante humana 2 (BMP-2), em defeito crítico ulnar em galinhas domésticas (*Gallus gallus domesticus*).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sistema ósseo das aves

Nas aves, os ossos têm dois papéis principais, de suporte para a musculatura e servir de reserva de cálcio e fósforo. Em galinhas poedeiras, esse reservatório de cálcio e fósforo deve estar prontamente disponível para a formação da casca do ovo, que vem diretamente do osso. Os ossos das aves têm o canal medular largo e apresentam a cortical mais frágil, apesar de altas taxas de cálcio na matriz óssea, quando comparados com os mamíferos (BENNETT; KUZMA, 1992). Este é formado por uma porção cortical e outra esponjosa, sendo a porção mineral resistente à compressão, enquanto o suporte de fibras orgânicas resiste a forças de torção e arqueamento (TULLY, 2002).

A composição óssea, tanto nas aves, quanto nos mamíferos, é formada basicamente por dois componentes: orgânicos e inorgânicos. A porção orgânica é formada por células (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos), fibras colágenas e substância base (proteoglicanos e glicoproteínas). A parcela orgânica é secretada principalmente pelos osteoblastos. O principal componente inorgânico é o fosfato de cálcio, responsável por dois terços do peso ósseo. O fosfato de cálcio interage com o hidróxido de cálcio transformando-se em hidroxiapatita. Conforme ocorre a formação dos cristais de hidroxiapatita, outros materiais inorgânicos como o carbonato de cálcio, sódio, magnésio e fluoreto vão se incorporando (MOTA; CASTRO JÚNIOR; CASTRO, 2008).

Os ossos longos das aves são desenvolvidos pela ossificação endocondral. As células dos ossos longos tornam-se condrócitos que secretam matriz extracelular (LOVERIDGE; THOMSON; FARQUHARSON, 1993). A camada pericondral é composta de fibroblastos, mais externos, que formam tecido conjuntivo, e de células mesenquimais, mais internas, em multiplicação. Estas células se hipertrofiam, e ao longo do tempo acumulam glicogênio, produzindo matriz extracelular que aumenta o osso mineralizado pela expansão osteoblástica. Há desenvolvimento simultâneo da vascularização óssea e diferenciação celular da linha de células pericondral. A calcificação ocorre devido à secreção de fosfatase alcalina pelos condrócitos e esta é essencial para o processo de mineralização, enquanto sua inibição interrompe o

processo de calcificação. Os osteoclastos agem sobre a cartilagem calcificada, e esta é preenchida por células que formarão a medula óssea e osteoblastos. Uma vez formada, a cavidade medular permanece inalterada, enquanto o periósteo é continuamente remodelado (TULLY, 2002).

2.2 Biomecânica óssea e ensaio de flexão

A biomecânica é a mecânica aplicada aos sistemas biológicos que proporcionam o entendimento das influências mecânicas sobre os processos de reparação óssea. Entender e compreender as propriedades estruturais e materiais dos ossos, assim como dos efeitos que as forças apresentam em ossos longos, permite que a decisão que o cirurgião ortopédico deva tomar referente a determinado implante ou método cirúrgico seja mais perspicaz e adequada para fixação da fratura que almeja corrigir (DALMOLIN et al., 2013).

Conforme a função que desempenha, os ossos são constantemente submetidos a diversos tipos de cargas, semelhante a estruturas utilizadas na engenharia (SOUZA et al., 2009). Por meio do estudo biomecânico, compreendem-se as forças e momentos que o esqueleto apendicular deve resistir, permitindo aos cirurgiões avanços na substituição total de articulações, no *design* da fixação de fraturas, na compreensão acerca da remodelação óssea, no entendimento das fraturas decorrentes do exercício, do trauma e de como transcorrem o reparo e a reconstrução óssea. Para tanto, é necessária a compreensão da biomecânica do osso normal intacto, dos fraturados e da mecânica dos implantes empregados. É de grande importância conhecer a composição e propriedades do material, sua geometria e a força atuante (DALMOLIN et al., 2013).

Os ossos apresentam a combinação das características de serem para determinadas situações frágeis e para outras dúcteis, sendo a porção orgânica 35% da matriz extracelular, desta forma responsável pela resistência à fratura, compressão e tração, conferindo maleabilidade tecidual sem que perca clinicamente sua dureza. Porém, a resistência à deformação deve-se aos componentes inorgânicos que constituem 65% da matriz (MOTA et al., 2008). Ossos corticais e esponjosos possuem composição similar com diferentes configurações estruturais; no osso cortical, os canais de Havers estão presentes e o tecido ósseo é depositado em camadas cilíndricas em torno destes.

No osso esponjoso, ou trabecular, não existem canais de Havers, sendo o tecido depositado em camadas longitudinais. Essa diferença microestrutural, combinada ao pequeno tamanho das trabéculas, resulta em menor rigidez e resistência do osso esponjoso (DALMOLIN et al., 2013).

Os ossos são mais resistentes na orientação longitudinal do que tangencial ou radial; isso se deve principalmente ao fato dos ósteons serem orientados ao longo do eixo ósseo e justapostos entre si. Assim, se o osso cortical receber carga na direção perpendicular aos ósteons, tenderá à fratura de maneira mais quebradiça (SCHIMTT, 2014). Por esse motivo, em aves, a flexão é o ensaio mais importante devida a forma de voo (TUNIO et al., 2015a).

As leis de Newton e Hooke formam a base da mecânica dos objetos elásticos. O comportamento mecânico do osso em situações fisiológicas é similar ao comportamento mecânico de um objeto elástico. Em física determina-se que quando uma força causa uma deformação e em seguida esta força é removida e o objeto reassume a posição e conformação original, denomina-se “deformação elástica”. Porém, se a carga é aplicada até o ponto em que o objeto não é capaz de reverter sua forma original, tem-se o “ponto de quiescência”, assim, essa deformação permanente acaba sendo denominada “deformação plástica”. Com a continuidade da aplicação da carga, obtém-se o “ponto de fratura” (DALMOLIN et al., 2013).

O ensaio de flexão consiste na aplicação de uma carga crescente em determinados pontos de uma barra geometricamente padronizada. A carga aplicada parte de um valor inicial igual a zero e aumenta lentamente até a ruptura do corpo de prova. É um ensaio bastante aplicado em materiais frágeis como cerâmicos e metais duros, ferro fundido, aço ferramenta e aço rápido, pois fornece dados quantitativos da deformação desses materiais (GARCIA; SPIM; SANTOS, 2000).

Vários estudos têm sido conduzidos para avaliar a eficácia biomecânica de diferentes dispositivos utilizados para o tratamento de fraturas em medicina e cirurgia de pequenos animais. Porém, ainda são limitadas informações sobre a avaliação biomecânica da consolidação de fraturas em aves (TUNIO et al., 2015a).

Na engenharia, são utilizados vários métodos de ensaio biomecânico utilizando testes de torção, de compressão e de flexão. O teste de flexão de três pontos é o

procedimento mais adequado para ossos de animais experimentais (TUNIO et al., 2015a). Existem dois tipos de ensaio de flexão: em três pontos e em quatro pontos; o ensaio de três pontos é utilizado com uma barra biplanar apoiada com a aplicação de carga no centro da distância entre os apoios, ou seja, existe três pontos de carga. Já a de quatro pontos difere visto que a carga é em dois pontos equidistantes dos apoios da barra biplanar. Os principais resultados dos ensaios são: módulo de ruptura na flexão, módulo de elasticidade, módulo de resiliência e módulo de tenacidade. Os resultados fornecidos podem variar com a temperatura, a velocidade de aplicação da carga, os defeitos superficiais e principalmente com a geometria da seção transversal da amostra (GARCIA; SPIM; SANTOS, 2000).

Uma das propriedades mecânicas avaliada com o ensaio de três pontos é a tensão de flexão, que avalia a aplicação de um esforço numa barra bi apoiada em que ocorre uma flexão e que a sua intensidade ocorrerá no centro do corpo de prova, na qual alcançará a flexão máxima (Fig. 1)(GARCIA; SPIM; SANTOS, 2000):

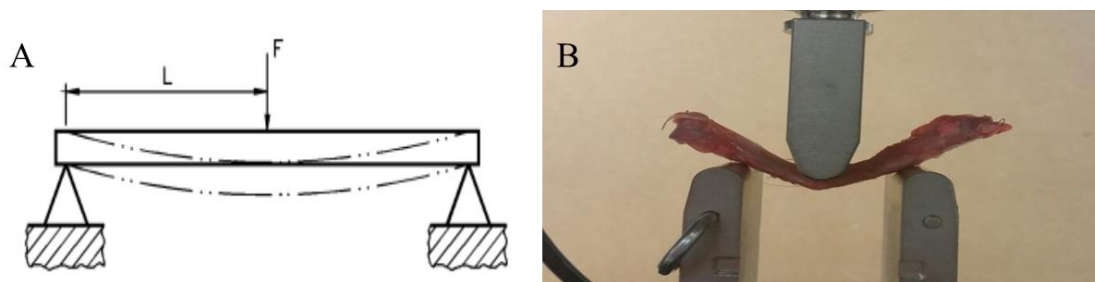


Figura 1: A) Flexão em uma barra bi apoiada(GARCIA; SPIM; SANTOS, 2000). B) Ilustração prática de flexão de três pontos em ulna de galinha.

2.3 Biomateriais

A engenharia de biomateriais vem buscando aprimorar o desenvolvimento de substitutos para o enxerto autólogo, pois tanto na medicina veterinária, quanto na humana, os tecidos orgânicos sofrem por doenças severas (como câncer), apresentam anormalidades congênitas, sofrem traumas com grandes perdas teciduais; sendo assim os tratamentos convencionais, às vezes, não são bem sucedidos (SAHITHI et al., 2010).

Os biomateriais são definidos como substâncias de origem natural ou sintética que são toleradas de forma transitória ou permanente pelos diversos tecidos que constituem os órgãos dos seres vivos. São utilizados como um todo ou parte de um

sistema que trata, restaura ou substitui algum tecido, órgão ou função do corpo, ou ainda como um material não biológico utilizado em um dispositivo médico, com a intenção de interagir com o sistema biológico (WILLIAMS, 1987).

Formar um suporte para a regeneração de tecidos é uma busca incessante na bioengenharia. Alguns pré-requisitos são necessários para que essa estrutura desempenhe as funções de suporte: ter microporos interconectados para que várias células possam migrar para dentro do tecido, aumentar o número de células e suprir com quantidades suficientes de nutrientes. Os microporos possibilitam tanto a formação vascular quanto o transporte. Isto é muito importante para a sobrevivência das células dentro dessas estruturas (OKAMOTO et al., 2006; JENSEN et al., 2007).

Devemos levar em consideração algumas características fundamentais para a utilização de biomateriais em organismos vivos: não ser cancerígeno e não causar toxicidade ao organismo; ser quimicamente estável; ter estabilidade mecânica adequada; densidade, forma e peso adequados para o organismo em questão; ter um custo acessível; ser biofuncional e principalmente desempenhar o papel para o qual foi fabricado (SILVER & DOILLON, 1989).

Estes podem ser classificados em função de sua origem, da reação tecidual que geram ao organismo ou de sua natureza química. Com relação a sua origem, os biomateriais podem ser autógenos (do próprio animal), alógenos (outro indivíduo, mas da mesma espécie), xenógenos (obtido de outra espécie) e aloplásticos (sintéticos e biocompatíveis) (SANTOS, 2002). Os aloplásticos são exclusivamente os biomateriais comerciais, podendo ser de natureza metálica, cerâmica ou polimérica, desde que sejam sinteticamente produzidos e que sejam biocompatíveis com o organismo escolhido como receptor. Além de diminuir a morbidade do sítio doador do enxerto, traz benefícios como a diminuição do tempo cirúrgico e vem em múltiplos tamanhos e formatos. Como desvantagens, esses tipos de materiais podem apresentar riscos de reação inflamatória seguida de infecção. Desta forma, apresenta-se a preferência pelo uso de aloplásticos reabsorvíveis, pois estudos demonstram que alguns enxertos não reabsorvíveis podem causar reações a longo prazo (PINTO, 2007).

Os biomateriais podem ainda ser classificados de acordo com seu comportamento fisiológico em biotoleráveis, bioinertes, bioativos e reabsorvíveis (biodegradáveis). Nos bioativos encontramos algumas biocerâmicas, que são biocompatíveis, com excelente resistência à compressão, alta resistência ao desgaste e

baixo coeficiente de atrito; porém, podendo apresentar dureza ou fragilidade. As biocerâmicas bioativas são aquelas que induzem uma determinada atividade biológica por parte do tecido hospedeiro frente à presença do material (BEN-NISSAN, 2003).

Existem basicamente três tipos de implantes biocerâmicos: inerte (alumina, zircônia, por exemplo), bioativo (biovidros, vitrocerâmicas e a hidroxiapatita) e os reabsorvíveis (fosfato tricálcicos e alguns tipos de biovidros) (THURMER, 2014). Nos biomateriais reabsorvíveis encontramos biocerâmicos formadores de cimentos com base de fosfato de cálcio, que apresentam características de osteocondução, principalmente o fosfato tricálcico, e por esse motivo atraem interesse significativo como substitutos ósseos (THURMER, 2014). Sua biocompatibilidade e ampla faixa de relação cálcio/fósforo (Ca/P) os tornam aplicáveis a uma série de situações distintas devido as diferentes propriedades superficiais, funcionalidade e taxas de dissolução. Assim, podendo servir como coberturas de implantes metálicos, cimentos, blocos, *scaffolds*, entre outros (BOSE; TARAFDER, 2012). Os cimentos de fosfato de cálcio são materiais constituídos por um pó e um líquido, os quais, ao serem misturados formam uma pasta que endurece espontaneamente à temperatura ambiente ou corporal como resultado da precipitação de um ou vários fosfatos de cálcio (CARRODEGUAS et al., 1999). E estes buscam manterem-se similares aos processos biológicos, como por exemplo tecido ósseo e dentes. Desta forma, dentre os cimentos cerâmicos de fosfato de cálcio usados na área médica encontramos os baseados em hidrogenofosfato de cálcio diidratado (DCPD), o hidrogenofosfato de cálcio anidro (DCPA), o fosfato de cálcio amorfo (ACP), o fosfato de octacálcio (OCP), a hidroxiapatita (HA) e o fosfato tricálcico (TCP) (DOROZHKIN, 2011).

2.3.1 Cimento de Fosfato Tricálcico (TCP)

Os substitutos ósseos baseados nos cimentos de fosfatos de cálcio têm revolucionado tanto a ortopedia quanto a odontologia no que diz respeito a reparo de fraturas, reposição e reparação de partes danificadas do sistema esquelético, pois se apresentam no mercado em forma de blocos, mas principalmente, falando de fosfato de cálcio, na forma de cimento ósseo (CARDOSO; ZAVAGLIA, 2010). Estes cimentos possuem um perfil biológico excelente para o desenvolvimento de implantes ou preenchimentos ósseos, pois apresentam composição muito semelhante à fase mineral dos ossos e dentes (íons fosfato e cálcio) sem apresentar toxicidade local ou sistêmica,

pois apresentam habilidade de formar ligações com o tecido hospedeiro, apresentando leve resposta inflamatória ao implante e sem formação de tecido fibroso envoltório (CARDOSO; ZAVAGLIA, 2010).

A utilização de cimentos ósseos a base de fosfato tricálcico vem crescendo no mercado devido à sua biocompatibilidade, bioatividade *in vivo*, biorreabsorção e osteocondutividade (ESLAMINEJAD; BORDBAR; NAZARIAN, 2013). Existem três polimórficos de fosfato tricálcico: na forma de baixa temperatura, o β -TCP, e de altas temperaturas, o α -TCP e o α' -TCP (CARRODEGUAS; DE AZA, 2011).

Os mais utilizados em medicina e odontologia são o β -TCP e o α -TCP, sendo que tanto um quanto o outro são aplicados nas áreas de odontologia, reconstruções maxilo faciais e ortopedia. O β -TCP é componente de vários blocos cerâmicos mono ou bifásicos e alguns compósitos, e o α -TCP é componente principal de vários cimentos ósseos hidráulicos (que são aglomerados que não somente ganham rigidez através de reações com água, como também formam um produto resistente à água) (CARRODEGUAS; DE AZA, 2011; THURMER, 2014). O interesse pelo fosfato tricálcico tem sido manifestado nessa área por conta de sua natureza reabsorvível que promove regeneração da estrutura óssea, por possibilitar a geração de porosidade, assim sendo um auxiliar no tratamento com próteses (CARRODEGUAS; DE AZA, 2011).

2.3.2 Sistema de cimento de Alfa Fosfato Tricálcico (α -TCP)

Apesar da existência de diversos sistemas de cimento de fosfato de cálcio estudados, os baseados em alfa-fosfato tricálcico (α -TCP) são de especial interesse em função de sua obtenção ocorrer durante a reação de pega de uma fase de hidroxiapatita (HA) deficiente em cálcio, similar à hidroxiapatita óssea. Dessa forma, estando presente, a hidroxiapatita favorece o crescimento ósseo no local, estabelecendo ligações de natureza química entre a hidroxiapatita e o tecido ósseo (que serve de componente bioativo), permitindo a proliferação de fibroblastos, osteoblastos e outras células ósseas, promovendo o crescimento tecidual, pois as células não distinguem entre a hidroxiapatita e a superfície óssea, o que é uma indicação de alta similaridade química superficial favorável (SANTOS, 2002; THURMER, 2014).

O α -TCP forma HA em ambientes fisiológicos através de processos miméticos, sendo muito semelhante à apatita biológica, o que lhe atribui comportamento osteocondutivo. Esse tipo de biomaterial possui efeitos sinérgicos sobre a osteogênese

quando usado como carreador para fatores de crescimento, como por exemplo, as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs)(SANTOS, 2002; LEE; SHIN, 2007).

A reação de pega aparentemente ocorre em duas etapas, sendo a primeira a dissolução das partículas de α -TCP, e a segunda a precipitação de cristais de hidroxiapatita deficiente de cálcio, possuindo um pH entre 6,5 e 8, sendo similar à hidroxiapatita biológica prevenindo assim efeitos citotóxicos no sítio de enxertia (SANTOS, 2002; THURMER et al., 2016). Assim, com esse pH e associado à temperatura corporal ocorre um aumento de sua resistência mecânica durante a pega, quando comparadas às obtidas em temperatura ambiente. Tal característica é devido à elevação da velocidade da reação de pega(SANTOS et al., 2002). Outro fator importante é que o produto final desse cimento, a hidroxiapatita deficiente em cálcio, apresenta uma relação Ca/P de 1,5, sendo que a hidroxiapatita óssea apresenta uma relação muito similar(SANTOS, 2002).

Embora a maioria dos fatores de crescimento sejam transportados por carreadores produzidos a partir de polímeros naturais ou sintéticos, materiais inorgânicos se tornaram uma alternativa para transportar proteínas e outras drogas, sendo amplamente utilizados no favorecimento do crescimento ósseo em lesões ósseas. Esses materiais são sintetizados com a finalidade de estimular fatores de crescimento. O α -TCP se caracteriza por apresentar um grande potencial como carreador na engenharia de tecido ósseo, devido à sua biocompatibilidade, degradação e osteocondutividade (SANTOS et al., 2002; LEE; SHIN, 2007).

O sistema α -TCP apresenta algumas características consideradas ideais para a viabilização de sua aplicação como cimento ósseo; algumas delas são a não alteração do volume e nem a liberação de calor durante a reação de pega, ausência de citotoxicidade, integridade estrutural quando em contato com os fluídos corpóreos e ótima biocompatibilidade (SANTOS, 2002).

2.4 Proteína morfogenética óssea (BMP- *Bonemorphogeneticproteins*)

Em meados de 1960, a enxertia óssea ganhou uma excelente ferramenta auxiliar no tratamento de fraturas e reconstrução óssea. Embora tecnicamente seja considerado um enxerto, este material tem como principal função a indução da formação óssea através de auxílio de carreadores (WILK, 2004). Classificadas como um subgrupo da superfamília dos fatores de crescimento transformadores beta (TGF- β –

transforminggrowthfactor $-\beta$), as BMPs são polipeptídeos multifuncionais que desempenham importante papel em uma gama de funções e processos celulares como a embriogênese, o crescimento e a diferenciação celular, a consolidação óssea e o reparo de fraturas (AL-AQL et al., 2008).

No final do anos 80, a tecnologia do DNA recombinante foi utilizada para gerar clones complementares do DNA das moléculas de BMP humano, sendo estes inseridos em células de mamíferos e de outros animais para a produção de BMP recombinantes humanas; conhecidas como rhBMP (WOZNEY et al., 1988). Desde então cerca de 20 BMPs foram isoladas e relatadas na literatura. Uma das BMPs humanas sintetizadas é a BMP-2, sendo a BMP mais potente na promoção de diferenciação celular rumo à linhagem osteoblástica (SYKARAS; OPPERMAN, 2003).

Os benefícios da obtenção de matriz óssea verdadeira e funcional sem a necessidade de um segundo sítio cirúrgico parece ser a grande vantagem do uso das proteínas morfogenéticas ósseas (SYKARAS; OPPERMAN, 2003) favorecendo em medicina veterinária para silvestres, visto a dificuldade de se obter grande conteúdo de enxertia óssea autógena de aves.

2.5 Defeito crítico

O defeito crítico é definido como o menor comprimento ósseo que não cicatriza espontaneamente durante o tempo de vida do animal em um osso e é espécie específico (HUH et al., 2005; PARK et al., 2008).

O desenvolvimento de biomateriais ocorreu devido aos estudos dos princípios básicos de biologia, química, matemática, física e engenharia para projetar materiais e compostos de materiais celulares para melhorar ou auxiliar na reconstrução cirúrgica de defeitos críticos; tendo em seu *design* a intuição de tentaram replicar processos biológicos básicos (CAPLAN; GOLDBERG, 1999). Dessa forma, a bioengenharia tem um papel importante no tratamento para sanar os defeitos, visto que é a engenharia responsável pela fabricação de dispositivos para cobrir essas falhas quando os tecidos não são capazes diretamente (CAPLAN; GOLDBERG, 1999).

A cicatrização de um tecido, como o tecido ósseo, pode ocorrer por um processo de reparo ou por regeneração. O resultado final de um reparo é uma cicatriz de tecido fibrótico; e da regeneração é um tecido com características indistinguíveis do tecido original. O problema com o tecido fibrótico é que ele pode não restaurar as funções

normais (mecânicas, por exemplo) do tecido ou órgão injuriado (STEIN, 2009). Quando ocorre a cicatrização óssea incompleta resulta em não-união, complicação freqüente tanto na ortopedia humana, quanto na veterinária (HUH et al., 2005).

São várias as doenças e os acidentes que causam defeitos ósseos que necessitam ser corrigidos, principalmente em animais. Porém, por conta dos custos e a facilidade, o tratamento de eleição para as correções destes defeitos são os enxertos ósseos autógenos em humanos. Este tratamento, porém, possui limitações e inconvenientes, dentre eles a difícil aceitação por parte dos pacientes, o volume e a forma limitada das áreas doadoras, o defeito gerado na extração do enxerto. Por todas essas razões, vários são os materiais que foram criados em medicina humana na tentativa de conseguir um substituto para o osso que o reconstituísse com êxito tanto na forma quanto na função (STEIN, 2009).

3 OBJETIVOS

Avaliar clínica, radiográfica, histológica e biomecanicamente o cimento ósseo de hidroxiapatita deficiente em cálcio associado ou não a proteína morfogenética óssea no tratamento de defeito crítico em ulna de galinhas domésticas (*Gallus gallus domesticus*).

4 JUSTIFICATIVA

O uso de cimentos ósseos a base de fosfato de cálcio vem sendo amplamente difundido em odontologia e medicina, porém, em medicina veterinária, principalmente na clínica de animais silvestres, é um campo a ser explorado. Desta forma, pesquisas buscando elucidar o defeito crítico em galinhas, associado à busca de cimentos ósseos e implantes que sejam relevantes para o tratamento de fraturas são de extrema importância para o sucesso e retorno a função do membro afetado.

5 RELEVÂNCIA CLÍNICA

Devido a necessidade da realização do teste *in vivo* do cimento ósseo de hidroxiapatita deficiente em cálcio oriundo de um sistema de cimento de alfa fosfato tricálcico (α -TCP), elaborado pelo Laboratório de Engenharia de Biomateriais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e associado à casuística de atendimentos de fraturas cominutivas em aves do Hospital de Clínicas Veterinárias da mesma Universidade, foi desenvolvido o presente trabalho com o interesse de num futuro próximo ser almejado o uso de tal material no atendimento de casos clínicos de falhas e perdas ósseas em aves.

6 HIPÓTESE

O grupo em que foi associado o cimento ósseo de hidroxiapatita deficiente em cálcio e a proteína morfogenética óssea apresentará melhores resultados tanto na avaliação radiográfica, quanto na histopatológica e que apresente um módulo de ruptura na flexão, de elasticidade e de resistência igual ou mais altos que o grupo controle positivo no ensaio biomecânico de flexão de três pontos por apresentar tecido ósseo mesclado com cartilaginoso se comparado com o osso saudável.

7 CAPÍTULO 1

HIDROXIAPATITA DEFICIENTE EM CÁLCIO ASSOCIADA A BMP PARA TRATAMENTO DE DEFEITO CRÍTICO EM ULNA DE *Gallus gallus domesticus*

Letícia Gutierrez de Gutierrez

(Artigo a ser submetido para publicação na Revista Arquivo Brasileiro de Medicina
Veterinária e Zootecnia UFMG)

HIDROXIAPATITA DEFICIENTE EM CÁLCIO ASSOCIADA A BMP PARA TRATAMENTO DE DEFEITO CRÍTICO EM ULNA DE *Gallus gallus domesticus*

Letícia Gutierrez de Gutierrez ^{1*}

1 Universidade Federal do Rio Grande do Sul

*leticiagutierrezveterinaria@gmail.com

RESUMO

O uso de cimento ósseo para o tratamento de fraturas cominutivas em aves vem crescendo no meio veterinário com a intenção de recuperar e reintroduzir o animal ao local de origem. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o uso de cimento ósseo de hidroxiapatita deficiente em cálcio (HAD) adicionado ou não com proteína morfogenética óssea (BMP) para o tratamento do defeito crítico (DC) diafisário em ulna de galinhas domésticas. Para tal, foram utilizadas 32 aves separadas aleatoriamente em 4 grupos de 8 animais. Em todos os animais foi realizada ostectomia de um segmento diafisário ulnar de 2cm. No grupo controle negativo (GCN) não foi aplicado qualquer material na área do defeito, no grupo controle positivo (GCP) o próprio segmento ósseo removido foi reinserido no local, no grupo cimento de HAD (GHAD) foi aplicado um cilindro de hidroxiapatita deficiente em cálcio na área do defeito e no grupo cimento de HAD e BMP (GHAD+BMP) além do cilindro de hidroxiapatita deficiente em cálcio foi aplicado 2µl proteína morfogenética óssea. A ulna foi estabilizada com um pino de Kirschner inserido de forma retrógrada. Foram realizados exames radiográficos, análise histopatológica e biomecânica das ulnas após 60 dias da cirurgia. O presente trabalho demonstrou que não houve diferença significativa de consolidação entre os grupos com e sem BMP, porém o grupo HAD+BMP apresentou-se mais eficiente para DC em galinhas na avaliação histopatológica, levando a resposta osteocondutora, por parte do cimento, e osteogênica, pela proteína. Porém, mais estudos são necessários para elucidar tal confirmação, por um período mais prolongado, confirmando que o material tem total osteointegração ao osso receptor.

Palavras-chave: cimento ósseo, osteocondutora, osteogênica, osteointegração e biomecânica

ABSTRACT

The use of bone cement for the salvage of comminuted fractures in birds has been growing in the veterinary field, intending to recover and reintroduce the animal to the place of its origin. The aim of the present article was to evaluate the use of calcium deficient hydroxyapatite bone cement (HAD) for the treatment of diaphyseal critical defect (DC) in ulna of domestic hens. The study used 32 birds, which were divided in 4 groups of 8 animals each, being: negative control (GCN), positive control (GCP), HAD cement (GHAD) and HAD cement associated with bone morphogenetic protein (GHAD + BMP). All animals went through osteotomy procedures and were assisted during a period of 60 days. In the GHAD group, the bone cement was tested and in the GHAD + BMP group the same cement was added to the BMP, in the GCP the removed fragment was replaced, working as an implant; finally, a group was used to evaluate the DC, from which the same fragment size was removed forming a 2cm gap, the GCN. Radiographic examinations, histopathological and biomechanical analysis of the ulna were performed. All animals were euthanized, and both the operated and contralateral wings were submitted to evaluation. The presented paper demonstrated that there was no significant difference in consolidation between the groups with and without BMP, but HAD + BMP was more efficient for DC in hens in the histopathological evaluation, leading to anosteoconductive response, by cement, and osteogenic, by protein. However, more studies are needed to elucidate such confirmation for a longer period, confirming that the material has total osseointegration to the receptor bone.

Keywords: bone cement, osteoconductive, osteogenic, osseointegration and biomechanics

INTRODUÇÃO

A cirurgia óssea reconstrutiva tem como principal objetivo restabelecer o arcabouço ósseo perdido, utilizando técnicas que simulem os mecanismos biológicos de reparo e remodelação (AUGUSTO et al., 2012). Desta forma, a engenharia de biomateriais vem buscando cada vez mais aperfeiçoar materiais compatíveis para o uso em medicina (CARRODEGUAS et al., 1999). A principal função da cirurgia reconstrutiva, com a utilização de enxertos ósseos, é restabelecer a função normal do osso lesionado sem prejuízo ao animal (TUNIO et al., 2015b). O enxerto autógeno corticoesponjoso é muito efetivo para auxiliar na nova formação óssea em mamíferos, porém, em aves, a obtenção de grandes volumes desse tipo de enxerto é mais complicado (SANAEI et al., 2011). O reparo de fraturas com defeito crítico em aves é desafiador, e fraturas que apresentam complicações e não são reparadas nesses animais podem resultar em não-união, má-união ou união retardada (TUNIO et al., 2015b). Assim, com a falta de autoenxerto para sanar defeito crítico em aves, o uso de enxertia através de métodos alternativos pode ser uma solução, visto que os estudos nessa área em aves ainda são escassos (TUNIO et al., 2015b).

Uma alternativa para resolver esse problema seria o uso de cimentos ósseos biocerâmicos. Um dos critérios fundamentais referentes ao uso de substitutos cerâmicos em defeitos ósseos é que o material cerâmico seja biofuncional e capaz de realizar a remodelação orientada do composto ósseo-cerâmico em questão (WILTFANG et al., 2002).

O alfa fosfato tricálcico (α -TCP, α -Ca₃(PO₄)₂) vem recebendo crescente atenção como matéria-prima para vários cimentos ósseos hidráulicos injetáveis, biocerâmicas biodegradáveis e compósitos para reparo ósseo (CARRODEGUAS; DE AZA, 2011) e é amplamente utilizado na área médica e odontológica, principalmente em cirurgias maxilo faciais. O α -TCP é aproximadamente duas vezes mais solúvel que a hidroxiapatita em pH fisiológico, e apresenta a tendência em se transformar em hidroxiapatita precipitado quando em contato com tecido vivo. O fato do α -TCP ser mais solúvel que o β -TCP torna um facilitador na absorção *in vivo* (BOHNER, 2001). A literatura voltada para o uso de cimento de α -TCP preconiza seu uso mais em odontologia e eventualmente em ortopedia, porém, relatos científicos que tratem de suas aplicações *in vivo* são escassos, havendo a necessidade de mais pesquisas nessa área (CARRODEGUAS; DE AZA, 2011).

Recentemente Thürmer et al.(2016) demonstraram que o método de precipitação úmida permite a obtenção do α -TCP em pó com uma elevada pureza (i.e. 100% de fosfato de α -tricálcio por difração de raios X). Além disso, este método de preparação de fosfato provou ser rápido e eficiente, sem uso de tempo de retenção elevado e resfriamento. Após a definição dos melhores parâmetros de síntese, foi possível verificar a viabilidade de sua utilização como cimento fosfato de cálcio e obtenção de um cimento ósseo de hidroxiapatita deficiente em cálcio altamente duro, o qual será testado neste estudo em aves.

É bem difundida, em odontologia, por exemplo, o uso de proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) para o tratamento de falhas ósseas, bem como seu uso associado com carreadores como hidroxiapatita e β -TCP, porém em medicina veterinária seu uso ainda é escasso por conta do alto custo. As BMPs desenvolvem um papel importante na consolidação óssea, pois são moléculas biológicas que tem como objetivo a proliferação celular conforme o sítio e tecido desejado (WEBB; TRICKER, 2000).

Apesar do estudo de Thürmer et al. (2016) *in vitro* demonstrar a capacidade de osteocondução do cimento ósseo de hidroxiapatita deficiente em cálcio feito com base no α -TCP, sua associação com proteínas osteoindutivas, como por exemplo, a proteínas morfogenética óssea humana (BMP 2), não foi estudada para correção de falhas ósseas em aves. As BMPs são bem difundidas na medicina para esse tipo de tratamento, porém em aves existem poucos relatos referenciando seu uso (TUNIO et al., 2015b).

O objetivo deste trabalho foi testar *in vivo* o uso do cimento de α TCP associado ao acelerador de pega de fosfato de sódio dibásico dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) que obteve com produto final um cimento ósseo de hidroxiapatita deficiente em cálcio em aves, elaborado pelo Laboratório de Biomateriais (LABIOMAT) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, associado a BMP-2 comercial.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi previamente analisado e aprovado (Anexo A) pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), número 31391.

Foram utilizadas 32 galinhas domésticas (*Gallus gallus domesticus*), da linhagem Hissex Brown, com a idade aproximada de 120 dias, sexualmente maduras,

com o peso entre 1,7 a 1,9 kg, vermifugadas e vacinadas. As aves foram adquiridas de um aviário especializado^a e foram alojadas inicialmente em uma gaiola coletiva de 2,6mX1,26mX1,2m. Os animais foram mantidos em uma sala com temperatura ambiente controlada, alimentação e água *ad libitum*, com limpeza e higienização diária durante todo o experimento. As aves tiveram um período de adaptação de, no mínimo, 20 dias antes da cirurgia e passaram por exame clínico geral e ainda por avaliação bioquímica e hematológica, sendo utilizadas somente aquelas que se apresentavam saudáveis. Os animais foram transferidos 48 horas antes do procedimento cirúrgico para gaiolas menores que comportavam duas galinhas (0,75mX1,17mX0,4m), permanecendo durante o transcorrer dos 10 primeiros dias de pós-operatório (PO) quando então retornavam para a gaiola coletiva.

As galinhas foram separadas aleatoriamente em quatro grupos de oito animais, sendo o grupo controle negativo (GCN), o grupo controle positivo (GCP), o grupo com cimento ósseo de hidroxiapatita deficiente em cálcio (GHAD) e o grupo com cimento ósseo de hidroxiapatita deficiente em cálcio associado com proteína morfogenética óssea (GHAD+BMP).

Os animais foram anestesiados com metadona, nalbufina ou fentanil associado com propofol de acordo com protocolo pré-definido. Todos os animais tiveram seus acessos venosos através da veia metatársica plantar medial e indução e manutenção anestésica geral com propofol por esta via. As aves foram intubadas com sonda orotraqueal, de tamanho 3 cm sem *cuff*, para o fornecimento de oxigênio. Durante o procedimento cirúrgico os animais foram monitorados e avaliados quanto a saturação de oxigênio, concentração de CO₂, frequência cardíaca, pressão arterial e eletrocardiograma. Cerca de 30 minutos antes do procedimento cirúrgico, as aves receberam enrofloxacina (15mg/kg, IM).

Todas as aves, independentemente do grupo, foram posicionadas em decúbito lateral com a asa a ser operada para cima. A remoção das penas na face lateral e medial do antebraço ocorreu com os animais anestesiados. A extremidade distal da asa foi envolvida por atadura ortopédica de algodão. A antissepsia foi realizada com clorexidine 2%. A diáfise ulnar foi exposta através de uma incisão cutânea e da fáscia muscular, seguido do afastamento musculatura na face dorsal do antebraço. O comprimento total da ulna foi mensurado e, partindo do ponto médio foi delimitado um centímetro proximal e um centímetro distal, totalizando 2 cm a serem removidos

(Fig.1A-G). As ostectomias foram realizadas com bisturi ultrassônico (Piezosonic-driller[®]) sob irrigação constante de NaCl 0,9% estéril em temperatura ambiente (Fig.1B). No grupo GCN o defeito ósseo foi mantido vazio. No grupo GCP o próprio segmento ósseo removido foi reinserto. No grupo GHAD o defeito ósseo foi preenchido com um cilindro de cimento a base de hidroxiapatita deficiente em cálcio, com dimensões similares ao segmento ósseo removido, que apresentava um orifício no centro de aproximadamente 1,5mm, da mesma dimensão de um pino de Kirschner. O cilindro era mantido previamente submerso em solução de NaCl 0,9% por 10 minutos (Fig.1C). No grupo GHAD+BMP além do cimento foi aplicado nas frestas das interfaces cimento/osso 1µL de BMP-2 (BMP-2 Termofischer[®]), totalizando 2 µL em cada ave do grupo com BMP. Em todas as aves, independentemente do grupo, a ulna foi estabilizada com um pino de Kirschner (1,5mm) inserido no canal medular de forma retrógrada. Após, a fáscia muscular e a pele foram suturadas com mononáilon 4-0 em padrão isolado simples.

Após a cirurgia os animais foram medicados para o controle da dor e analgesia com meloxicam (0,5mg/kg/SID/IM/3 dias), cloridrato de tramadol (15mg/kg/SID/IM/3dias) e dipirona (25mg/kg/BID/IM/3 dias). Como terapia antimicrobiana foi utilizada enrofloxacina (15mg/kg/SID/VO/7 dias). Além disso, foi aplicada uma bandagem “em 8” na asa operada. Essa era trocada a cada 24 horas durante os 10 primeiros dias, dessa forma as limpezas das feridas cirúrgicas eram realizadas com solução salina 0,9% e gaze. Durante o experimento, todas intercorrências e complicações foram registradas em fichas individuais.

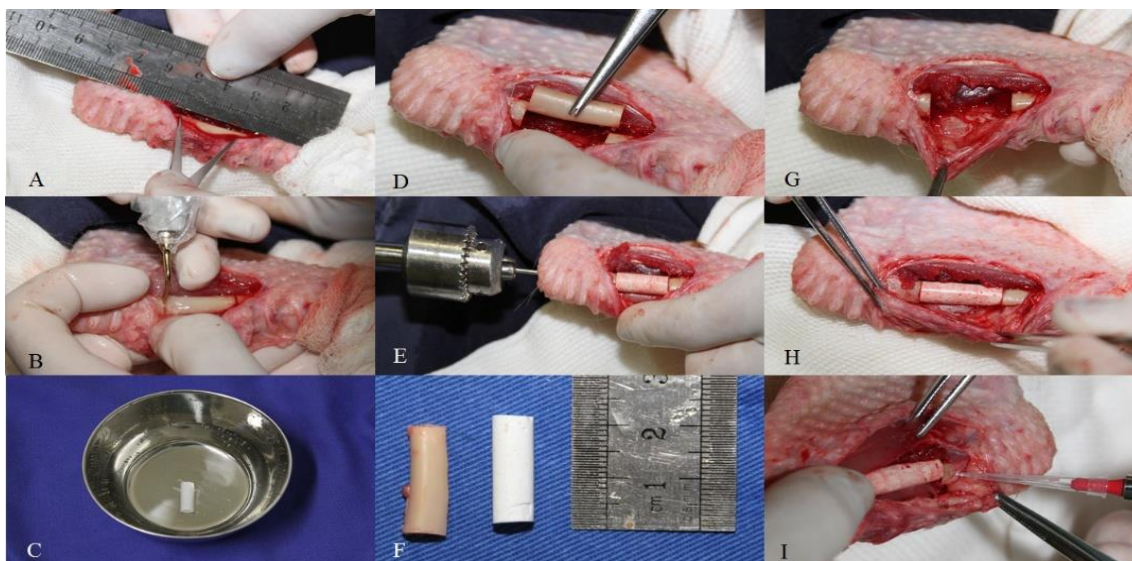


Figura 1: A) medição do comprimento do defeito crítico de 2cm na ulna. B) osteotomia com bisturi ultrassônico. C) hidratação por 10 minutos do cimento ósseo de HAD. D) osso pós osteotomia. E) colocação do pino de forma retrógrada. F) fragmento ósseo pós osteotomia e cimento de HAD. G) defeito crítico (GCN). H) cimento ósseo de hidroxiapatita deficiente em cálcio implantado. I) colocação de 1µL de BMP na interface proximal.

Imediatamente após o procedimento cirúrgico foram realizadas as radiografias do antebraço operado e a cada 15 dias até completar 60 dias de PO. Os exames radiográficos pós-cirúrgicos foram avaliados através da tabela proposta por Ehrhart et al.(2005) e adaptada para este trabalho, onde dois avaliadores em conjunto estabeleceram um escore de pontuação para esses exames (Tab. 1).

Passados 60 dias da cirurgia, os 32 animais foram submetidos a eutanásia com tiopental (50mg/kg/IV) e cloreto de potássio 10% (ao efeito) respeitando as diretrizes da prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e do CFMV. Após este procedimento, as asas de duas galinhas de cada grupo foram encaminhadas ao Setor de Patologia Veterinária da UFRGS. Cada ulna foi cuidadosamente dissecada e mantida em formol tamponado a 10% por 48h. Após este período, foi descalcificada no ácido nítrico a 8% por aproximadamente 8h. Posteriormente, as amostras foram processadas rotineiramente para histologia, coradas pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) e analisadas de maneira descritiva através da microscopia óptica.

Para a avaliação biomecânica foram avaliados seis animais dos grupos GCP, GHAD e GHAD+BMP, os quais também tiveram suas duas asas removidas, dissecadas e os pinos de Kirschner removidos. As peças foram mantidas refrigeradas e umedecidas até o momento da análise, a qual foi realizada no mesmo dia da eutanásia, no Departamento de Engenharia de Materiais da UFRGS.

Cada ulna (operada e não-operada) foi submetida ao ensaio de flexão em três pontos com os ossos apoiados em suas extremidades (40mm) e a carga mecânica aplicada no centro do cimento/implante. Foi aplicada carga no centro do cimento/implante da distância entre os apoios de contato cimento/osso proximal e distal e a taxa de aplicação de carga foi de $1\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$. As amostras foram testadas usando a máquina de ensaios Instron (modelo 3369), 2kN de capacidade (Instron®, corp, USA), na qual computava os dados fornecidos pela máquina em um software original do fabricante (BLUEHILL 2, versão 2.27) (Fig.2). Em relação às variáveis da biomecânica os parâmetros avaliados foram a deformidade até a ruptura (Standard) (mm/mm), a tensão na ruptura (MPa) e a carga de ruptura (N).



Figura 2: A) máquina de ensaios Instron modelo 3369. B) ulna contralateral posicionada no teste de três pontos. C) momento de flexão.

Os dados obtidos foram digitados no programa Excel e posteriormente exportados para o programa SPSS versão 20.0 para análise estatística. Foram descritas as variáveis quantitativas pela média, desvio padrão, mediana, o mínimo e o máximo. Na análise radiográfica foram comparados os dados entre os grupos pelo teste de Kruskal Wallis, e ainda foram comparados os dados dentro dos grupos ao longo do tempo de consolidação pelo teste de Friedman. Através do score foi realizada a comparação dos achados entre os grupos e entre os tempos de um mesmo grupo. A comparação entre as asas operadas e as não operadas no teste biomecânico, foi realizada

utilizando o teste de Wilcoxon. Para todas as análises foi considerado um nível de significância de 5% ($P < 0.05$).

Tabela 1 –Escore para avaliação radiográfica proposto por Ehrhart et al. (2005) e adaptado para avaliação do uso do cimento ósseo de hidroxiapatita deficiente em cálcio associado a BMP-2 para tratamento de defeito crítico ósseo de 2cm em ulna de galinhas.

Critérios para o escore	Pontos
INCORPORAÇÃO/UNIÃO DO CIMENTO/IMPLANTE	
Interface Proximal	
Perda do detalhe da linha de osteotomia/ostectomia.	2
Linha de osteotomia ainda visível.	1
Linha de osteotomia larga.	0
Interface Distal	
Perda do detalhe da linha de osteotomia.	2
Linha de osteotomia ainda visível.	1
Linha de osteotomia larga.	0
QUALIDADE ÓSSEA DO DEFEITO CRÍTICO	
Preenchimento ósseo completo	2
Formação de calo ósseo, sem união	1
Sem reação óssea	0
QUALIDADE ÓSSEA DO CIMENTO/IMPLANTE	
Contorno do enxerto inalterado.	2
Presença de leve reabsorção da cortical, sem deformação e/ou fratura.	1
Marcante reabsorção da cortical, deformação e/ou fratura.	0
QUALIDADE DO OSSO RECEPTOR	
Marcante formação de novo osso, com calo formando ponte óssea.	2
Formação de novo osso receptor, mas com ponte óssea pobre.	1
Sem produção de novo osso.	0
ASPECTO E FIXAÇÃO DO PINO	
Implantes metálicos com aparência normal.	2
Lise ao redor do pino.	1
Migração do pino	0
IMPRESSÃO GLOBAL DA CONSOLIDAÇÃO	
União radiográfica.	2
Evidência radiográfica de calo, mas sem união.	1
Mínima ou sem evidência radiográfica de união.	0

RESULTADOS

O protocolo anestésico foi efetivo para a realização dos procedimentos cirúrgicos e não houve nenhuma intercorrência. As medicações no PO foram eficientes para manter o bem-estar dos animais, livres de dor e com a amplitude de movimento das asas preservadas. As feridas cirúrgicas cicatrizaram de maneira adequada sem nenhuma alteração.

Observou-se que passados 10 dias de PO os animais dos grupos GHAD, GHAD+BMP e GCP apresentavam aumento de volume na região operada com rubor e calor. Aos 20 dias, o GCP não apresentava alterações, já os outros dois grupos ainda apresentavam aumento de volume, porém, de menor tamanho e sem rubor e calor na

região. Esse fato permaneceu até os 60 dias de PO. No GCN não foi observada essa alteração.

Em quatro aves (50%) do GCN foi observado migração do pino, sendo que em três casos ela ocorreu antes dos 30 dias de PO (37,5%) e uma antes dos 15 dias de PO (12,5%). Nos GHAD e GHAD +BMP houve migração do pino após 45 dias de PO em uma ave (12,5%) de cada grupo. Não houve migração do pino nas aves do GCP. Outra complicação vista no GCN foi que um animal (12,5%) apresentou aumento de volume na articulação úmero radial associada à migração do pino.

Na avaliação radiográfica foi percebido que no GCP o processo de reação periosteal enxerto/osso receptor iniciou aos 15 dias em seis animais (80%), sendo que nos outros dois animais iniciou aos 30 dias (20%). No GHAD duas aves apresentaram reação periosteal cimento/osso receptor aos 15 dias (12,5%), cinco aos 30 dias (62,5%) e uma aos 45 dias (12,5%). Uma apresentou quebra do cimento aos 15 dias (12,5%). No GHAD +BMP os oito animais apresentaram reação periosteal aos 30 dias (100%). Seis animais iniciaram com a formação de ponte óssea aos 45 dias (75%), porém, sem contato entre as extremidades. Uma ave apresentou soltura do enxerto aos 45 dias e reabsorção óssea no mesmo período (12,5%) e uma apresentou quebra do cimento aos 15 dias (12,5%). Na avaliação incorporação cimento/osso receptor, os animais do GHAD e GHAD+BMP demonstraram reação periosteal mais exacerbada na face caudal do osso, porém não apresentaram consolidação completa aos 60 dias de PO. Na avaliação da qualidade óssea do defeito crítico no GCN foi verificado que em 87,5% dos casos havia a presença de reação periosteal nas bordas proximais e distais da falha, porém, evoluindo para não-união. Referente à impressão de consolidação, os GCN, GHAD e GHAD+BMP não apresentaram consolidação total em nenhum dos tempos. Diferentemente do GCP, que apresentou 100% de consolidação aos 30 dias, com remodelamento do calo ósseo aos 60 dias. A avaliação estatística dos escores obtidos a partir da tabela adaptada de Ehrhart et al. (2005) demonstrou diferença entre os grupos para cada um dos tempos e na evolução da consolidação dentro dos grupos, conforme detalhado na tabela 2.

Tabela 2- Tabela comparativa do escore entre os grupos e entre os tempos.

Grupo		Tempo 0	Tempo 15	Tempo 30	Tempo 45	Tempo 60	P dentro grupos*
GCN	Média±dp	2,0±0,0 ^a	2,5±2,3 ^a	3,3±4,1 ^a	3,3±4,1 ^a	3,3±4,1 ^a	0,991
	Mediana (mín.-máx.)	2,0 (2,0-2,0)	2,0 (0,0-8,0)	2,0 (0,0-12,0)	2,0 (0,0-12,0)	2,0 (0,0-12,0)	
GCP	Média±dp	4±0,0 ^b	6,3±1,3 ^b	11,6±1,1 ^b	11,9±0,4 ^b	12±0,0 ^b	<0,001
	Mediana (mín.-máx.)	4,0 (4,0-4,0)	6,5 (4,0-8,0)	12,0 (9,0-12,0)	12,0 (11,0-12,0)	12,0 (12,0-12,0)	
GHAD	Média±dp	4±0,0 ^b	4,5±1,7 ^{a,b}	7,6±1,1 ^{a,b}	7,8±0,5 ^a	7,8±0,5 ^{a,b}	<0,001
	Mediana (mín.-máx.)	4,0 (4,0-4,0)	4,0 (2,0-8,0)	8,0 (5,0-8,0)	8,0 (7,0-8,0)	8,0 (7,0-8,0)	
GHAD+BMP	Média±dp	4±0,0 ^b	3,5±0,9 ^a	6,8±1,8 ^a	7,5±1,4 ^a	7,0±1,5 ^a	<0,001
	Mediana (mín.-máx.)	4,0 (4,0-4,0)	4,0 (2,0-4,0)	8,0 (4,0-8,0)	8,0 (4,0-8,0)	8,0 (4,0-8,0)	
P entre grupos**		<0,001	0,001	<0,001	<0,001	<0,001	

*valor P obtido pelo teste de Friedman; **valor P obtido pelo teste de Kruskal-Wallis. ^{a,b}letras diferentes significam grupos estatisticamente diferentes.

Na avaliação histopatológica do GCN foi observada acentuada proliferação de tecido conjuntivo fibroso multifocal, além de discreto infiltrado inflamatório composto por linfócitos e heterófilos, sem presença de osteoclastos. No GCP, foi observada acentuada proliferação de osteoblastos e de matriz óssea com trabéculas espessadas e proliferação discreta de tecido conjuntivo fibroso. No GHAD, foi possível observar proliferação de tecido conjuntivo fibroso moderado, com matriz óssea não mineralizada, além de discreta quantidade de matriz cartilaginosa e osteoclastos. Foi observado ainda áreas multifocais moderadas de necrose, além de áreas multifocais císticas preenchidas por discreta quantidade de material amorfo basofílico. Já no GHAD+BMP, foi observada acentuada proliferação de matriz óssea organizada, com presença de células de linhagem hematopoiética ao centro, com moderada quantidade de osteoclastos, múltiplas áreas de formação de matriz cartilaginosa, além de acentuada proliferação de tecido conjuntivo fibroso. Ainda, múltiplas áreas císticas contendo material fracamente eosinofílico a basofílico amorfo, por vezes contendo cristais, com infiltrado inflamatório moderado ao redor dessas estruturas, constituído por macrófagos, linfócitos e ocasionais heterófilos (Fig.3). Na avaliação dos ossos contralaterais, nenhuma amostra apresentou alteração, afirmando tratar-se de ossos saudáveis. As amostras tiveram o corte de forma longitudinal para análise.

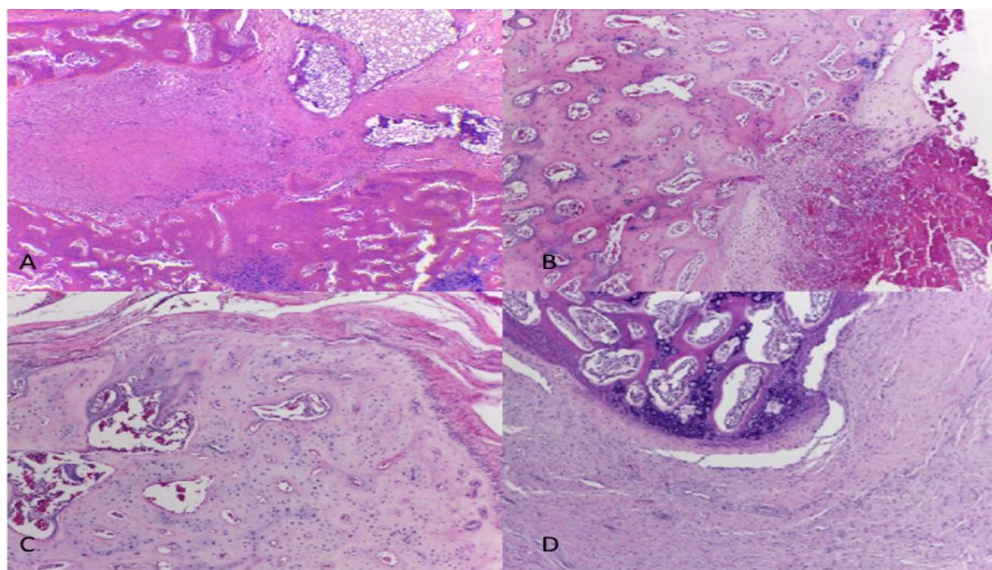


Figura 3: Histopatológico dos grupos estudados: A) GHAD+BMP, acentuada proliferação de matriz óssea organizada, múltiplas áreas de formação de matriz cartilaginosa, além de acentuada proliferação de tecido conjuntivo fibroso e presença de osteoclastos. B) GHAD, proliferação de tecido conjuntivo moderado, com matriz óssea não mineralizada, presença de osteoclastos e tecido cartilaginoso moderado. C) GCP, acentuada proliferação de osteoblastos e de matriz óssea. D) GCN, proliferação de tecido conjuntivo fibroso multifocal, além de discreto infiltrado inflamatório composto por linfócitos e ocasionais heterófilos.

Na análise biomecânica foi possível observar que na variável deformação até a ruptura (mm/mm) houve diferença significativa no GCP entre o lado operado e não-operado, e nos demais grupos não houve diferença estatística. Ao ser comparado a tensão na ruptura (MPa) houve diferença estatística significativa entre o lado operado e o contralateral para o GCP. Quando comparados os grupos, houve diferença estatisticamente significativa entre o GCP e o GHAD+BMP, porém, não houve em relação aos contralaterais. Na avaliação referente à carga de ruptura (N) foi observada diferença estatística entre o lado operado e o contralateral dentro dos GHAD e GHAD+BMP. Quando comparados os grupos, houve diferença estatística no lado operado entre o GHAD+BMP e o GCP. Não houve diferença entre os grupos no lado contralateral.

DISCUSSÃO

Neste estudo, a utilização de galinhas domésticas como modelo experimental foi satisfatória por apresentar vantagens de maior facilidade de manipulação e manejo. Apesar de os ossos das aves serem comumente descritos como frágeis e quebradiços com um grande canal medular (BENNETT, KUZMA, 1992) não houve fraturas durante o desenvolvimento do modelo e no período pós-operatório. Estudos demonstrando o uso de cimento ósseo para o tratamento de defeito crítico em aves são escassos (TUNIO et al., 2015) e na espécie utilizada não foi encontrado nenhum relato utilizando cimento ósseo de hidroxiapatita deficiente em cálcio a base de α -TCP como tratamento, assim, demonstrando a importância e relevância desta pesquisa.

O fato de tanto o grupo com autoenxerto quanto com os com cimento apresentarem aumento de volume passados os 10 dias de PO, também foi relatado em um estudo comparando o uso de α -TCP em grânulos associado a sinvastatina (um fármaco controlador do colesterol, que de forma tópica estimula a liberação de BMP-2 pelos osteoblastos) no qual também houve aumento de volume na área da enxertia, com ocorrência de ulcerações em alguns animais (NYAN et al., 2009). Este fato pode ser justificado pela reação inflamatória do organismo perante um corpo estranho e reações químicas e físicas entre os componentes dos cimentos/implantes/BMP/osso receptor com o corpo. A inexistência dessa reação no GCN, corrobora esta hipótese, dado ao fato de não haver fonte de reação tecidual (autoenxerto ou cimento).

O tratamento de fraturas em aves com o uso de apenas um pino intramedular muitas vezes é falho, pois como os ossos possuem a cavidade medular larga, normalmente os pinos não conseguem preenche-lo adequadamente e, desse modo, não ficam ancorados, resultando em dificuldade para evitar as forças de rotação (ALIEVI et al., 2008 *apud* LEVITT, 1989). Assim, o GCN apresentou maior ocorrência de migração de pino por haver um *gap* e a fixação com um pino intramedular acabou tornando-se instável pelo não preenchimento ósseo, apesar de o rádio conferir alguma resistência a rotação. A própria movimentação da asa também favorece a ocorrência deste tipo de falha. Nos grupos com cimento, somente um animal de cada grupo apresentou falha no implante, diferentemente do GCP que não apresentou nenhuma. O fato dos animais dos grupos com cimento não apresentarem tantas falhas no implante provavelmente deve-se ao fato do orifício confeccionado no cimento ser de 1,5mm,

conforme o diâmetro do fio de Kirschner, permitindo assim, maior área de contato pino/cimento, oferecendo maior estabilidade e rigidez a ele.

A falha óssea (2 cm) realizada no GCN demonstrou ser válida como defeito crítico, pois de 8 animais, somente um (12,5%) apresentou reação e formação de ponte óssea. Um defeito adequado para avaliar materiais de enxertia, como cimentos ósseos ou implantes, deve ser crítico e os modelos de animais devem ser adultos devido à alta capacidade dos animais jovens para a consolidação óssea (ANDERSON et al., 1999).

Em medicina veterinária, apesar da diversidade de espécies tratadas, o defeito crítico em aves ainda não é bem elucidado, tendo mais materiais e estudos realizados em pombos como modelos experimentais. Tunio et al.(2015b) realizaram um estudo avaliando o defeito de 1 cm em ulna de pombas, com o objetivo de verificar o poder de osteocondução e osteoindução da hidroxiapatita associada à matriz óssea desmineralizada (DBM), demonstrando que ocorreu reação osso/enxerto e que todas as aves apresentaram cicatrização óssea, concluindo que enxertos com hidroxiapatita isolado ou associado com DBM, com fixação esquelética externa, são adequados para o tratamento de defeito em pombos. Esse estudo de Tunio et al. (2015b) teve como referência para a definição do tamanho de 1 cm de defeito o experimento de Sanaei et al. (2015) que compararam o uso de enxerto autógeno e DBM na mesma espécie. Porém, os trabalhos referidos não relataram o uso de grupos de controle para o defeito realizado, assim não sendo possível a confirmação de tratar-se de um defeito crítico e sim uma falha óssea.

Em medicina veterinária temos alguns estudos correlacionam o tamanho do diâmetro ósseo com o defeito crítico em algumas espécies, sendo de duas vezes o seu diâmetro em defeito crítico na diáfise do rádio de coelhos (AN & FRIEDMAN, 1999), e de duas vezes e meio na diáfise tibial de ovelha (CHRISTOU et al., 2014) e na diáfise femoral de cães (LINDSEY et al., 2006).O defeito ósseo produzido no presente trabalho foi de aproximadamente 2,5 vezes o diâmetro ósseo e, apesar de não terem sido encontrados trabalhos descrevendo modelos críticos em galinhas, foi adequado visto que houve não-união em 87,5% dos animais, demonstrado que realmente se trata de um defeito crítico e que, portanto, não consolidaria naturalmente.

As técnicas descritas para enxertia autógena em aves apresentam as mesmas complicações que as descritas em mamíferos, apesar de todos os benefícios que esse tipo de enxertia resulta. Além disso, em aves é mais difícil de encontrar um sítio de

coleta de osso cortical em grandes volumes sem prejuízo ao animal ou de obtenção de osso esponjoso, pois as aves apresentam ossos pneumáticos, com poucas áreas de coletas (SANAIEI et al., 2015).

As fraturas cominutivas em aves são mais comuns na clínica veterinária (LEOTTE et al., 2004) e, desta forma, o uso de cimento ósseo aparenta ser um método eficaz de tratamento para esses tipos de fraturas, visando maior rapidez e retorno da função da ave. Em mamíferos, existe uma variedade de substitutos ósseos e técnicas para recuperação óssea, assim evitando a necessidade da utilização de autoenxertos. Porém, diferentemente dos mamíferos, em aves, ainda não existem variedades de substitutos ósseos testados (SANAIEI et al., 2015), portanto, sendo um campo a ser explorado.

A avaliação das imagens radiográficas utilizando a tabela adaptada de Ehrhart et al. (2005) demonstrou ser eficiente para os grupos em que havia o cimento ósseo e o autoenxerto, porém, no grupo controle negativo aparentou não ser adequada, pois houve disparidade nos resultados. Desta forma, sendo necessária a criação de um critério substituindo a qualidade óssea enxerto/implante por qualidade óssea do defeito crítico. Assim, com a introdução de uma avaliação da reação que o osso ostectomizado sofreu, para observar crescimento ósseo onde foi realizada a falha como defeito crítico.

Ainda nessa avaliação foi possível ver que em 100% dos animais do GCP apresentaram consolidação óssea até os 30 dias e que aos 60 dias era possível observar a remodelação óssea. Esse resultado era esperado por tratar-se de um fragmento ósseo retirado e recolocado no seu sitio de origem, não causando nenhum tipo de reação inflamatória além do esperado em um processo de consolidação normal. Esse grupo foi elaborado com o intuito de demonstrar que as aves, por conta do seu metabolismo acelerado, apresentam um processo de consolidação rápida, quando comparado aos mamíferos. Porém, os preceitos de sucesso em um tratamento ortopédico são os mesmos em ambos, com estabilidade absoluta, apresentação de calo ósseo mínimo, alinhamento e suprimento sanguíneo (FERRAZ et al., 2008).

Os grupos com cimento ósseo, GHAD e GHAD+BMP, apresentaram diferença estatística entre os tempos da análise radiográfica. O GHAD apresentou entre os tempos 0 e 30 ($P=0,012$), 0 e 45 ($P=0,012$) e 0 e 60 ($P=0,012$), demonstrando que durante os 60 dias o cimento ósseo de hidroxiapatita deficiente em cálcio apresentou uma evolução na consolidação favorável, realizando sua função de osteocondução. Já o GHAD+BMP,

apresentou diferença estatística significativa, porém, iniciando somente no tempo de 45 dias PO, 0 e 45 ($P=0,044$) e 15 e 45 ($P=0,016$). Assim, levando a crer que por conta da ação das BMPs o processo de consolidação foi mais retardado, porém sua evolução radiográfica foi satisfatória por apresentar a formação de ponte óssea durante o período de 60 dias. Apesar de se observar um pior desempenho na avaliação radiográfica comparando com os demais grupos, na análise histopatológica, o grupo com BMPs demonstrou-se mais ativo e reativo na produção de células osteogênicas na avaliação histopatológica.

Existem poucos relatos tratando do uso de BMP-2 em aves, sendo que a espécie mais estudada com esse tipo de enxertia são os pombos. Sample et al. (2008) relataram seu uso associado com uma pasta de fosfato de cálcio para o tratamento de uma fratura cominutiva proximal no úmero de um Grou-americanos (*Grus americana*), com fixação esquelética externa (Tie-in) com sucesso e recuperação da função na asa. Um estudo realizado em tíbias de cães, que usou BMP para o tratamento com uso de enxertia, notou melhores resultados na imagem radiográfica nos casos com BMP aos 45 dias, alegando que tal fato se dava por conta que essa proteína em contato com as células indiferenciadas presentes na medula óssea são capazes de induzir e se diferenciarem em células ósseas no local de enxertia, colaborando com o processo de deposição de novo tecido ósseo (CARLO et al., 2007), e que essas proteínas são responsáveis pelo recrutamento de células osteoprogenitoras para os locais de formação óssea (CARLOS et al., 2007 *apud* SOMMERMAN et al., 1983), atuando na quimiotaxia destas células para o local da implantação (CARLOS et al., 2007 *apud* LIND, 1996).

Na análise histopatológica dos contralaterais, as amostras demonstraram os resultados esperados, sendo livres de qualquer alteração óssea, confirmando que se tratavam de aves saudáveis. Os animais do GCN apresentaram aspectos histopatológicos de não união, com acentuada proliferação de tecido conjuntivo fibroso multifocal, assim confirmando trata-se de um defeito crítico válido para a espécie. No GCP, a presença de osteoblastos e matriz óssea com trabéculas espessadas confirma a consolidação e interação do autoenxerto/osso receptor, também confirmando que se tratavam de galinhas saudáveis e que estavam aptas para servirem de modelo para o uso do cimento ósseo.

Nos grupos em que foi utilizado o cimento ósseo de hidroxiapatita deficiente em cálcio foi possível identificar a presença do biomaterial juntamente com a reação do

osso receptor, além da presença de osteoclastos e proliferação de matriz óssea associada com áreas de necrose perto do material amorfo do cimento. Assim, demonstrando que o corpo se apresentou ativo referente à resposta imunológica ao mesmo tempo que o cimento ósseo realizou sua função de osteocondução. Dennis e colaboradores (1992) e Yamada e colaboradores (1997) sugeriram que existem evidências em vários estudos que os osteoclastos são responsáveis pelo processo de reabsorção das cerâmicas de fosfato de cálcio.

Para a avaliação biomecânica foi utilizado como base estudo de Tunio et al. (2015a), os quais avaliaram o tratamento de fraturas transversas em ulna de pombos com fixador esquelético externo e compararam o lado fraturado consolidado com contralateral saudável, verificando o quanto de carga e deformidade as ulnas resistiriam em ensaio biomecânico de três pontos. No trabalho de Tunio et al. (2015a) as ulnas apresentavam aumento de volume na área da fratura, assim como no presente experimento. Em ambos as aves não apresentavam restrições de movimento nos membros operados. Ainda, as ulnas operadas no trabalho citado, apresentavam-se consolidadas antes do ensaio biomecânico, demonstrando que o tratamento com fixador esquelético externo foi eficaz. Já no trabalho aqui relatado, as ulnas, tanto com cimento ósseo, quanto com o cimento e o BMP apresentaram estar em processo de consolidação na análise histopatológica, porém ainda não aparentando consolidação radiográfica completa.

Em ortopedia veterinária é bem elucidado que para uma boa consolidação em fraturas de alto “strain” necessitamos de rigidez e contato dentre os fragmentos para a formação de um calo ósseo primário, como na referente pesquisa tratou-se de um cimento ósseo a técnica mais adequada para a fixação aparentemente seria o uso de placa de compressão dinâmica de baixo contato (LC-DCP), assim aumentando a área de contato osso receptor/cimento ósseo e a rigidez do foco de fratura. À medida que as extremidades da fratura são comprimidas uma contra a outra, a área de contato dos fragmentos aumenta e as forças passam a ser compartilhadas pelo osso e pela placa levando à estabilidade (STIFFLER, 2004). Conforme Witsberger et al.(2010), os objetivos da fixação de fraturas com placas e parafusos incluem fixação estável, restauração do alinhamento do membro e retorno ao uso funcional de forma mais precoce possível. Porém, um dos limitadores para a utilização de tal técnica neste projeto foi o custo deste tipo de implante metálico. Sendo assim, houve a necessidade

da utilização de uma técnica com menor encargo financeiro (pino intramedular). Mesmo assim, houve a consolidação no grupo controle positivo, demonstrando que a técnica foi adequada e promoveu estabilidade suficiente para tal.

Referente aos resultados da biomecânica foi observado que o GHAD+BMP apresentou-se mais elástico que os demais grupos, apresentando uma mediana de deformação de $0,46 \pm 0,10$ mm/mm, enquanto o GHAD apresentou a mediana de $0,20 \pm 0,14$ mm/mm e o GCP $0,15 \pm 0,12$ mm/mm. Assim o GCP demonstrou ser mais rígido que os demais grupos e o GHAD+BMP o mais flexível. O osso cortical apresenta maior rigidez que o osso esponjoso, suportando maior carga, mas com deformação menor antes da fratura. O osso esponjoso, devido à sua estrutura porosa, suporta uma deformação maior antes de sofrer a fratura (KUPCZIK, 2008). Desta forma, as reações do cimento /osso receptor apresentaram características biomecânicas semelhantes ao osso esponjoso na deformação. Ainda se tratando da maior deformação por parte do GHAD+BMP, acredita-se ser um resultado esperado visto que a BMP-2 fazem parte do grupo de proteínas da superfamília do fator transformador de crescimento beta (TGF β) que tem como objetivo a proliferação de células ósseas e auxiliar na consolidação. Porém, essas proteínas além de realizarem a diferenciação de células mesenquimais osteogênicas e a regulação dos osteoclastos, podem ainda resultar na proliferação de células cartilaginosas e fibroblastos, dando maior elasticidade aos tecidos formados na interação cimento ósseo/osso receptor em que foi aplicado a BMP-2. Vale lembrar que a formação óssea ocorre via direta (intramembranosa periosteal) e indireta (endocondral). Em ambos os mecanismos ocorre uma indução de osso e cartilagem através da interação epitélio-mesenquimal que inicia a diferenciação celular específica e leva à formação de células precursoras da linhagem osteoblástica ou condroblástica. As evidências suportam a hipótese de que as BMPs atuam sobre as células progenitoras esqueléticas e induzem a diferenciação de osteoblastos e condroblastos. O tratamento com BMP-2 geralmente direciona a formação de células osteogênicas, porém também pode levar a formação condroblásticas (SYKARAS; OPPERMAN, 2003), desta forma gerando mais tecido conjuntivo cartilaginoso associado ao ósseo como foi visualizado no histopatológico das aves do GHAD+BMP e dando sustento ao fato de suportarem maior deformação em milímetros quando comparados com os outros grupos.

Neste estudo houve diferença significativa quando comparados os lados operado com seu contralateral no caso do GCP, diferente do relatado no trabalho de Tunio et

al.(2015a), que não identificou diferença significativa das ulnas fraturadas comparadas com as contralaterais saudáveis. Uma das justificativas para tal diferença talvez seja por conta do método de fixação ser diferente entre os trabalhos e devido ao fato de que no trabalho aqui relatado foi realizado a ostectomia e aplicação de um implante de 2 cm, assim levando a maior ativação e recrutamento por parte dos osteoblastos quando se comparando a uma fratura simples transversa como a relatada por Tunio et al. (2015a), logo o GCP sendo mais resistente a deformação que o osso saudável.

A diferença relacionada ao módulo de ruptura em flexão (MPa), entre o grupo que foi usado o implante (GCP) e seus contralaterais, ajuda a afirmar o fato que, quando comparado ao trabalho de Tunio et al. (2015a), o GCP ($42,38 \pm 12,91$) é mais resistente que seu contralateral ($19,26 \pm 16,27$) por conta de apresentar a formação de dois calos ósseos, tornando o osso mais resistente a deformação plástica que o osso com uma fratura transversa consolidada em pombas relado por esses autores. Quando comparados os grupos, não houve diferença estatística no lado contralateral, e houve diferença estatística significativa entre o GCP e o GHAD+BMP. Essa diferença provavelmente deve-se ao mesmo fato recentemente citado, demonstrando que para ocorrer a deformação plástica o GCP necessita maior tensão que os demais grupos.

Na avaliação referente o quanto de carga em Newtons (N) as ulnas eram capazes de suportar até sua deformação plástica, havendo diferença significativa entre as ulnas nos grupos GHAD e GHAD+BMP e seus contralaterais, e quando comparado entre os grupos, o GCP e o GHAD+BMP apresentaram diferença significativa. Não houve diferença significativa entre os grupos contralaterais. O fato de que as ulnas com implante terem apresentado melhor resposta cicatricial justifica o fato de serem mais resistentes tanto quanto a tensão em MPa, quanto em receber mais carga em N. E o fato de os ossos que receberam o cimento ósseo puramente ou o cimento ósseo associado a BMP serem menos resistentes a carga, quando comparados com as ulnas contralaterais, também é plausível pelo mesmo fato que o GCP conseguiu receber mais carga, pois nos grupos com cimento ósseo, apesar de histologicamente apresentarem reação periosteal e neoformação óssea, sua consolidação não foi completa aos 60 dias, necessitando mais tempo de avaliação para que o processo de reparo ósseo pudesse ser completo.

CONCLUSÃO

O presente trabalho confirmou que não há diferença na avaliação radiográfica entre os grupos em que foi usado o cimento ósseo de hidroxiapatita deficiente em cálcio, e que na avaliação histopatológica ambos demonstram ser eficientes para o tratamento de defeito diafisário de 2 cm na ulna de galinhas. Na avaliação biomecânica as amostras com o cimento ósseo apresentam relativa resistência, demonstrando haver sinais da formação de um processo cicatricial ósseo positivo. O cimento ósseo de hidroxiapatita deficiente em cálcio associado ou não a BMP demonstra ser compatível para espécie e que apresenta eficaz ação osteoindutora, porém o período de 60 dias de avaliação parece ser insuficiente para o acompanhamento completo do processo de reparo ósseo.

FONTES DE AQUISIÇÃO

^a– Produtor rural Charles Clair Pontalti, Estrada RS 122, S/N - Km 56, CEP 95180-000, Farroupilha - RS.

REFERÊNCIAS

- ALIEVI, M.M.. *et al.* Osteossíntese de úmero em pombos domésticos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.60, n.4, p.843-850, 2008.
- AN, Y.H.; FRIEDMAN, R.J. Animal Models of Bone Defect Repair. In: Animal in orthopedic research. Florida: CRC Press, cap.13, p.241-254. 1999.
- AUGUSTO, C. et al. Utilização de matriz óssea desmineralizada para reparo de falhas ósseas. **Revista de Odontologia da Unesp**, v. 41, n. 3, p. 209–214, 2012.
- BENNET, R.A., KUZMA, A.B. Fracture management in birds. **Journal Zoo Wildlife Medicine**. v.23, n.1, p.5-38, 1992.
- BOHNER, M. Physical and chemical aspects of calcium phosphates used in spinal surgery. **European Spine Journal**, v. 10, n. SUPPL. 2, p. 114–121, 2001.
- CARLO, R. J. DEL et al. Integração de aloenxertos ósseos corticais associados ou não a células-tronco da medula óssea, proteína óssea morfogenética (BMP) e autoenxerto esponjoso em cães. **Veterinária e Zootecnia**, v. 14, n. 0102–5716, p. 204–215, 2007.
- CARRODEGUAS, R. G. et al. Cimentos de Fosfato de Cálcio. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 2, p. 30–32, 1999.
- CARRODEGUAS, R. G.; DE AZA, S. Alfa Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 10, p. 3536–3546, 2011.
- CHRISTOU, C. et al. Ovine model for critical-size tibial segmental defects.

Comparative Medicine, v. 64, n. 5, p. 377–385, 2014.

DENNIS, J.E. HAYNESWORTH, S.E.; YOUNG, R.G.; CAPLAN; A.I. Osteogenesis in marrow-derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted subcutaneously: effect of fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenic expression. **CellTransplant**, n1, p.23-32, 1992.

FERRAZ, V. C. M. et al. Avaliação radiográfica e de função de vôo após fixação de osteotomias distais do úmero em pombas (*Columba livia*), com modelo de fixador externo articulado. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 8, p. 351–357, 2008.

KUPCIK F. (2008). Influência da Ciprofloxacina na Resistência do Calo Ósseo de Fraturas Padronizadas de Fêmures de Ratos. Pontifícia Universidade Católica Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Curitiba, pag.11

LEOTTE, A. M. et al. Fixação esquelética externa tipo Ia (unilateral-uniplanar) para osteossíntese diafisária de úmero em pombos domésticos (*Columba livia*). **Ciência Rural**, v. 34, n. 0103–8478, p. 1865–1870, 2004.

LINDSEY, R.W. *et al.* The Efficacy of cylindrical titanium mesh cage for the reconstruction of a critical size canine segmental femoral diaphyseal defect. **Journal of Orthopedic Research**, v.24, n 7, p. 1438-53, 2006

NYAN, M. et al. Effects of the combination with α -tricalcium phosphate and simvastatin on bone regeneration. **Clinical Oral Implants Research**, v. 20, n. 3, p. 280–287, 2009.

SANAEI, R. et al. Evaluation of Osteogenic Potentials of Avian Demineralized Bone Matrix in the Healing of Osseous Defects in Pigeons. **Veterinary Surgery**, v. 44, n. 5, p. 603–612, 2015.

SYKARAS, N.; OPPERMAN, L. A. Bone morphogenetic proteins (BMPs): how do they function and what can they offer the clinician? **Journal of oral science**, v. 45, n. 2, p. 57–73, 2003.

8 DISCUSSÃO

O modelo experimental com galinhas foi satisfatório, pois além de animais de fácil manuseio, não foi encontrado no meio científico estudos preconizando o uso de cimento ósseo de hidroxapatita deficiente em cálcio com alto teor de dureza associado a BMP na espécie. O tempo cirúrgico para o GHAD+BMP foi mais prolongado que os demais grupos por conta de haver a necessidade do uso de micropipetas para a colocação de 1 μ L em cada interface cimento/osso receptor, porém nada que prejudicasse o andamento e o tempo anestésico. Em contrapartida, o tempo cirúrgico para o GCN foi mais rápido pelo fato de não haver a necessidade da utilização do enxerto, cimento ou do cimento mais o BMP-2.

O protocolo analgésico e os cuidados pós-operatório foram adequados, pois os animais não apresentavam dores e mantiveram a amplitude de movimento das asas, fato também observado por Tunio et al. (2015a) em uma pesquisa avaliando o uso de fixadores esqueléticos externos em pombos domésticos para o tratamento em fraturas transversas diafisárias.

Um dos complicadores no uso da BMP-2 para esse estudo foi o fato de apresentar um custo elevado para a realidade clínica, sendo assim necessário estruturar as doses para cada interface osso receptor/cimento ósseo de forma que não houvessem erros e desperdícios do material. Outro complicador do uso foi o fato de haver a necessidade da aplicação de carreadores na proteína, sendo necessário seu prévio preparo em um laboratório especializado, o que prejudica seu uso na rotina clínica. Em contrapartida, os fragmentos previamente elaborados pelo Laboratório de Engenharia de Materiais da UFRGS foram facilmente esterilizados em autoclave, de fácil manuseio e sua implantação na falha com pino intramedular foi rápida. Porém, ainda há necessidade de estudos com seu uso em diferentes métodos de fixação.

Referente à imobilização temporária com bandagem em “oito”, foi verificado que os períodos de 10 dias de PO demonstraram-se insuficientes para o GCN, pois de oito animais, quatro (50%) apresentaram migração do pino intramedular. O mesmo foi verificado em um animal de cada grupo que utilizou cimento e nenhum no GCP. Devido ao fato de tratar-se de um defeito crítico, uma fixação mais rígida seria o ideal para que não ocorresse a migração do implante e manter por mais tempo a bandagem em “oito”. Em um estudo realizado em pombos domésticos avaliando o uso de miniplacas em fraturas de rádio e ulna associado ao tratamento de bandagem em “oito” concluiu que o

uso do curativo pós-operatório por até 10 dias pode ser vantajoso e parece reduzir o risco de infecção pós-operatória da ferida e auxilia na consolidação (BENNERT et al., 2016). Diferentemente do trabalho aqui realizado, visto que nesse grupo que apresentou mais falhas do implante por tratar-se do grupo controle para avaliação da falha de 2cm, logo houve mais instabilidade no foco e movimentação por manter a bandagem por apenas 10 dias. Assim, mais estudos são necessários avaliando o defeito crítico em galinhas utilizando placas e parafusos como método de fixação e as vantagens do uso de bandagem em oito por um período mais prolongado que 10 dias sem trazer prejuízos para a movimentação da asa.

Kojic et al.(2009) avaliaram a irritabilidade cutânea do α -TCP tanto sólido, quanto em pasta, na pele de coelhos, e concluíram que esse biomaterial não é irritante ou citotóxico nesses animais, visto que não houve reação como eritema, edema ou necrose. Em outro estudo, realizado em ratos, foi testado o uso de α -TCP associado a BMP-2 (liberado por via tópica com o uso de sinvastatina) e esse apresentou toxicidade em doses altas. Tal característica deve-se ao fato de que foram testadas diferentes doses do fármaco de sinvastatina. Nos grupos em que foram usadas doses de 0,25 a 0,5mg de sinvastatina notou-se rubor, edema e ulcerações, as quais foram tratadas com cicatrização por segunda intenção, sendo confirmada a dose com o poder de osteogênese de 0,1mg do fármaco e de 14mg de α -TCP (dose do biomaterial que foi usada para todos os grupos) (NYAN et al., 2009). Já no presente estudo, tanto nos animais em que foram utilizados os cimentos com ou sem BMP, quanto nos em que foi usado o implante autógeno, evidenciou-se rubor e calor na região da implantação até o décimo dia de PO, porém sem ulcerações. Esta reação pode ser atribuída a resposta inflamatória induzida pelo próprio ato operatório e pela resposta aos materiais aplicados. O aumento de volume observado ao longo dos 60 dias nos grupos onde foi utilizado o cimento ósseo pode ser justificado pela maior resposta tecidual (NYAN et al., 2009).

Na avaliação radiográfica dos grupos com cimento ósseo e com cimento associado a BMP-2, foi possível observar que não houve consolidação radiográfica; porém com a análise biomecânica e histopatológica do material foi confirmada a existência de reação periosteal e osteointegração do cimento com o osso receptor. Dessa forma, um acompanhamento da osteointegração cimento/osso receptor em um período mais prolongado que 60 dias se torna necessário para a confirmação radiográfica de

consolidação, pois nesses grupos verificou-se que o cimento ósseo teve uma parte reabsorvida e que ocorreu a formação de ponte óssea, porém não tendo suas interfaces conectadas e consolidadas. No grupo em que foi associado BMP-2, a proliferação celular e presença de osteoclastos foi mais exacerbada que nos demais grupos, demonstrando haver interferência das células pluripotentes inseridas nas interfaces, porém o período da análise demonstrou-se curto para confirmação de total osteointegração, osteoindução e consolidação pela avaliação radiográfica, conforme figura 2 (Fig.2).

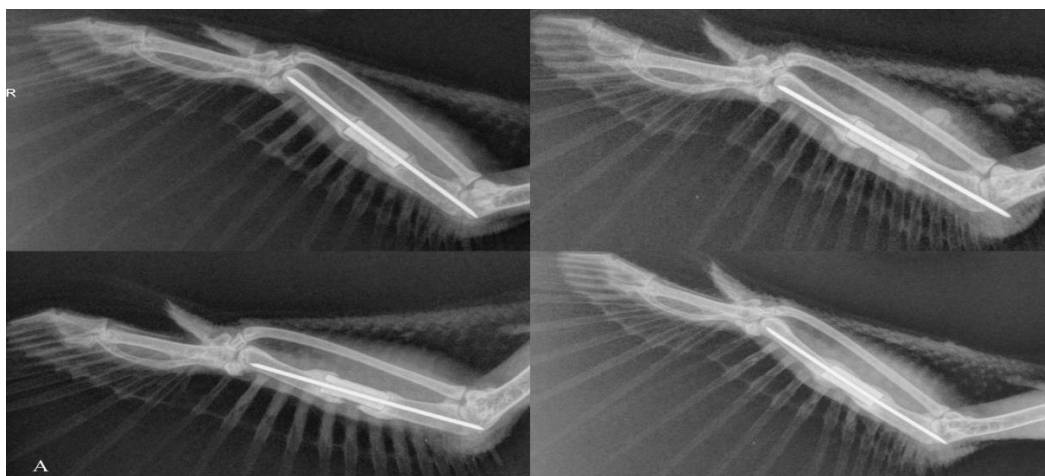


Figura 2: Imagem radiográfica médio-lateral de 60 dias de quatro animais que foram utilizados o cimento ósseo de hidroxiapatita deficiente em cálcio associado a BMP-2.

Os resultados nas imagens radiográficas para o grupo GCN foram dentro do esperado, demonstrando não-união radiográfica, migração dos pinos e aparente reabsorção dos bordos, conforme figura 3. Dessa forma, a falha de 2 cm na ulna de galinhas demonstrou-se um defeito crítico válido, visto que não houve consolidação. Geralmente o tamanho de um defeito crítico deve ser duas vezes maior que a largura de osso na área do defeito (SANAEI et al., 2015).

Os animais do GCP apresentaram consolidação aos 30 dias, dado similar ao relatado por Alievi et al. (2001) em fraturas de tibiotarso de pombos tratadas com fixação esquelética externa de forma fechada. Em outro estudo experimental em que foram testados dois tipos de fixação esquelética externa (tipo I e tipo II) para fraturas tibiotársicas de galinhas a consolidação ocorreu em média aos 40 dias para o grupo I e 35 dias para o grupo II, não havendo diferença significativa entre os dois grupos (CONTI, 2005). Já para Gouvêa et al. (2010) a consolidação ocorreu em média de 26 e

30 dias utilizando diferentes configurações de microplacas de titânio em fraturas de tibiotarso em pombos, sem influência do tipo de microplacas.

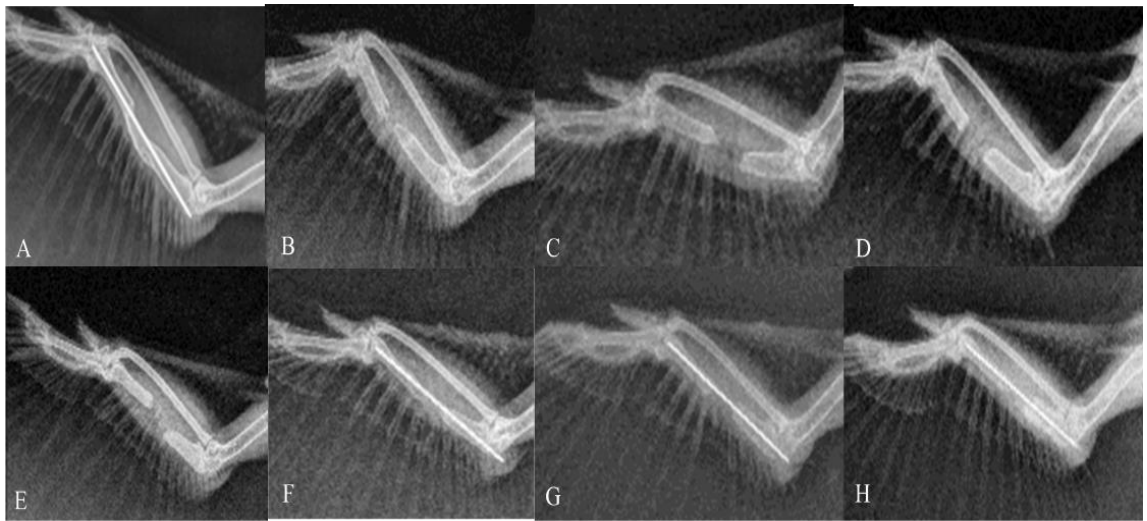


Figura3: Imagem radiográfica médio-lateral do defeito ósseo de cada animal do GCN aos 60 dias A) GCN1. B)GCN2.C) GCN3.D)GCN4. E) GCN5. F) GCN6. G) GCN7. H) GCN8.

Um dos problemas observados nessa pesquisa foi que dois animais apresentaram falha e colapso do cimento ósseo, tanto no grupo com cimento, quanto no grupo com o cimento associado a BMP. Outro complicador por parte do uso da BMP foi que dois animais apresentaram imagem radiográfica compatível com não-união e reabsorção óssea aos 60 dias, porém não sendo possível confirmar ser rejeição por conta da ação da proteína ou se por falha do método de fixação por conta da migração e oscilação do pino. Nos dois casos em que ocorreram colapso com quebra do cimento ósseo, tanto na galinha do grupo com BMP, quando no grupo sem, apresentaram indícios radiográficos de proliferação óssea, seguindo para consolidação, porém sendo necessário um acompanhamento por mais tempo.

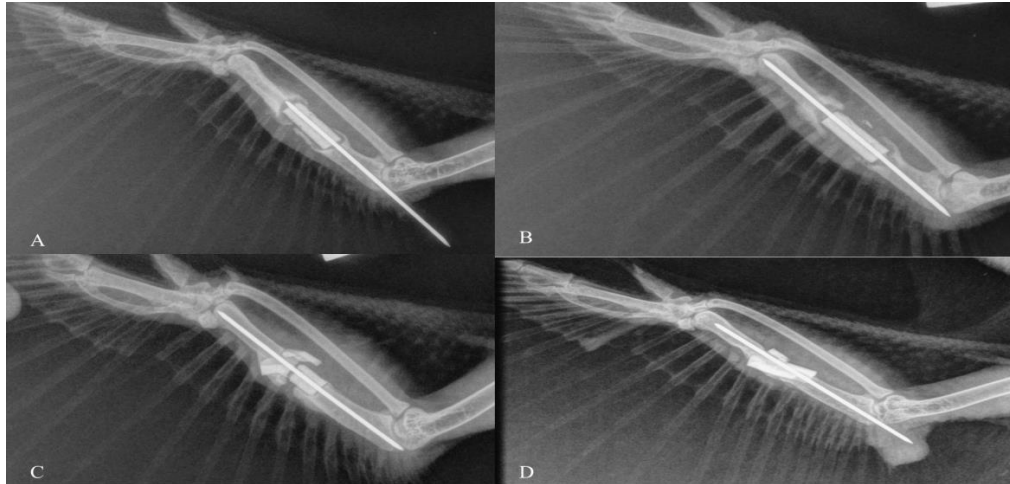


Figura 4: A) Galinha do GHAD+BMP, apresentando falha do implante aos 60 dias B) Galinha do GHAD+BMP aos 60 dias, apresentando imagem radiográfica compatível com reabsorção e não integração cimento/osso receptor C) Animal do GHAD+BMP em que ocorreu falha no cimento ósseo, porém apresentando reação e crescimento ósseo no local da falha D) falha no cimento ósseo em galinha do GHAD, porém apresentando aparente reação endosteal do osso receptor com o cimento.

A avaliação histopatológica foi dentro do esperado para todos os grupos, pois no GCN foram encontrados sinais compatíveis de não-união, como a presença de infiltrado inflamatório, tecido conjuntivo fibroso e ausência de células osteogênicas. Assim como em um estudo referente a defeito crítico em mandíbula de caninos, feito por *Huh et al.* (2005), em que nos grupos em que se retirou mais de 15mm de osso das mandíbulas apresentaram características histopatológicas similares ao GCN. Já para *Nyan et al.* (2009), em um estudo testando a mesma base de cimento ósseo que deste trabalho, associado também a BMP, em ratos, apresentaram em seu grupo controle características semelhantes ao do GCN, que foi a presença de tecido conjuntivo fibroso, porém, como não estava avaliando defeito crítico, nesse caso foi possível observar a presença de uma fina camada de novo osso em formação se direcionando para o centro da lesão na 8ª semana do teste.

Nos grupos GHAD e GHAD+BMP a análise histopatológica foi satisfatória, porém demonstrou a necessidade de uma análise mais prolongada para avaliar se haveria ou não reabsorção cimento/osso receptor; apesar de todas as características da proliferação tecidual de ambos os grupos levarem a crer que tal evolução ocorreria caso

os animais fossem avaliados por um período mais prolongado, como por exemplo 120 dias. A bioatividade e a osteocondutividade dos grânulos de cimento α -TCP podem favorecer a regeneração óssea. Sabe-se que a degradação parcial de cimentos de fosfato de cálcio causa liberação de íons de cálcio e fosfato no microambiente ósseo, que em longo prazo promovem a mineralização e aumentam a neoformação óssea (LEGEROS, 2008). Em um estudo com coelhos observou-se a neoformação óssea sobre a superfície e no interior das partículas de cimento α -TCP quando aplicados em defeito ósseo, semelhante ao presente estudo (KIHARA et al., 2006). Esses dados dão suporte à afirmação de que o sistema com base em α -TCP formando o cimento ósseo de hidroxiapatita deficiente em cálcio é um material osteocondutivo, permitindo que a matriz óssea se desenvolva através dele, e que pela avaliação histopatológica do GHAD+BMP conclui-se que a associação do cimento a proteína foi positivo visto que células osteogênicas e proliferação de matriz óssea foi verificada nas amostras, além de proliferação de tecido conjuntivo fibrocartilaginoso (Fig.5). Assim como para Nyan et al.(2009), que observaram que nos grupos em que se usava 0,1mg de sinvastatina associada ao cimento de α -TCP apresentava a formação osteogênica e proliferação óssea.

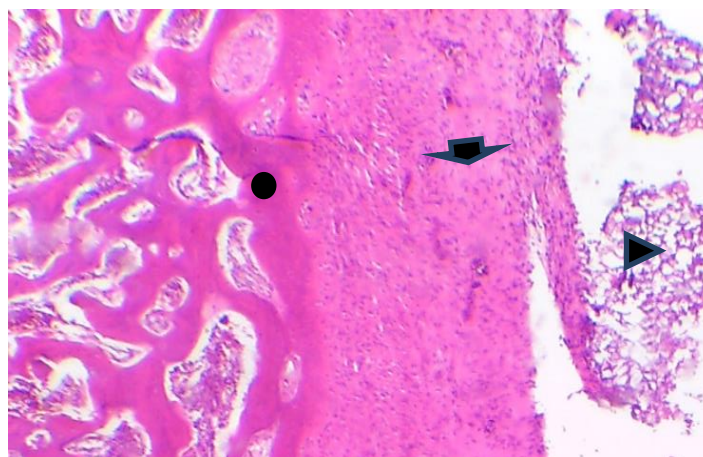


Figura 5: Imagem histopatológica demonstrando a reação tecidual dos animais submetidos ao uso do cimento ósseo associado a BMP, onde os símbolos são: (círculo) matriz óssea mineralizada(seta) formação de novo osso (matriz óssea não mineralizada), (triângulo) cimento ósseo de hidroxiapatita deficiente em cálcio não absorvido (material amorfo).

Por haver pouca referência no meio científico de estudos biomecânicos da utilização de cimento ósseo em aves, foi necessário a busca de literatura voltada a testes biomecânicos realizados em roedores e um caso realizado em fratura transversal em pombas, o qual foi tomado como modelo para este estudo. Por esse motivo, a escolha pela forma de preparo das peças foi baseada no estudo de Tunio et al.(2015a). O procedimento de eutanásia e a dissecação das ulnas, e suas contralaterais, foram de fácil manejo, e o fato de logo após a dissecação as peças serem levadas de forma refrigerada para análise não demonstrou prejuízo nos resultados, pois todas se mantiveram umedecidas não levando a erros e falta de padronização por desidratação óssea.

Referente aos resultados da biomecânica do trabalho foi possível observar que o GHAD+BMP apresentou-se ser mais elástico que os demais grupos, apresentando uma mediana de deformação de $0,46 \pm 0,10$ mm/mm, enquanto o GHAD apresentou a mediana de $0,20 \pm 0,14$ mm/mm e o GCP $0,15 \pm 0,12$ mm/mm. Assim o GCP demonstrando ser mais rígido que os demais grupos e o GHAD+BMP mais flexível. O osso cortical apresenta maior rigidez que o osso esponjoso, suportando maior carga, mas uma deformação menor antes da fratura. O osso esponjoso, devido à sua estrutura porosa, suporta uma deformação maior antes de sofrer a fratura (KUPCZIK, 2008), desta forma, as reações do cimento ósseo /osso receptor apresentam características biomecânicas semelhantes ao do osso esponjoso no módulo de deformação.

Na análise do módulo de deformação em mm comparando as ulnas contralaterais, houve diferença significativa quando comparados com os lados operado no caso do GCP, diferentemente do relatado por Tunio et al.(2015a), que não identificaram diferença significativa das ulnas fraturadas comparadas com as contralaterais saudáveis referente a deformação em mm. Uma das justificativas para tal diferença se dá por conta do método de fixação ser diferente entre os trabalhos e devido ao fato de que no trabalho aqui relatado realizou a ostectomia e aplicação de um implante de 2 cm, assim levando a maior ativação e recrutamento por parte dos osteoblastos quando se comparando a uma fratura simples transversa como a produzida por Tunio et al. (2015a).

Ainda referente a deformação, o fato de haver maior deformação por parte do GHAD+BMP, pode se justificar visto que a BMP-2 faz parte do grupo de proteínas da superfamília do fator transformador de crescimento beta (TGF β) que tem como objetivo a proliferação de células ósseas e auxiliar na consolidação. Porém, essas proteínas além

de realizarem a diferenciação de células mesenquimais osteoprogenitoras e a regulação dos osteoclastos, podem ainda resultar na proliferação de células cartilaginosa e fibroblastos, dando maior elasticidade aos tecidos formados na interação cimento ósseo/osso receptor em que foi aplicado a BMP-2. Vale lembrar que a formação óssea ocorre via direta (intramembranosa- periosteal) e indireta (endocondral). Em ambos os mecanismos ocorre indução de osso e cartilagem através da interação epitélio-mesenquimal que inicia a diferenciação celular específica e leva a formação de células precursoras da linhagem osteoblástica ou condroblástica. O tratamento com BMP-2 geralmente direciona a formação de células osteogênicas, porém também pode levar a formação condroblásticas (SYKARAS; OPPERMAN, 2003), desta forma gerando mais tecido conjuntivo cartilaginoso associado ao osso como foi visualizado no histopatológico das aves do GHAD+BMP e dando sustento ao fato de suportarem maior deformação em milímetros quando comparados com os outros grupos.

A diferença relacionada ao módulo de ruptura em flexão, em megapascal (MPa), entre o grupo que foi usado o implante (GCP) e seus contralaterais, ajuda a afirmar o fato que, quando comparado ao trabalho de Tunio et al. (2015a), o GCP ($42,38 \pm 12,91$) é mais resistente que seu contralateral ($19,26 \pm 16,27$) por conta de apresentar a formação de dois calos ósseos, tornando o osso mais resistente à deformação, elástica e plástica, que o osso com uma fratura transversa consolidada em pombas relado pelos autores. Quando comparados os grupos, não houve diferença estatística no lado contralateral, e houve diferença estatística significativa entre o GCP e o GHAD+BMP. Essa diferença provavelmente deve-se ao mesmo fato recentemente citado, demonstrando que para ocorrer a deformação o GCP necessita maior pressão que os demais grupos. Em um estudo realizado em ratos para avaliar a influência do antiinflamatório de diclofenaco de sódio na consolidação de fraturas em fêmur, concluiu que nos grupos em que se usava o fármaco, o calo ósseo demonstrou menor resistência à tensão, concluindo-se que nas condições estudadas, o fármaco alterou o processo de consolidação e o metabolismo ósseo, levando a retardo na maturação do calo e menor rigidez do osso intacto (nos casos em que somente se usou o fármaco e não se realizou a fratura), respectivamente (MULLER et al., 2004). O fato de que as ulnas com implante (GCP) terem apresentado melhor resposta cicatricial justifica o fato de ser mais resistente tanto em tensão (Mpa), quanto em carga (N). Já os ossos que receberam o cimento ósseo puramente ou o cimento ósseo associado à BMP serem menos resistentes a carga, quando comparados

com as ulnas contralaterais, também é plausível pelo mesmo fato que o GCP conseguiu receber mais carga, pois nos grupos com cimento ósseo, apesar de histologicamente apresentarem reação periosteal e neoformação óssea, sua consolidação não foi completa aos 60 dias, necessitando mais tempo de avaliação. E o fato de no grupo GCP apresentar menor deformação e maior tensão de ruptura e carga que os grupos com cimento ósseo, com ou sem BMP, demonstra haver reação tecidual nas interfaces cimento/osso receptor, e que por apresentarem mais tecido cartilaginoso as amostras se colocaram menos espásticas que o grupo controle positivo.

O uso da análise histopatológica e ensaio biomecânico em um mesmo estudo são importantes, pois enquanto o ensaio fornece informações sobre o comportamento do osso como um todo (osso cortical, cimento ósseo e implante), a análise histopatológica completa estes resultados com os dados mais específicos da parte de reação celular, indicando a fase de reparo em que o osso analisado se encontra.

Devido à variedade de formas e tamanhos dos ossos, e o fato de que não existem padrões pré-estabelecidos para os testes biomecânicos ósseos em animais, há um grande número de variáveis a serem consideradas ao se estabelecer qual ensaio biomecânico usar. Infelizmente, não existem padrões no meio científico bem estabelecido para testes biomecânicos dos ossos de cada espécie, assim muitos dos dados biomecânicos publicados não são exatos devido à falta de padronização na hora da realização dos testes. O desenho experimental deve seguir princípios científicos válidos e replicar a situação clínica específica que está sendo modelada (LIEBSCHNER, 2004), como por exemplo, o teste de flexão para um osso que tem como sua estrutura e planejamento do vôo. Porém, mais estudos com outros tipos de ensaios devem ser realizados para melhor elucidar a resistência mecânica do cimento ósseo de hidroxiapatita deficiente em cálcio osteointegrado com o osso receptor em aves.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho confirmou que não há diferença significativa nas avaliações radiográficas entre os grupos em que foram usados o cimento ósseo de hidroxiapatita deficiente em cálcio, e que na avaliação histopatológica apresentam reação osteogênica demonstrando ser eficiente para o tratamento de defeito crítico diafisário de 2 cm na ulna de galinhas. Tal confirmação é baseada porque o estudo demonstrou que esse cimento é capaz de realizar osteocondução na espécie e que no período estipulado de 60 dias as amostras, associado ou não a BMP, apresentaram ação osteocondutora e material amorfo a ser reabsorvido para a formação de matriz óssea. Na avaliação biomecânica as amostras com o cimento ósseo apresentaram relativa resistência, demonstrando haver sinais de formação de um processo cicatricial ósseo positivo. Referente ao grupo controle negativo, a falha de 2 cm apresentou ser satisfatória para o uso como defeito crítico na diáfise da ulna de galinhas, pois não aparentou sinais de consolidação na avaliação histopatológica, assim sendo válido seu uso como base para teste do cimento ósseo escolhido. Dessa forma, o cimento ósseo de hidroxiapatita deficiente em cálcio, associado ou não a BMP, demonstrou ser compatível para espécie por apresentar eficaz ação osteocondutora, porém o período escolhido com base na consolidação normal de fraturas em aves não foi o adequado para este estudo, sendo necessário pesquisas posteriores com esse material por um período mais prolongado que 60 dias.

Sugestões para posteriores pesquisas:

- Prolongar o estudo para 120 dias;
- Avaliar histologicamente e biomecanicamente a reação dos tecidos nos períodos 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120 dias;
- Realizar análise histopatológica das amostras em que for feito o teste biomecânico;
- Avaliação de fármacos que incentivam a produção de BMP;
- Realizar um grupo controle com o mesmo cimento, porém em forma de grânulos para compara o poder de osteointegração e o período.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-AQL, Z. S. et al. Molecular Mechanisms Controlling Bone Formation During Fracture Healing and Distraction Osteogenesis. **Journal of Dental Research**, v. 87, n. 2, p. 107–118, 2008.

ALIEVI, M.M. *et al.* Redução fechada e fixação esquelética externa tipo I para tratamento de fraturas de tibiotarso em pombos domésticos (*Columba livia*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, n.3, p.259–266, 2002.

ALIEVI, M.M.. *et al.* Osteossíntese de úmero em pombos domésticos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.60, n.4, p.843-850, 2008.

AN, Y.H.; FRIEDMAN, R.J. Animal Models of Bone Defect Repair. In: Animal in orthopedic research. Florida: CRC Press, cap.13, p.241-254. 1999

ANDERSON, M. L. C. et al. Critical Size Defect in the Goat ' s 0 s Ilium. **Clinical Orthopedics and Related Research**, n. 364, p. 231–239, 1999.

AUGUSTO, C. et al. Utilização de matriz óssea desmineralizada para reparo de falhas ósseas. **Revista de Odontologia da Unesp**, v. 41, n. 3, p. 209–214, 2012.

BEN-NISSAN, B. Natural bioceramics: From coral to bone and beyond. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 7, n. 4–5, p. 283–288, 2003.

BENNERT, B. M. et al. Evaluation of Two Miniplate Systems and Figure-of-eight Bandages for Stabilization of Experimentally Induced Ulnar and Radial Fractures in Pigeons (*Columba livia*). **Journal of avian medicine and surgery**, v. 30, n. 2, p. 111–121, 2016.

BENNET, R.A., KUZMA, A.B. Fracture management in birds. **Journal Zoo Wildlife Medicine**. v.23, n.1, p.5-38, 1992.

BOHNER, M. Physical and chemical aspects of calcium phosphates used in spinal surgery. **European Spine Journal**, v. 10, n. SUPPL. 2, p. 114–121, 2001.

BOSE, S.; TARAFDER, S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: A review. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 4, p. 1401–1421, 2012.

CAPLAN, A. I.; GOLDBERG, V. M. Principles of tissue engineered regeneration of skeletal tissues. **Clinical orthopaedics and related research**, n. 3678, p. S12–S16, 1999.

CARDOSO, H.; ZAVAGLIA, C. A. C. **Cimento de Alfa-TCP com Diferentes Aditivos : Cinética da Reação de Cura , Propriedades Mecânicas e Avaliação da Citotoxicidade Cimento de Alfa-TCP com Diferentes Aditivos : Cinética da Reação de Cura , Propriedades Mecânicas e Avaliação da Citotoxicidade**. 2010.

121p.Universidade Estadual de Campinas, 2010.

CARLO, R. J. DEL et al. Integração de aloenxertos ósseos corticais associados ou não a células-tronco da medula óssea, proteína óssea morfogenética (BMP) e autoenxerto esponjoso em cães. **Veterinária e Zootecnia**, v. 14, n. 0102–5716, p. 204–215, 2007.

CARRODEGUAS, R. G. et al. Cimentos de Fosfato de Cálcio. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 2, p. 30–32, 1999.

CARRODEGUAS, R. G.; DE AZA, S. Alfa Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 10, p. 3536–3546, 2011.

CHRISTOU, C. et al. Ovine model for critical-size tibial segmental defects. **Comparative Medicine**, v. 64, n. 5, p. 377–385, 2014.

CONTI, J.B. De. Osteossíntese de tibiotarso em galinhas (Plimouth rock-white): modelo experimental para uso em aves selvagens. 2005. 48p. Dissertação (Mestrado em cirurgia) - Programa de Pós- graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, 2005.

DALMOLIN, F. et al. Biomecânica óssea e ensaios biomecânicos -fundamentos teóricos. Biomecânica óssea e ensaios biomecânicos -fundamentos teóricos Bone biomechanics and biomechanics essays -theoretical foundations. **Ciência Rural**, v. 439439, p. 1675–1682, 2013.

DENNIS, J.E. HAYNESWORTH, S.E.; YOUNG, R.G.; CAPLAN; A.I. Osteogenesis in marrow-derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted subcutaneously: effect of fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenic expression. *Cell Transplant*, n1, p.23-32, 1992.

ESLAMINEJAD, M. B.; BORDBAR, S.; NAZARIAN, H. Odontogenic differentiation of dental pulp-derived stem cells on tricalcium phosphate scaffolds. **Journal of Dental Sciences**, v. 8, n. 3, p. 306–313, 2013.

FERRAZ, V. C. M. et al. Avaliação radiográfica e de função de vôo após fixação de osteotomias distais do úmero em pombas (*Columba livia*), com modelo de fixador externo articulado. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 8, p. 351–357, 2008.

GARCIA, A.; SPIM, J. A.; SANTOS, C. A. DOS. Ensaios dos materiais. p. 247, 2000. HUH, J. Y. et al. Critical size defect in the canine mandible. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 100, n. 3, p. 296–301, 2005.

GOUVÊA, A.S. *et al.* Titanium microplates for treatment of tibiotarsus fractures in pigeons. **Ciência Rural**, Santa Maria, online, 2010.

JENSEN, S. S. et al. Evaluation of a novel biphasic calcium phosphate in standardized bone defects. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs.

Clinical Oral Implants Research, v. 18, n. 6, p. 752–760, 2007.

KIHARA, H. et al. Biodegradation Process of alpha-TCP Particles and New Bone Formation in a Rabbit Cranial Defect Model. **Wiley InterScience Biomed Mater**, v. 79, n. 2, p. 1–5, 2006.

KOJIC, Z. A tissue-implant of reaction associated with subcutan implantation of alpha-tricalcium phosphate dental ceramic, and hydroxyapatite bioceramic in rats, **Acta Veterinaria**, v. 58, p.381-393, 2008.

KUPCIK F. (2008). Influência da Ciprofloxacina na Resistência do Calo Ósseo de Fraturas Padronizadas de Fêmures de Ratos. Pontifícia Universidade Católica Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Curitiba, pag.11

LEE, S. H.; SHIN, H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 4–5, p. 339–359, 2007.

LEGEROS, R. Z. Calcium Phosphate-Based Osteoinductive Materials. **American Chemical Society**, v. 108, n. 11, p. 4742–4753, 2008.

LEOTTE, A. M. et al. Fixação esquelética externa tipo Ia (unilateral-uniplanar) para osteossíntese diafisária de úmero em pombos domésticos (*Columba livia*). **Ciência Rural**, v. 34, n. 0103–8478, p. 1865–1870, 2004.

LIEBSCHNER, M. A. K. Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. **Biomaterials**, v. 25, n. 9, p. 1697–1714, 2004.

LINDSEY, R.W. *et al.* The Efficacy of cylindrical titanium mesh cage for the reconstruction of a critical size canine segmental femoral diaphyseal defect. **Journal of Orthopedic Research**, v.24, n 7, p. 1438-53, 2006

MOTA, N. L.; CASTRO JÚNIOR, A. F.; CASTRO, B. K. Embriologia e histofisiologia do tecido ósseo : revisão de literatura e bases histofisiológicas das principais doenças ósseas metabólicas. p. 27–32, 2008.

MULLER, S. S. et al. Análise clínica e biomecânica do efeito do diclofenaco sódico na consolidação da fratura da tíbia no rato *. **Acta Ortopedia Brasileira**, v. 12, n. 4, p. 197–204, 2004.

NYAN, M. et al. Effects of the combination with α -tricalcium phosphate and simvastatin on bone regeneration. **Clinical Oral Implants Research**, v. 20, n. 3, p. 280–287, 2009.

OKAMOTO, M. et al. Influence of the porosity of hydroxyapatite ceramics on in vitro and in vivo bone formation by cultured rat bone marrow stromal cells. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 17, n. 4, p. 327–336, 2006.

PARK, J. W. et al. Evaluation of bone healing with eggshell-derived bone graft

substitutes in rat calvaria: A pilot study. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 87, n. 1, p. 203–214, 2008.

PINTO, J. G. S. Enxerto autógeno x biomateriais no tratamento de fraturas e deformidades faciais—uma revisão de conceitos atuais. **Revista da Faculdade de Odontologia - UPF**, v. 12, n. 3, p. 79–84, 2007.

SAHITHI, K. et al. Polymeric composites containing carbon nanotubes for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, n. 3, p. 281–283, 2010.

SAMPLE, S. et al. Clinical use of recombinant human bone morphogenic protein-2 in a whooping crane (*Grus americana*). **Veterinary Surgery**, v. 37, n. 6, p. 552–557, 2008.

SANAEI, M. R. et al. Heterotopic Implantation of Autologous Bone Marrow in Rock Pigeons (*Columba livia*): Possible Applications in Avian Bone Grafting. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 25, n. 4, p. 247–253, 2011.

SANAEI, R. et al. Evaluation of Osteogenic Potentials of Avian Demineralized Bone Matrix in the Healing of Osseous Defects in Pigeons. **Veterinary Surgery**, v. 44, n. 5, p. 603–612, 2015.

SANTOS, L. **Desenvolvimento de Cimento de Fosfato de Cálcio Reforçado por Fibras para Uso na Área Médico-Odontológica**. 2002. 274p. Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Engenharia Mecânica, 2002.

SANTOS, L. AL. DOS et al. Fiber-enriched double-setting calcium phosphate bone cement. v. 3, 2002.

SCHIMTT, B. **Ensaio biomecânico para Determinação do diâmetro de barra conectora de polimetilmetacrilato em fixador esquelético externo tipo Ia : no úmero de suínos . Ensaio biomecânico para determinação do diâmetro de barra conectora de polimetilmetacrilato em fixado**. 2014. 46p. Programa de Pós- graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, 2014.

SILVER, F.; DOILLON, C. Biocompatibility interactions of biological implantable materials. **VCH Publishers**, v. 1, p. 306, 1989

SOUZA, R. A. et al. Propriedades Mecânicas do tecido ósseo e riscos de fraturas. **XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba**, p. 1–3, 2009.

STEIN, R. S. **Estudo Comparativo Da Neoformação Óssea Utilizando-Se O Enxerto Autógeno E Três Substitutos : Defeitos Ósseos Em Ratos**. 2009. 59p. Programa de Pós graduação em Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2009.

STIFFLER, K. Internal fracture fixation. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, 2004. Vol 19, p. 105-113.

SYKARAS, N.; OPPERMAN, L. A. Bone morphogenetic proteins (BMPs): how do they function and what can they offer the clinician? **Journal of oral science**, v. 45, n. 2, p. 57–73, 2003.

THURMER, M. B. **Alfa- Fosfato Tricálcico obtido por reação via úmida para aplicação em cimento ósseo e cimentos compósitos**.2014. 169p.Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

THURMER, M. B.; DIEHL, C. E.; DOS SANTOS, L. A. L. Calcium phosphate cements based on alpha-tricalcium phosphate obtained by wet method: Synthesis and milling effects. **Ceramics International**, v. 42, n. 16, p. 18094–18099, 2016.

TULLY, T. N. Basic avian bone growth and healing. **Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice**, v. 5, n. 1, p. 23–30, 2002.

TUNIO, A. et al. Biomechanical Assessment of Fracture Healing in a Pigeon Ulna. v. 31, n. 1, p. 139–147, 2015a.

TUNIO, A. et al. Histologic Evaluation of Critical Size Defect Healing With Natural and Synthetic Bone Grafts in the Pigeon (*Columba livia*) Ulna. **Journal of avian medicine and surgery**, v. 29, n. 2, p. 106–113, 2015b.

WEBB, J. C. J. C. J.; TRICKER, J. A review of fracture healing. **Current Orthopaedics**, v. 14, n. 6, p. 457–463, nov. 2000.

WILLIAMS, D. F. Definitions in biomaterials. **Progress in biomedical engineering**. v.4, 1987

WILTFANG, J. et al. Degradation characteristics of α and β tri-calcium-phosphate (TCP) in minipigs. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 63, n. 2, p. 115–121, 2002.

WITSBERGER, D.A.; et al. Minimally invasive application of a radial plate following placement of an ulnar rod in treating antebrachial fractures. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, vol 6,p. 459-467, 2010.

WOZNEY, J. M. et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. **Science**, v. 242, p. 1528–1534, 1988.

YAMADA, S.; HEYMANN, D.; BOULER, J.M.; DACULSI, G. Osteoclastic resorption of biphasic calcium phosphate ceramic with different hydroxiapatite/beta-tricalcium phosphate ratios. *Biomaterial*, New York, v. 18, p. 1037-1041, 1997.

ANEXO A

Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 31391

Título: Fosfato Tricálcico associado a proteína óssea morfogenética para tratamento de defeito ósseo em aves

Vigência: 15/05/2016 à 31/08/2017

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

MARCELO MELLER ALIEVI - coordenador desde 15/05/2016
LUIS ALBERTO LOUREIRO DOS SANTOS - coordenador desde 15/05/2016
MIÚRIEL DE AQUINO GOULART - Aluno de Doutorado desde 15/05/2016
Leticia Gutierrez de Gutierrez - Aluno de Mestrado desde 15/05/2016
Mariana Zacouteguy Boos - Aluno de Mestrado desde 15/05/2016
EDUARDO ALMEIDA RUIVO DOS SANTOS - Aluno de Mestrado desde 15/05/2016
Manuel Eduardo Robayo Trujillo - Aluno de Doutorado desde 15/05/2016
Bernardo Schmitt - Aluno de Doutorado desde 15/05/2016
Lucas Antonio Heinen Schuster - Aluno de Doutorado desde 15/05/2016
Nelson Junior Tagliari - Aluno de Mestrado desde 15/05/2016
Aires Santana Rumpel - Aluno de Mestrado desde 15/05/2016

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 30/05/2016 - SALA 330 DO ANEXO I - PRÉDIO DA REITORIA DA UFRGS/CAMPUS CENTRO/UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 32 galinhas adultas com a idade entre 6 a 12 meses, peso entre 1,5 e 2,5 kg, provenientes do Aviário Dois Irmãos, localizado na Av. Bento Gonçalves 3993, bairro Vila João Pessoa, CEP 90650-003-Porto Alegre(RS), de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Quinta-Feira, 9 de Junho de 2016


ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA
Vice Coordenador da comissão de ética