

André Ferrari De França Camargo

**Avaliação histomorfométrica comparativa
dos defeitos ósseos cavitários preenchidos com
vidro bioativo e com enxerto ósseo autólogo:
estudo experimental em coelhos**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ortopedia e Traumatologia

Orientador: Prof. Dr. Olavo Pires de Camargo

**São Paulo
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Camargo, André Ferrari de França
Avaliação histomorfométrica comparativa dos defeitos ósseos cavitários
preenchidos com vidro bioativo e com enxerto ósseo autólogo : estudo experimental em
coelhos / André Ferrari de França Camargo. -- São Paulo, 2015.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ortopedia e Traumatologia.
Orientador: Olavo Pires de Camargo.

Descritores: 1.Transplante ósseo 2.Osteogênese 3.Vidro 4.Coelhos

USP/FM/DBD-143/15

DEDICATÓRIA

à minha avó Norma,
por sempre ter incentivado o estudo como forma de engrandecimento;

à minha mãe Márcia,
por ter me ensinado a encarar com alegria qualquer desafio;

à minha esposa Anezka e à minha filha Isabella,
por serem minha razão de viver.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Olavo Pires de Camargo, Professor Titular e Chefe do Departamento de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por ter me recebido no Grupo de Oncologia Ortopédica e pelo incentivo constante. Obrigado pela orientação neste trabalho e pelos ensinamentos que vão muito além da Medicina: humildade, dedicação, sinceridade e sobretudo a valorização da família.

Ao Dr. André Mathias Baptista, médico assistente do Grupo de Oncologia Ortopédica, colega, amigo e sócio, pela confiança em mim depositada e pelo auxílio neste trabalho. Obrigado pela amizade que desenvolvemos nestes anos de convivência.

Aos Drs. Marcelo Tadeu Caiero, Daniel César Seguel Rebolledo e Luiz Filipe Marques Correia, amigos e colegas de profissão, com os quais muito aprendi e aprendo constantemente.

À Dra. Cláudia Regina Gomes Cardim Mendes de Oliveira, Chefe do Serviço de Anatomia Patológica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelas idéias iniciais que nortearam a metodologia histopatológica deste trabalho.

À Dra. Renée Zon Filippi, patologista do Serviço de Anatomia Patológica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela disponibilidade constante para auxiliar na solução de casos complexos.

Ao Dr. Renato Natalino, patologista do Serviço de Anatomia Patológica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo inestimável papel em analisar todas as lâminas deste trabalho.

Às secretárias do Serviço de Pós-Graduação do Departamento de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Rosana Moreno Costa e Tânia Maria Borges, pela dedicação e competência com que coordenam o programa.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Enxertos e substitutos ósseos	2
1.2 Vidro bioativo	3
1.3 Mecanismo de ação do vidro bioativo	7
2. OBJETIVO	9
3. REVISÃO DA LITERATURA	10
4. MÉTODOS	17
4.1 Critérios de inclusão	20
4.2 Critérios de exclusão	20
4.3 Procedimento cirúrgico	21
4.4 Eutanásia	24
4.5 Metodologia histomorfométrica	25
4.6 Análise estatística	27
5. RESULTADOS	28
6. DISCUSSÃO	47
7. CONCLUSÕES	52
8. ANEXOS	53
9. REFERÊNCIAS	54

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

®	marca registrada
<	menor que
>	maior que
ARNm	ácido ribonucléico mensageiro
BAG	<i>bonalive® granules</i>
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i> – proteína morfogenética óssea
Ca ⁺²	cátion cálcio
CaCl ₂	cloreto de cálcio
CaO	óxido de cálcio
CDC	<i>centers for disease control and prevention</i> – centros de controle e prevenção de doenças dos EUA
DP	desvio padrão
EUA	estados unidos da américa
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
g	gramas
H ⁺	hídron, ou cátion hidrogênio
H ₃ O ⁺	cátion hidroxônio
HC	Hospital das Clínicas
HE	hematoxilina-eosina
kg	quilograma
mg	miligramas
mL	mililitros
mm ²	milímetros quadrados
Na ⁺	cátion de sódio
Na ₂ O	óxido de sódio
O	oxigênio
pH	símbolo para a medida do potencial hidrogeniônico
P ₂ O ₅	óxido de fósforo
P ⁵⁺	cátion fósforo
Si	silício
Si ⁴⁺	cátion silício
TCqp	tomografia computadorizada quantitativa periférica
TGF	<i>tissular growth factor</i> - fator de rescimento tissular
UI	unidades internacionais
µm	micrômetro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: estrutura molecular básica do tetraedro SiO ₄	3
Figura 2: estrutura molecular de um tetraedro duplo	4
Figura 3: estrutura molecular da mica	4
Figura 4: estrutura molecular tridimensional complexa de SiO ₂	5
Figura 5: forma de apresentação do BonAlive®	17
Figura 6: aspecto macroscópico do BonAlive®	18
Figura 7: via de acesso cirúrgico	22
Figura 8: criação da janela óssea na base do trocânter maior, com um saca-bocados	22
Figura 9: defeito ósseo já criado, delimitado pelas corticais do fêmur	23
Figura 10: defeito ósseo preenchido com grânulos de vidro bioativo	23
Figura 11: exemplo de aspecto macroscópico de um fêmur tratado com vidro bioativo	29
Figura 12: osso normal do coelho	33
Figura 13: exemplo de fêmur tratado com autoenxerto	34
Figura 14: detalhe da transição entre o autoenxerto e o tecido normal	35
Figura 15: fibrose e vasos neoformados em defeito tratado com autoenxerto	36
Figura 16: infiltrado inflamatório em um fêmur tratado com autoenxerto	37
Figura 17: trabécula madura normal da medular do coelho	38
Figura 18: trabécula neoformada em um fêmur tratado com autoenxerto	39
Figura 19: área com grande atividade de neoformação óssea	40
Figura 20: fêmur tratado com vidro bioativo	41
Figura 21: neoformação óssea em um fêmur tratado com vidro bioativo	42
Figura 22: neovascularização em um fêmur tratado com vidro bioativo	43
Figura 23: trabécula imatura neoformada adjacente a um grânulo de vidro bioativo	44
Figura 24: intensa neoformação óssea em um fêmur tratado com vidro bioativo	45
Figura 25: osteoclasto próximo a um grânulo de vidro bioativo	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: resultados do trabalho preliminar piloto	19
Tabela 2: graus de escore atribuídos às variáveis semi-quantitativas	26
Tabela 3: dados individuais	30
Tabela 4: resumo dos resultados das variáveis quantitativas	31
Tabela 5: resumo dos resultados das variáveis semiquantitativas	32

RESUMO

Camargo AFF. *Avaliação histomorfométrica comparativa dos defeitos ósseos cavitários preenchidos com vidro bioativo e com enxerto ósseo autólogo: estudo experimental em coelhos* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

O tratamento das lesões ósseas cavitárias com autoenxerto ainda é considerado o padrão-ouro. Seu uso, entretanto, é limitado, devido principalmente à baixa disponibilidade e à morbidade do sítio doador. Os enxertos ósseos sintéticos são estudados com o objetivo de superar as limitações decorrentes da retirada de autoenxerto ou da disponibilidade de bancos de tecidos. O vidro bioativo é um material sintético osteoindutor, osteocondutor e antibacteriano, à base de sílica e cria um arcabouço para o crescimento ósseo. **Objetivo:** comparar o vidro bioativo com o autoenxerto, com relação às características histomorfométricas. **Métodos:** foi realizado um estudo experimental prospectivo caso-controle em animais, para comparar o vidro bioativo com o autoenxerto com relação às características histomorfométricas. Oito coelhos foram submetidos a uma cirurgia em que um defeito cavitário foi criado em ambos os fêmures proximais; de um lado, o defeito ósseo criado foi preenchido com os grânulos de vidro bioativo; do outro, o defeito ósseo foi preenchido com o autoenxerto retirado do lado contralateral. Os lados foram randomizados. Catorze dias após a cirurgia os animais foram sacrificados. **Resultados:** a análise histológica revelou que a neoformação óssea entre os dois grupos foi equivalente, e que a contagem de osteoblastos foi superior nos fêmures tratados com vidro bioativo. A contagem de osteócitos, por outro lado, foi menor. A semelhança na intensidade de neoformação óssea coincide com o encontrado na literatura. As diferenças de contagem celular são concordantes com o mecanismo de ação do vidro bioativo: aumento do turnover ósseo, estímulo dos osteoblastos e retardo na sua diferenciação para osteócitos. **Conclusão:** o vidro bioativo promove neoformação óssea semelhante ao autoenxerto neste modelo animal de defeito ósseo cavitário. **Nível de evidência III, estudo caso-controle.**

Descritores: 1. Transplante ósseo 2. Osteogênese 3. Vidro 4. Coelhos

ABSTRACT

Camargo AFF. *Comparative histomorphometric analysis of the cavitary bone defects filled with bioactive glass, or autologous bone graft: experimental study in rabbits* [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Autograft is still considered the gold standard in the treatment of cavitary bone lesions. The low availability and donor site morbidity, however, limits its use. Synthetic bone grafts have been studied in order to overcome the limitations of autograft or allograft. Bioactive glass is an osteoinductive, osteoconductive and antibacterial silica-based synthetic material. It promotes the creation of a scaffold for bone growth. **Objectives:** to compare bioactive glass and autograft regarding their histomorphometric characteristics. **Methods:** the author conducted a prospective case-control experimental study on animals, to compare the histomorphometric characteristics of bioactive glass *versus* autograft. Eight rabbits underwent surgery in which a cavitary defect was created in both proximal femurs. On one side, the bone defect was filled with bioactive glass granules and on the other, the defect was filled with autograft grafted from the contralateral side. The sides were randomized. Fourteen days after surgery, the animals were euthanized. **Results:** histologic analysis revealed that bone neoformation was equivalent among the two groups and the osteoblasts cell-count was higher in the femurs treated with bioactive glass. The osteocytes cell-count, however, was lower. The similarity in bone formation between both groups was also found in the literature. The differences in cell-count of osteocytes and osteoblasts are in accordance with the mechanism of action of the bioactive glass: increase in bone turnover, stimulation of osteoblasts and inhibition of their differentiation into osteocytes. **Conclusion:** bioactive glass is similar to autograft regarding bone neoformation, in this animal model of cavitary bone defects. **Level of evidence III, case-control study.**

Descriptors: 1. Bone transplantation 2. Osteogenesis 3. Glass 4. Rabbits

1. INTRODUÇÃO

A reconstrução dos defeitos ósseos permanece um desafio técnico para a medicina moderna¹⁻³. Os defeitos ósseos podem decorrer de diversas situações, tais como perdas ósseas traumáticas, osteomielites ou tumores ósseos.

O autoenxerto ósseo foi utilizado na antiguidade pela primeira vez para corrigir um defeito da calota craniana⁴. Pelas suas propriedades de osteocondução, osteoindução e osteogênese, é ainda considerado o padrão-ouro para levar à neoformação óssea^{3,5}. Entretanto, seu uso apresenta algumas limitações: existe disponibilidade limitada (por ser uma fonte esgotável) e causa morbidade no sítio doador, como cicatrizes e dor no pós operatório, além de haver o risco de complicações cirúrgicas no leito doador, que pode chegar a 10%^{6,7} (perdas sanguíneas, hematomas, hérnias musculares, infecção do sítio cirúrgico, deiscência de sutura, dor crônica, lesões neurológicas ou até mesmo fratura, além do tempo cirúrgico ser inevitavelmente maior)^{3,8}. Além disso, a qualidade biológica do autoenxerto é dependente da saúde geral e da idade do paciente⁹.

O aloenxerto também é tecido ósseo humano, porém de outro indivíduo. As principais vantagens do aloenxerto em relação ao autoenxerto são a ausência de um sítio doador do próprio paciente (portanto não há o risco de morbidade e complicações locais para obtenção do enxerto), e a possibilidade de se usar grandes volumes de enxerto. Entretanto, os ossos passam por um tratamento que geralmente inclui irradiação e/ou congelamento. Os métodos de esterilização tendem a degradar a qualidade biológica e biomecânica do aloenxerto¹⁰. Desta forma, é bom osteocondutor mas lhe falta propriedade osteoindutora e osteogênica⁸, por não ser tecido vivo. Além disso, o aloenxerto possui fatores imunogênicos, que podem levar a uma reação inflamatória do organismo hospedeiro (podendo provocar a reabsorção completa do aloenxerto). Há ainda o risco de transmissão de doenças infectocontagiosas⁸. Em 2005, o CDC documentou mais de 60 casos nos EUA de infecções causadas por aloenxertos contaminados por algum tipo de patógeno¹⁰. Uma outra desvantagem dos aloenxertos é

que são poucos os centros que tem disponibilidade de banco de tecidos.

Essas dificuldades e limitações tem motivado a busca por substitutos ósseos que sejam uma alternativa ao enxerto autólogo e ao aloenxerto. Em todo o mundo, há uma tendência para os substitutos ósseos sintéticos substituírem os auto e aloenxertos. Em 2005, pela primeira vez na história, o número de cirurgias ortopédicas realizadas nos EUA em que se utilizaram substitutos ósseos sintéticos superou o número de cirurgias com autoenxertos¹⁰.

1.1 Enxertos e substitutos ósseos

No estudo da biologia dos enxertos e substitutos ósseos devem ser compreendidos o que são agentes osteocondutores, osteogênicos e osteoindutores^{3,11}:

- **Agentes osteocondutores:** elementos que facilitam a incursão de vasos sanguíneos e tecido ósseo neoformados num arcabouço pré-definido, estruturado, e que em alguns casos vai sendo progressivamente substituído por osso neoformado (biocerâmicas - como a hidroxiapatita, os fosfatos e trifosfatos de cálcio e o próprio vidro bioativo –, aloenxerto, autoenxerto, polímero sintético e o metal poroso).

- **Agentes osteogênicos:** os elementos celulares (células mesenquimais pluripotenciais – células tronco) do material transplantado (enxerto) que sobrevivem ao transplante e têm a capacidade de se diferenciar em células de tecido ósseo ou vascular na área receptora. O autoenxerto é o melhor exemplo. O vidro bioativo, por ser um material sintético desprovido de células, não possui nenhuma atividade osteogênica.

- **Agentes osteoindutores:** são moléculas capazes de induzir as células-tronco mesenquimais do hospedeiro a se diferenciarem em tecido ósseo, além de induzir a sua proliferação e diferenciação em osteoblastos (como as BMP's e o TGF). O autoenxerto é repleto de substâncias com atividade osteoindutora. O vidro bioativo também tem propriedades osteoindutoras, como veremos adiante. A propriedade osteoindutora do

vidro bioativo é, supostamente, pelo menos semelhante ao efeito do BMP-2¹⁰.

Os substitutos ósseos são muito utilizados na cirurgia ortopédica, traumatológica e bucomaxilofacial e podem ser definidos como “todo o material de origem humana, animal, vegetal ou sintético, destinado à implantação no homem com a perspectiva de uma reconstituição do capital ósseo, para o reforço de uma estrutura óssea ou para o preenchimento de uma perda de substância óssea de origem traumática ou ortopédica”¹¹. O substituto ósseo ideal deve ser biocompatível, reabsorvível, osteocondutor, osteoindutor, estruturalmente similar ao osso normal, fácil de usar e custo-efetivo^{11,12}, características essas que estão presentes no vidro bioativo, conforme será explanado adiante.

1.2 Vidro bioativo

O vidro bioativo pertence a um subgrupo de biomateriais sintéticos à base de sílica (SiO₂). A estrutura molecular básica é um tetraedro composto por um átomo de silício (Si) ao centro com 4 átomos de oxigênio (O) equidistantes (Figura 1).

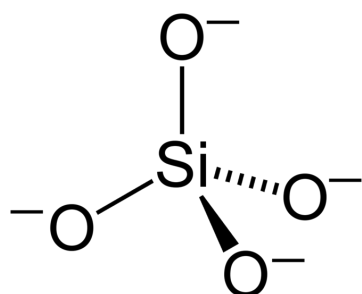


Figura 1: estrutura molecular básica do tetraedro SiO₄ – a base para todos os tipos de silicatos. Os vértices do tetraedro são os quatro átomos de oxigênio e o átomo de silício encontra-se exatamente no centro.

Esse tetraedro pode combinar-se com outros tetraedros através dos átomos de

oxigênio dos vértices, criando estruturas diversas e complexas, que são os polimorfismos da SiO_2 . O exemplo mais simples de polimorfismo da SiO_2 é o tetraedro duplo (figura 2), formado por dois tetraedros unidos através do compartilhamento de um átomo de oxigênio.

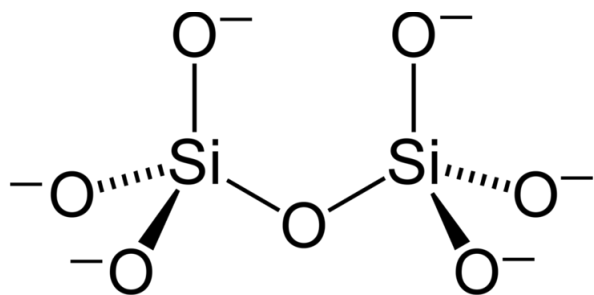


Figura 2: estrutura molecular de um tetraedro duplo.

Outro polimorfismo de SiO_2 é a mica (Figura 3), formada por vários tetraedros conectados no mesmo plano com a espessura de um único tetraedro.

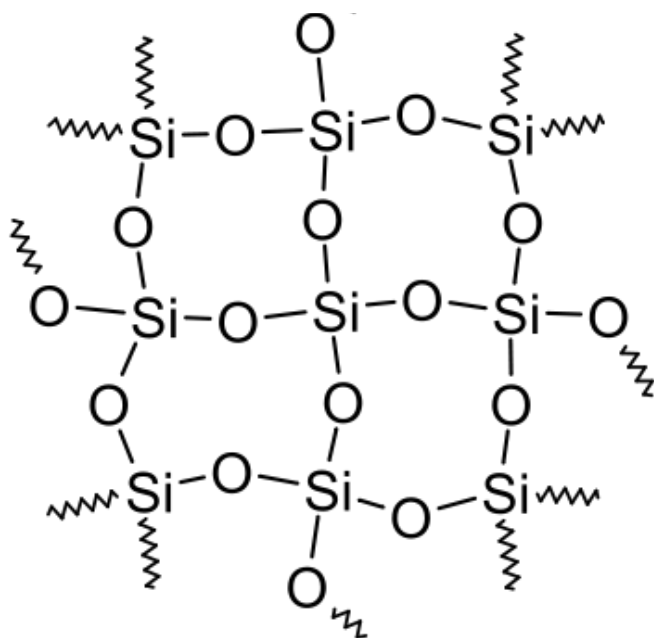


Figura 3: estrutura molecular da mica.

Os polimorfismos mais elaborados de SiO_2 são estruturas tridimensionais complexas, como o quartzo (Figura 4).

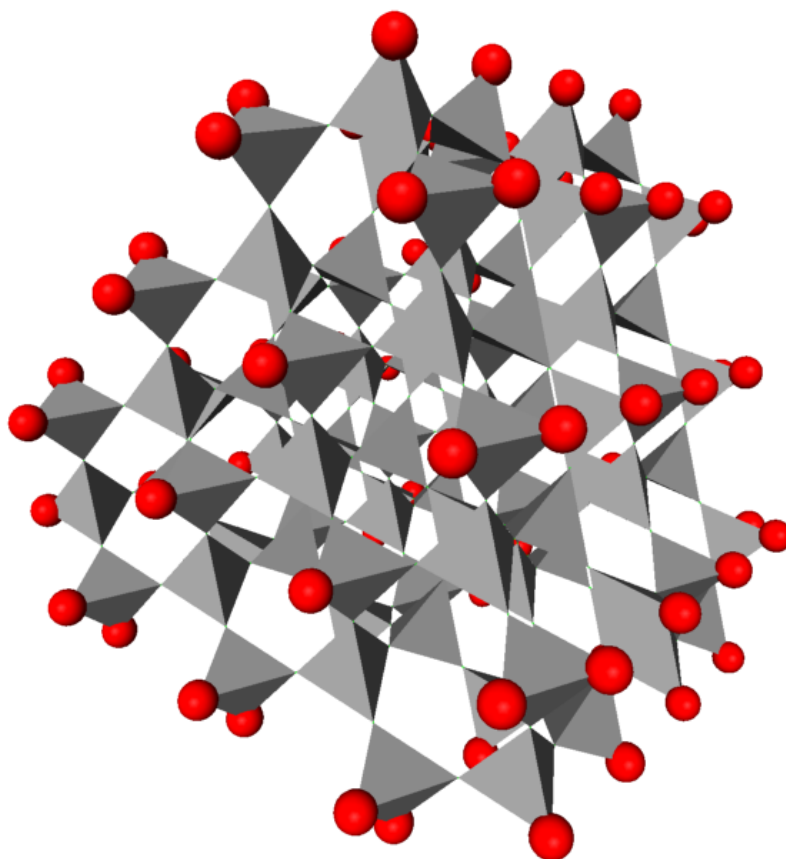


Figura 4: estrutura molecular tridimensional complexa de SiO_2 .

Os vidros são materiais sólidos amorfos, ou seja, não cristalinos, que tem uma temperatura de transição vítrea (transição reversível entre um estado duro e relativamente rígido e um estado mole e "borrachoso"). Para o SiO_2 "puro" essa temperatura é em torno de $1250\text{ }^\circ\text{C}$. Diversas substâncias podem ser adicionadas para se obter diferentes propriedades: maior resistência, dureza, transparência, reduzir temperatura de transição vítrea, coloração, etc. Os átomos dessas substâncias ficam aprisionados no interior da estrutura tridimensional básica de SiO_2 .

Os vidros bioativos tem propriedades únicas de ligação à superfície óssea^{10,13}: sua principal característica é a capacidade de promover uma ligação química com a hidroxiapatita (sal inorgânico naturalmente presente no tecido ósseo) e promover um arcabouço para o crescimento ósseo¹⁴⁻¹⁶. É um material desenvolvido na década de 1970 pela Universidade de Turku, na Finlândia, e as primeiras aplicações clínicas iniciaram-se na década de 1980. Os primeiros trabalhos relacionados ao seu uso na cirurgia ortopédica são da década de 1990¹⁷. Recebeu aprovação europeia para uso como substituto ósseo em cirurgia ortopédica apenas em 2006^{8,14}. Principalmente na Finlândia, na Universidade de Turku, vem sendo utilizado na cirurgia craniomaxilofacial e também em diversos tipos de cirurgias ortopédicas, como para preenchimento de defeitos ósseos cavitários produzidos pela ressecção intralesional de tumores ósseos benignos^{18,19}.

O tipo de vidro bioativo a ser utilizado neste estudo é o S53P4 (53% SiO₂, 23% Na₂O, 20% CaO, 4% P₂O₅) e seu nome comercial é BonAlive®. Este vidro bioativo é um substituto ósseo sintético osteoindutor^{8,13,17}, osteocondutor²⁰ e também antibacteriano^{8,21,22}, provavelmente devido ao aumento do pH e do efeito osmótico provocado pela dissolução do vidro e aumento das concentrações de cálcio e íons –OH pelos grânulos, que causariam perturbações no potencial de membrana das bactérias²¹. Já foi demonstrada ação bacteriostática *in vitro* contra 29 bactérias relevantes no cenário clínico (inclusive *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus*)²². Também foi demonstrada ação bactericida contra *Neisseria meningitidis*, *Yersinia enterocolitica*, *Corynebacterium ulcerans*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* e mesmo *S. aureus* meticilina-resistente²¹. Dos diversos tipos de vidro bioativo testados, o S53P4 foi o que demonstrou melhores resultados (efeito antibacteriano com concentrações menores)²¹.

Assim, o vidro bioativo concentra, além da atividade antibacteriana, duas (osteocondução e osteoindução) das três principais propriedades dos enxertos ósseos.

1.3 Mecanismo de ação do vidro bioativo

O mecanismo molecular de ação na interface grânulo – tecido hospedeiro já foi bastante estudado¹⁰. O processo químico na superfície dos grânulos de vidro bioativo inicia-se ao contato com os fluidos biológicos. Ocorre uma rápida troca iônica entre os grânulos e o fluido extracelular (Na^+ dos grânulos e H^+ e H_3O^+ do fluido extracelular), fazendo com que a estrutura molecular do grânulo se dissolva. Os íons Na^+ , Ca^{+2} , P^{5+} e Si^{4+} difundem para fora dos grânulos e se forma uma camada rica em silício na superfície do grânulo, através da condensação de grupos hidratados de sílica. Os íons Ca^{+2} e PO_4^{+3} do fluido extracelular também precipitam nesta camada rica em silício, que funciona como um “template” para a precipitação do fosfato de cálcio.

Os grânulos de vidro bioativo estimulam o crescimento e maturação dos osteoblastos, além de promover a expressão e manutenção do fenótipo de osteoblasto (retardando a diferenciação para osteócito). Além disso o vidro bioativo também estimula o aumento da função dos osteoblastos, deixando-os mais ativos. A fibronectina, glicoproteína naturalmente encontrada no fluido extracelular, aumenta a ligação das células à superfície dos grânulos, nesta camada de fosfato de cálcio recém formada. Os macrófagos, células tronco mesenquimais e osteoprogenitoras do hospedeiro se proliferam e diferenciam-se em osteoblastos produtores de matriz óssea.

Durante as primeiras duas semanas, ocorre um aumento de expressão de ARNm relacionado à síntese de colágeno tipo I, II e III, osteocalcina, osteonectina, osteopontina (marcadores de síntese óssea) e de catepsinas (marcadores de reabsorção óssea). Enquanto nos defeitos sem vidro bioativo os níveis desses ARNm se normalizam após as primeiras duas semanas, na presença dos grânulos de vidro bioativo esses níveis permanecem altos (de 2,1 a 11,6 vezes mais altos) por até oito semanas¹⁰.

Portanto, pode-se resumir o mecanismo de ação do vidro bioativo como um aumento da taxa de “turnover” ósseo no local. Desta forma, há um equilíbrio dinâmico entre a dissolução da matriz do grânulo e a síntese de tecido ósseo em sua superfície.

A hipótese deste estudo é que a neoformação óssea proporcionada pelo vidro bioativo na reparação de lesões ósseas cavitárias é equivalente à neoformação óssea proporcionada pelo autoenxerto. Como o vidro bioativo induz um aumento da taxa de “turnover” ósseo local¹⁰, esperamos encontrar um aumento no número de osteoblastos e osteoclastos nos casos expostos ao vidro bioativo. Além disso, esperamos uma queda na contagem de osteócitos, uma vez que o vidro bioativo retarda a diferenciação do osteoblasto para osteócito¹⁰. Pouco há na literatura sobre uso do vidro bioativo S53P4 em lesões cavitárias, utilizando-se análise histopatológica para compará-lo ao autoenxerto, ainda hoje considerado padrão de enxertia³.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é comparar as características histológicas da neoformação óssea proporcionada pelo vidro bioativo na reparação de lesões ósseas cavitárias, com o autoenxerto, considerado o padrão-ouro.

O objetivo principal é comparar a neoformação óssea entre os dois grupos. Objetivos secundários são comparar a neovascularização, fibrose, infiltrado inflamatório e as contagens de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Por ser ainda o vidro bioativo um material de desenvolvimento relativamente recente, ainda há poucos trabalhos na literatura acerca de suas propriedades e resultados com seu uso.

Hench et al. foi o pioneiro na utilização de vidros bioativos para fins biomédicos em 1976^{10,23}. Ele propôs a teoria de que o material implantado deveria idealmente ter uma superfície quimicamente dinâmica e que induzisse alterações histológicas na interface com o osso hospedeiro. Tais alterações seriam processos biológicos normais, ou seja, aconteceriam normalmente mesmo se o material implantado não estivesse presente. Concentrações insuficientes ou em excesso de íons na superfície produziriam efeito negativo na osteogênese²³.

Diferentes vidros bioativos tem taxas variadas de bioatividade (capacidade de se ligar ao tecido ósseo, biodegradar-se e formar uma camada superficial de hidroxiapatita) dependendo de sua composição química. A proporção de SiO₂ é determinante: a ligação mais rápida entre os grânulos de vidro bioativo e o tecido ósseo é alcançada com vidros contendo entre 45 e 52% (em peso molecular) de SiO₂, mas a ligação ocorre não apenas com tecido ósseo mas também com partes moles. Vidros contendo entre 53 e 60% de SiO₂ reagem mais lentamente, mas a bioatividade é mais duradoura e não ocorre ligação com as partes moles. A partir de 60% de SiO₂, os vidros não tem mais bioatividade e são por isso denominados vidros bioinertes. Dessa forma, a característica crítica para a bioatividade óssea é conter menos de 60% de SiO₂ em peso molecular¹⁰. Além do SiO₂, os outros componentes básicos dos vidros bioativos são Na₂O, CaO e P₂O₅. A presença de Na₂O e CaO em proporções maiores que 20% em peso os faz serem muito reativos em meio aquoso²⁴. Essa é uma característica bem-vinda, considerando-se que o microambiente em que ocorre o processo de reabsorção dos grânulos de vidro bioativo e neoformação óssea está repleto de fluido extracelular. O vidro bioativo, com suas

propriedades únicas de ligação à superfície óssea (capacidade de ligação à hidroxiapatita naturalmente presente no tecido ósseo), promove um arcabouço para o crescimento ósseo^{10,14,15}. A formação dessa superfície de ligação envolve reações de dissolução, precipitação e trocas iônicas¹⁷. Com o passar do tempo, o vidro bioativo é substituído por osso⁸.

A neovascularização é fundamental para que ocorra a osteogênese, e já foi demonstrado que o vidro bioativo S53P4 pode estimular a neovascularização^{8,25}. Peltola et al (2001), em um modelo animal de obliteração do seio frontal em coelhos, comparam o vidro bioativo com a hidroxiapatita; os resultados mostram uma neoformação óssea mais rápida no grupo do vidro bioativo e com neovascularização mais intensa²⁵.

Heikkilä et al. (1993)²⁶ comparam a osteointegração do vidro bioativo e da hidroxiapatita em reconstruções de defeitos cônicos epifisários e metafisários do fêmur distal em coelhos (criados através da cartilagem articular), por uma artrotomia no joelho. Após três semanas, os grânulos de vidro bioativo têm 61% de sua superfície coberta por osso neoformado, enquanto que nos grânulos de hidroxiapatita esse número é 47%. Após seis e 12 semanas, entretanto, a diferença deixa de existir (78% e 79%, respectivamente, nos grânulos de vidro bioativo, e 67% e 78% nos grânulos de hidroxiapatita).

Em 1995 Heikkilä et al.²⁷ comparam o autoenxerto com o vidro bioativo em defeitos ósseos cavitários cilíndricos na região trocantérica de 18 coelhos e não encontram diferença entre a neoformação óssea nos dois grupos. Eles demonstram que a camada de neoformação óssea ao redor dos grânulos aumenta progressivamente de espessura, de 82µm na terceira semana para 163µm na 12ª semana. Ou seja, aproximadamente metade do efeito total observado na 12ª semana estava presente já na terceira semana, evidenciando que a intensidade do efeito é decrescente, sendo muito mais intenso nas primeiras semanas. Os autores também demonstram que a neoformação óssea ocorre da periferia para o centro. Eles concluem que o vidro bioativo é um material promissor para preencher defeitos cavitários.

Em 1997, Virolainen et al.¹⁷ comparam o vidro bioativo com o autoenxerto em um modelo de defeitos corticais em 35 ratos (sete animais em cada intervalo de tempo – três, sete, 14, 28 e 46 dias), e 15 animais foram usados como grupo controle (três em cada intervalo de tempo). Após duas semanas, a neoformação óssea foi significativamente maior no grupo tratado com autoenxerto e essa diferença se manteve estável nos intervalos de tempo subsequentes. Eles demonstram que, diferentemente dos defeitos tratados com autoenxerto (nos quais havia uma expressão maior de TGF α -1 e colágeno do tipo I), nos casos tratados com vidro bioativo há uma maior expressão de colágeno tipo III. Segundo os autores, esse fato comprova que a neoformação óssea induzida pelo vidro bioativo é predominantemente do tipo intramembranosa. Os autores concluem que o vidro bioativo tem uma superfície osteocondutora eficaz, mas que não alcança a capacidade do autoenxerto de promover a osteogênese. Entretanto, não foi realizada análise histopatológica comparando-se o vidro bioativo com autoenxerto.

Ainda em 1997, Turunen et al.²⁸ avaliam a utilização do vidro bioativo como uma cobertura (“coating”) em implantes intramedulares, usando um modelo experimental em tíbias de coelhos. Os implantes recobertos com vidro bioativo tem uma melhor integração óssea que os implantes de titânio comuns. Eles sugerem que esta poderia ser uma utilização deste material no futuro.

Em 1998, Peltola et al.²⁹ utilizam grânulos de vidro bioativo em uma série de dez pacientes com sinusite crônica para obliterar o seio frontal. Os pacientes foram acompanhados por cinco anos, em média. As tomografias computadorizadas regulares demonstram uma redução discreta mas progressiva da densidade do material implantado. Os autores concluem que o material é promissor e bem tolerado, além de ser adequado para a obliteração dos seios frontais. Segundo eles, o resultado da obliteração é mantido devido à estabilidade do material.

Em 2001, Peltola et al.²⁵ comparam os grânulos de vidro bioativo e de hidroxiapatita para tratar defeitos cranianos e do seio frontal em coelhos. Os resultados mostram reabsorção mais rápida dos grânulos e neoformação óssea mais rápida nos

defeitos preenchidos com vidro bioativo. Além disso, a neovascularização é mais rápida nos casos tratados com vidro bioativo. Segundo os autores, isto pode ser inferido pela formação mais rápida de tecido fibroso, o que está relacionado à presença de neovascularização.

Também em 2001, Loty et al.²⁰ investigam o comportamento de osteoblastos de fetos de ratos em culturas sobre placas de vidro bioativo (55S), comparando-os com o vidro bioinerte (60S). A diferença encontrada (maior diferenciação celular e neoformação óssea no grupo com vidro bioativo), segundo os autores, indica a importância da composição da superfície em promover a diferenciação das células osteogênicas e a subsequente aposição de matriz óssea.

Em 2003, Peltola et al.³⁰ estudam os efeitos de três materiais sintéticos bioativos em grânulos para tratar defeitos cranianos e do seio frontal. Os autores investigam dois tipos diferentes de vidros bioativos e a hidroxiapatita. Um total de 45 animais foi utilizado: em cada intervalo de tempo (um, três e seis meses) foram usados 5 animais em cada grupo. A comparação da hidroxiapatita com um desses vidros, o BAG1, já havia sido realizado em 2001 pelos mesmos autores. O outro vidro bioativo, o BAG2, é passível de molde e pode ser prefabricado em diversas formas complexas, o que poderia ser muito útil em algumas situações clínicas específicas. Entretanto, a neoformação óssea no grupo tratado com grânulos de BAG2 é significativamente menor que no grupo tratado com o BAG1. Os autores sugerem que mais estudos devem ser realizados para viabilizar o uso deste tipo “moldável” de vidro bioativo.

Também em 2003, Lindfors et al.³¹ comparam três diferentes tipos de vidro bioativo (S53P4, S59.7P2.5, e S52P3) e dois tamanhos diferentes de grânulos (200-250µm e 630-800µm) em defeitos ósseos do fêmur distal de coelhos. Concluem que, com relação à composição dos vidros, o S53P4 mostra-se o mais eficaz, mas o S52P3, que tem uma pequena porcentagem de alumínio em sua composição (3%) também demonstra uma boa osteocondução. Surpreendentemente, o S59.7P2.5, que devido à alta concentração de Si, deveria ser inerte, também apresentou alguma capacidade

osteocondutora. Com relação ao tamanho dos grânulos, eles constatam que os grânulos maiores (630-800 μ m) permitem uma neoformação óssea significativamente mais abundante.

Em 2005, Valimaki et al.³² correlacionam os achados de um exame de imagem (tomografia computadorizada quantitativa periférica - TCqp) com a incorporação dos grânulos de vidro bioativo. Realizam um defeito intramedular na tíbia de ratos e o preenchem com os grânulos de vidro bioativo. Comparando os resultados da análise da TCqp com os da histomorfometria, os autores concluem que o método de imagem pode ser adequado para o seguimento *in vivo* do processo de incorporação dos grânulos de vidro bioativo.

Em 2006, o mesmo autor publica um artigo de revisão¹⁰ acerca da base molecular de ação do vidro bioativo. Ele salienta que o ponto crítico para existência de bioatividade é apresentar em sua composição menos que 60% (em peso molecular) de SiO₂. Conclui afirmando que os vidros bioativos são um grupo promissor de substitutos ósseos sintéticos.

Também em 2006, Peltola et al.¹⁹ publicam uma série de 42 casos de obliteração do seio frontal usando grânulos de vidro bioativo, devido a sinusite crônica. Eles obtiveram sucesso em 92% dos pacientes. Foram retiradas amostras com um, cinco e 10 anos após a cirurgia e revelaram a presença inicialmente de tecido fibroso, seguido de neoformação óssea, mas sempre com remanescentes dos grânulos de vidro bioativo. Culturas microbiológicas não obtiveram crescimento bacteriano.

Em 2008, Lindfors et al.³³ avaliam o silício sérico em 25 pacientes operados por tumores ósseos benignos, divididos em dois grupos. Um grupo recebeu vidro bioativo (n = 14) e o outro, autoenxerto (n = 11). Análise de amostras de sangue retiradas com dois, três, oito, 12, 24 e 36 meses após a cirurgia não evidenciou diferenças significativas entre os dois grupos.

Ainda em 2008, Lindfors et al. publicam outro trabalho com a mesma série de 25 pacientes¹⁸, comparando os dois grupos com radiografias simples e tomografias computadorizadas realizadas com dois, três, oito, 12, 24 e 36 meses após a cirurgia. O defeito ósseo é preenchido mais rapidamente no grupo com autoenxerto, mas após 36 meses não houve diferença entre os dois grupos. Os autores observam que o tempo para desaparecimento do enxerto às radiografias varia consideravelmente entre os grupos, sendo que no grupo do autoenxerto o tempo médio é de 12 meses e no grupo do vidro bioativo o tempo varia entre 24 (lesões pequenas) e 36 meses (lesões grandes). Durante o seguimento, a espessura da cortical aumenta mais significativamente no grupo do vidro bioativo. A neoformação óssea centrípeta é novamente demonstrada.

No ano seguinte, Lindfors et al.³⁴ publicam um relato de caso de um cisto ósseo aneurismático recidivado na falange proximal do segundo dedo da mão de uma criança de três anos de idade, tratado com sucesso usando os grânulos de vidro bioativo. Com dois anos de seguimento, não havia sinais de nova recidiva e o osso apresentava crescimento normal e com remodelação para a forma praticamente normal.

Em 2010, novamente Lindfors et al.³⁵ publicam uma pesquisa prospectiva randomizada comparando o vidro bioativo com o autoenxerto no tratamento de lesões ósseas benignas. Os casos foram operados entre 1993 e 1997 e o seguimento médio foi de 14 anos. Dez pacientes no grupo do vidro bioativo e 11 no grupo do autoenxerto foram incluídos no estudo. Os grupos foram comparados com exames de imagem (radiografias simples, tomografia computadorizada e ressonância magnética). No grupo do vidro bioativo, a cavidade preenchida aparentava ser mais densa às radiografias. Remanescentes dos grânulos podiam ainda ser observados. Em alguns casos, como em fibromas não ossificantes e encondromas, as corticais ficavam mais espessadas.

Também em 2010, Lindfors et al.³⁶ publicam um estudo multicêntrico em que 11 pacientes com osteomielite crônica foram tratados com vidro bioativo. O patógeno mais comum foi o *Staphylococcus aureus* e o tempo médio de seguimento foi 24 meses. Nove dos 11 pacientes tiveram resolução completa da osteomielite crônica. Os autores

concluíram que o vidro bioativo pode ser utilizado para o tratamento de osteomielite crônica, com bons resultados.

Em 2011, Frantzen et al.⁸ realizam um estudo de artrodese vertebral em 17 pacientes, comparando grânulos de vidro bioativo (lado esquerdo) com autoenxerto (lado direito). A avaliação foi feita com radiografias e tomografia computadorizada. Todos os pacientes obtiveram consolidação satisfatória do lado do autoenxerto, mas em apenas 12 do lado do vidro bioativo. Mesmo assim, os autores concluem que o vidro bioativo pode ser considerado uma boa alternativa para cirurgias de coluna no futuro. Os autores também observam uma neovascularização mais rápida nos casos tratados com vidro bioativo.

Também em 2011, Heikkilä et al.³⁷ publicam um estudo randomizado com 25 pacientes com fraturas-depressão do planalto tibial lateral e comparam o tratamento com vidro bioativo (n = 14) ou com autoenxerto (n = 11). Não foram observadas diferenças na avaliação subjetiva, testes funcionais, exames clínicos e radiológicos após um período de 12 meses. Os autores concluem que grânulos de vidro bioativo podem ser utilizados no lugar de autoenxerto como um material de preenchimento em casos de fratura-depressão de planalto lateral.

Ainda em 2011, Perna et al.³⁸ avaliam retrospectivamente 29 pacientes com fratura-depressão do planalto lateral, clínica e radiologicamente. Eles foram divididos em dois grupos: 15 pacientes foram tratados com vidro bioativo e dez com autoenxerto. Após 11 anos de seguimento, não há diferenças entre os dois grupos. Os autores concluem que o vidro bioativo pode ser utilizado como substituto ósseo nas fraturas-depressão do planalto lateral, com bons resultados clínicos e radiológicos a longo prazo.

Pouco há na literatura sobre uso do vidro bioativo S53P4 em lesões cavitárias, utilizando-se análise histopatológica para compará-lo ao autoenxerto, ainda hoje considerado padrão de enxertia³. Portanto, os conhecimentos acerca dos mecanismos celulares e de biologia molecular envolvidos nesse processo ainda são escassos.

4. MÉTODOS

O trabalho foi conduzido pelo Grupo de Oncologia Ortopédica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (IOT-HCFMUSP), após a aprovação da Comissão de Ética em 11/04/2012 (Anexo 1: aprovação do protocolo de pesquisa 024/12 intitulado “AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DO VIDRO BIOATIVO EM DEFEITOS ÓSSEOS CAVITÁRIOS – ESTUDO EXPERIMENTAL COMPARATIVO EM COELHOS”).

O vidro bioativo escolhido para este estudo foi o S53P4 com grânulos entre 630-800 μm , tendo como base o estudo de Lindfords³¹ que concluiu que, dentre as diversas composições e tamanhos, esta combinação seria aquela com maior bioatividade. Com nome comercial BonAlive[®] (Figuras 5 e 6), os grânulos são produzidos pelo Centro de Biomateriais de Turku, na Finlândia. O material é composto de 53% de SiO_2 , 23% de Na_2O , 20% de CaO e 4% de P_2O_5 . O material é fornecido já esterilizado, utilizando-se óxido de etileno, e estocado em embalagens plásticas duplas até o uso na sala de operação.



Figura 5: forma de apresentação do BonAlive[®]



Figura 6: aspecto macroscópico do BonAlive[®]

Foram utilizados coelhos *Oryctolagus cuniculus*, da linhagem New Zealand, machos, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no laboratório de investigação médica (LIM) 41 do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da FMUSP.

Para se determinar a metodologia a ser utilizada no trabalho, foi realizado um estudo piloto. Primeiramente foram utilizados seis fêmures de coelhos. Os modelos utilizados nos estudos de Virolainen¹⁷ e Heikkilä²⁷ foram utilizados como base e algumas adaptações foram realizadas para permitir a reprodutibilidade do método. Primeiramente, observou-se que coelhos de pequeno porte (peso < 5kg) apresentavam fêmures com dimensões muito pequenas, o que dificultava a criação de um defeito ósseo sem causar uma fratura no local. Além disso, não se conseguiu reproduzir a técnica de se utilizar uma trefina para a realização de um defeito cilíndrico pois houve fratura durante a realização dos defeitos. Definiu-se pela realização manual dos defeitos, utilizando uma cureta delicada, o que no estudo piloto demonstrou ser um método seguro e reprodutível. Com as informações obtidas durante a realização do piloto, foi definida a metodologia que será descrita adiante.

Os dados obtidos dos primeiros seis fêmures operados permitiram o cálculo do tamanho da amostra necessário para este trabalho. Utilizamos o parâmetro quantitativo “contagem de osteoblastos por campo de grande aumento” por ser aquele que, após o exposto anteriormente, acreditávamos que haveria o aumento mais significativo com a intervenção. Os resultados do trabalho preliminar piloto podem ser encontrados na tabela 1.

Tabela 1 - Resultados do trabalho preliminar piloto

Variável	Autoenxerto (n = 3)	Vidro bioativo (n = 3)
dimensões (mm²)		
média (DP)	66,4 (5,6)	68,1 (10,9)
mediana (mín; máx)	66,3 (60,8; 72,1)	69,4 (56,7; 78,3)
osteoblastos		
média (DP)	65,3 (11,1)	91,3 (21,0)
mediana (mín; máx)	64 (55; 77)	92 (70; 112)
osteócitos		
média (DP)	88 (25,1)	28,7 (20,1)
mediana (mín; máx)	90 (62; 112)	26 (10; 50)

Considerando um poder de 80% e confiança de 95%, calculou-se o tamanho da amostra necessário para encontrar-se uma diferença significativa na contagem dos osteoblastos e, utilizou-se a seguinte fórmula³⁹:

$$n = \left[\left(Z_{\frac{\alpha}{2}} + Z_{\beta} \right) \times \frac{Sd}{D} \right]^2$$

onde:

- n = tamanho da amostra
- $Z_{\alpha/2}$ = erro alfa (5%) = 1,96
- Z_{β} = erro beta (20%) = 0,84
- Sd = desvio padrão da diferença entre os pares
- D = média da diferença entre os pares

Chegou-se assim a um tamanho de amostra de 8 coelhos.

Utilizando-se o parâmetro qualitativo “neoformação óssea”, o resultado do cálculo do tamanho da amostra seria 175 coelhos.

4.1 Critérios de inclusão

Os coelhos devem ter um porte suficiente para permitir a realização do procedimento cirúrgico, ou seja, um peso aproximado de 5 kg, conforme determinado previamente durante a realização dos pilotos. Os animais foram criados de acordo com as normas de manejo ético dos animais e liberados pelo biotério para o experimento. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em condições controladas de iluminação, temperatura e umidade, recebendo água *ad libitum* e ração específica para a espécie. Antes de cada procedimento operatório foram submetidos a jejum de oito horas.

4.2 Critérios de exclusão

Foram adotados os seguintes critérios de exclusão:

- alterações ou problemas clínicos e de locomoção;
- infecção, fratura no sítio abordado e alterações clínicas importantes, como redução de peso maior que 10%, após o procedimento cirúrgico;

Seria substituído o animal que morresse ou cujo tecido retirado não possibilitasse a análise adequada (problema de obtenção ou preparação). Todos os animais excluídos seriam submetidos à eutanásia e à necrópsia para o esclarecimento da causa da exclusão. A ocorrência recorrente de óbitos e de lesões importantes, como perda da função articular, sério desconforto (intenso e/ou prolongado) ou sofrimento do animal durante a realização do experimento (2 semanas), implicaria na interrupção

e/ou encerramento dos procedimentos previstos para este estudo.

4.3 Procedimento cirúrgico

Os procedimentos a seguir descritos estão em conformidade com a lei número 11.794 de 08 de outubro de 2008, que estabelece procedimentos para uso científico de animais⁴⁰ e são uma adaptação dos modelos utilizados nos estudos de Virolainen¹⁷ e Heikkilä²⁷.

Antes do início da anestesia, por meio de sorteio, foi decidido qual lado receberia o vidro bioativo e qual receberia o autoenxerto.

Após o sorteio, os animais foram anestesiados.

Os coelhos foram anestesiados com administração intramuscular de uma associação de quetamina (40 mg/kg) e midazolam (2 mg/kg) de modo a facilitar a tricotomia dos quadris e venopunctura de veia da orelha com cateter calibre 22G para realização de fluidoterapia com 10mL/kg/h de soro fisiológico.

Em seguida, foi administrado propofol na dose de 5mg/kg, por via intravenosa, de modo a permitir a colocação e fixação de máscara para administração de isofluorano, diluído em oxigênio a 100%, por meio do circuito anestésico Mapleson D.

Cinco minutos antes do início do procedimento cirúrgico os animais receberam 10 mcg/kg de citrato de fentanila por via subcutânea.

Após a anestesia, os coelhos foram posicionados em decúbito lateral, com lado sorteado para cima. Após assepsia e antissepsia, foram colocados os campos cirúrgicos, expondo somente a área a ser operada.

A via de acesso foi longitudinal, centrada no trocânter maior do fêmur, de extensão suficiente para expor o trocânter (cerca de 3 cm), com dissecação da pele, subcutâneo, músculo glúteo máximo e enfim exposição óssea (Figura 7).

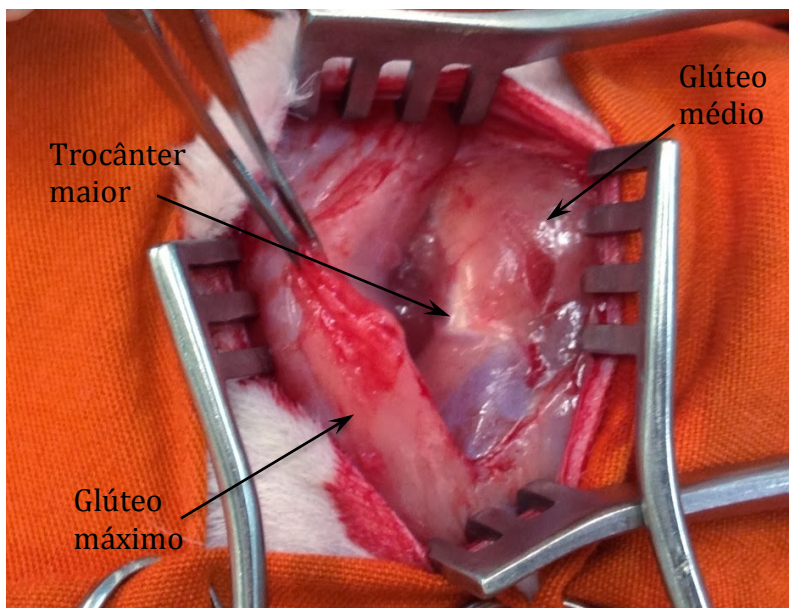


Figura 7: via de acesso cirúrgico; glúteo máximo afastado posteriormente (pinça) e exposição do trocânter maior. Os tendões do músculo glúteo médio e dos rotadores internos são mantidos intocados (coelho 2, lado direito).

Utilizando uma pinça saca-bocados delicada, foi retirada a parede da cortical lateral do fêmur na base do trocânter maior (Figura 8).

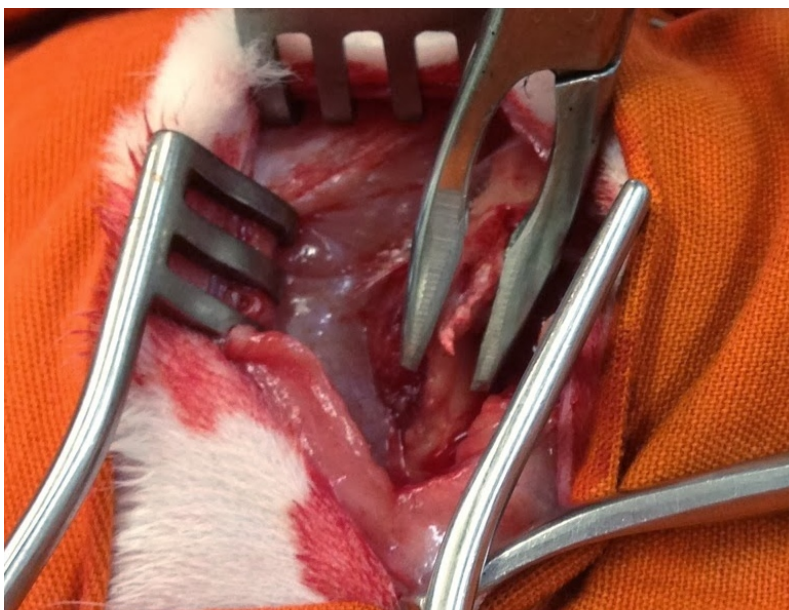


Figura 8: criação da janela óssea na base do trocânter maior, com um saca-bocados (coelho 2, lado direito).

Através dessa janela, foi realizada uma cavidade de 1cm de extensão com uma cureta, limitada transversalmente pelas corticais do fêmur (Figura 9).

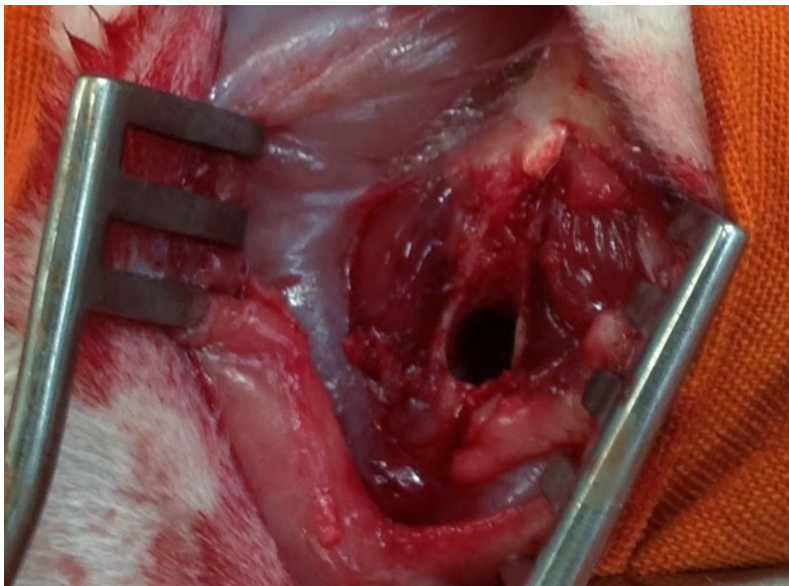


Figura 9: defeito ósseo já criado, delimitado pelas corticais do fêmur (coelho 2, lado direito).

O osso curetado foi armazenado para ser utilizado como autoenxerto no lado contralateral. O defeito foi então preenchido com os grânulos de vidro bioativo (Figura 10).

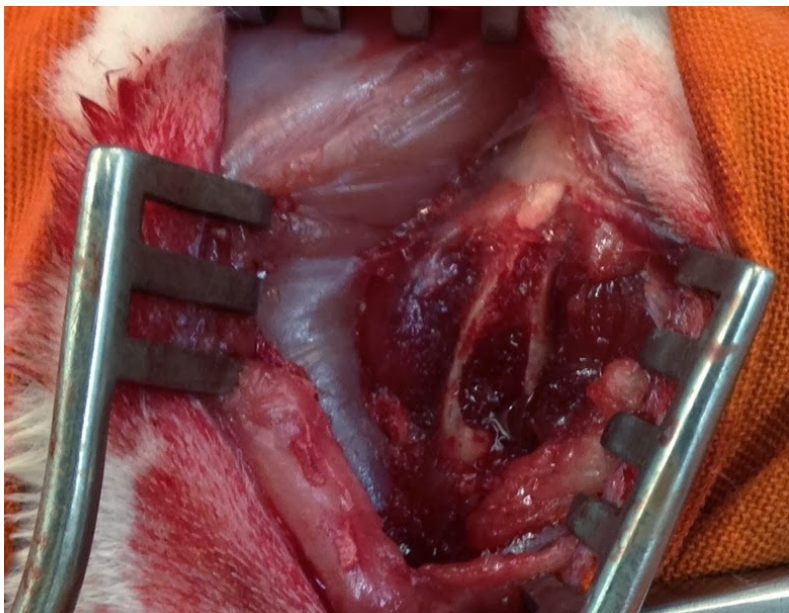


Figura 10: defeito ósseo preenchido com grânulos de vidro bioativo (coelho 2, lado direito).

A musculatura foi reaproximada com pontos de nylon e a pele suturada. O animal foi então mudado de decúbito e o mesmo procedimento foi repetido no lado contralateral. Porém, o defeito cavitário foi preenchido agora com o autoenxerto que havia sido coletado do primeiro lado. Imediatamente após o término da cirurgia, o animal foi acondicionado em um cesto apropriado, aquecido e isolado dos demais. Após a recuperação anestésica total, os coelhos foram devolvidos às suas gaiolas no Biotério de Manutenção da Área de Pesquisas Biológicas do Laboratório de Biomecânica do IOT-HCFMUSP (LIM 41) e mantidos em ambiente com temperatura, umidade e ciclo circadiano controlados, recebendo água e ração *ad libitum*. A carga total nos membros operados foi permitida imediatamente, sem qualquer tipo de restrição ou imobilização. Durante os primeiros sete dias de pós-operatório, os animais receberam: enrofloxacin na dose de 10 mg/kg a cada 12 horas por via subcutânea, meloxicam na dose de 0,1 mg/kg a cada 24 horas por via subcutânea e cloridrato de tramadol na dose de 4 mg/kg a cada 12 horas por via subcutânea.

4.4 Eutanásia

Após duas semanas da cirurgia, os animais foram sacrificados. As eutanásias foram realizadas de acordo com a resolução de número 714 do Conselho Federal de Medicina Veterinária de 2002, que estabelece as normas sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais. Os animais foram anestesiados da mesma forma descrita anteriormente: administração intramuscular de uma associação de quetamina (40 mg/kg) e midazolam (2 mg/kg) e venopunctura da veia safena com cateter calibre 22G para administração de propofol na dose de 5mg/kg, por via intravenosa. A seguir foi administrada uma solução de cloreto de potássio a 20% na dose de 1,0 a 2,0 mEq/kg. Após confirmado o óbito do animal, os fêmures proximais foram removidos utilizando-se a mesma via cirúrgica descrita anteriormente. Realizou-se uma osteotomia no terço proximal do fêmur, cerca de 1cm abaixo da lesão criada, e desarticulação cuidadosa do quadril. As peças foram submetidas à limpeza, retirando-se o excesso de partes moles, colocadas em recipientes adequados com solução de formol a 10% e identificadas com o número do coelho e o lado correspondente. Após a retirada das peças anatômicas para o estudo histomorfométrico, as carcaças foram embaladas em sacos plásticos devidamente identificados e encaminhados à seção

de descarte de carcaças da FMUSP, que se encarregou do descarte das mesmas em local apropriado, de acordo com o Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviço de Saúde – PGRSS do IOT-HCFMUSP conforme legislação em vigor (RDC ANVISA nº 306/2004 e resolução CONAMA nº 358/2005) e as normas de biossegurança expressas na resolução nº 5, de agosto de 1993, do Conselho Nacional do Meio Ambiente.

4.5 Metodologia Histomorfométrica

A metodologia histomorfométrica foi uma adaptação do estudo de Rosselli⁴¹. As peças coletadas da forma descrita acima foram encaminhadas ao serviço de Anatomia Patológica do IOT-HCFMUSP, fixadas em formalina tamponada a 10% e submetidas à descalcificação com EDTA. Após a descalcificação, os espécimes foram banhados em solução aquosa de bicarbonato de sódio a 5%, sendo desidratados em concentrações crescentes de álcool, diafanizados em xilol. A seguir as peças foram seccionadas no eixo coronal do fêmur, na região central do defeito ósseo, e depois embebidas e incluídas em parafina. Depois foram confeccionadas as lâminas com cortes histológicos de 5µm coradas pelo método de hematoxilina-eosina (HE). Realizou-se a análise histológica descritiva, em microscopia de luz, das lâminas obtidas.

A análise das lâminas permitiu avaliar variáveis semiquantitativas (neovascularização, fibrose, neoformação óssea e infiltrado inflamatório) e variáveis quantitativas (dimensões do defeito ósseo criado - longitudinal e transversal, em milímetros –, número de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos). A avaliação destes parâmetros foi realizada em microscópio Olympus modelo CX41 acoplado a uma câmera digital Leica DC300F por um patologista com experiência em patologia óssea. A análise histológica foi realizada através da constatação da presença e intensidade das variáveis citadas.

Cada variável foi considerada da seguinte maneira: “neovascularização” é a presença de capilares e vasos neoformados de médio calibre na região do defeito ósseo; “fibrose” é a presença de tecido conjuntivo denso com fibras colágenas; “infiltrado inflamatório” é a presença de células

inflamatórias – linfócitos e monócitos –; “neoformação óssea” é o tecido ósseo imaturo com arranjo de colágeno desorganizado. Osteoblastos são as células ativas (aspecto poligonal) ou inativas (aspecto achatado) na superfície das trabéculas; osteócitos são as células inativas incorporadas na matriz óssea; osteoclastos são células gigantes multinucleadas encontradas em lacunas na superfície das trabéculas (responsáveis pela reabsorção óssea). As variáveis semiquantitativas foram categorizadas em escala crescente, de 0 a 3, conforme estabelecido pelo serviço de Anatomia Patológica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da FMUSP, levando-se em consideração a intensidade dos fenômenos microscópicos observados (tabela 2). Utilizando o menor aumento (12,5X), cada lâmina foi dividida em quatro quadrantes representando aproximadamente 25% do total da área observada. A média dos escores dos quatro quadrantes é o escore dado para a lâmina.

Tabela 2 - graus de escore atribuídos às variáveis qualitativas “vascularização”, “fibrose”, “infiltrado inflamatório” e “neoformação óssea reacional”

escore	Área do quadrante
0 – nenhum	0%
1 – discreto	≤ 25%
2 – moderado	26-50%
3 - intenso	> 50%

A presença e intensidade de neoformação óssea foi categorizada em: 0 – neoformação ausente; 1 - neoformação presente entre 1 e 25% do defeito; 2 – neoformação presente entre 26 e 50% do defeito; e 3 - neoformação presente entre 51 e 100%. A presença e quantificação da fibrose, infiltrado inflamatório e neoformação óssea foram categorizadas da mesma maneira. O número de osteoblastos, osteoclastos e de osteócitos foram contados no mesmo microscópio utilizando a objetiva de maior aumento (Olympus – Plan C N 40x – 0,17mm² de área) em área escolhida pelo patologista como sendo área com maior densidade de neoformação óssea.

4.6 Análise Estatística

As avaliações semiquantitativas foram descritas com uso de frequências absolutas e relativas em cada fêmur e comparadas entre os fêmures com uso do teste Wilcoxon pareado⁴². As medidas quantitativas foram descritas com uso de medidas resumo (média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo) em cada fêmur e comparadas com uso de testes t-Student pareado⁴², com exceção apenas dos osteoclastos, que também foram comparados com uso do teste Wilcoxon pareado.

Os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

Não houve nenhum caso de infecção no sítio cirúrgico, nem deiscência de sutura. Nenhum animal teve alterações significativas de peso. Nenhuma fratura ocorreu no local de criação do defeito ósseo; contudo, um dos coelhos (nº 5) apresentou uma fratura com mínimo desvio no fêmur distal, na região supracondiliana, no lado tratado com vidro bioativo. Tal fratura foi apenas evidenciada no momento da eutanásia. Por estar distante da área do estudo (a osteotomia para retirada da peça foi acima da área fraturada), foi optado por não excluir este animal. Não houve problemas com relação à criação dos defeitos. Todas as peças foram adequadamente preparadas para obtenção das lâminas. Entretanto, nos fêmures tratados com vidro bioativo, a realização dos cortes nos blocos de parafina para obtenção das lâminas era mais trabalhosa que nos fêmures tratados com autoenxerto. Isso levou a criação de artefatos em todas as lâminas dos fêmures tratados com vidro bioativo.

Não houve doença detectada nos oito animais que efetivamente participaram do estudo. Não foram observadas alterações importantes relativas à mobilidade do animal, nem mesmo no coelho que apresentou a fratura supracondiliana de fêmur.

Macroscopicamente, observamos que os fêmures encontravam-se externamente indistinguíveis de fêmures não operados. Os tendões dos músculos glúteos e rotadores internos encontravam-se normalmente inseridos e não se podia identificar com precisão onde havia sido realizada a janela óssea na base do trocânter. Nos fêmures tratados com vidro bioativo, via-se claramente onde era o defeito original devido à presença dos remanescentes dos grânulos, que têm coloração esbranquiçada (Figura 11).

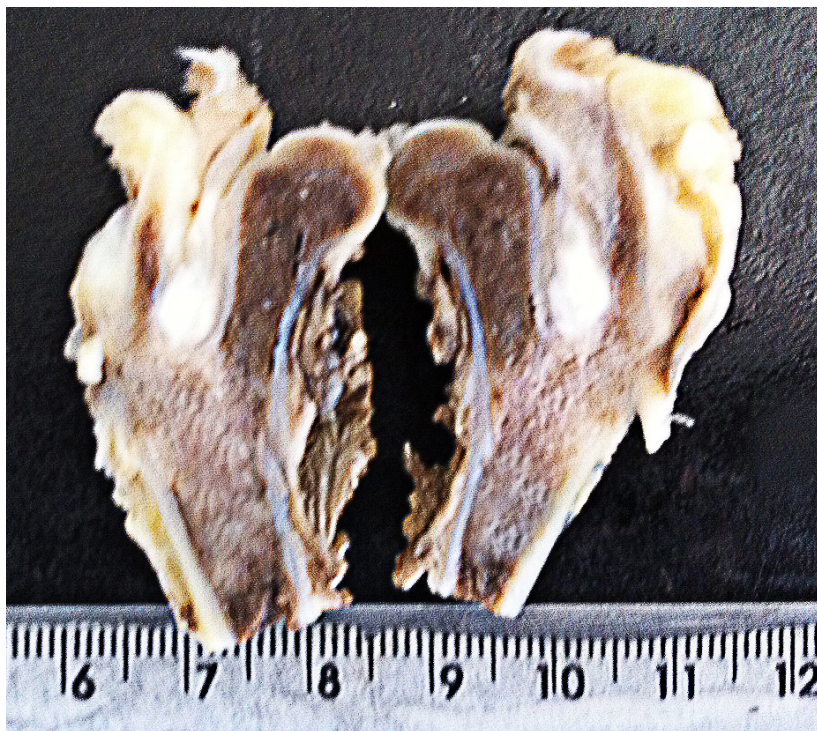


Figura 11: exemplo de aspecto macroscópico de um fêmur tratado com vidro bioativo, antes da inclusão na parafina (coelho 1, lado esquerdo).

Tabela 3 - dados individuais

coelhos	Autoenxerto								Vidro Bioativo									
	lateralidade	área (mm ²)	osteoblastos	osteócitos	osteoclastos	neoformação óssea	infiltrado inflamatório	neovascularização	fibrose	lado	área (mm ²)	osteoblastos	osteócitos	osteoclastos	neoformação óssea	infiltrado inflamatório	neovascularização	fibrose
1	D	57,8	66	60	4	3	2	0	1	E	60,0	105	38	1	3	1	2	2
2	E	77,0	72	63	1	2	1	1	2	D	68,3	70	12	0	2	1	1	2
3	D	69,0	53	47	1	2	2	2	2	E	68,3	111	55	1	3	0	2	1
4	D	65,0	49	21	2	1	1	2	2	E	76,0	120	15	0	2	1	2	2
5	E	63,0	76	65	1	3	1	2	2	D	61,8	59	33	0	2	1	1	1
6	D	68,3	65	49	2	2	2	2	2	E	75,0	93	30	1	2	1	2	2
7	D	49,5	57	30	1	1	2	2	1	E	78,0	99	28	5	3	2	2	2
8	E	58,5	83	60	4	3	2	2	1	D	77,0	87	33	1	2	1	1	2

Tabela 4 - resumo dos resultados das variáveis quantitativas

Variável	Autoenxerto (n = 8)	Vidro bioativo (n = 8)	p
dimensões (mm²)			0,142
média (DP)	63,5 (8,4)	70,5 (7,0)	
mediana (mín; máx)	64 (49,5; 77)	71,6 (60; 78)	
osteoblastos			0,037
média (DP)	65,1 (11,7)	93 (20,5)	
mediana (mín; máx)	65,5 (49; 83)	96 (59; 120)	
osteócitos			0,025
média (DP)	49,4 (16,2)	30,5 (13,4)	
mediana (mín; máx)	54,5 (21; 63)	31,5 (12; 55)	
osteoclastos			0,233*
média (DP)	2 (1,3)	1,1 (1,6)	
mediana (mín; máx)	1,5 (1; 4)	1 (0; 5)	

Resultado do teste t-Student pareado

* resultado do teste Wilcoxon pareado

Tabela 5 - resumo dos resultados das variáveis semiquantitativas

Variável	Autoenxerto (n = 8)	Vidro bioativo (n = 8)	p
neoformação óssea – n (%)			0,480
0	0 (0,0)	0 (0,0)	
1	2 (25,0)	0 (0,0)	
2	3 (37,5)	5 (62,5)	
3	3 (37,5)	3 (37,5)	
infiltrado inflamatório – n (%)			0,059
0	0 (0,0)	1 (12,5)	
1	3 (37,5)	6 (75,0)	
2	5 (62,5)	1 (12,5)	
3	0 (0,0)	0 (0,0)	
neovascularização – n (%)			>0,0999
0	1 (12,5)	0 (0,0)	
1	1 (12,5)	3 (37,5)	
2	6 (75,0)	5 (63,5)	
3	0 (0,0)	0 (0,0)	
fibrose – n (%)			0,655
0	0 (0,0)	0 (0,0)	
1	3 (37,5)	2 (25,0)	
2	5 (63,5)	6 (75,0)	
3	0 (0,0)	0 (0,0)	

Resultado do teste t-Student pareado; * resultado do teste Wilcoxon pareado

Os resultados estão resumidos nas tabelas 3, 4 e 5. A média da área do defeito criado (medida no corte longitudinal, no centro da lesão) foi de 63,5mm² no grupo controle e 70,5mm² no grupo do vidro bioativo e que essa diferença não foi significativa (p = 0,142). Não se observou diferença entre os dois grupos com relação à neoformação óssea (p = 0,480), neovascularização (p > 0,999) e fibrose (p = 0,655). Entretanto, houve uma tendência (p = 0,059) de que os fêmures tratados com vidro bioativo tenham menores graus de infiltrado inflamatório que aqueles tratados com autoenxerto.

Com relação à contagem celular, observamos que nos fêmures tratados com vidro bioativo, os valores de osteoblastos foram maiores que nos fêmures tratados com autoenxerto ($p = 0,037$), mas o número de osteócitos foi menor ($p = 0,025$). O número de osteoclastos entre os dois grupos foi semelhante ($p = 0,233$).

As figuras 12-25 são microfotografias histológicas dos fêmures tratados com autoenxerto e vidro bioativo.

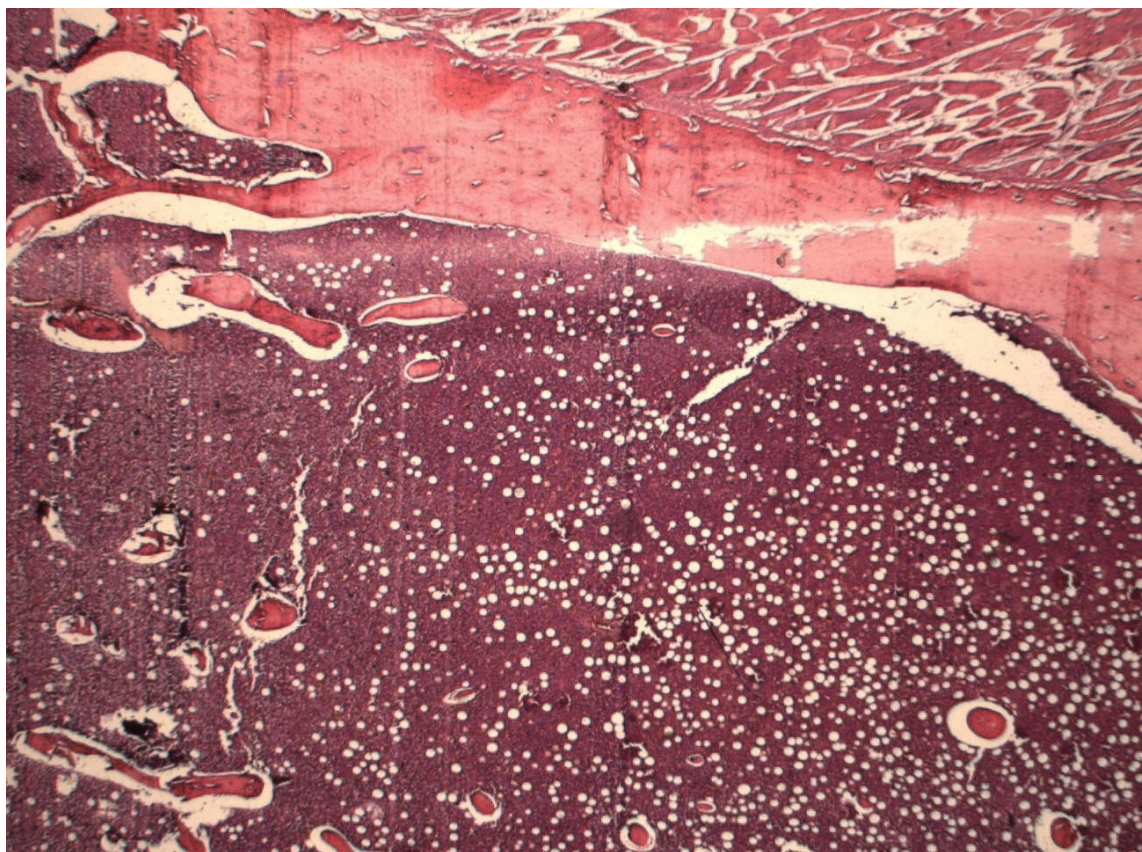


Figura 12: osso normal do coelho. Podemos ver a cortical óssea e, acima dela (canto superior direito), parte da musculatura esquelética adjacente ao fêmur proximal. Abaixo da cortical óssea, vemos o aspecto da zona intramedular, com poucas trabéculas ósseas e tecido hematopoiético exuberante. Coloração HE, aumento de 12,5X (coelho 1, lado direito, fora da área onde foi criado o defeito)

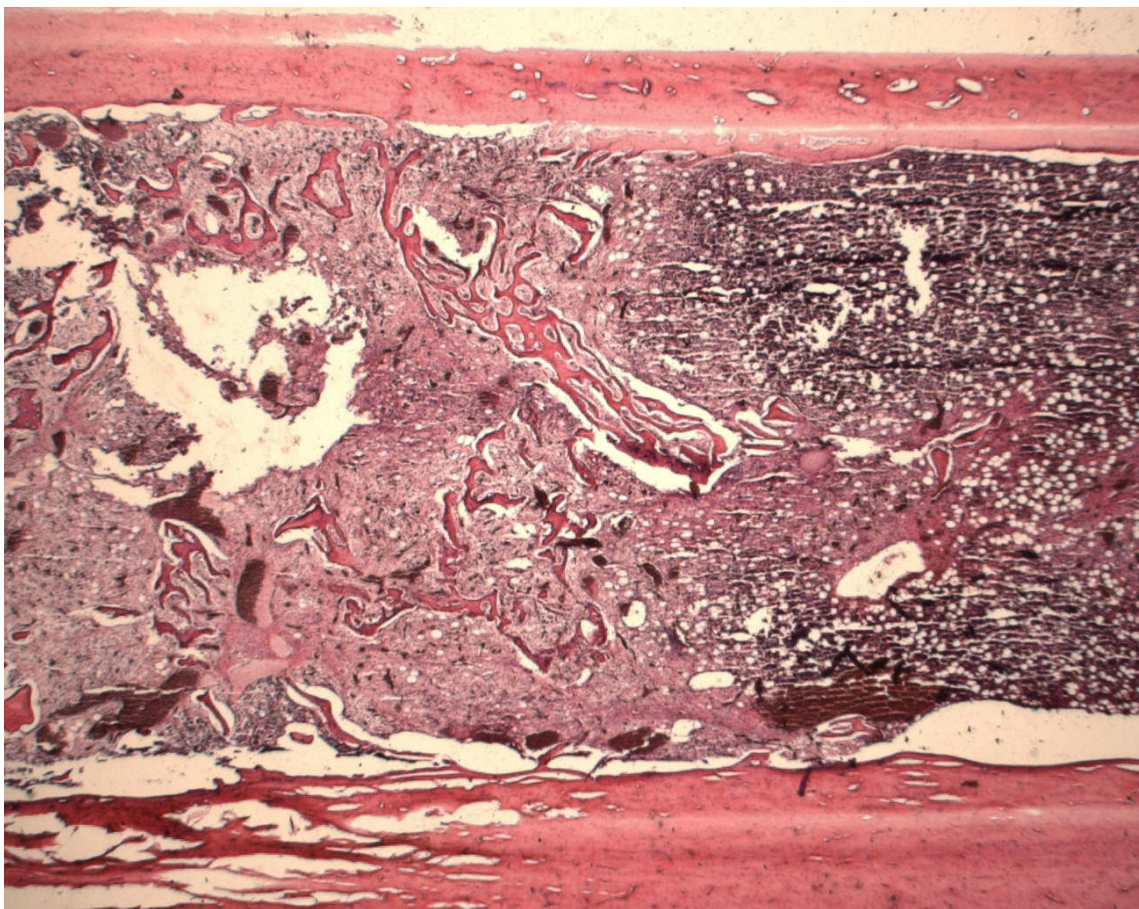


Figura 13: exemplo de fêmur tratado com autoenxerto, podendo-se visualizar as duas corticais ósseas (acima e abaixo da foto), parte do defeito criado (à esquerda) e osso normal à direita. Pode-se observar claramente a distinção entre as duas áreas; à direita, há poucas trabéculas ósseas e a medular funcionante (tecido hematopoiético) é exuberante; à esquerda, há muita fibrose e neoformação óssea, com trabéculas imaturas. Coloração HE, aumento de 12,5X (coelho 2, lado esquerdo).

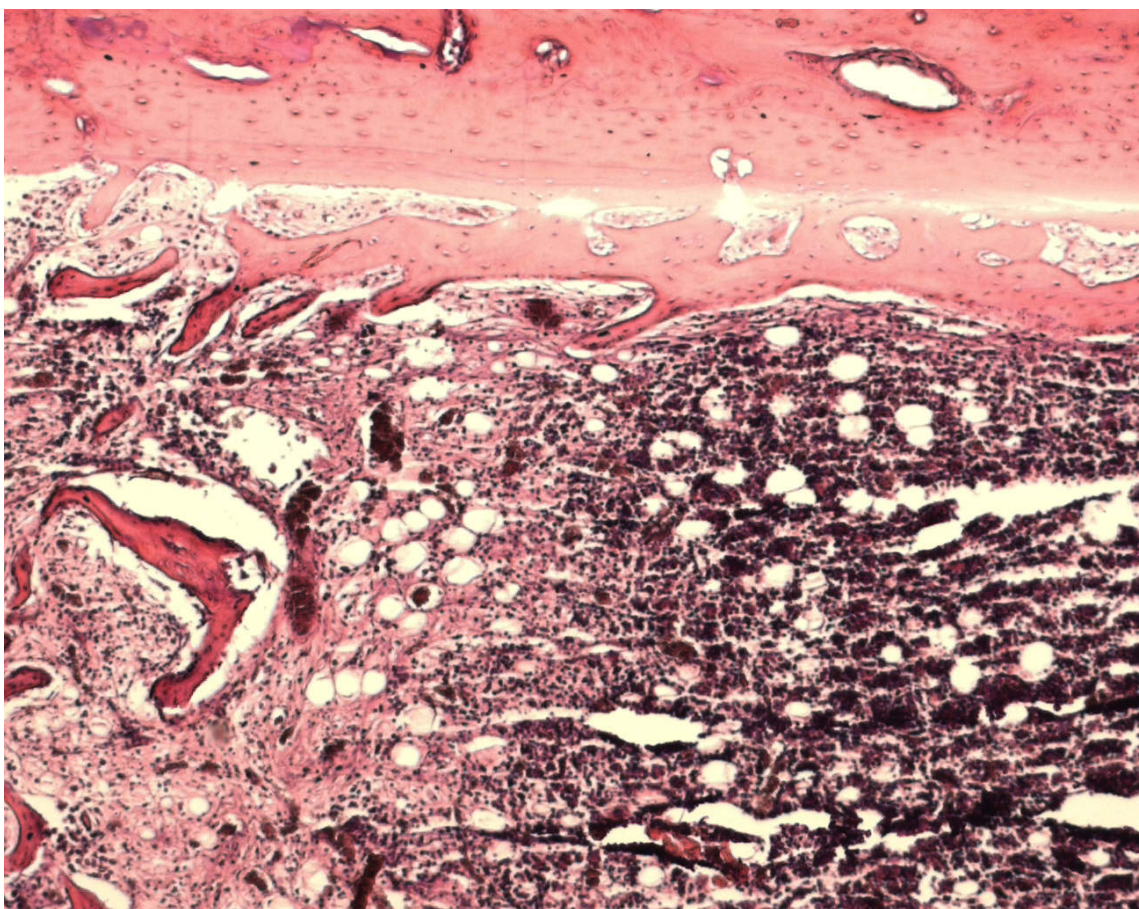


Figura 14: detalhe da nítida transição entre o defeito tratado com autoenxerto (à esquerda) e o tecido normal (à direita). À esquerda há mais fibrose e neoformação óssea, sem tecido hematopoiético, que é a quase totalidade do conteúdo intramedular da porção normal do osso, à direita. Acima, vemos a cortical óssea e o endósteo. Coloração HE, aumento de 50X (coelho 2, lado esquerdo).

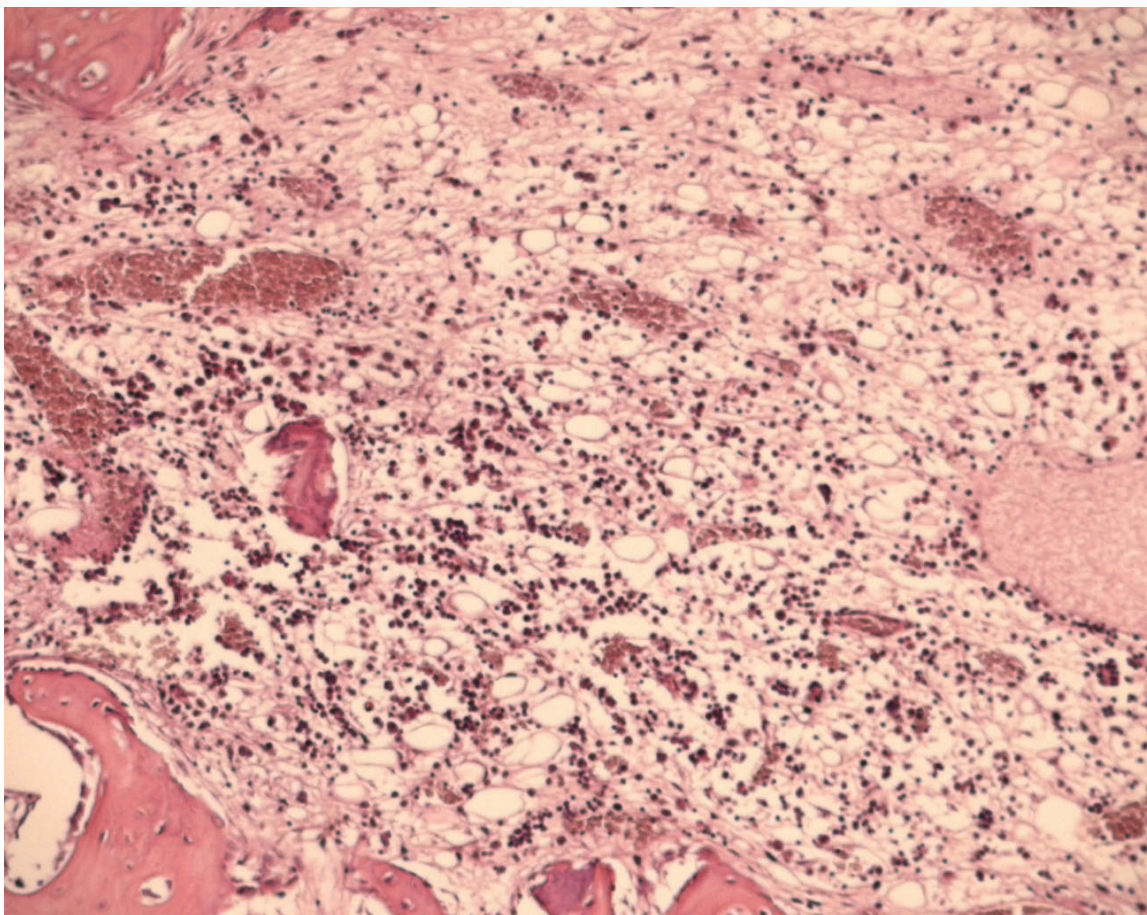


Figura 15: exemplo de fêmur tratado com autoenxerto. Nesta área a neoformação óssea é praticamente inexistente, mas há fibrose, alguns vasos neoformados (com hemáceas em seu interior) e intenso infiltrado inflamatório (células mais basofílicas). Coloração HE, aumento de 100X (coelho 4, lado direito).

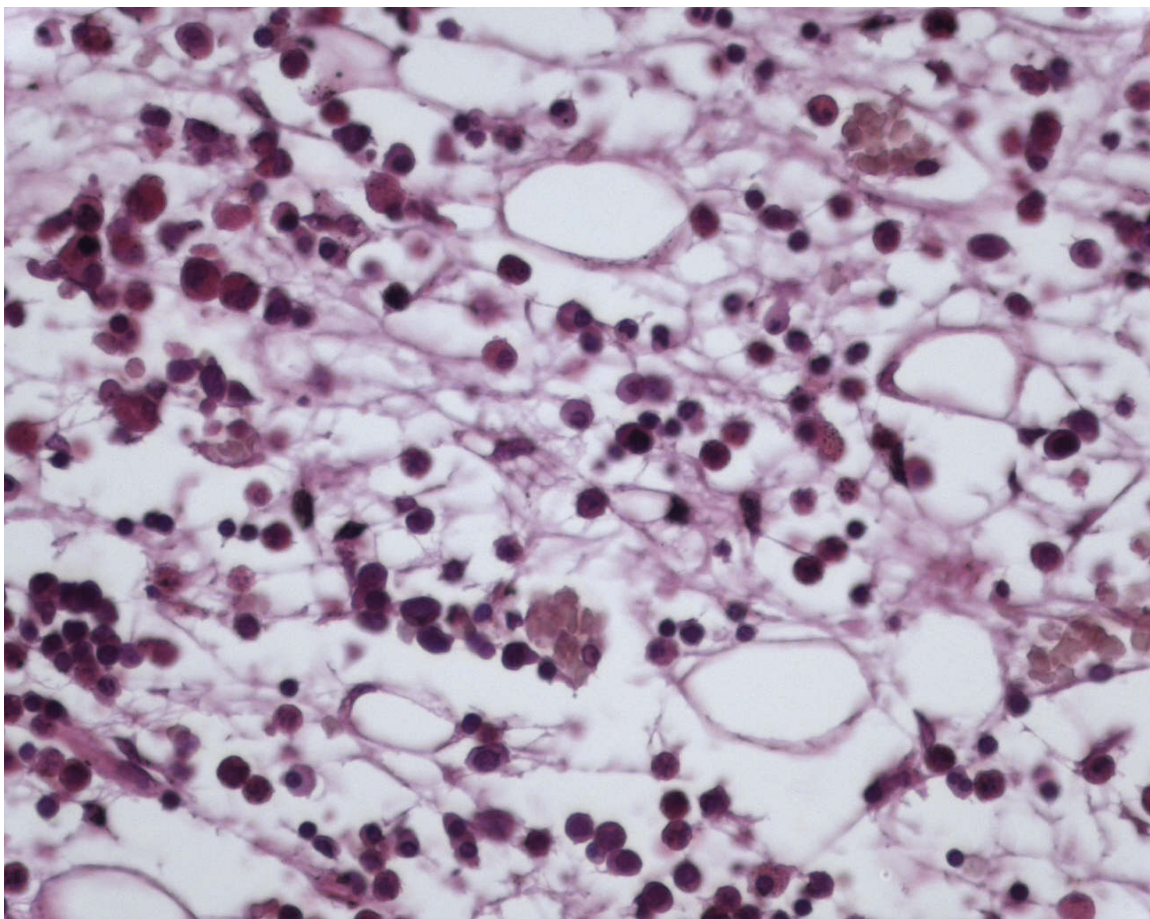


Figura 16: detalhe do aspecto das células inflamatórias encontradas em um fêmur tratado com vidro bioativo. Numerosos plasmócitos (células com citoplasma amplo e núcleo basofílico excêntrico), linfócitos (células mais basofílicas, com citoplasma escasso) e monócitos (células com mais citoplasma). Coloração HE, aumento de 400X (coelho 4, lado esquerdo).

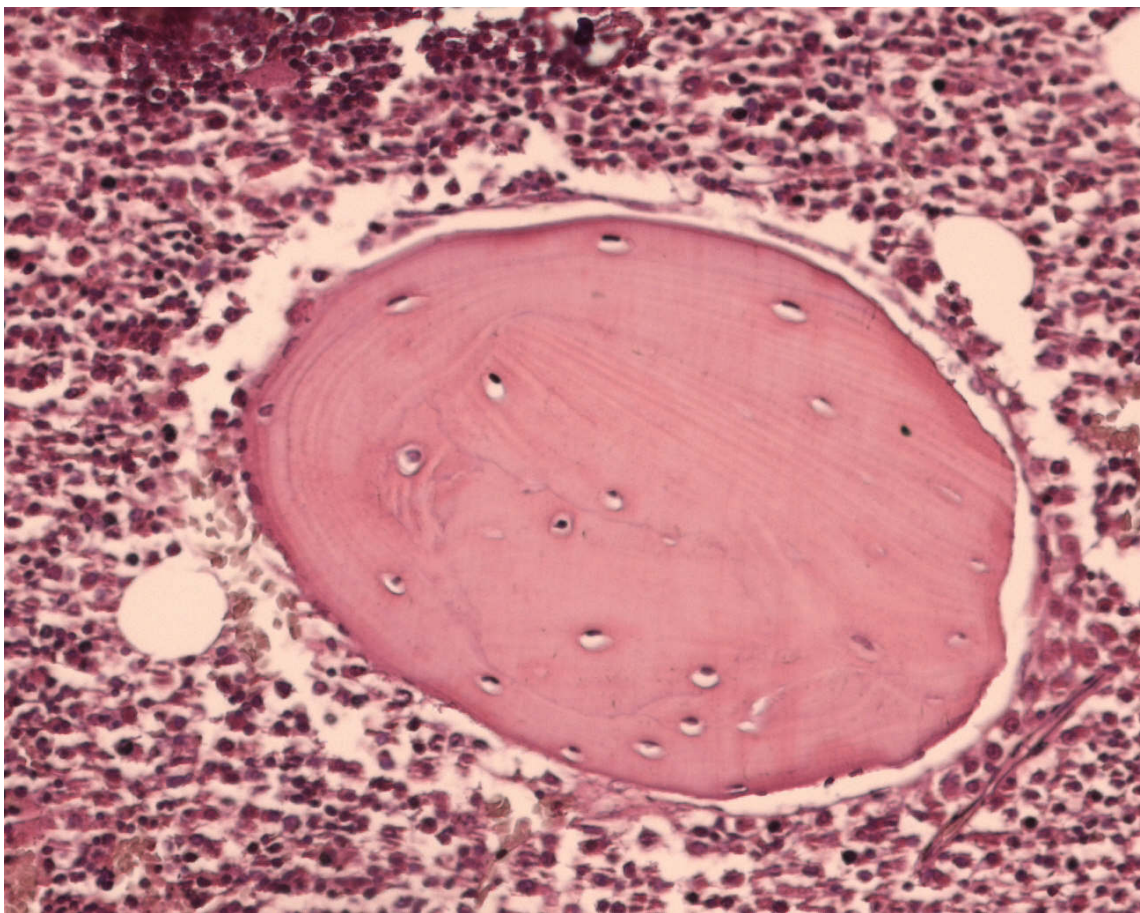


Figura 17: trabécula madura normal da medular do coelho, com poucos osteoblastos em sua superfície. Aumento de 200X (coelho 5, lado esquerdo, fora da área onde foi criado o defeito).

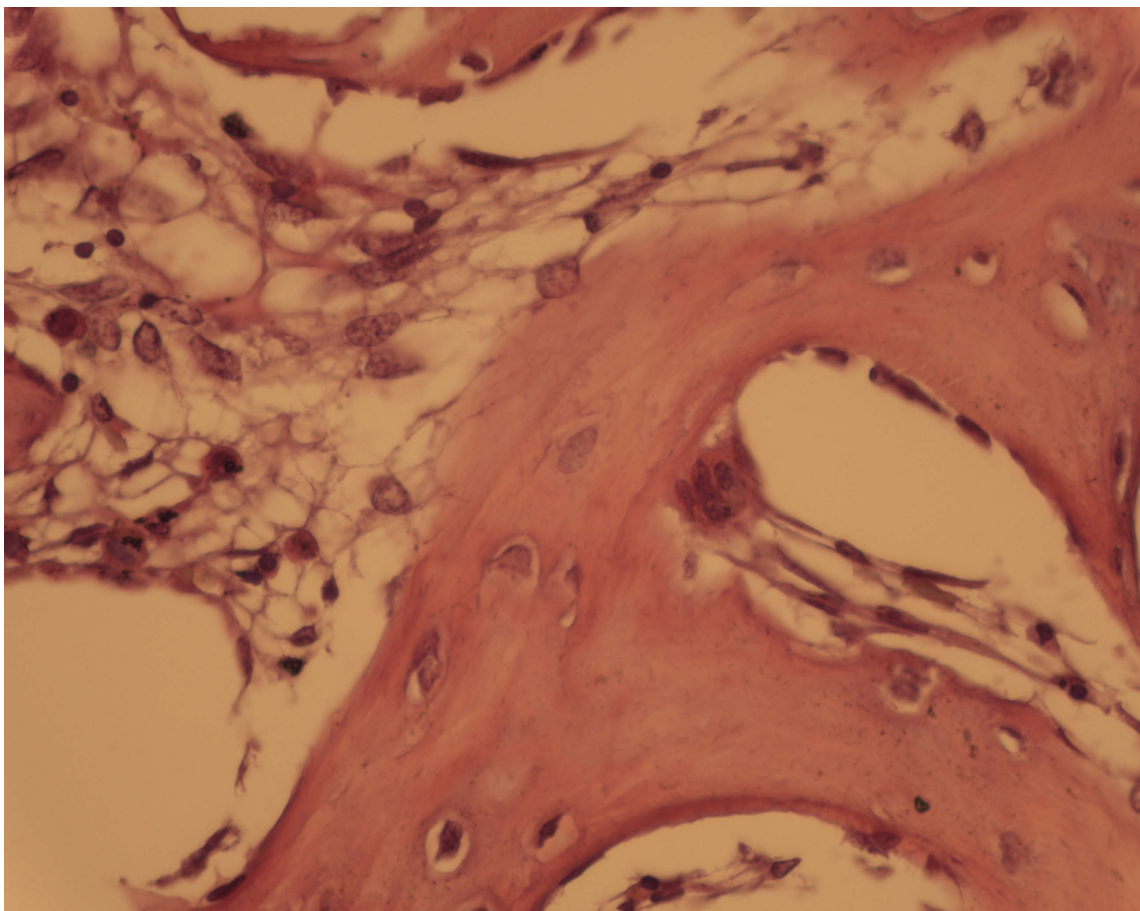


Figura 18: exemplo de trabécula neoformada, com diversos osteoblastos na superfície. Também se pode visualizar um osteoclasto, no centro da imagem. Coloração HE, aumento de 400X (coelho 4, lado direito).

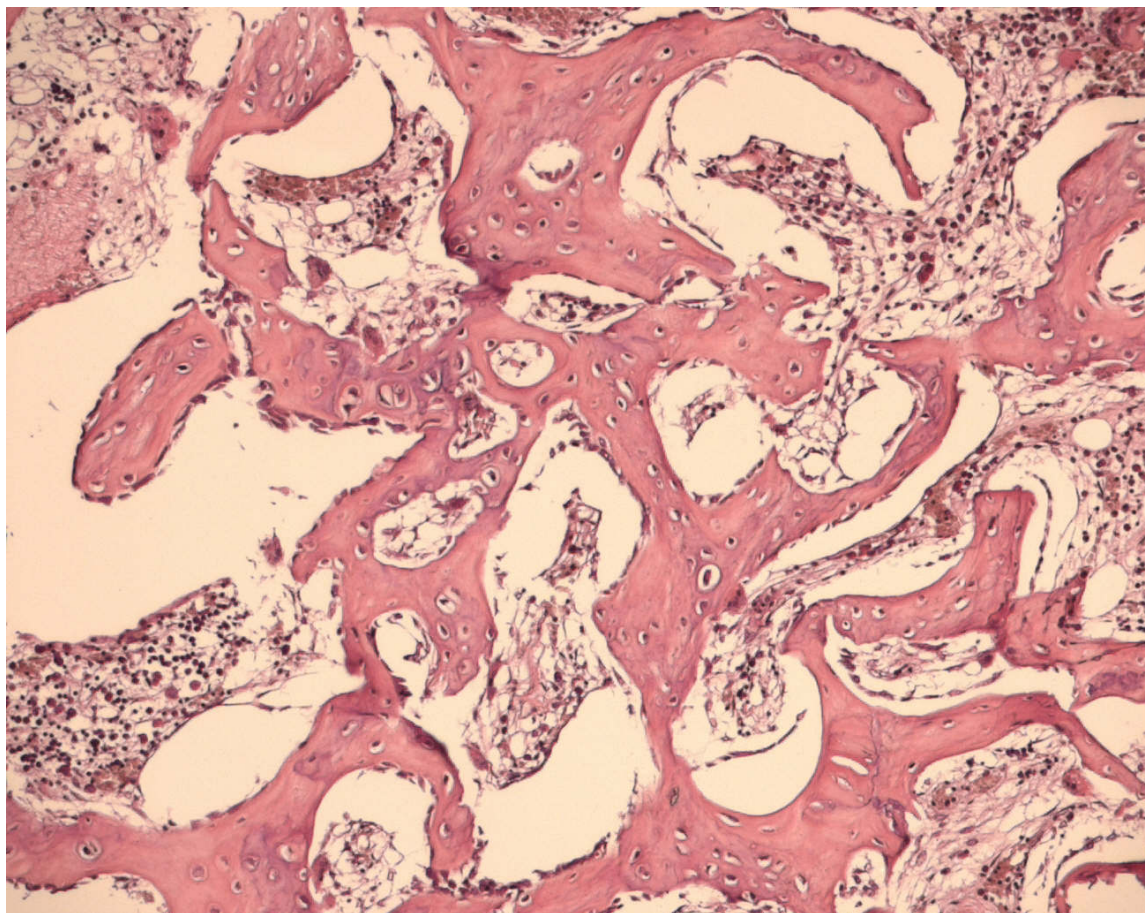


Figura 19: área com grande atividade de neoformação óssea em fêmur tratado com autoenxerto. Observamos as trabéculas ósseas neoformadas, muito diferentes da trabécula madura normal mostrada anteriormente. Observar a grande quantidade de osteoblastos na superfície da trabécula. Coloração HE, aumento de 100X (coelho 4, lado direito).

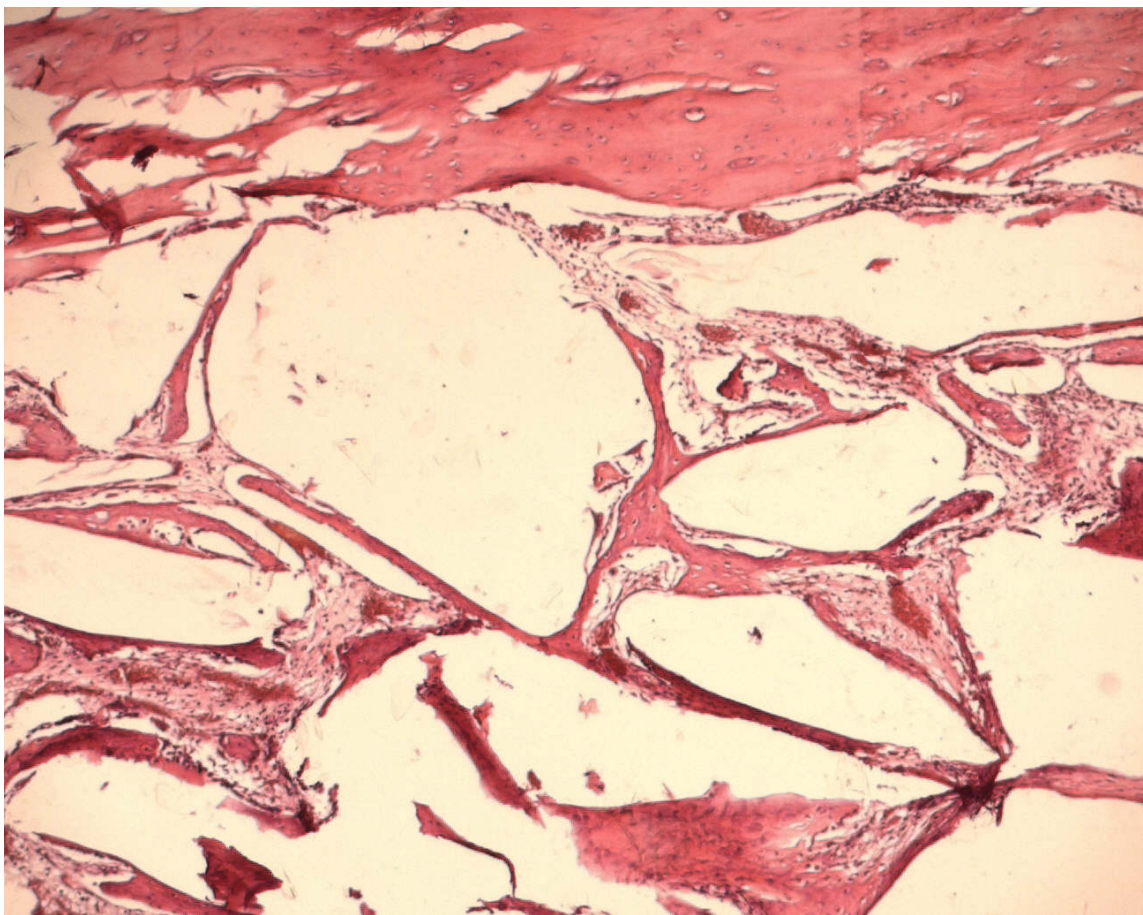


Figura 20: fêmur tratado com vidro bioativo. No topo da imagem pode-se ver a cortical óssea e, abaixo, os remanescentes dos grânulos. Tais grânulos encontram-se totalmente recobertos por trabéculas neoformadas. Coloração HE, aumento de 50X (coelho 6, lado esquerdo).

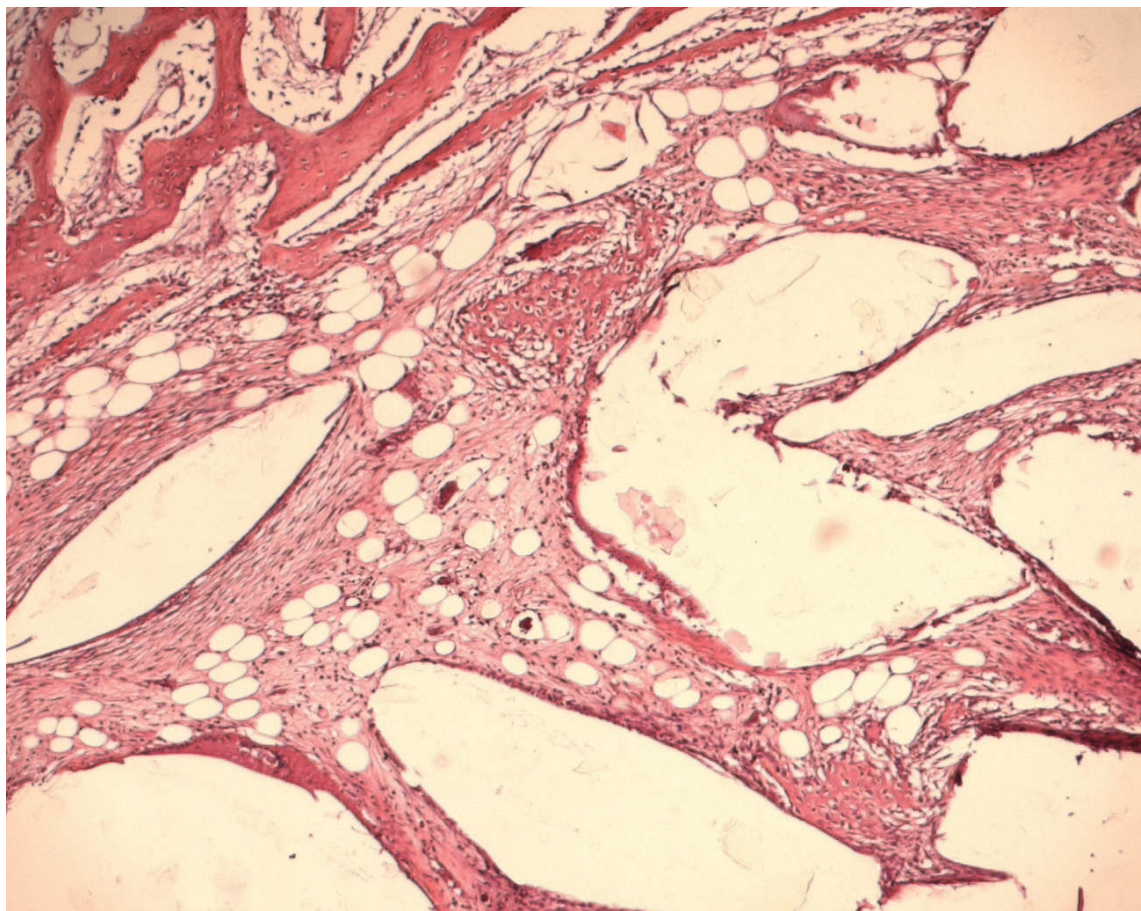


Figura 21: fêmur tratado com vidro bioativo. No canto superior esquerdo há uma área de neoformação óssea e no restante da imagem podemos ver os remanescentes dos grânulos. Os mesmos encontram-se com fina camada de trabéculas neoformadas e, entre eles, tecido fibroso e vasos neoformados. Coloração HE, aumento de 100X (coelho 7, lado esquerdo).

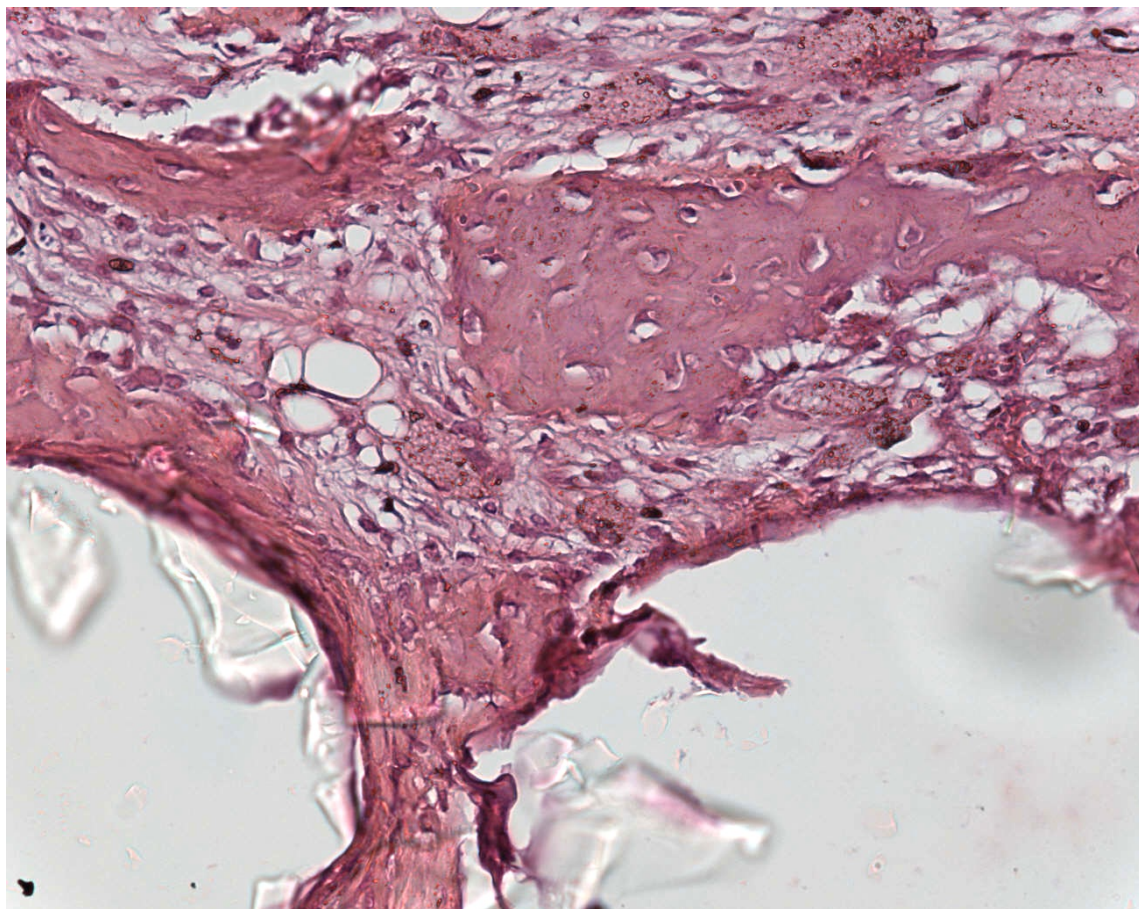


Figura 22: fêmur tratado com vidro bioativo, com intensa neoformação óssea ao redor dos grânulos e vasos neoformados. Abaixo podemos ver fragmentos remanescentes dos grânulos. Coloração HE, aumento de 200X (coelho 8, lado direito).

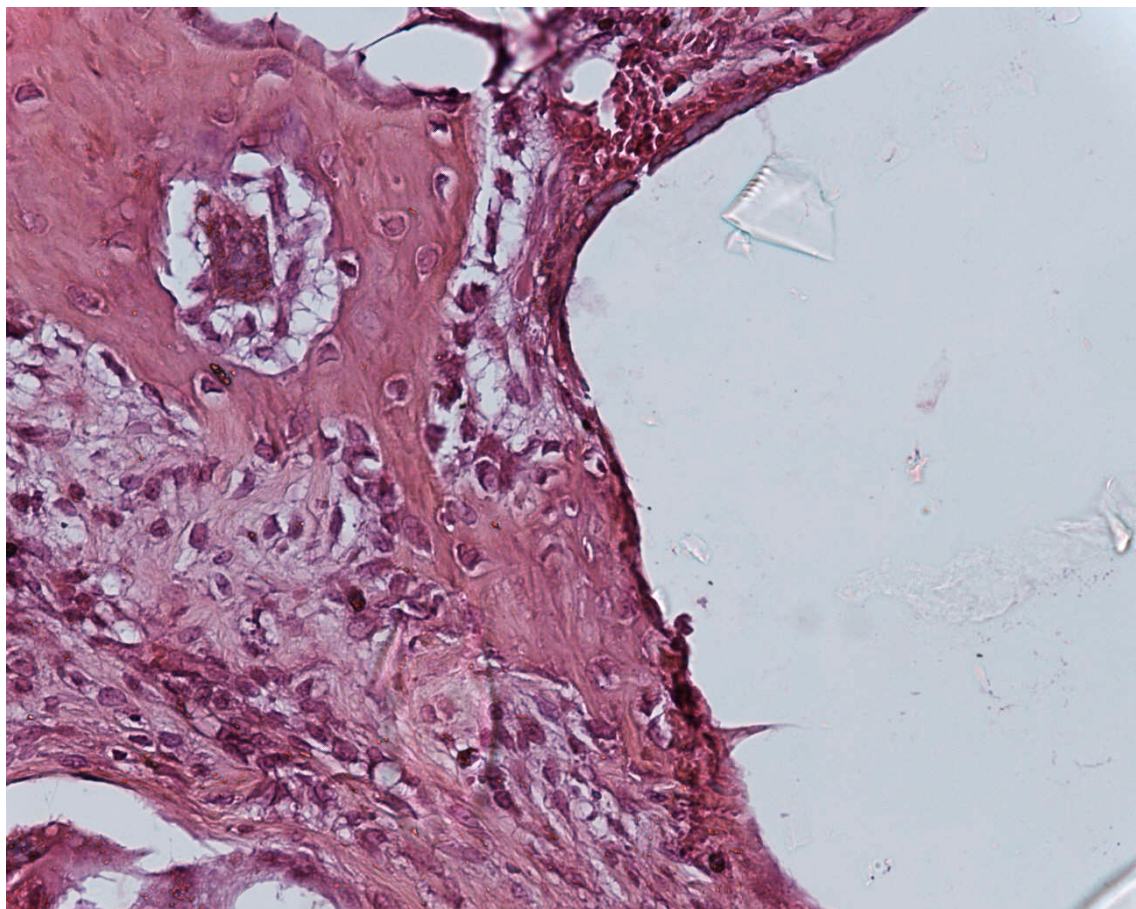


Figura 23: neoformação óssea adjacente a um grânulo de vidro bioativo. No canto superior esquerdo pode-se ver uma trabécula imatura repleta de osteoblastos. Coloração HE, aumento de 200X (coelho 7, lado esquerdo).

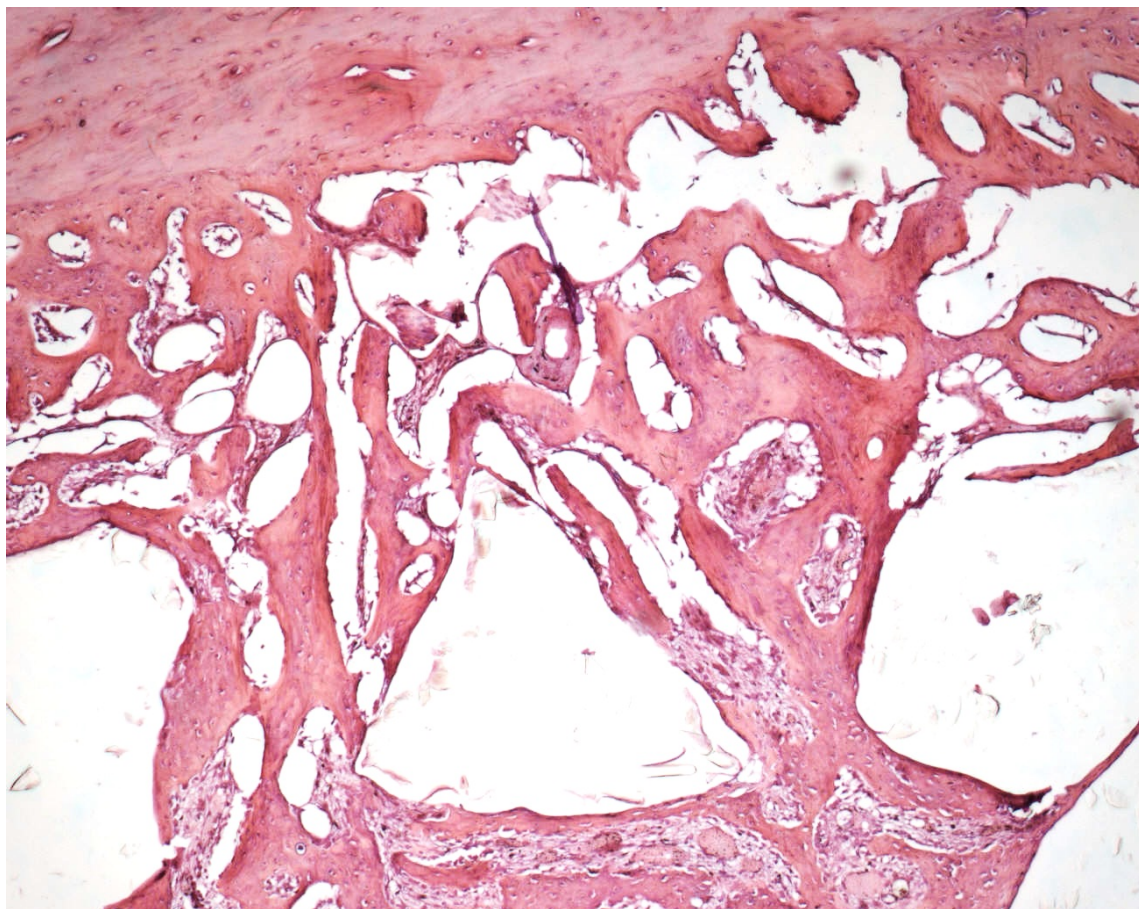


Figura 24: fêmur tratado com vidro bioativo. Área com intensa neoformação óssea, próxima a um dos limites da lesão (acima vemos a cortical óssea). Nota-se também a presença de remanescentes dos grânulos de vidro bioativo, totalmente recobertos por uma camada de osso imaturo neoformado. Coloração HE, aumento de 100X (coelho 8, lado direito).

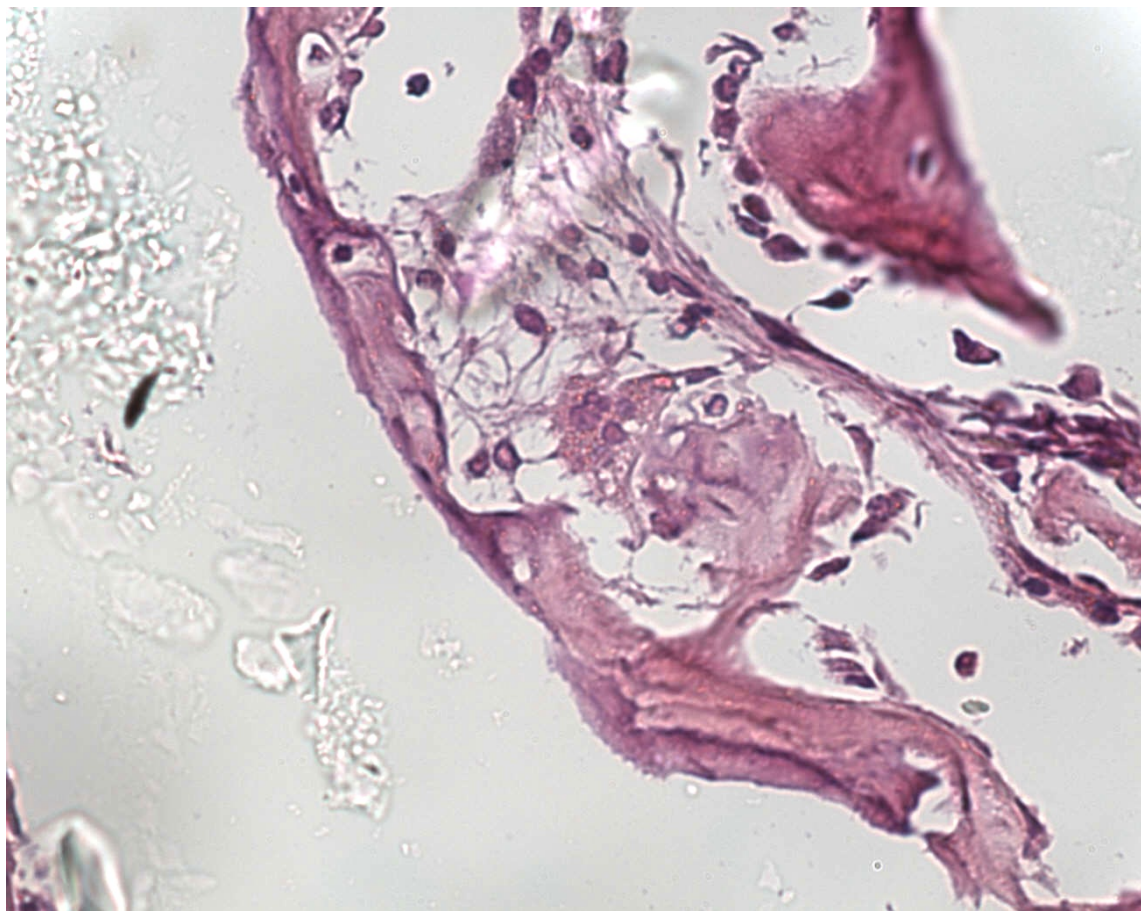


Figura 25: osteoclasto próximo à fina camada de osso neoformado adjacente a um grânulo de vidro bioativo. Coloração HE, aumento de 400X (coelho 6, lado esquerdo).

6. DISCUSSÃO

O enxerto ósseo autólogo, ou autoenxerto, pode ser empregado em todos os casos em que há perda de tecido ósseo, como as lesões cavitárias ósseas benignas. Ainda hoje, é considerado o padrão-ouro quando tratamos de enxertia óssea. Porém, há algumas limitações para seu uso, relacionadas principalmente à morbidade cirúrgica do sítio doador e à disponibilidade restrita. A busca por substitutos ósseos que tenham as qualidades do autoenxerto, porém sem as suas desvantagens, culminou nas últimas décadas com o desenvolvimento de uma nova classe de materiais, os vidros bioativos. O vidro bioativo S53P4 (assim nomeado devido à sua composição) utilizado neste trabalho foi desenvolvido na Universidade de Turku e, desde a década de 1990, alguns trabalhos foram publicados sobre o tema. Entretanto, a maioria deles foi conduzida na instituição que desenvolveu o produto, o que pode representar um viés.

O objetivo principal deste estudo foi comparar a intensidade de neoformação óssea entre os dois grupos, um tratado com autoenxerto e outro com grânulos de vidro bioativo. A igualdade encontrada entre dois grupos é condizente com os resultados de estudos prévios^{8,17,27,35}. O vidro bioativo tem um mecanismo de ação molecular que o torna osteoindutor, como explicado anteriormente. Além disso, o osso neoformado é depositado na superfície dos grânulos, de forma centrípeta. Assim, os grânulos funcionam como um arcabouço que vai sendo progressivamente reabsorvido, portanto pode-se dizer que o vidro bioativo também é osteocondutor. Dessa forma, o vidro bioativo é reabsorvível, osteocondutor e osteoindutor, que são três das características do substituto ósseo ideal.

Os objetivos secundários foram: comparar a neovascularização, o infiltrado inflamatório, a formação de fibrose e as contagens celulares de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. A neovascularização tem um papel fundamental na reparação óssea; quando ela é modesta ou ausente, a neoformação óssea fica prejudicada. Já foi demonstrado que o vidro bioativo pode promover a neovascularização^{8,25}, mas nunca havia sido feita uma comparação com o autoenxerto. O presente estudo demonstrou que a intensidade de neovascularização entre os dois grupos foi semelhante, o que corrobora a hipótese e os resultados encontrados de neoformação óssea. A intensidade do

infiltrado inflamatório também foi semelhante entre os dois grupos (até mesmo com uma pequena tendência de ser menor no grupo tratado com grânulos de vidro bioativo), mostrando que os grânulos não induzem uma resposta inflamatória exacerbada, mesmo sendo um corpo estranho. Como dito anteriormente, a biocompatibilidade é uma das características fundamentais para o substituto ósseo ideal, e a baixa intensidade de infiltrado inflamatório reacional nos defeitos tratados com vidro bioativo comprova que este material é biocompatível. Por último, a intensidade da fibrose também foi avaliada neste estudo. A fibrose aparece nos primeiros estágios de consolidação óssea (calo fibroso), portanto uma intensidade diferente entre os dois grupos poderia significar que eles se encontravam em estágios diferentes do processo, ou que a velocidade de reparação ou consolidação óssea são diferentes nos dois grupos. Porém, a intensidade de fibrose entre os dois grupos foi similar.

Este foi o primeiro estudo que realizou a contagem e comparação dos três tipos celulares fundamentais do metabolismo ósseo: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. O vidro bioativo induz um aumento de “turnover” ósseo local¹⁰, conforme explicado anteriormente. Sendo assim, era de se esperar que o número de osteoblastos e osteoclastos fosse maior no grupo do vidro bioativo que no grupo do autoenxerto. Os grânulos de vidro bioativo, além de estimular o aumento da função dos osteoblastos, estimulam o crescimento e maturação dos osteoblastos e promovem a expressão e manutenção do fenótipo de osteoblasto, retardando a diferenciação para osteócito¹⁰. Dessa forma, esperava-se que os osteócitos não estivessem aumentados quando comparados com o grupo do autoenxerto, ou até mesmo reduzidos. Os resultados obtidos neste estudo estão em conformidade com tais expectativas: o número de osteoblastos foi cerca de 50% maior no grupo do vidro bioativo e o número de osteócitos foi cerca de 30% da quantidade encontrada nos defeitos com autoenxerto.

O achado dessas diferenças entre números de osteoblastos e osteócitos no presente estudo corrobora a teoria de que o vidro bioativo aumenta o “turnover” ósseo, estimulando os osteoblastos e retardando sua diferenciação em osteócitos.

Quanto aos osteoclastos, esperávamos um aumento no grupo tratado com grânulos de vidro bioativo, pelas mesmas razões (aumento do “turnover” ósseo). Entretanto, não encontramos diferença no número de osteoclastos. Isso provavelmente deve-se ao fato de sua quantidade ser consideravelmente menor que os osteócitos ou osteoblastos. Para contornar esse fato, seria necessária uma quantidade muito maior de coelhos para se encontrar alguma diferença entre os dois grupos. Outra alternativa seria tornar maior o campo de contagem, uma vez que no campo que foi utilizado

para contagem celular neste estudo (um campo na objetiva de maior aumento, que compreende $0,17\text{mm}^2$) havia apenas um ou dois osteoblastos, ou às vezes mesmo nenhum. Entretanto, isso exigiria o uso de contagem automatizada com auxílio de software dedicado.

A escolha do intervalo de duas semanas para realização da eutanásia foi baseada em dados de estudos prévios. Em 1993, Heikkilä²⁶ comprova que com três semanas (o menor intervalo do estudo) já se observa neoformação óssea evidente e que os achados mudam muito pouco após esse período. Ele demonstrou que a espessura da neoformação óssea ao redor dos grânulos mudou pouco entre a terceira e a 12ª semana (mais da metade de todo o processo ocorre até a terceira semana). Välimäki, em 2006¹⁰, que utilizou um modelo experimental semelhante ao do trabalho de Heikkilä, demonstrou que a neoformação óssea já era abundante apenas duas semanas após o procedimento cirúrgico.

Com relação à técnica cirúrgica, pode-se criticar o método de realização dos defeitos ósseos, que foi de forma manual, o que poderia gerar alguma heterogeneidade nas cavidades. Entretanto, os defeitos do presente estudo foram homogêneos e a análise estatística demonstrou que não houve diferença nas dimensões medidas nos dois grupos. Sendo assim, o fato de ter sido utilizado um método manual e supostamente impreciso para criação dos defeitos, e não um método totalmente reprodutível, como uma trefina, por exemplo, não comprometeu os resultados obtidos no presente estudo. Além disso, o método utilizado fez com que todos os defeitos criados fossem delimitados pelas paredes internas da cortical femoral, fato que é muito mais próximo da realidade cirúrgica após uma curetagem de um tumor benigno.

Defeito crítico é um conceito que sempre deve ser abordado quando tratamos de neoformação óssea em defeitos criados artificialmente. Um defeito ósseo é “crítico” quando não há possibilidade de regeneração espontânea. Defeitos muito pequenos podem regenerar-se espontaneamente, independentemente da intervenção realizada, o que poderia eventualmente invalidar os achados do estudo. Os defeitos criados pelo método descrito foram todos críticos: em média, 6,5mm de diâmetro por 10mm de extensão longitudinal. Heikkilä em 1995²⁷ avalia o defeito crítico de fêmures de coelhos New Zealand e determina que, para ser considerado um defeito crítico, este deve ser maior que 3,5mm de diâmetro por 7mm de extensão longitudinal. Rosselli⁴¹ em 2014 também afirma que para ser crítico, o defeito deve ser maior que 4mm de diâmetro por 6mm de profundidade. Delgado-Ruiz⁴³, por sua vez, afirma que o defeito crítico em coelhos deve ter um

diâmetro de pelo menos 6mm. Essas medidas são todas significativamente menores que os defeitos criados no presente estudo.

O estudo tem limitações. A principal delas é a avaliação histológica feita visualmente, em pequeno aumento, em diversos quadrantes, e não de forma automatizada por um software apropriado, como por exemplo no estudo de Heikkilä et al.²⁷. Entretanto, o método de análise semiquantitativa utilizado que foi desenvolvido pelo Departamento de Anatomia Patológica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do HC-FMUSP já foi utilizado em outros trabalhos^{41,44-46}. De fato, o parâmetro que foi utilizado é essencialmente o mesmo que o software utiliza: a área. O software calcula a porcentagem da área do defeito criado que está ocupada por osso neoformado, dessa forma caracterizando uma análise quantitativa com alto grau de precisão. No método utilizado neste trabalho, a área em que há neoformação óssea é avaliada visualmente pelo patologista, em pequeno aumento, em diversos quadrantes do defeito ósseo criado. Os outros parâmetros semiquantitativos (neovascularização, infiltrado inflamatório e fibrose) também foram analisados da mesma forma. Certamente, um método automatizado e informatizado traria resultados mais precisos, mas o método descrito demonstra boa reprodutibilidade e é rotineiramente utilizado em trabalhos realizados no Instituto de Ortopedia e Traumatologia do HC-FMUSP que requerem análise histológica. Outra limitação foi o baixo número de coelhos utilizado (oito coelhos). O tamanho da amostra foi calculado a partir de dados do estudo piloto descrito anteriormente. Idealmente, para cálculos de tamanho de amostra, o parâmetro escolhido deve ser aquele do objetivo principal do estudo – neste caso, a neoformação óssea. Entretanto, como já foi dito, este cálculo resultou num número de 175 coelhos, considerando um poder de 80% e confiança de 95%. Seria impraticável realizar um estudo com esta quantidade de animais e a diferença possivelmente encontrada seria de magnitude muito pequena e dificilmente teria algum significado clínico. Por isso, optou-se por escolher a variável quantitativa que melhor representaria a neoformação óssea, e tal variável foi a contagem de osteoblastos, o que resultou no número de oito coelhos.

Com os resultados obtidos neste estudo, pudemos observar que os grânulos de vidro bioativo são de fácil manuseio, o que facilita o preenchimento de lesões cavitárias. O vidro bioativo possui uma importante capacidade osteocondutora, o que pôde ser demonstrado pela nítida neoformação óssea ao redor dos grânulos, dando o aspecto de que as trabéculas neoformadas

estavam emoldurando completamente os remanescentes dos grânulos. Os grânulos são progressivamente reabsorvidos centripetamente. O vidro bioativo possui uma capacidade osteoindutora que já foi descrita acima (mecanismo de ação molecular), estimulando a neoformação óssea tão intensamente quanto o autoenxerto. Como dito anteriormente, o substituto ósseo ideal deve ser biocompatível, reabsorvível, osteocondutor, osteoindutor, estruturalmente similar ao osso normal, fácil de manusear e custo-efetivo^{11,12}. Como vimos, o vidro bioativo concentra quase todas essas características. Ele só não é estruturalmente similar ao osso normal, no sentido macroestrutural, mas o é no âmbito molecular. E custo-efetividade é um aspecto difícil de ser avaliado e que não foi o escopo deste trabalho. Custo-efetividade do vidro bioativo poderia ser tema para um estudo futuro.

Embora alguns estudos clínicos já tenham sido realizados (principalmente séries de casos)^{8,35}, ainda há espaço para estudos de biologia molecular para esclarecer mais detalhes do mecanismo de ação do vidro bioativo. Como pequenas alterações na constituição dos grânulos, como a presença de outros íons, pode alterar esse processo? Como uma terapia antirreabsortiva conjunta, que inibisse os osteoclastos (por exemplo, o ácido zoledrônico), afetaria a neoformação óssea? É possível recobrir implantes com vidro bioativo, da mesma forma que alguns implantes são recobertos por hidroxiapatita? Qual seria a diferença de osteointegração de implantes (próteses metálicas, por exemplo) recobertos por vidro bioativo ou por hidroxiapatita? Como o vidro bioativo poderia ser incluído no rol de materiais passíveis de prototipagem em três dimensões e quais benefícios haveriam para a reconstrução de defeitos ósseos complexos?

Os vidros bioativos vem sendo foco de intensas pesquisas, especialmente na Universidade de Turku, Finlândia. Uma nova geração de vidros bioativos vem sendo desenvolvida desde o final dos anos 1990, contendo outros íons (Na_2O - K_2O - MgO - CaO - B_2O_3 - P_2O_5 - SiO_2) e, com esta nova fórmula, é agora possível que sejam fabricadas estruturas mais complexas, tais como microesferas, fibras e implantes porosos¹⁰.

Essas e outras perguntas demonstram que esta ainda é uma área cinzenta do conhecimento médico, e muito pode ainda ser produzido tanto no âmbito experimental, como estudos pré-clínicos e clínicos.

7. CONCLUSÕES

Defeitos ósseos cavitários em coelhos, quando tratados com vidro bioativo, apresentam neoformação óssea semelhante aos defeitos tratados com autoenxerto. Com relação à contagem celular, houve superioridade no número de osteoblastos e inferioridade no número de osteócitos nos defeitos tratados com vidro bioativo. Nas demais variáveis estudadas, os dois métodos são similares.

8. ANEXOS



A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **11/04/2012**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **024/12** intitulado: **“AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DO VIDRO BIOATIVO EM DEFEITOS ÓSSEOS CAVITÁRIOS – ESTUDO EXPERIMENTAL COMPARATIVO EM COELHOS”** que utilizará **15** animais da espécie **coelhos new zealand**, apresentado pelo **Departamento de ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Olavo Pires de Camargo

Pesquisador (a) Executante: André Ferrari de França Camargo

CEP-FMUSP, 12 de Abril de 2012.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

9. REFERÊNCIAS

1. Zwingenberger S, Nich C, Valladares RD, Yao Z, Stiehler M, Goodman SB. Recommendations and considerations for the use of biologics in orthopedic surgery. *BioDrugs*. 2012;26(4):245–56.
2. Matassi F, Nistri L, Chicon Paez D, Innocenti M. New biomaterials for bone regeneration. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2011;8(1):21–4.
3. Zabeu JLA, Mercadante MT. Bone graft substitutes compared to autologous bone graft in orthopedic surgery – Systematic literature review. *Rev Bras Ortop*. 2008;43(3):59–68.
4. Meeder PJ, Eggers C. The history of autogenous bone grafting. *Injury*. 1994;25 Suppl 1:A2–3.
5. Phillips GO. Clinical applications of bone allografts and substitutes. *World Scientific Pub Co Inc*; 2005.
6. Montgomery DM, Aronson DD, Lee CL, LaMont RL. Posterior spinal fusion: allograft versus autograft bone. *J Spinal Disord*. 1990;3(4):370–5.
7. Banwart JC, Asher MA, Hassanein RS. Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. *Spine*. 1995;20(9):1055–60.
8. Frantzen J, Rantakokko J, Aro HT, Heinänen J, Kajander S, Gullichsen E, et al. Instrumented Spondylodesis in Degenerative Spondylolisthesis With Bioactive Glass and Autologous Bone: A Prospective 11-year Follow-up. *J Spinal Disord Tech*. 2011;24(7):455–61.
9. Ahlmann E, Patzakis M, Roidis N, Shepherd L, Holtom P. Comparison of anterior and posterior iliac crest bone grafts in terms of harvest-site morbidity and functional outcomes. *J Bone Joint Surg Am*. 2002;84-A(5):716–20.
10. Välimäki VV, Aro HT. Molecular basis for action of bioactive glasses as bone graft substitute. *Scand J Surg*. 2006;95(2):95–102.
11. Greenwald A, Boden S, Goldberg V, Khan Y. Bone Graft Substitutes: *Facts, Fictions & Applications*. *Bone*. 2001;(68th annual meeting):1–6.
12. Croci AT, Camargo OP, Oliveira NR, Okane SY, Campos Filho R. The use of hydroxyapatite in the surgical treatment of benign non aggressive bone lesions. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 1994;49(3):116–9.
13. Heikkilä JT, Mattila KT, Andersson O, Knuuti J, Yli-Urpo A. Behavior of

- bioactive glass in human bone. *Bioceramics*. 1995;8:35–41.
14. Andersson O, Karlsson K. On the bioactivity of silicate glass. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 1991;129(1-3):145–51.
 15. Hamadouche M, Sedel L. Ceramics in orthopaedics. *Journal of Bone & Joint Surgery*. 2000;82-B:1095–9.
 16. Gatti A. Bioactive glasses and chemical bond. *Biomaterials*; 1992. 97-106.
 17. Virolainen P, Heikkilä J, Yli-Urpo A, Vuorio E, Aro HT. Histomorphometric and molecular biologic comparison of bioactive glass granules and autogenous bone grafts in augmentation of bone defect healing. *J. Biomed. Mater. Res.* 1997;35(1):9–17.
 18. Lindfors NC, Heikkilä JT, Koski I, Mattila K, Aho AJ. Bioactive glass and autogenous bone as bone graft substitutes in benign bone tumors. *J. Biomed. Mater. Res.* 2008;90B(1):131–6.
 19. Peltola M, Aitasalo K, Suonpää J, Varpula M, Yli-Urpo A. Bioactive glass S53P4 in frontal sinus obliteration: a long-term clinical experience. *Head Neck*. 2006;28(9):834–41.
 20. Loty C, Sautier JM, Tan MT, Oboeuf M, Jallot E, Boulekbache H, et al. Bioactive glass stimulates in vitro osteoblast differentiation and creates a favorable template for bone tissue formation. *J. Bone Miner. Res.* 2001;16(2):231–9.
 21. Munukka E, Leppäranta O, Korkeamäki M, Vaahtio M, Peltola T, Zhang D, et al. Bactericidal effects of bioactive glasses on clinically important aerobic bacteria. *J Mater Sci: Mater Med.* 2008;19(1):27–32.
 22. Leppäranta O, Vaahtio M, Peltola T, Zhang D, Hupa L, Hupa M, et al. Antibacterial effect of bioactive glasses on clinically important anaerobic bacteria in vitro. *J Mater Sci: Mater Med.* 2008;19(2):547–51.
 23. Clark AE, Hench LL, Paschall HA. The influence of surface chemistry on implant interface histology: a theoretical basis for implant materials selection. *J. Biomed. Mater. Res.* 1976;10(2):161–74.
 24. Bauer TW, Muschler GF. Bone Graft Materials: An Overview of the Basic Science. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2000;371:10.
 25. Peltola MJ, Aitasalo KM, Suonpää JT, Yli-Urpo A, Laippala PJ. In vivo model for frontal sinus and calvarial bone defect obliteration with bioactive glass S53P4 and hydroxyapatite. *J. Biomed. Mater. Res.* 2001;58(3):261–9.

26. Heikkilä JT, Aho AJ, Yli-Urpo A, Andersson OH, Aho HJ, Happonen RP. Bioactive glass versus hydroxylapatite in reconstruction of osteochondral defects in the rabbit. *Acta Orthop Scand.* 1993;64(6):678–82.
27. Heikkilä JT, Aho HJ, Yli-Urpo A, Happonen RP, Aho AJ. Bone formation in rabbit cancellous bone defects filled with bioactive glass granules. *Acta Orthop Scand.* 1995;66(5):463–7.
28. Turunen T, Peltola J, Helenius H, Yli-Urpo A, Happonen RP. Bioactive glass and calcium carbonate granules as filler material around titanium and bioactive glass implants in the medullar space of the rabbit tibia. *Clin Oral Implants Res.* 1997;8(2):96–102.
29. Peltola M, Suonpää J, Aitasalo K, Varpula M, Yli-Urpo A, Happonen RP. Obliteration of the frontal sinus cavity with bioactive glass. *Head Neck.* 1998;20(4):315–9.
30. Peltola MJ, Aitasalo KMJ, Suonpää JTK, Yli-Urpo A, Laippala PJ, Forsback A-P. Frontal sinus and skull bone defect obliteration with three synthetic bioactive materials. A comparative study. *J. Biomed. Mater. Res.* 2003;66(1):364–72.
31. Lindfors NC, Aho AJ. Granule size and composition of bioactive glasses affect osteoconduction in rabbit. *J Mater Sci: Mater Med.* 2003;14(4):365–72.
32. Välimäki V-V, Moritz N, Yrjans JJ, Dalstra M, Aro HT. Peripheral quantitative computed tomography in evaluation of bioactive glass incorporation with bone. *Biomaterials.* 2005;26(33):6693–703.
33. Lindfors NC, Heikkilä JT, Aho AJ. Long-term evaluation of blood silicon and osteocalcin in operatively treated patients with benign bone tumors using bioactive glass and autogenous bone. *J. Biomed. Mater. Res.* 2008;87B(1):73–6.
34. Lindfors NC. Treatment of a recurrent aneurysmal bone cyst with bioactive glass in a child allows for good bone remodelling and growth. *Bone.* 2009;45(2):398–400.
35. Lindfors NC, Koski I, Heikkilä JT, Mattila K, Aho AJ. A prospective randomized 14-year follow-up study of bioactive glass and autogenous bone as bone graft substitutes in benign bone tumors. *J. Biomed. Mater. Res.* 2010;94(1):157–64.
36. Lindfors NC, Hyvönen P, Nyysönen M, Kirjavainen M, Kankare J, Gullichsen E, et al. Bioactive glass S53P4 as bone graft substitute in treatment of osteomyelitis. *Bone. Elsevier Inc;* 2010;47(2):212–8.
37. Heikkilä JT, Kukkonen J, Aho AJ, Moisander S, Kyyrönen T, Mattila K. Bioactive glass granules: a suitable bone substitute material in the operative

- treatment of depressed lateral tibial plateau fractures: a prospective, randomized 1 year follow-up study. *J Mater Sci: Mater Med*. 2011;22(4):1073–80.
38. Perna K, Koski I, Mattila K, Gullichsen E, Heikkilä J, Aho A, et al. Bioactive glass S53P4 and autograft bone in treatment of depressed tibial plateau fractures - a prospective randomized 11-year follow-up. *J Long Term Eff Med Implants*. 2011;21(2):139–48.
 39. Kirkwood BR, Sterne J. *Essential Medical Statistics*. 3rd ed. Massachusetts, USA: Wiley-Blackwell; 2014.
 40. Brasil. Lei nº 11.794 de 08 de outubro de 2008. Estabelece procedimentos para uso científico de animais. *Diário Oficial da União*. Brasília (DF); 2008.
 41. Rosselli JEGC, Martins DMFS, Martins JL, Oliveira CRGCM de, Fagundes DJ, Taha MO. The effect of simvastatin on the regeneration of surgical cavities in the femurs of rabbits. *Acta Cir Bras*. 2014;29(2):87–92.
 42. Kirkwood B, Sterne J. *Essential Medical Statistics*. 2nd ed. Massachusetts (USA): Blackwell Science; 2006.
 43. Delgado-Ruiz RA, Calvo-Guirado JL, Abboud M, Ramirez-Fernández MP, Maté-Sánchez JE, Negri B, et al. Porous titanium granules in critical size defects of rabbit tibia with or without membranes. *Int J Oral Sci*. 2014;6(2):105–10.
 44. Rosselli JEGC. *Estudo do efeito da simvastatina na reparação óssea de cavidades cirúrgicas em fêmur de coelhos* [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2012.
 45. Barbosa MO, Cristante AF, Santos GBD, Ferreira R, Marcon RM, Barros Filho TEP de. Neuroprotective effect of epidural hypothermia after spinal cord lesion in rats. *Clinics (Sao Paulo)*. 2014;69(8):559–64.
 46. Narazaki DK, Barros Filho TEP de, Oliveira CRGCM de, Cristante AF, Iutaka AS, Marcon RM, et al. Spinal cord regeneration: the action of neurotrophin-3 in spinal cord injury in rats. *Clinics (Sao Paulo)*. 2006;61(5):453–60.