

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS
CURSO DE MESTRADO

ÓXIDO DE GRAFENO NO REPARO DE DEFEITO ÓSSEO
SEGMENTAR EXPERIMENTAL EM RÁDIO DE COELHOS

PAULO HENRIQUE DE AFFONSECA JARDIM

CAMPO GRANDE, MS
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS
CURSO DE MESTRADO

**ÓXIDO DE GRAFENO NO REPARO DE DEFEITO ÓSSEO
SEGMENTAR EXPERIMENTAL EM RÁDIO DE COELHOS**

PAULO HENRIQUE DE AFFONSECA JARDIM

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias como requisito
para obtenção do título de Mestre
em Ciências Veterinárias
Orientador: Prof. Dr. Fabrício de
Oliveira Frazílio

CAMPO GRANDE, MS
2018



Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
 Coordenadoria de Pós-Graduação (CPG/PROPP)



Ata de Defesa de Dissertação
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
Mestrado

Aos vinte e nove dias do mês de junho do ano de dois mil e dezoito, às treze horas e trinta minutos, na sala A da Pós-Graduação da FAMEZ/UFMS, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Fabricio de Oliveira Frazilio (UFMS), Fernando Arevalo Batista (UFMS) e Iandara Schettert Silva (UFMS), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho do aluno: **PAULO HENRIQUE DE AFFONSECA JARDIM**, CPF 02166728138, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Curso de Mestrado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**ÓXIDO DE GRAFENO NO REPARO DE DEFEITO ÓSSEO SEGMENTAR EXPERIMENTAL EM RÁDIO DE COELHOS**" e orientação de Fabricio de Oliveira Frazilio. O presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra ao aluno que expôs sua Dissertação. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, o presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu Parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR

Dr. Fabricio de Oliveira Frazilio

Dr. Fernando Arevalo Batista

Dra. Iandara Schettert Silva

Dra. Mariana Isa Poci Palumbo (Suplente)

ASSINATURA

Fabricio de Oliveira Frazilio
Fernando Arevalo Batista
Iandara Schettert Silva

AVALIAÇÃO

Aprovado
Aprovado
Aprovado

RESULTADO FINAL:

Aprovação

Aprovação com revisão

Reprovação

OBSERVAÇÕES:

Nada mais havendo a ser tratado, o Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinaturas:

Fabricio de Oliveira Frazilio *Paulo Henrique de A. Jardim*
 Presidente da Banca Examinadora Aluno

Dedico este trabalho a minha mãe Maria Inês de Affonseca Jardim,
ao meu pai Wilson Nunes Jardim, ao meu irmão Luiz Renato de
Affonseca Jardim e a minha irmã Ana Carolina de Affonseca Jardim
que me proporcionaram saúde e ensino.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me proporcionar o ambiente psicológico e social para que os obstáculos da vida fossem vencidos com maior naturalidade e leveza.

A minha mãe por ser o minha maior incentivadora e exemplo de dedicação ao ensino e estudo.

Ao meu pai por ter sido um exemplo de humildade, humanização e boa índole.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fabrício de Oliveira Frazílio por acreditar, ensinar e fornecer as oportunidades de estudo desde a graduação.

Aos Professores, Dr. Além-Mar Bernardes Gonçalves e Diego Alves por fornecer contribuição técnica e literal para a produção das esponjas com o biomaterial.

Ao Prof. Dr. Eric Schmidt Rondon pela contribuição teórica e conselhos durante o estudo.

Ao Prof. Dr. Danilo Carloto Gomes por doar seu tempo e conhecimento a nível histológico

A Prof. Dra. Iandara Schetterd Silva pela confiança e contribuição técnica autorizando a utilização da estrutura laboratorial.

A FINEP por contribuir com o fornecimento do equipamento de microtomografia computadorizada de raios-x.

A Profa. Dra. Larissa Correa Hermeto pela ajuda técnica e teórica.

A Karen Fernanda da Silva por fornecer os cuidados necessários anestésicos além de contribuir com ideias e conselhos.

A Maria Clara Echeverria Aragão, Patrícia Pizani, Felipe Granado e Igor Ortiz pela dedicação com cuidados diários com os animais.

A Beatriz Candolo Marques pela contribuição técnica e no equilíbrio emocional necessário nos momentos difíceis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 Tecido e Reparo Ósseo	17
3.2 Óxido de Grafeno.....	19
3.3 Esponja de Colágeno Hidrolisada.....	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Locais de Desenvolvimento	23
4.2 Animais e Grupos Experimentais	23
4.3 Síntese do Óxido de Grafeno e Embebição da Esponja de Colágeno.....	24
4.4 Pré-Cirúrgico	25
4.5 Anestesia	25
4.6 Indução do Defeito Ósseo e Aplicação das Esponjas.....	26
4.7 Pós-Operatório	29
4.8 Avaliações Radiológicas	30
4.9 Delineamento do experimento	30
4.10 Protocolo de eutanásia e descarte	31
4.11 Avaliação de energia de raios-x por Microtomografia Computadorizada	32
4.12 Análise Estatística	34
5 RESULTADOS	35
5.1 Ponte óssea	35
5.1.1 Estudo comparativo dos defeitos ósseos tratados e não tratados em cada grupo; tratados e tratados de grupos diferentes; não tratados e não tratados de grupos diferentes	35
5.2 Preenchimento ósseo	38

5.2.1 Estudo comparativo dos defeitos ósseos tratados e não tratados em cada grupo; tratados e tratados de grupos diferentes; não tratados / não tratados de grupos diferentes	38
5.3. Energia de raios-x no defeito ósseo	41
6 DISCUSSÃO	44
7 CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	50

LISTA DE FIGURAS

Figura I - Indução do defeito ósseo. A) Incisão crânio-medial de pele e subcutâneo. B) Isolamento da musculatura e exposição óssea. C) Distância de 2 centímetros da articulação. D) Marcação da segunda linha de osteotomia pela extremidade do osteótomo de 0,5cm. E) Osteotomia com auxílio da serra circular. F) Linhas das osteotomias realizadas.....	27
Figura II - Ostectomia e implantação da esponja. A) Falha óssea produzida. B) Averiguação do comprimento de 0,5cm de falha óssea. C) Implantação da esponja no local da falha óssea. D) Esponja no local da falha óssea. E) Esponja com óxido de grafeno. F) Esponja esculpida no formato do fragmento ósseo removido.....	28
Figura III - Preparo da peça para análise de densidade óssea. A) Membros torácicos de dois coelhos. B) Desarticulação rádio-cárpica dos membros. C) Peça acomodada na gaveta do aparelho. D) Local de introdução da gaveta para análise. E) Seleção da opção de retângulo para análise. F) Retângulos realizados no local da falha óssea	33
Figura IV – Representação gráfica da predominância de classificações “Não Observada” em relação a “Baixa” nas avaliações de ponte óssea aos 15 dias de pós-operatório	35
Figura V – Aspecto radiográfico da formação de ponte óssea aos 30 e 45 dias de pós-operatório. Observe ponte óssea classificada como “Intensa” em B (setas verdes) em defeito ósseo do grupo GGO aos 30 dias e ponte óssea classificada como “Baixa” em seu controle GGOC (seta, E) possível de ser visualizada apenas em projeção crânio-caudal. Em H observe ponte óssea classificada como “Moderada” (setas), se tornando mais uniforme e radiopaca em (I) visualizadas em defeitos ósseos do grupo GEC. Em (K e L, círculo), visualizar aumento de radiopacidade uniforme do grupo GECC aos 45 dias.....	36

Figura VI – Scores e representações estatísticas identificados nos defeitos ósseos relacionadas a ponte óssea aos 30 e 45 dias de pós-operatório. A) Scores de ponte óssea encontrados nos defeitos ósseos aos 30 dias. B) Medianas e interquartis das análises de ponte óssea aos 30 dias. C) Scores de ponte óssea encontrados nos defeitos ósseos aos 45 dias. D) Medianas e interquartis das análises de ponte óssea aos 45 dias	37
Figura VII – Scores e representações estatísticas identificados nos defeitos ósseos relacionadas a ponte óssea aos 60 dias de pós-operatório. A) Scores de ponte óssea encontrados nos defeitos ósseos. B) Medianas e interquartis das análises de ponte óssea. C) Aspecto radiográfico de defeito ósseo tratado com óxido de grafeno classificada como 3 em projeção médio-lateral e projeção crânio-caudal em (D).	38
Figura VIII – Aspecto radiográfico pós-cirúrgico das possíveis classificações de preenchimento do defeito ósseo encontradas nos grupos. A) “Ausente”. B) “Baixa”. C) “Moderada”. D) “Intensa”. Notar ausência de reação em (A), aumento de radiopacidade das extremidades do defeito ósseo em (B), mineralização difusa porém incompleta em (C) e mineralização próxima de completa em (D).	39
Figura IX – Scores e representações estatísticas identificados nos defeitos ósseos relacionadas ao preenchimento ósseo aos 15 e 30 dias de pós-operatório. A) Scores de preenchimento ósseo avaliados aos 15 dias. B) Medianas e interquartis das análises de preenchimento ósseo aos 15 dias. C) Scores de preenchimento ósseo avaliados aos 30 dias. D) Medianas e interquartis das análises de preenchimento ósseo aos 30 dias.	40
Figura X – Scores e representações estatísticas identificados nos defeitos ósseos relacionadas ao preenchimento ósseo aos 45 e 60 dias de pós-operatório. A) Scores de preenchimento ósseo avaliados aos 45 dias. B) Medianas e interquartis das análises de preenchimento ósseo aos 45 dias. C) Scores de preenchimento ósseo avaliados aos 60 dias. D) Medianas e interquartis das análises de preenchimento ósseo aos 60 dias.	41

- Figura XI – Imagens da análise de intensidade de raios-x realizadas pelo aparelho de microtomografia computadorizada. Círculo amarelo - Seleção da região de análise (retângulos azuis e vermelhos) para obtenção dos resultados. A) Imagem de defeito ósseo com pouca reação local. B) Imagem de defeito ósseo com moderada reação local. C) Imagem de defeito ósseo consolidado. 42
- Figura XII – Valores de energia de raios-x (X.D.) obtidos para as análises e suas representações estatísticas. A) 30 dias pós-cirúrgico. B) representação gráfica das análises estatísticas aos 30 dias pós-cirúrgico. C) 60 dias pós-cirúrgico D) representação gráfica das análises estatísticas aos 60 dias de pós-cirúrgico..... 43

AUTORIZAÇÃO DE COMITÊ



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada "Óxido de grafeno no reparo de defeito ósseo segmentar experimental em rádio de coelhos", registrada com o nº 817/2016, sob a responsabilidade de **Fabricio de Oliveira Frazilio** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 11ª reunião ordinária do dia 09/12/2016.

FINALIDADE	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	15/01/2017 a 01/12/2017
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Oryctolagus cuniculus</i> / Nova Zelândia Branco
Nº de animais	24
Peso/Idade	4 kg/adultos
Sexo	Macho e Fêmea
Origem	Criadouro particular

Beixeira
Maria Araújo Teixeira
Coordenadora da CEUA/UFMS
Campo Grande, 09 de dezembro de 2016.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua.2000@gmail.com
fone (67) 3345-7925

RESUMO

JARDIM, P.H.A. Óxido de grafeno no reparo de defeito ósseo segmentar experimental em rádio de coelhos. 2018. 60p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2018.

Estudos recentes com óxido de grafeno têm demonstrado efeitos promissores na consolidação óssea. Objetivou-se com este estudo avaliar a consolidação de defeitos ósseos segmentares em rádios de coelhos tratados com óxido de grafeno. Foram utilizados 24 coelhos brancos da raça Nova Zelândia adultos com um peso de $3 \pm 0,5$ kg, 12 machos e 12 fêmeas, os quais foram submetidos à indução de defeitos ósseos em ambos os rádios. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: esponja de colágeno + óxido de grafeno = GGO, n = 12 (6 machos e 6 fêmeas) e esponja de colágeno = GEC, n = 12 (6 machos e 6 fêmeas). Em ambos os grupos, o membro direito dos animais foi submetido apenas ao defeito ósseo e não receberam tratamento, sendo denominados: Esponja de colágeno + óxido de grafeno controle = GGOC e Esponja de colágeno controle = GECC. O defeito ósseo no membro esquerdo foi preenchido com os seguintes biomateriais, conforme cada grupo: esponja de colágeno hidrolisada liofilizada + óxido de grafeno (GGO) ou esponja de colágeno hidrolisada liofilizada (GEC). Para avaliação entre os grupos, foram realizadas análises radiológicas pré-operatória, pós-operatória e a cada 15 dias após a indução do defeito, obtendo-se a última análise aos 60 dias. Após 30 dias, seis animais de cada grupo foram submetidos a eutanásia para análises de energia de raios-x no defeito ósseo, fornecidas com auxílio da imagem da microtomografia computadorizada de raios-x. Após 60 dias estas análises foram repetidas nos demais. Com auxílio das análises estatísticas não significativas ($P > 0,05$), conclui-se que a utilização do óxido de grafeno no processo de reparo ósseo não apresentou diferença detectável nas avaliações quando comparado com a esponja de colágeno ou com o defeito ósseo controle.

Palavras-chave: Consolidação óssea, biomaterial, esponja de colágeno, tecido ósseo, nanomateriais de carbono.

ABSTRACT

JARDIM, P.H.A. Graphene oxide in healing an experimental segmental bone defect in rabbit radius. 2018. 60p. Master's Degree Dissertation - Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2018.

In recent studies, graphene oxide has shown promising effects on bone healing. This study aimed to evaluate the healing of segmental bone defects in rabbit radii treated with graphene oxide. Bone defects were induced on both radio of twenty-four adult New Zealand White rabbits weighing 3 ± 0.5 kg, 12 males and 12 females. The animals were randomly divided into two groups: collagen sponge + graphene oxide (GGO), n = 12 (6 males and 6 females) and collagen sponge (GEC), n = 12 (6 males and 6 females). In both groups, the right limb of the animals was submitted only to the bone defect and did not receive treatment, being denominated: collagen sponge + graphene oxide control (GGOC) and collagen sponge control (GECC). The bone defect induced on the left limb was filled with the following biomaterials, according to each group: lyophilized hydrolyzed collagen sponge + graphene oxide (GGO) or lyophilized hydrolyzed collagen sponge (GEC). For evaluation between groups, radiological analyzes were performed preoperatively, postoperatively and every 15 days after the defect induction, the last analysis was made on the 60th day. On the 30th day, six animals from each group were submitted to euthanasia and X-ray energy analysis, using computerized x-ray microtomography image. On the 60th day, the remaining animals were analyzed. Through non-significant statistical analyzes ($P > 0.05$) we concluded that the use of graphene oxide in the bone repair process showed no detectable difference in evaluations when compared to the collagen sponge or to the control.

Key words: Bone healing, biomaterial, collagen sponge, bone tissue, carbon nanomaterials.

1 INTRODUÇÃO

A maioria das fraturas em animais de companhia é curada em um período de tempo aceitável com a estabilização adequada dos fragmentos ósseos (EGGER et al., 2014). O Modelamento e remodelamento ósseo podem ser estimulados por microlesões, estímulos mecânicos, estímulos combinados ou por mecanismos desconhecidos. Entretanto, em alguns casos clínicos, não ocorre regeneração óssea ou aumento de massa óssea da forma esperada, tornando necessário a utilização de técnicas coadjuvantes para a obtenção dos resultados esperados (CARVALHO et al., 2002).

Apesar dos crescentes avanços em algumas áreas, o ortopedista pouco pode fazer para aumentar a velocidade de consolidação óssea, melhorar a cicatrização e o tempo de recuperação dos animais (DOUAT, 2004). O uso de células, fatores bioativos, e/ou matrizes de suporte pode melhorar a cura da fratura fornecendo ou estimulando o fator deficiente. Assim, terapias alternativas como o uso de proteínas reguladoras de formação óssea, bem como biomateriais indutores ósseos são muito importantes, pois podem minimizar o tempo de tratamento e os custos, garantindo o retorno mais rápido às atividades normais (DOUAT, 2004; EGGER et al. 2014).

Os biomateriais podem ser caracterizados por uma substância ou uma combinação de substâncias, de origem natural ou sintética, que não sejam drogas ou fármacos, que podem ser usadas durante qualquer período de tempo, que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo (DONARUMA, 1988). Com o propósito de evitar enxertos ósseos autógenos, o material deve responder a determinados requisitos, como possuir estrutura estável, rapidez na incorporação com o tecido ósseo, promover osteocondução e gerar pouca ou nenhuma complicação associada ao seu uso (MELLONIG 1991).

Os materiais bioativos podem ser agrupados segundo suas propriedades que intensificam a cicatrização quanto a osteogênese, formação de novo osso, osteoindução, recrutamento e diferenciação de células

formadoras de osso, osteocondução, suporte mecânico, ou um arcabouço para células formadoras de osso. Essas opções terapêuticas podem ser usadas isoladamente ou em combinações sinérgicas (EGGER et al., 2014).

Entre os novos materiais mais expressivos provenientes da nanociência e nanotecnologia estão os nanomateriais de carbono, dos quais os nanotubos de carbono, e mais recentemente o grafeno, são os mais representativos (ZARBIN, 2013).

O óxido de grafeno (GO) é proveniente da esfoliação do grafite oxidado (DREYER, et al., 2010; PARK & RUOFF, 2009). Ele é constituído por uma pequena monocamada de átomos de carbono com formato de favo de mel bidimensional (MEHRALI et al., 2014), com aplicação em vários campos biotecnológicos (ZANCANELA et al., 2016), e aplicações biomédicas (NOVOSELOV, 2004; YANG, 2013), sendo considerado como um dos biomateriais mais importantes da última década.

Assim, para que se possa compreender e recapitular a cascata de cicatrização, defeitos ósseos devem ser realizados *in vivo* através de modelos animais apropriados. Esses modelos permitem padronizar ou eliminar variáveis que contribuem para o sucesso ou fracasso de materiais de engenharia de tecidos. Os animais podem ser obtidos de mesma origem ou raça, e mantidos em condições ambientais idênticas (KHAN & LANE, 2004).

Dentre as espécies, coelhos são muito usados para modelos de consolidação óssea, eficácia de agentes osteoindutores e arcabouços osteocondutores. A abordagem cirúrgica de ossos longos frequentemente utilizados é simples, e o rádio (ou ulna), sendo um osso emparelhado, não necessita de osteossíntese. Modelos de defeito tanto de rádio como de ulna são comumente executados. A decisão para qualquer modelo é baseada pela forma preferida de secção transversal do osso (PEARCE, 2007). O defeito ósseo experimental deve ter um tamanho determinado para que não ocorra reparo espontâneo (HORNER et al., 2010).

Para que ocorra a manutenção do volume ósseo perdido e prevenção da invaginação de massa muscular que circunda o defeito ósseo, torna-se indispensável à presença de um material suporte que forneça estrutura no qual o novo tecido possa ser formado (POTIER & PETITE, 2005). Em um estudo realizado por Oliveira (2010), a esponja de gelatina (EG) comportou-se como um carreador apropriado para uso em defeitos ósseos de cães sendo maleável, biocompatível, porosa, radiotransparente e reabsorvível, além de ter característica de grande absorção de fluidos.

Estudos recentes têm demonstrado resultados promissores de regeneração do tecido ósseo, ensejando a perspectiva de que terapias celulares associadas a biomateriais em defeitos ósseos poderão se beneficiar com o progresso dos ensaios in vivo e in vitro. A literatura tem investigado inúmeros biomateriais naturais ou sintéticos para tal fim, sendo ainda um desafio a escolha do melhor biomaterial, pois a biocompatibilidade é essencial, devendo ser aceito pelo tecido justaposto sem respostas imunológicas e inflamatórias danosas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a utilização da esponja de colágeno enriquecida com óxido de grafeno no reparo de defeito ósseo em rádio de coelhos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a presença ou não de ponte óssea no local dos defeitos, com auxílio de imagem radiográfica e compará-las entre os grupos.
- Avaliar o preenchimento no local do defeito ósseo com auxílio de imagem radiográfica e compará-las entre os grupos.
- Avaliar a energia de raios-x no local do defeito ósseo no membro tratado com esponja de colágeno, tratado com esponja de colágeno embebida em óxido de grafeno e não tratado com auxílio da imagem de microtomografia computadorizada de raio-x, fazendo um estudo comparativo entre os grupos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Tecido e Reparo Ósseo

O tecido ósseo é o principal componente do esqueleto, protegendo órgãos, servindo de suporte para tecidos moles e depósito de substâncias como cálcio, fosfato, e outros íons. É considerado um tipo especializado de tecido conjuntivo constituído por células e material extracelular calcificado denominado matriz óssea que são revestidos por membranas conjuntivas contendo células osteogênicas, chamadas de perióstio e endóstio (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). Este tecido tem origem embrionária a partir de células indiferenciadas do mesênquima, as quais apresentam capacidade de originar os múltiplos tecidos mesenquimais, como o conjuntivo, cartilaginoso, adiposo, muscular, mucoso e o hematopoiético (INTROINI, 2011).

O osso pode ser oriundo de uma ossificação intramembranosa (internamente no tecido conjuntivo) ou por ossificação endocondral (no interior de um molde cartilaginoso). As duas formas de desenvolvimento dão origem a um tecido ósseo, no qual não se distingue a maneira como se formou inicialmente. O osso formado originalmente é chamado de osso primário, que é substituído gradual e continuamente por osso secundário (SAMUELSON, 2007).

A maior parte do osso é de matriz extracelular inorgânica, que compõe dois terços do total da matriz, o restante da matriz (orgânica) consiste principalmente de fibras colágenas (tipo I) e uma quantidade pequena de substância fundamental amorfa. Os materiais inorgânicos têm como substâncias mais abundantes o cálcio e o fósforo, formando principalmente cristais de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (SAMUELSON, 2007). A associação de hidroxiapatita e fibras de colágeno proporciona a característica singular de dureza do tecido ósseo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

Macroscopicamente verifica-se que o osso é formado por uma parte compacta, sem cavidades visíveis, e outra esponjosa, com muitas cavidades intercomunicantes. As extremidades dos ossos longos, também chamadas de epífises, são formadas de esponjoso, e a parte cilíndrica (diáfise), formada pelo compacto (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

O osso compacto constitui 80% do esqueleto, e forma a camada externa dos ossos. Nele as fibras de colágeno estão distribuídas na forma de lamelas que ficam paralelas umas as outras ou se dispõem em camadas concêntricas em torno de canais com vasos, formando os sistemas de Havers. Cada sistema é constituído por um longo cilindro, paralelo ao eixo longitudinal do osso (diáfise). No centro deste cilindro existe o canal de Havers que contém vasos, nervos e tecido conjuntivo frouxo. Esses canais comunicam-se entre si, com a cavidade medular e com a superfície externa do osso por meio de canais transversais denominados de canais de Volkmann (SILVA, 2009).

As células que compõe o tecido ósseo são: osteócitos, osteoblastos e osteoclastos. Os osteócitos são células que se encontram na matriz óssea e ocupam lacunas das quais partem canalículos. Cada lacuna é constituída por apenas um osteócito que se comunica com outro através de seus prolongamentos por meio de junções comunicantes, por onde passam pequenas moléculas e íons de um para o outro. Outra célula que compõe o tecido ósseo é o osteoblasto. É encontrado sempre nas superfícies ósseas, dispostos lado a lado, lembrando um epitélio simples e responsável por sintetizar a parte orgânica (colágeno tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas) da matriz óssea, concentrar fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz e na síntese de osteonectina e a osteoclastina responsáveis por facilitar a deposição de cálcio e estimular a atividade dos osteoblastos. A célula responsável pela reabsorção e remodelação óssea é o osteoclasto, células gigantes multinucleadas e extensamente ramificadas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

A reparação é um processo complexo, porém bem ordenado, iniciado em resposta a injúrias, resultando em reestabelecimento da estrutura e função do esqueleto (DIMITRIOU et al., 2005; AL-AQL et al., 2008).

A forma mais comum da cicatrização das fraturas é a consolidação indireta ou secundária, caracterizada por uma cicatrização óssea endocondral e intramembranosa (GERSTENFELD et al., 2006). Neste processo, assim como na regeneração de outros tecidos, são identificadas fases distintas e que se sobrepõem, sendo estas: fase inflamatória, fase reparadora e fase remodeladora (GRIFFON, 2005; CROSS, 2012).

Ocorre inicialmente o recrutamento de células-tronco mesenquimais que se diferenciarão em condrócitos, produzindo cartilagens e osteoblastos formando o osso. Em seguida é produzida uma matriz cartilaginosa, que mineraliza, se transformando em osso, com iniciativa da reabsorção da cartilagem mineralizada. Após a formação do osso primário ocorre a fase de remodelação, em que o calo ósseo inicial é modificado por formação e reabsorção óssea secundária para restaurar a estrutura anatômica e suportando as cargas mecânicas (GERSTENFELD et al., 2003). Alguns fatores como a diminuição de suprimento vascular, deficiência no vigor da resposta osteocondral e deficiências da estabilidade ou continuidade física, podem contribuir para o atraso ou impedimento da cicatrização óssea. O uso de fatores bioativos, células e/ou matrizes de suporte pode melhorar o reparo da fratura fornecendo ou estimulando o fator deficiente (EGGER et al., 2014).

3.2 Óxido de Grafeno

O óxido de grafeno surgiu há quase 150 anos como um precursor do grafeno (BRODIE, 1960). Ele é constituído por uma pequena monocamada de átomos de carbono com formato de favo de mel bidimensional (MEHRALI et al., 2014), proveniente da esfoliação do grafite oxidado (PARK & RUOFF, 2009; DREYER et al., 2010).

Popularmente conhecido como grafite, a grafita é um alótropo do carbono. É encontrada naturalmente e em bastante quantidade. Sua estrutura é bastante estável (oxida-se a temperatura superior a 550°C) e tem condutividade elétrica elevada (104 S/cm em temperatura ambiente), sendo considerado o mais estável, em condições normais de temperatura e pressão, dos alótropos do carbono. A grafita apresenta uma estrutura do tipo lamelar, formada por planos de átomos de carbono organizados de forma hexagonal (camadas de grafeno) em hibridização do tipo sp² (MACEDO, 2011).

O grafeno e seus compostos exibem propriedades químicas e físicas únicas (ZANCANELA et al., 2016). Quimicamente são estruturas baseadas em carbono com alta área de superfície, leve, elasticidade mecânica excepcional, grande mobilidade como transportador, biocompatibilidade, capacidade de funcionalização e baixa resistividade térmica e elétrica (MISRA et al., 2012). Devido a essas propriedades, o óxido de grafeno (GO), os óxidos de grafeno reduzidos (RGO) e os nanocompositos GO recentemente atraíram interesse em uma ampla gama de áreas, incluindo vários campos biotecnológicos (ZANCANELA et al., 2016) e aplicações biomédicas (NOVOSELOV, 2004; YANG, 2013).

Usualmente o GO é sintetizado pelo método Brodie (BRODIE, 1960), Staudenmaier (STAUDENMAIER, 1898) ou Hummers (HUMMERS, 1958) e suas modificações, podendo ser produzidas grandes quantidades de amostra (VALLÉS et al., 2008; SALVATIERRA, 2013). O procedimento mais aceito e reproduzido atualmente é o método modificado de Hummer's, como sugerido por Hirata (2004).

Embora utilizado em diversas áreas, Panzarini et al. (2016) relatam que os resultados sobre a toxicidade ainda são conflitantes. Algumas literaturas tem demonstrado toxicidade de diferentes nanopartículas de carbono em vários modelos de embriões biológicos, como frango (KURANTOWICZ et al., 2017) e peixe-zebra (TSAI et al., 2016). Kurantowicz et al. (2017) obtiveram resultados satisfatórios demonstrando que não observaram quaisquer impactos negativos

sobre o peso corporal ou orgânico, bioquímica no soro sanguíneo ou dano oxidativo ao fígado de modelos de embriões de frango, indicando que as nanopartículas de carbono poderiam circular no sangue sem causar quaisquer efeitos colaterais.

Quando estudados em relação ao tecido ósseo a dependência entre citotoxicidade e expressão de genes relacionados à osteogênese são encontradas aplicando altas concentrações de nanotubos de carbono, óxido de grafeno ou nanofitas de óxido de grafeno (O-GNR) (RICCI et al., 2017). Fato também demonstrado por Constanda et al. (2016), onde foi encontrada citotoxicidade de nanocompositos em doses elevadas (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em osteoblastos.

Com o avanço das pesquisas, alguns estudos mostraram que materiais a base de grafeno podem promover a adesão e a proliferação de osteoblastos (AGARWAL et al., 2010; KALBACOVA et al., 2010), estimulá-los eletricamente durante a formação do tecido através da sua superior condutividade elétrica (SUPRONOWICZ et al., 2002), promover a mineralização de hidroxiapatita, com qualidade osteocondutora (LIU et al., 2012; LIU et al., 2014), e como também sugerido por Zancanela et al. (2016), aumentar a formação de nódulos mineralizados, estimular a biomineralização e acelerar a regeneração óssea.

Peng et al. (2017), ao estudarem o óxido de grafeno como ligação entre um biopolímero e uma biocerâmica, observaram que os materiais que o continham promoveram a formação de apatita semelhante ao tecido ósseo, adesão celular e diferenciação osteogênica. Assim como Ren et al. (2017) que encontraram valores elevados de diferenciação celular óssea de células tronco mesenquimais de ratos em materiais contendo óxido de grafeno.

3.3 Esponja de Colágeno Hidrolisada

Os agentes com capacidade hemostática de aplicação tópica fazem parte de uma grande evolução da ciência frente a quadros de hemorragias difusas de órgãos e tecidos (DO PRADO et al., 2014).

Esponjas hemostáticas, como as esponjas de gelatina, são oferecidas com finalidade de redução da perda de sangue durante o procedimento cirúrgico. A esponja de gelatina é altamente absorvível, expansível, agindo como mecanismo hemostático mecânico (GAZZERI et al., 2014).

Alguns agentes hemostáticos podem contribuir para adesão de células, promovendo quimiotaxia, citodiferenciação, e síntese de matriz celular, sendo suas propriedades e composição, fatores influentes no tempo de persistência deste no local implantado e na reação tecidual (GABRIELLI et. al., 2009).

Oliveira et al. (2010), ao realizarem estudo com células tronco, utilizaram a esponja de colágeno como “scaffold” de seus tratamentos, tendo resultado satisfatórios com propriedades próximas a de um “scaffold” ideal em modelos experimentais caninos.

Em 2017 Dong utilizou a esponja de gelatina associada à prata em defeitos ósseos em calvárias infectadas de ratos, obtendo êxito no tratamento, acelerando o processo de cicatrização óssea. Assim como Corsetti (2017) que utilizou a esponja de gelatina como um de seus carreadores de células-tronco para o tratamento de defeitos experimentais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Locais de Desenvolvimento

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Laboratório de Técnica Cirúrgica Veterinária e os exames radiológicos no Laboratório de Diagnóstico por Imagem, ambos localizados na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

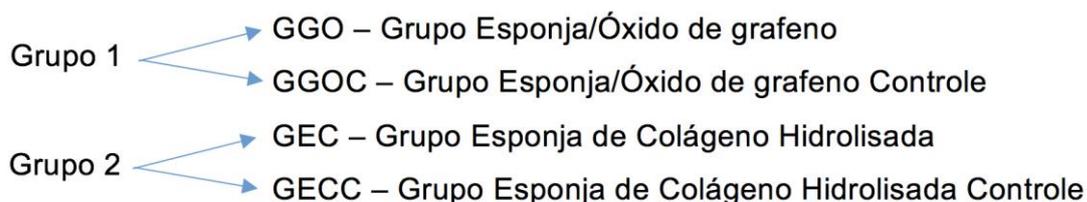
A síntese do óxido de grafeno e embebição das esponjas de colágeno foram realizadas no Laboratório de Nanomateriais e Nanotecnologia Aplicada (LNNA), localizado no Instituto de Física (INFI) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

A análise de energia de raios-x do defeito ósseo foi realizada no laboratório de Modelos Experimentais de Doença, localizado na Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

4.2 Animais e Grupos experimentais

O experimento teve início após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da proposta registrada com o número 817/2016. Foram utilizados 24 coelhos saudáveis, adultos, 12 machos e 12 fêmeas, da raça nova Zelândia, do mesmo grupo de contemporâneos, adquiridos comercialmente, idade média de 8 meses, peso médio de $3 \pm 0,5$ kg. Os animais foram mantidos em baias individuais e alimentados com ração comercial para coelhos e água ad libitum.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos de 12, contendo 6 machos e 6 fêmeas em cada grupo. O osso rádio direito de cada animal foi utilizado como controle de seu grupo:



4.3 Síntese do Óxido de Grafeno e Embebição da Esponja de Colágeno

A síntese foi realizada por esfoliação química do grafite pelo método modificado de Hummer's descrito por Hirata et al. (2004), onde o grafite é misturado ao nitrato de sódio em um recipiente resfriado a zero grau Celsius. Na sequência, adicionou-se ácido sulfúrico sob agitação homogênea e, em seguida, adicionou-se gradualmente permanganato de potássio nesta solução, de modo que a temperatura não ultrapasse 20 °C. Após duas horas de reação, a solução foi removida do banho de zero grau Celsius, mas permanecendo sob agitação por 5 dias. Como resultado, uma pasta viscosa de cor marrom avermelhada foi obtida. Então, misturou-se esta pasta a uma solução aquosa com 5% em massa de H₂SO₄, deixando-se reagir por duas horas. Na sequência, foram adicionados cerca de 30% em massa de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), reagindo por mais duas horas.

A purificação ocorreu com a dispersão e precipitação de toda a mistura em solução aquosa, com 3 e 0,5% de H₂SO₄ e H₂O₂, respectivamente. Após dois dias de precipitação, o sobrenadante da solução foi removido e descartado. Este processo foi repetido dez vezes. Para finalizar, um pequeno volume da pasta precipitada foi disperso em água deionizada por sonicação, obtendo-se assim o óxido de grafeno. Para garantir a homogeneidade de solução que contém o óxido de grafeno, o material particulado precipitado foi removido. Assim, restaram na solução apenas flocos de monocamadas de óxido de grafeno, ou até mesmo flocos com poucas camadas (< 5), ficando estáveis em água por longos períodos. Em seguida foi colocado em luz ultravioleta com finalidade de esterilização.

A embebição da esponja, adquirida comercialmente como Hemospon®¹, foi realizada retirando-a de forma estéril de sua embalagem e a colocando em um frasco estéril onde posteriormente adicionou-se óxido de grafeno com auxílio de uma pipeta, fazendo movimentos de apreensão e soltura da mesma

¹ Hemospon®/Technew Comércio e Indústria Ltda - Rio de Janeiro- Brasil

com uma pinça anatômica de dissecação até que esta atingisse o seu maior volume de absorção do óxido de grafeno líquido. Após a embebição da esponja, esta foi transportada para uma placa estéril e colocada em uma câmara a vácuo de sílica para que o líquido evaporasse durante 24 horas. Cada esponja foi preparada 24 horas antes do procedimento cirúrgico, onde logo após seu preparo, a mesma foi utilizada.

4.4 Pré-Cirúrgico

Os animais passaram por um período de adaptação ao ambiente por 7 dias visando o ajuste aos horários de alimentação e limpeza das baias assim como a manipulação e contato do tratador.

4.5 Anestesia

Os animais foram pré-medicados com cloridrato de cetamina² 10% 30mg.kg⁻¹ e cloridrato de xilazina³ 2% 5mg.kg⁻¹ por via intramuscular. Em seguida foi realizada tricotomia ampla de ambos os membros torácicos desde abaixo da articulação rádio-cárpica até a articulação escápulo-umeral e introdução de um cateter intravenoso na veia auricular para fluidoterapia e manutenção da anestesia caso necessária. Em seguida foi realizado bloqueio do plexo braquial com lidocaína⁴ 2% 4mg.kg⁻¹ no membro esquerdo e no membro direito respectivamente. Caso a anestesia regional não atingisse o efeito esperado era realizado cloridrato de fentanila⁵ 5 mcg.kg⁻¹ por via intravenosa a cada 15 minutos.

² Ketalex®/ Rhobifarma Industria Farmacêutica LTDA – Hortolândia - SP

³ Xilazin®/ Rhobifarma Industria Farmacêutica LTDA – Hortolândia - SP

⁴ Cloridrato de lidocaína 2%/ Hipolabor Farmacêutica LTDA – Sabará - MG

⁵ Fentanest® 0,0785mg/ml/ Cristália – Itapira - SP

4.6 Indução do Defeito Ósseo e Aplicação das Esponjas

O animal foi posicionado em decúbito dorsal. Em seguida foi realizado a antisepsia dos membros com iodopolividona⁶ 10% e álcool etílico hidratado⁷ 70%, proteção das extremidades com bandagem estéril e colocação dos panos de campo. Foi realizado acesso crânio-medial do rádio esquerdo por incisão de pele de aproximadamente 2cm, seguida de divulsão do tecido subcutâneo e isolamento da musculatura, permitindo a exposição da diáfise do rádio. Em seguida foi realizada uma ostectomia de 0,5cm de extensão na diáfise do rádio, distando 2 cm da articulação rádio cárpica, com auxílio de um disco serrilhado⁸ acoplado a uma caneta odontológica com rotação controlada por pedal⁹, uma régua¹⁰ para as mensurações e um osteótomo de 0,5cm de largura¹¹. Para evitar a termonecrose óssea, foi realizada irrigação do local da osteotomia com solução fisiológica 0,9% durante este procedimento (Figura I).

⁶ Iodopolividona Tópico®/ Vic Pharma Industria e Comércio LTDA- Taquaritinga - SP

⁷ BM Ciclo 70®/ Ciclo Farma Industria Química LTDA – Serrana - SP

⁸ Disco serrilhado para contra ângulo 13mm/ Alpha Instrumentos Cirúrgicos - Ribeirão Preto - SP

⁹ Motor odontológico para pequenos animais/ Ortovet – São Paulo - SP

¹⁰ Régua de alumínio/ Goller – Chapecó - SC

¹¹ Osteótomo 5mm/ Cãomedica – Campinas - SP

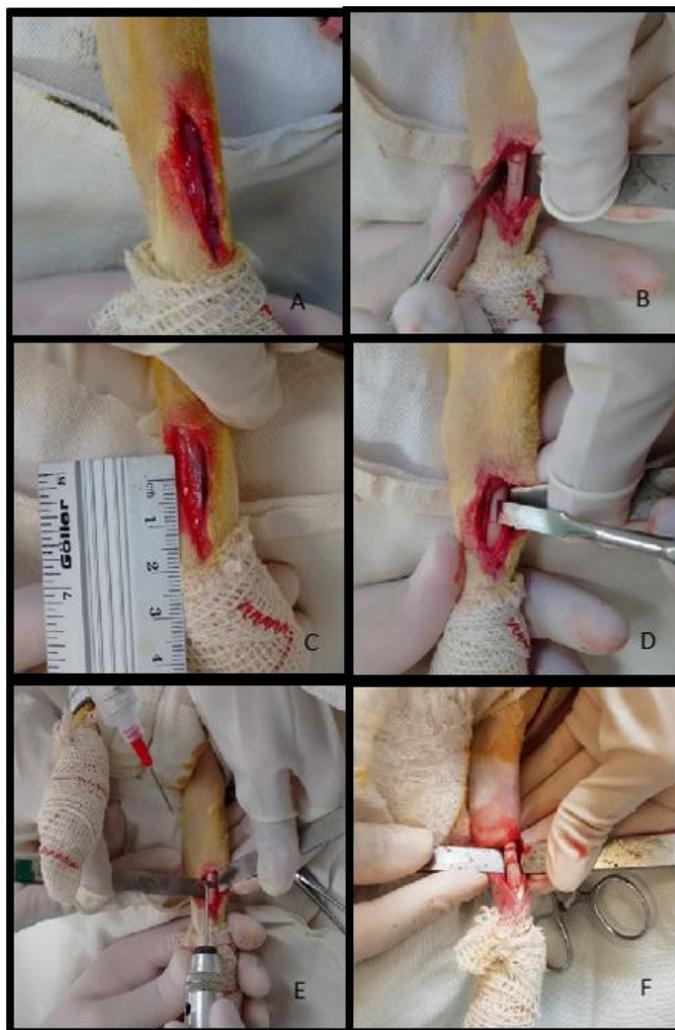


Figura I - Indução do defeito ósseo. A) Incisão crânio-medial de pele e subcutâneo. B) Isolamento da musculatura e exposição óssea. C) Distância de 2 centímetros da articulação. D) Marcação da segunda linha de osteotomia pela extremidade do osteótomo de 0,5cm. E) Osteotomia com auxílio da serra circular. F) Linhas das osteotomias realizadas.

O segmento do rádio foi removido, obtendo-se desta forma uma falha óssea de 0,5 centímetro de extensão. Para o preenchimento da falha óssea, as esponjas foram esculpidas com o uso da lâmina de bisturi para adquirirem o formato do fragmento ósseo retirado do rádio dos coelhos. As esponjas, após serem esculpidas, adquiriram medidas semelhantes às da falha óssea em comprimento largura e altura. Quando alocadas no defeito ósseo foi aguardada a absorção de sangue do local do defeito ósseo até que a esponja ficasse totalmente preenchida com sangue (Figura II)

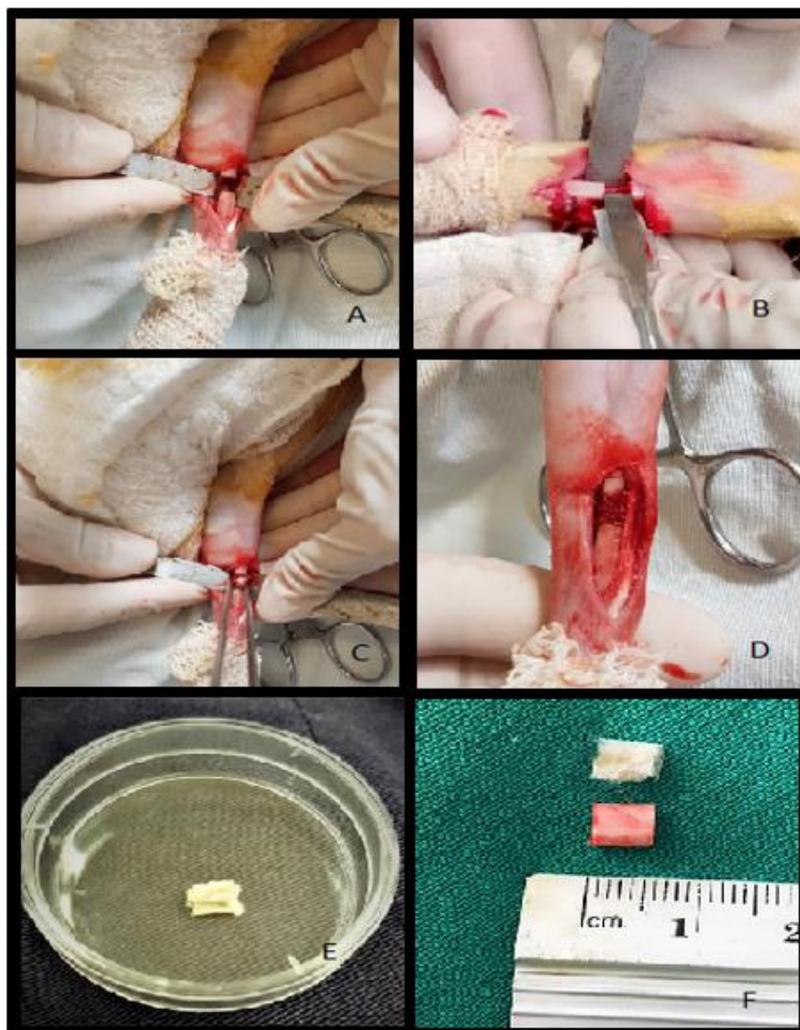


Figura II - Osteotomia e implantação da esponja. A) Falha óssea produzida. B) Verificação do comprimento de 0,5cm de falha óssea. C) Implantação da esponja no local da falha óssea. D) Esponja no local da falha óssea. E) Esponja com óxido de grafeno. F) Esponja esculpida no formato do fragmento ósseo removido.

As falhas ósseas foram preenchidas com a esponja correspondente ao grupo do animal da seguinte forma:

- *Grupo esponja (GEC)*

Seis coelhos machos e seis fêmeas receberam como tratamento da falha óssea do rádio esquerdo, esponja de colágeno.

- *Grupo esponja com óxido de grafeno (GGO)*

Seis coelhos machos e seis fêmeas receberam como tratamento da falha óssea do rádio esquerdo, esponja de colágeno com óxido de grafeno.

No membro torácico direito (controles GGOC e GECC), foi realizado o procedimento até a retirada do fragmento ósseo, contudo as falhas ósseas não foram preenchidas, permanecendo vazias.

Em todos os grupos (GEC, GGO) e nos membros torácicos direito, a sutura de aproximação da musculatura e subcutâneo foi realizada com fio poliglecaprone 25¹² número 4-0, em padrão simples contínuo. Para a sutura de pele foi utilizado náilon cirúrgico¹³ número 4-0 em padrão “x” isolado.

4.7 Pós-Operatório

Durante o período de 7 dias os animais foram submetidos à antibioticoterapia com benzilpenicilina benzatina¹⁴ 40.000 UI.kg⁻¹ por via intramuscular profunda a cada 48 horas. Para controle analgésico foi utilizado sulfato de morfina¹⁵ nos dois primeiros dias na dose de 1mg.kg⁻¹ por via subcutânea a cada 8 horas. Após os dois primeiros dias foi utilizado cloridrato de tramadol¹⁶ na dose de 4mg.kg⁻¹ por via subcutânea a cada 12 horas durante mais três dias. Foi realizado cetoprofeno¹⁷ na dose de 3mg.kg⁻¹ por via subcutânea a cada 24 horas durante 3 dias. Não foi necessária a utilização de nenhum tipo de bandagem, tampouco colar elizabetano.

4.8 Avaliações Radiológicas

Foram realizadas imagens controle no período pré-operatório, imediatamente após o procedimento cirúrgico e aos 15, 30, 45, 60 dias após a

¹² Caprofil®/ Johnson & Johnson do Brasil Industria e comércio de produtos para saúde LTDA – São José dos Campos - SP

¹³ Nylon®/ Shalon – São Luis de Montes Belos - GO

¹⁴ Bepeben®1.200.000UI/ Teuto Brasileiro S/A – Anápolis - GO

¹⁵ Dimorf®/ Cristália – Itapira - SP

¹⁶ Tramadon®/ Cristália – Itapira - SP

¹⁷ Biofen® 10%/ Biofarm Química e Farmacêutica LTDA – Jaboticabal - SP

intervenção cirúrgica. As radiografias pré-operatórias foram realizadas com objetivo de descartar qualquer animal que apresentasse afecções ortopédicas que pudessem comprometer a pesquisa. No período pós-operatório, as radiografias serviram para acompanhamento da ponte óssea e preenchimento do defeito e como controle para verificar qualquer comprometimento que fizesse descartar o animal ao longo do estudo.

As avaliações da ponte óssea e preenchimento do defeito foram realizadas classificando-as e as graduando em: Não observada (0), Baixa (1), Moderada (2) e Intensa (3).

As classificações de ponte óssea foram determinadas pelo número de interfaces com ponte óssea, ou seja, o número da pontuação acompanhou o número de interfaces com pontes, logo o local poderia obter uma pontuação máxima (“Intensa”) quando 3 pontes ósseas fossem observadas nos defeitos ósseos avaliados. Para a classificação quanto à ponte óssea foram avaliadas as extremidades que não entravam em contato com a ulna, ou seja, região dorsal, crânio-medial e crânio-lateral.

Para a classificação de preenchimento foi observado o aumento ou não da radiopacidade presente no local do defeito ósseo.

4.9 Delineamento do experimento

Os tempos de avaliação dos grupos foram:

Tempo 0 (T0): 10 minutos após a recuperação do paciente - obtenção das imagens radiológicas (RX) pós-cirúrgicas imediatas.

Tempo 1 (T1): 15 dias após T0 – Obtenção das Imagens radiológicas de 15 dias após o procedimento cirúrgico.

Tempo 2 (T2): 30 dias após T0 – Obtenção das Imagens radiológicas de 30 dias após o procedimento cirúrgico e eutanásia de metade dos animais para as imagens de microtomografia (grupo 6 GGO e 6 GECC).

Tempo 3 (T3): 45 dias após T0 - Obtenção das Imagens de 45 dias após o procedimento cirúrgico dos 12 animais restantes (6 GGO e 6 GECC).

Tempo 4 (T4): 60 dias após T0 - Obtenção das Imagens radiológicas de 60 dias após o procedimento cirúrgico e eutanásia dos animais para as imagens de microtomografia (grupo 6 GGO e 6 GECC).

Esquema do delineamento experimental:

			T0 ↓	T1 ↓	T2 ↓	T3 ↓	T4 ↓
Tempo	Dia 0	Dia 0	15 dias	15 dias	15 dias	15 dias	15 dias
GGO	Anestesia e preparo	Procedimento cirúrgico	Observação e cuidados pós-cirúrgicos	Observação, alimentação e limpeza do ambiente			
GGOC	Anestesia e preparo	Procedimento cirúrgico	Observação e cuidados pós-cirúrgicos	Observação, alimentação e limpeza do ambiente			
GEC	Anestesia e preparo	Procedimento cirúrgico	Observação e cuidados pós-cirúrgicos	Observação, alimentação e limpeza do ambiente			
GECC	Anestesia e preparo	Procedimento cirúrgico	Observação e cuidados pós-cirúrgicos	Observação, alimentação e limpeza do ambiente			

4.10 Protocolo de eutanásia e descarte

Foram aplicados por via intramuscular cloridrato de cetamina 10% na dose de 10mg.kg⁻¹ e cloridrato de xilazina 2% na dose de 5mg.kg⁻¹. Ato contínuo, foi induzida a parada cardiorrespiratória com o uso de propofol¹⁸ dose-efeito. Após 20 minutos foi colocado cateter na veia auricular e administrado 10ml de cloreto de potássio¹⁹ 10%.

¹⁸ Propovan® / Cristália-Itapira-SP

¹⁹ Cloreto de potássio 10,0%/ Samtec Biotecnologia LTDA – Ribeirão Preto - SP

Após a eutanásia foram coletados os membros torácicos para as outras avaliações e realizado o descarte dos animais no setor de coleta de resíduos infectantes da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

4.11 Avaliação de energia de raios-x por Microtomografia Computadorizada

Após 30 dias do procedimento cirúrgico, 3 machos e 3 fêmeas de cada grupo foram eutanasiados para avaliação de energia de raios-x. Os demais foram eutanasiados após 60 dias do procedimento para as mesmas avaliações.

Após eutanásia, os membros torácicos foram coletados dos animais realizando osteotomia distal do úmero. Em seguida foi realizada sutura da pele do membro onde foi realizada a incisão para osteotomia do úmero, com fio poliéster/algodão 3-0 com padrão de sutura continua simples (Figura III A), identificação dos membros (Registro do animal e esquerdo/direito), acomodados em um isopor com gelo e transportados até o laboratório. No laboratório foi realizada desarticulação rádio-cárpica e síntese da pele com mesmo fio e padrão da sutura anterior (Figura III B).

Concluída esta etapa, a peça foi colocada na gaveta do aparelho de microtomografia²⁰ para realizar a imagem na posição médio-lateral (Figura III C e D). A peça foi ajustada de forma que o defeito ficasse no centro da imagem gerada. Isso foi conseguido fazendo imagens e, conforme o local do defeito na imagem era realizado o ajuste da peça na gaveta. As imagens foram realizadas selecionando as opções de KVP = 45 e tempo de exposição = 1,2 segundos oferecidas pela máquina. Depois de gerada a imagem, estas foram salvas em pastas com o registro e lado do membro de cada animal para realizar as mensurações ao final do estudo pelo software (Molecular Imaging Software),

²⁰ Bruker invivo xtreme Imaging System® - Massachusetts - EUA

com finalidade de diminuir os fatores interferentes como o tamanho e a região dos retângulos oferecidos para análise da imagem pela máquina.

As mensurações foram realizadas após a seleção da opção “Use a Constant Value 0.000000 for all ROI’s” da opção “Set Background” localizada na barra “Manual ROI’s”. Foram realizadas três mensurações em locais diferentes do mesmo defeito ósseo, realizando a média dos três valores de X.D. O tamanho e os locais das áreas selecionadas para análise foram os mesmos (Figura III E e F).



Figura III - Preparo da peça para análise de intensidade de raio-x. A) Membros torácicos de dois coelhos. B) Desarticulação rádio-cárpica dos membros. C) Peça acomodada na gaveta do aparelho. D) Local de introdução da gaveta para análise. E) Seleção da opção de retângulo para análise. F) Retângulos realizados no local da falha óssea.

4.12 Análise Estatística

Foi realizado o teste de Wilcoxon para análise dos dados radiográficos. Os resultados obtidos pela análise de energia de raios-x no local do defeito ósseo foram confrontados estatisticamente por meio de provas paramétricas empregando-se o método de análise fatorial para comparações múltiplas, seguido do teste de Tukey-Kramer quando houve diferença para a comparação entre os grupos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Ponte óssea

5.1.1 Estudo comparativo dos defeitos ósseos tratados e não tratados em cada grupo; tratados e tratados de grupos diferentes; não tratados e não tratados de grupos diferentes

Os resultados obtidos das avaliações realizadas aos 15 dias de pós-operatório dentro de cada grupo mostraram que 40 (83,3%) dos defeitos ósseos avaliados, independente do grupo e do tratamento, não apresentavam ponte óssea. Tendo em vista a baixa variabilidade das pontuações, os resultados não apresentaram diferença estatisticamente significativa ao nível de significância de 5% (Figura IV).

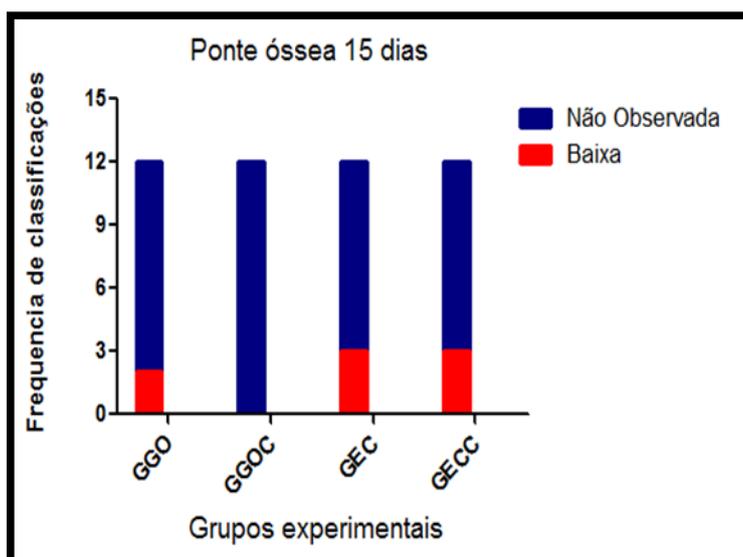


Figura IV – Representação gráfica da predominância de classificações “Não observada” em relação a “Baixa” nas avaliações de ponte óssea aos 15 dias de pós-operatório.

Quando comparados após 30 dias de pós-operatório os grupos apresentaram classificações distribuídas. Foi encontrado um número maior de defeitos ósseos classificados em “Moderada” e “Intensa” nos grupos GGO (5 e 4) e GECC (6 e 2) respectivamente (Figura V). Entretanto, quando comparados com seus defeitos ósseos correspondentes, não apresentaram estatisticamente

diferença ao nível de significância 5% (Figura VI).

Aos 45 dias de pós-operatório as avaliações realizadas dentro de cada grupo mostraram uma evolução mais acentuada no grupo GGO comparado a seu controle e ao GEC. Apesar do número maior de classificações “Intensa” do grupo GGO, os resultados, quando comparados com os demais, não apresentaram diferença estatística ao nível de significância 5%. Ao realizar as avaliações do grupo GEC os resultados mostraram uma evolução contrária ao que ocorreu no grupo GGO. O membro controle (GECC) demonstrou mais classificações “Intensas” totalizando 66,6%, do que o defeito ósseo tratado (GEC) 33,3% e o GGOC 33,3%. Entretanto, estatisticamente esses resultados não apresentaram diferença ao nível de significância 5% (Figura VI).

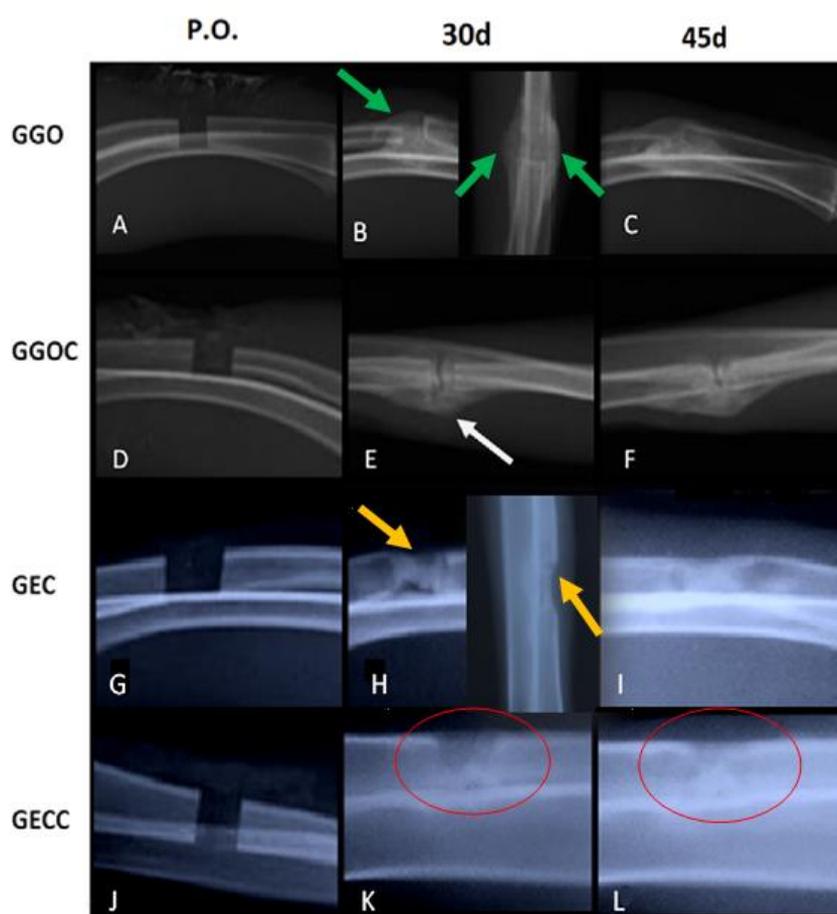


Figura V – Aspecto radiográfico da formação de ponte óssea aos 30 e 45 dias de pós-operatório. Observar ponte óssea classificada como “Intensa” em B (setas verdes) em defeito ósseo do grupo GGO aos 30 dias e ponte óssea classificada como “Baixa” em seu controle GGOC (seta, E) possível de ser visualizada apenas em projeção crânio-caudal. Em H observar

ponte óssea classificada como “Morerada” (setas), se tornando mais uniforme e radiopaca em (I) visualizadas em defeitos ósseos do grupo GEC. Em (K e L, círculo), visualizar aumento de radiopacidade uniforme do grupo GECC aos 45 dias.

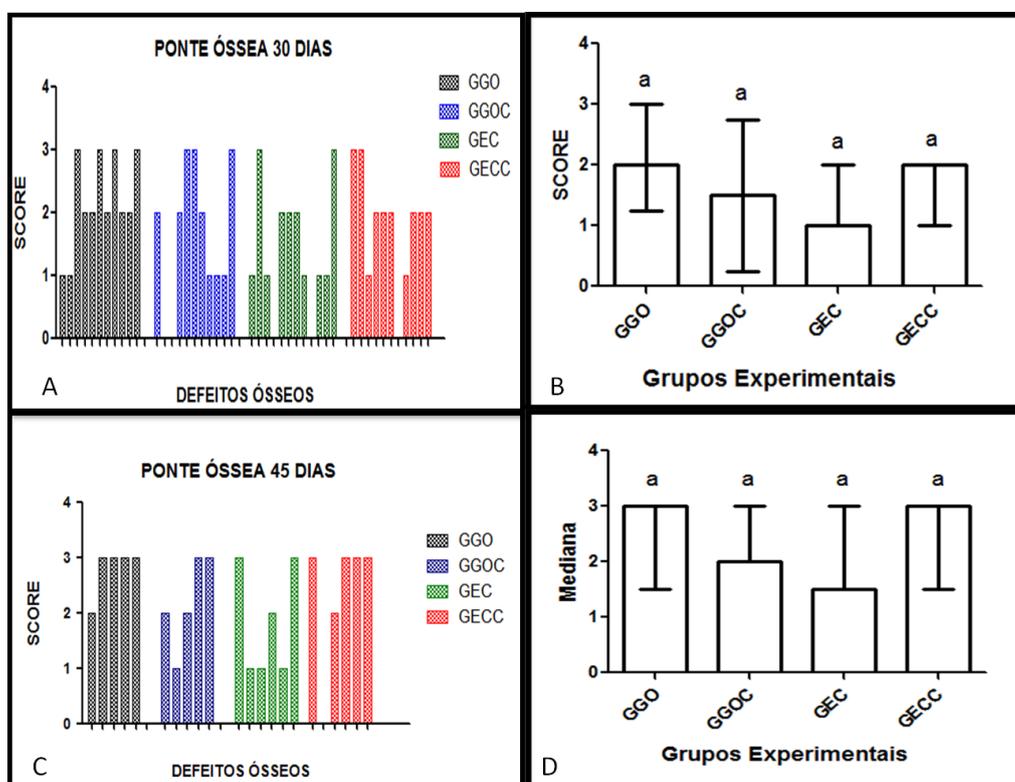


Figura VI – Scores e representações estatísticas identificados nos defeitos ósseos relacionadas a ponte óssea aos 30 e 45 dias de pós-operatório. A) Scores de ponte óssea encontrados nos defeitos ósseos aos 30 dias. B) Medianas e interquartis das análises de ponte óssea aos 30 dias. C) Scores de ponte óssea encontrados nos defeitos ósseos aos 45 dias. D) Medianas e interquartis das análises de ponte óssea aos 45 dias.

As avaliações realizadas aos 60 dias de pós-operatório demonstraram que na maior parte dos defeitos ósseos tratados e não tratados havia ponte óssea. Não foram observadas grandes progressões de classificações em relação às avaliações realizadas em 45 dias de pós-operatório. O grupo GGO apresentou mais classificação “Intensa” que os demais grupos, entretanto, após as comparações realizadas com os demais grupos, não houve diferença estatisticamente significativa ao nível de significância de 5% (Figura VII).

evolução melhor, em pontuações, nos defeitos ósseos do grupo GGO em relação ao seu controle (GGOC) e o tratado com esponja de colágeno (GEC). O inverso aconteceu no estudo realizado com o grupo GEC, GECC e GGOC. O grupo GECC evoluiu melhor que os defeitos tratados com a esponja de colágeno e o controle do outro grupo (GGOC). Apesar do aumento da frequência nas classificações “moderada” nos defeitos tratados do grupo GGO e nos controles do grupo GEC, não houve diferença estatística ao nível de significância 5% (Figuras VIII e IX).

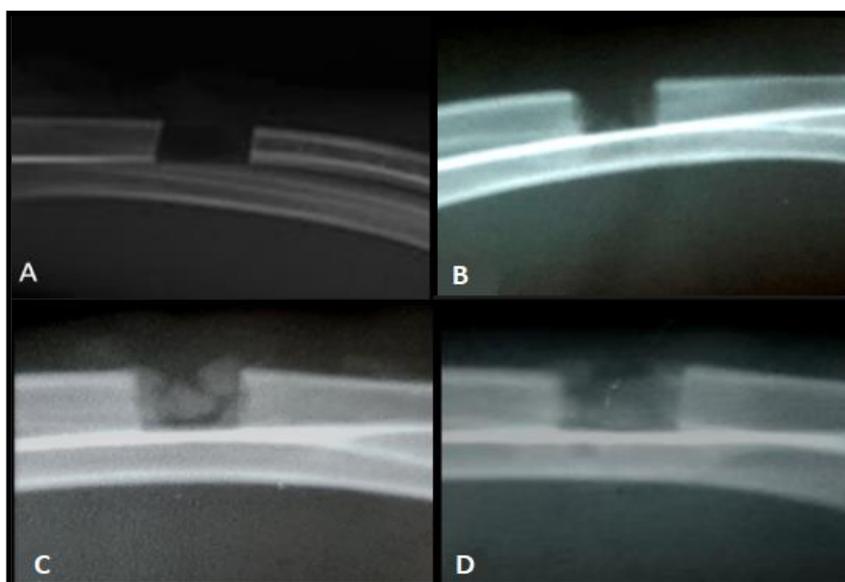


Figura VIII – Aspecto radiográfico pós-cirúrgico das possíveis classificações de preenchimento do defeito ósseo encontradas nos grupos. A) “Ausente”. B) “Baixa”. C) “Moderada”. D) “Intensa”. Notar ausência de reação em (A), aumento de radiopacidade das extremidades do defeito ósseo em (B), mineralização difusa porém incompleta em (C) e mineralização próxima de completa em (D).

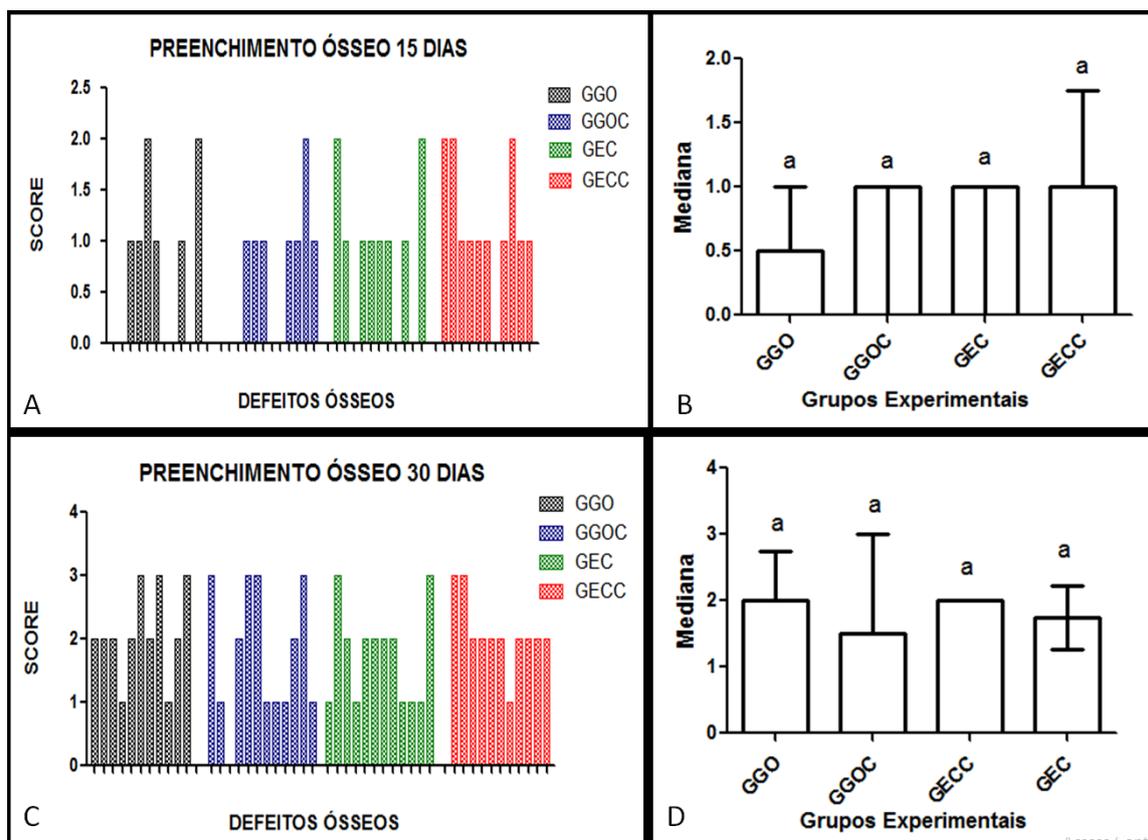


Figura IX – Scores e representações estatísticas identificados nos defeitos ósseos relacionadas ao preenchimento ósseo aos 15 e 30 dias de pós operatório. A) Scores de preenchimento ósseo avaliados aos 15 dias. B) Medianas e interquartis das análises de preenchimento ósseo aos 15 dias. C) Scores de preenchimento ósseo avaliados aos 30 dias. D) Medianas e interquartis das análises de preenchimento ósseo aos 30 dias.

Após 45 de pós-operatório os resultados obtidos mostraram uma boa evolução de preenchimento dos defeitos ósseos nos dois grupos. Foi encontrado um número maior de classificações “intenso” nos grupos GGO e GECC. Um dos defeitos ósseos do grupo GGO permaneceu sem reação óssea que indicasse processo de reparo ósseo. Tanto o grupo GGO quanto o grupo GEC quando confrontados entre eles e com seus controles, não foram estatisticamente diferentes ao nível de significância 5% (Figura X).

Aos 60 dias de pós-operatório o defeito ósseo do grupo GGO que se apresentava sem reação permaneceu sem evidências de algum preenchimento. Todos os outros tratados deste grupo evoluíram para preenchimento total, ou seja, foram classificados como “Intenso”. No GGOC

dos 6 defeitos ósseos 2 permaneceram com classificação “Moderado” os demais estavam totalmente preenchidos. No grupo GEC, tanto os tratados como os controles não apresentaram evolução permanecendo com as mesmas classificações de quando avaliados aos 45 dias. Quando todos foram confrontados estatisticamente, não foi observada diferença ao nível de significância de 5%.

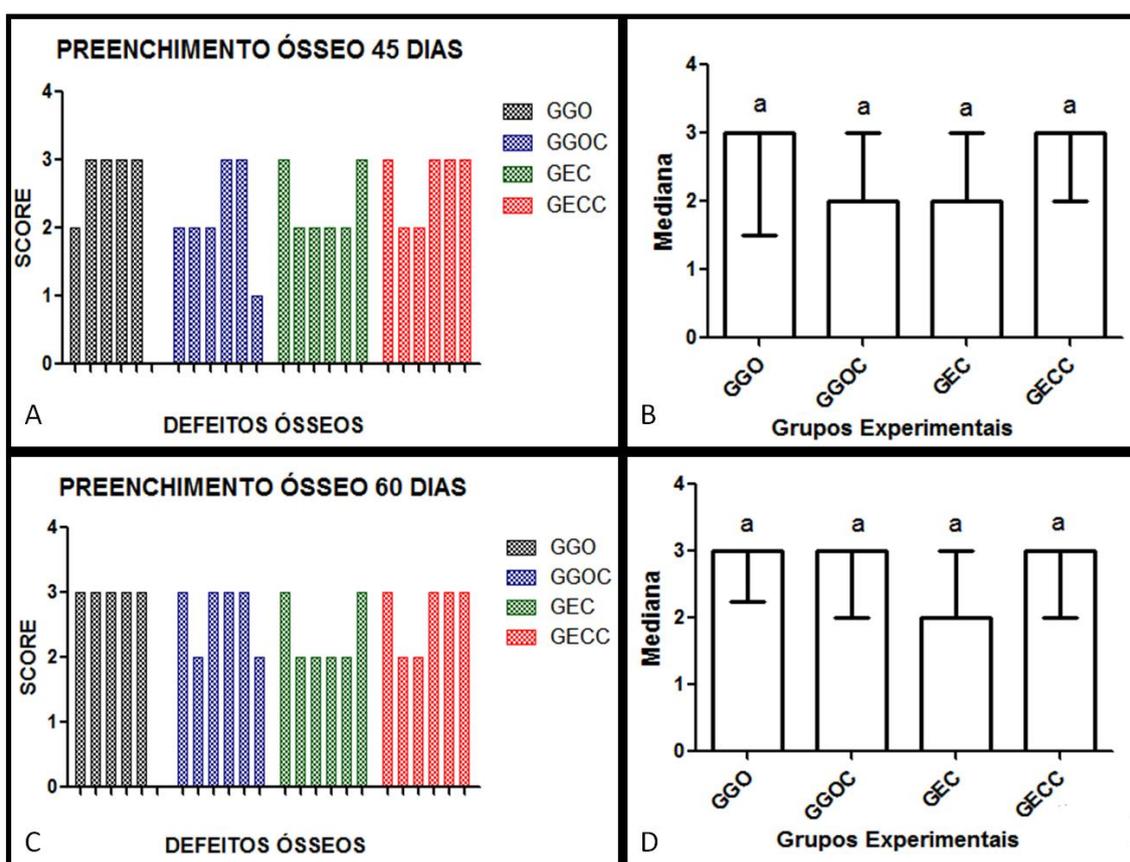


Figura X – Scores e representações estatísticas identificados nos defeitos ósseos relacionadas ao preenchimento ósseo aos 45 e 60 dias de pós-operatório. A) Scores de preenchimento ósseo avaliados aos 45 dias. B) Medianas e interquartis das análises de preenchimento ósseo aos 45 dias. C) Scores de preenchimento ósseo avaliados aos 60 dias. D) Medianas e interquartis das análises de preenchimento ósseo aos 60 dias.

5.3. Energia de raios-x no defeito ósseo

Após as avaliações realizadas com auxílio do aparelho (Figura XI), os valores médios de energia de raios-x encontrados após 30 dias se mostraram

muito semelhantes (Figura XII). O grupo GGOC obteve valores maiores seguido pelo grupo GGO, GEC e GECC respectivamente. A pouca variabilidade nos resultados conferiu estatisticamente diferenças não significativas ao nível de significância de 5%. Aos 60 dias, o grupo GGO apresentou o valor menor em relação aos outros grupos seguidos do GECC, GEC e GGOC. Apesar dos diferentes valores de médias encontrados, quando confrontados não apresentaram diferença estatística ao nível de significância de 5% (Figura XII).

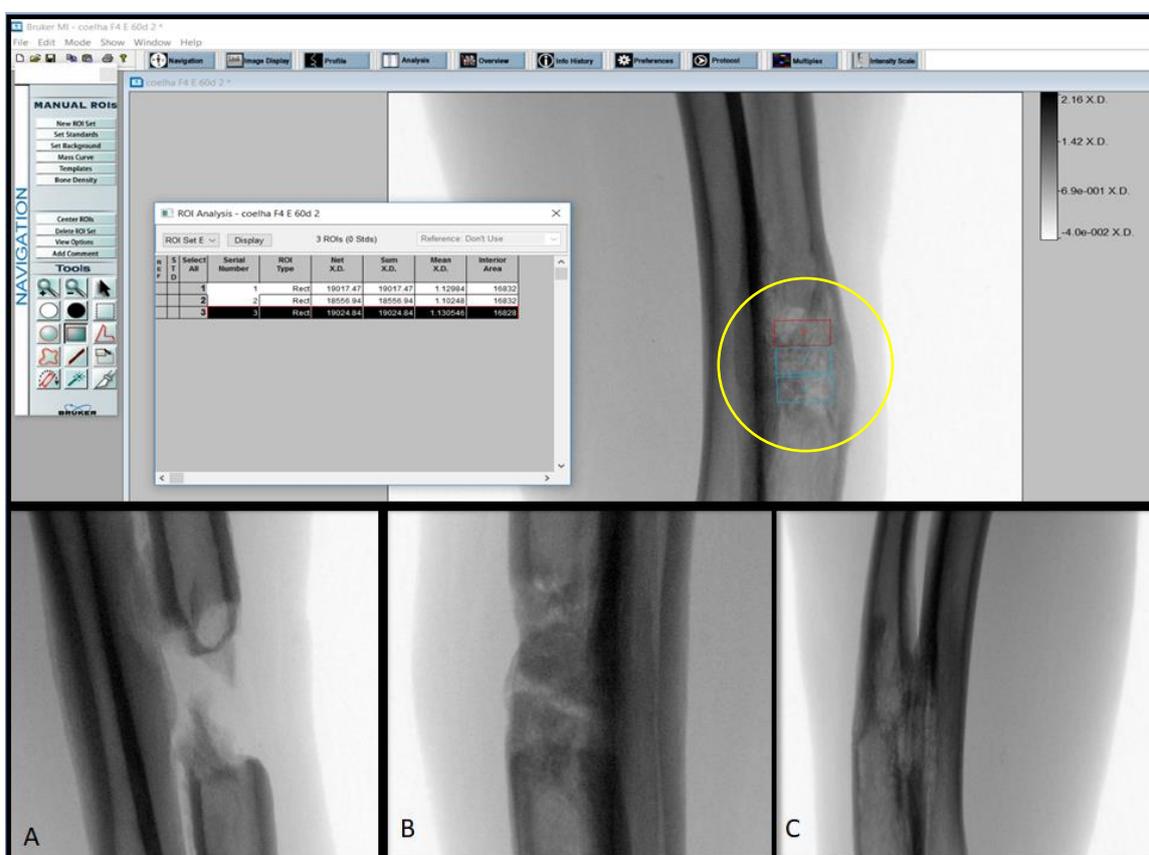


Figura XI – Imagens da análise de intensidade de raios-x realizadas pelo aparelho de microtomografia computadorizada. Círculo amarelo - Seleção da região de análise (retângulos azuis e vermelhos) para obtenção dos resultados. A) Imagem de defeito ósseo com pouca reação local. B) Imagem de defeito ósseo com moderada reação local. C) Imagem de defeito ósseo consolidado.

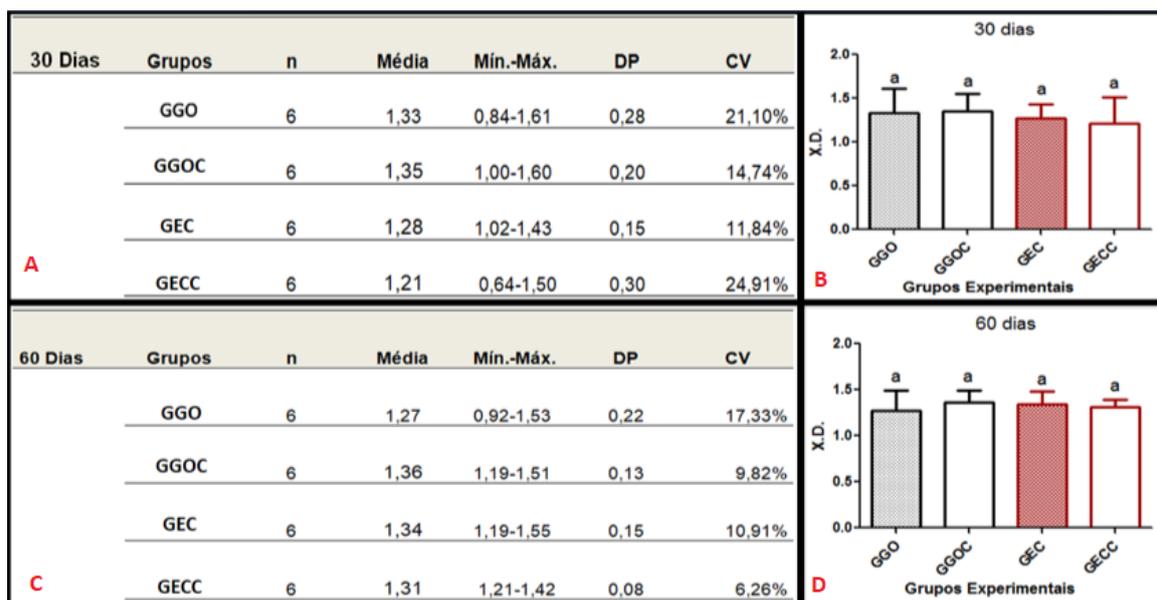


Figura XII – Valores de energia de raios-x (X.D.) obtidos para as análises e suas representações estatísticas. A) 30 dias pós-cirúrgico. B) representação gráfica das análises estatísticas aos 30 dias pós-cirúrgico. C) 60 dias pós-cirúrgico D) representação gráfica das análises estatísticas aos 60 dias de pós-cirúrgico.

6 DISCUSSÃO

A escolha do modelo experimental de defeito ósseo segmentar em rádio de coelhos se mostrou adequada, pois as dificuldades encontradas apresentavam soluções executáveis. Os animais foram fáceis de obter, manipular e alojar. O acesso fácil ao rádio para a realização do defeito ósseo assim como a dispensabilidade de estabilização do osso por implantes como sugerido por Pearce (2007), proporcionou agilidade no procedimento cirúrgico e obtenção dos dados para possível análise. Os modelos de defeito tanto de rádio como de ulna são comumente utilizados. A decisão para qualquer modelo é baseada pela forma preferida de secção transversal do osso. Uma das justificativas para a não estabilização dos fragmentos ósseos é forte ligação do rádio e da ulna (PEARCE, 2007), característica essa de suma importância para o tipo de estudo, visto que o material em questão não oferece resistência mecânica, promove apenas suporte estrutural para o intracrescimento ósseo, vascular e possível indução de formação óssea (FINKEMEIER, 2002).

Outro fator de notável relevância para a escolha deste modelo foi o tamanho. Alguns autores relataram benefícios como o de ser pequeno o bastante para utilizar grupos moderadamente numerosos, porém grande o suficiente para possibilitar a osteotomia e a facilidade de administração de drogas por via parenteral. Ademais esta espécie tem grande semelhança do sistema harvesiano ósseo e do tipo de reparação óssea pós-fratura ao dos seres humanos. (HARKNESS & WAGNER, 1993; NUNAMAKER, 1998; GUARNIERO, 2007; YAMAMOTO, 2012).

A manutenção do volume ósseo perdido, prevenção da invaginação de massa muscular que circunda o defeito ósseo e suporte para que o tecido ósseo possa ser formado citada por Potier & Petite (2005), foi obtida com a esponja de colágeno hidrolisado (gelatina) Hemospon®. Oliveira (2010), relatou características benéficas da esponja de gelatina utilizando-a como um carreador apropriado para uso em defeitos ósseos de cães. Por esta ser maleável, biocompatível, porosa, radiotransparente e reabsorvível, com

característica de grande absorção de fluidos, foi utilizada também como carreador do GO.

Diversas são as fontes para obtenção de colágeno sendo mais tipicamente utilizadas as de tendão de bovino, derme bovina, pele de bezerro ou derme porcina. (BUNYARATAVEJ & WANG, 2001). O Hemospon® é uma esponja de gelatina liofilizada de origem porcina que demonstrou, em um estudo realizado por Gabrielli et al. (2009), ter resposta inflamatória mais intensa e permanente do que as outras estruturas avaliadas no estudo, dentre elas o Avitene®, fabricado com colágeno de origem bovina. Durante o tratamento da ferida cirúrgica nos pós-operatório não foi observada reação inflamatória exacerbada nos defeitos ósseos tratados que pudesse caracterizar rejeição ao material utilizado em nosso estudo.

Radiograficamente houve um índice alto de defeitos ósseos que apresentaram escores baixos de ponte óssea (48/48) e preenchimento ósseo (40/48) aos 15 dias de avaliação pós-operatória. Esses índices melhoraram aos 30 dias. Alguns estudos trazem o início das avaliações radiológicas a partir dos 30 dias como o de Freitas et al. (2012); Mohan et al. (2013), porém a escassez de bibliografias consultada com o óxido de grafeno in vivo trouxe a necessidade da utilização de uma avaliação aos 15 dias de pós-cirúrgico.

Os resultados obtidos nas avaliações radiológicas dos defeitos ósseos não tratados (GGOC e GECC), independente do grupo, mostraram início de consolidação óssea semelhante aos encontrados nos estudos realizados por Cianini et al. (2006); Freitas et al. (2012); Mohan et al. (2013) e Morato et al. (2013) em defeitos ósseos segmentares de coelhos, iniciando a partir dos 30 dias de pós-operatório, estando reparada por volta dos 120 dias. Em nosso estudo as formações de ponte óssea e preenchimento ósseo nos grupos GGOC e GECC ficaram evidentes em grande parte aos 30 dias de pós-operatório evoluindo para a maior classificação aos 60 dias. Vale lembrar que este estudo se concentrou em verificar o comportamento do biomaterial nas primeiras etapas da consolidação óssea, excluindo assim a fase remodeladora,

pois se entendeu que não haveria importância nas conclusões inferidas sobre o objetivo do estudo.

Apesar de classificações melhores do grupo GECC quando comparado entre os defeitos ósseos controle de cada grupo, não ficou evidenciada diferença que sugerisse efeito sistêmico benéfico, Tavares et al. (1994) ou influência desfavorável como encontrado por Ribeiro et al. (2008). Estes autores realizaram estudos de ostectomia e estimulação do reparo ósseo à distância, ou seja, realizaram o defeito ósseo em um osso e introduziram um implante em outro osso do mesmo animal com a finalidade de descobrir se ocorreria melhora no reparo ósseo caracterizando estimulação por via sistêmica.

Com os resultados confrontados estatisticamente, o tratamento GGO e GEC não obtiveram diferença com seus respectivos controles (GGOC e GECC) tampouco entre eles, porém nota-se que quando foi utilizada a esponja com GO, as pontuações obtidas, tanto de ponte quanto de preenchimento ósseo, foram maiores do que a dos outros grupos. Vale ressaltar que ao realizar imagens radiológicas, torna-se difícil ou mesmo impossível, diferenciar finas junções fibrosas ou cartilaginosas em início de mineralização (CROSS, 2012).

Na tentativa de buscar métodos não invasivos e que forneçam informações mais consistentes, nós utilizamos em nosso estudo outra técnica para a avaliação das alterações da qualidade óssea. A tomografia computadorizada micro ou "micro-CT" é uma imagem de raio-x em 3D, obtida pelo mesmo método usado na tomografia computadorizada, mas em pequena escala com resolução maciçamente aumentada (BRUKER, 2018).

Segundo Rocha (2015), a tomografia computadorizada possui processo de aquisição de imagem semelhante ao de raio-x convencional, baseando-se também na absorção diferenciada do feixe de raio-x pelos tecidos. A imagem radiológica é gerada pela desigualdade de absorção de raios-x de cada estrutura que compõe o corpo do animal, sendo possível identificar diferentes nuances de cinza. Com isso o contraste é mostrado na imagem por meio desta

diferença de absorção de raios-x. Isso ocorre em razão de diferentes espessuras, densidade física, número atômico e pico de quilovoltagem (AVANTE et al., 2015). A imagem da tomografia tem qualidade superior à da radiografia convencional. O aparelho contém detectores que convertem os fótons de raio-x transmitidos em corrente elétrica, que é amplificada e convertida em números por meio digital. Em seguida estes dados são processados pelo computador e a imagem é formada por uma matriz de pixels (ROCHA, 2015).

As análises de energia de raios-x foram realizadas no equipamento Bruker in vivo xtreme Imaging System®, utilizando o programa Molecular Imaging Software. O sistema é calibrado por energia e a unidade X.D., utilizada neste estudo, é o valor calibrado de energia de raios-x. Vizard et al. (2010) utilizaram a energia de raios-x para propor uma possível metodologia de análises de tecido ósseo em ratos obtendo êxito em seus objetivos. Em nosso estudo foi retirado um segmento ósseo do local a ser avaliado. Como a consolidação óssea está diretamente relacionada com neoformação tecidual no local e deposição mineral, a consolidação do defeito levaria a um aumento da densidade local e como consequência um aumento de energia de raios-x verificadas com o auxílio do software. Segundo Avante (2015), o ar é menos denso seguido por gordura, água/músculo e tecido ósseo que apresenta a densidade relativa mais elevada do corpo do animal.

Os valores encontrados mostraram uma média de energia de raios-x sem diferença estatística entre os grupos aos 30 e 60 dias de pós-cirúrgico. Esperava-se que com os resultados obtidos até então em laboratório, como o favorecimento a adesão e a proliferação de osteoblastos (AGARWAL, et al. 2010; KALBACOVA, et al. 2010), a característica de promover a mineralização de hidroxiapatita com qualidade ósteocondutora (LIU et al. 2012; LIU et al. 2014), o aumento da formação de nódulos mineralizados (ZANCANELA, et al. 2016), favorecimento da formação de apatita semelhante ao tecido ósseo, adesão celular e diferenciação osteogênica (PENG, et. al. 2017), obtenção de

valores elevados de diferenciação celular óssea de células tronco mesenquimais de ratos (REN, 2017), como até mesmo a melhora da biocompatibilidade do colágeno (De MARCO, 2017) pelo óxido de grafeno, obtivéssemos neste estudo uma melhora significativa utilizando os métodos de avaliação de imagem selecionados.

Salientamos que embora o processo de reparo ósseo possa ser analisado por meio de diferentes métodos, acredita-se que a avaliação histológica permite seu conhecimento morfológico em nível de microscopia óptica e avaliação de seus aspectos mais significativos, sendo possível mostrar a verdadeira composição tecidual prevalente (GARBIN, 2001; CROSS, 2012).

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos conclui-se que a utilização da esponja de colágeno enriquecida com óxido de grafeno pode ser considerada como um possível método de preenchimento de falhas ósseas, apresentando evolução mais avançada porém sem diferença estatística relacionadas a utilização da esponja de colágeno sozinha e a não utilização de um método de tratamento no defeito ósseo segmentar experimental em rádio de coelhos, avaliadas pelos métodos de imagem radiológica tradicional e por aferição de energia de raios-x fornecidas pelo equipamento de microtomografia computadorizada de raios-x.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, S.; ZHOU, X.; YE, F.; HE, Q.; CHEN, G.C.K.; SOO, J.; BOEY, F.; ZHANG, H.; CHEN, P. Interfacing live cells with nanocarbon substrates. **Langmuir**, v.26, p.2244–2247, 2010.

AL-AQL, Z.S.; ALAGL, A.S.; GRAVES, D.T.; GERSTENFELD, L.C.; EINHORN, T.A. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction. **Journal of Dental Research**, v.87, n.2, p.107-118, 2008.

AVANTE, M.L.; PÁFARO, V.; FELICIANO, M.A.R.; CANOLA, J.C. Introdução à Radiologia. In: FELICIANO, M.A.R.; CANOLA, J.C.; VICENTE, W.R.R. **Diagnóstico por Imagem em Cães e Gatos**. São Paulo: Medvet, p.3-21, 2015.

BUNYARATAVEJ, P.; WANG, H.L. **Journal of Periodontology**. v.72, p.215-229, 2001.

BRODIE, B.C. Sur le poids atomique du graphite. **Annales de Chimie et de Physique**, v.59, p.466-472, 1960.

BRUKER, **X-ray Micro Computed Tomography (Micro-CT) for Samples**. Disponível em: <<https://www.bruker.com/products/microtomography/micro-ct-for-sample-scanning.html>> Acesso em: 18 de Maio de 2018.

CARVALHO, D.C.L.; ROSIM, G.C.; GAMA, L.O.R.; TAVARES, M.R.; TRIBIOLO, R.A.; SANTOS, I.R. Cliquet, Alberto et al. Tratamentos não farmacológicos na estimulação da osteogênese. **Revista de Saude Publica**, v. 36, n. 5, p. 647–654, 2002.

CIANINI, R.B.; RAHAL, S.C.; VOLPI, R.S.; TAGA, R.; GRANJEIRO, J.M.; CESTARI, T.M.; MAMPRIM, M.J. Mistura de proteínas morfogenéticas ósseas, hidroxiapatita, osso inorgânico e colágeno envolta por membrana de pericárdio no preenchimento de defeito ósseo segmentar em coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.1, p.59-67, 2006.

CONSTANDA, S.; STAN, M.S.; CIOBANU, C.S.; MOTELICA-HEINO, M.; GUÉGAN, R.; LAFDI, DINISCHIOTU, K.A.; PREDOI, D. Carbon nanotubes-hydroxyapatite nanocomposites for an improved osteoblast cell response. **Journal of Nanomaterials**, v.2016, 2016.

CORSETTI, A.; BAHUSCHEWSKYJ, C.; PONZONI, D.; LANGIE, R.; SANTOS, L.A.; CAMASSOLA, M.; NARDI, N.B.; PURICELLI, E. Repair of bone defects using adipose derived stem cells combined with alpha-tricalcium phosphate and gelatin sponge scaffolds in a rat model. **Journal of Applied Oral Science**, v.25, n.1, p.10-19, 2017.

CROSS, A.R. Fracture biology and biomechanics. In: TOBIAS, K.M.; JOHNSTON, S.A.N. **Veterinary surgery small animal**. St. Louis: Elsevier, cap.41, p.565- 571, 2012.

DE MARCO, P.; ZARA, S.; DE COLLI, M.; RADUNOVIC, M.; LAZOVIĆ, V.; ETTORRE, V.; DI CRESCENZO, A.; PIATTELLI, A.; CATALDI, A.; FONTANA, A. Graphene oxide improves the biocompatibility of collagen membranes in an in vitro model of human primary gingival fibroblasts. **Biomedical Materials**. v.12, n.5, 2017.

DIMITRIOU, R.; TSIRIDIS, E.; GIANNOUDIS, P.V. Current concepts of molecular aspects of bone healing. **Injury**, v.36, p.1392-1404, 2005.

DO PRADO, T.D.; RIBEIRO, R.G.; DAMASCENO, A.D.; DE NARDI, A.B. Hemostasia e procedimentos anti-hemorrágicos. *Agragian Academy*, v.1, n.01, p.210-227, 2014.

DONARUMA, L. G. Definitions in biomaterials, in: D. F. Williams, Elsevier, Amsterdam, 1987, p.72. *Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition*, v. 26, n. 9, p. 414–414, 20 ago. 1988.

DONG, Y.; LIU, W.; LEI, Y.; WU, T.; ZHANG, S.; GUO, Y.; LIU, Y.; CHEN, D.; YUAN, Q.; WANG, Y. Effect of Gelatin Sponge with Colloid Silver on Bone Healing in Infected Cranial Defects. **Materials Science & Engineering: C**, v.70, n. 1, p.371-377, 2017.

DOUAT, E.S.V. **Estudo comparativo do efeito do ultra-som terapêutico de 1MHZ com frequência de repetição de pulso de 100MHZ e 16 HZ no reparo de osteotomia por escareação em tibia de rato**. 2004. 74f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

DREYER, D.R; PARK, S.; BIELAWISKI, C.W.; RUOFF, R.S. The chemistry of graphene oxide. **Chemical Society Reviews**, v.39, p.228-240, 2010.

EGGER, E., PLUHAR, E. Aceleração da cicatrização da fratura. In: BOJRAB, M.J. **Mecanismos das Doenças em Cirurgias de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, p.681-688, 2014.

FINKEMEIER, C. G. Bone-grafting and bone graft substitutes. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, Needham, v. 84, n. 3, p. 649-58, 2002

FREITAS, S.H.; DÓRIA, R.G.S.; MENDONÇA, F.S.; SANTOS, M.D.; MOREIRA, R.; SIMÕES, R.S.; CAMARGO L.M.; MARQUES, A.T.C.; SIMÕES, M.J. Tomografia computadorizada da matriz óssea mineralizada heteróloga fragmentada e metilmetacrilato na reparação de falhas ósseas segmentares

produzidas em tibia de coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.6, p.1547-1554, 2012.

GABRIELLI, M.A.C.; VIEIRA, E.H.; PALEARI, A.G.; CERRI, P.S.; KLÜPPEL, L.E. Avaliação histológica de agentes hemostáticos implantados em mandíbulas de coelhos. **Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-facial**, v.9, n.2, p. 97 - 106, 2009.

GARBIN JÚNIOR, E. A. Influência de solução anestésica local contendo articaína no processo de reparo em feridas de extração dental: análise histológica em ratos. 151f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2001.

GAZZERI, R.; De BONIS, C.; GALARZA, M. Use of a Thrombin-gelatin Hemostatic Matrix (Surgiflo) in Spinal Surgery. *Surgical Technology International*, v.25, p.280-285, 2014.

GERSTENFELD, L.C.; ALKHIARY, Y.M.; KRALL, E.A.; NICHOLLS, F.H.; STAPLETON, S.N.; FITCH, J.L. Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.54, p.1215-1228, 2006.

GERSTENFELD, L.C.; CULLINANE, D.M.; BARNES, G.L.; GRAVES, D.T.; EINHORN, T.A. Fracture healing as a post-natal developmental 33 process: molecular, spatial and temporal aspects of its regulations. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.88, p.873-884, 2003.

GUARNIERO, R.; VAZ, C.E.S.; SANTANA, P.J.; MOLIN, É.D.; BRAUN, J.; HARADA, M.S.H. Avaliação do efeito do ibandronato na consolidação de fratura: estudo experimental em coelhos. **Revista Brasileira de Ortopedia**. v.42, n.8, 2007.

GRIFFON D.J. Fracture healing. In JOHNSON A.L.; HOULTON J.E.; VANNINI R. **AO Principles of Fracture Management in the Dog and Cat**. New York: Thieme Medical Publishers, p.529, 2005.

HARKNESS, J.E.; WAGNER, J.E. **Biologia e clínica de coelhos e roedores**. Ed. Roca, 3ªed., São Paulo-SP, 1993.

HIRATA, M.; GOTOU, T.; HORIUCHI, S.; FUJIWARA, M.; OHBA, M. Thin-film particles of graphite oxide 1. **Carbon**, v.42, n.14, p. 2929–2937, 2004.

HORNER, E.A.; KIRKHAM, J.; WOOD, D.; CURRAN, S.; SMITH, M.; THOMSON, B.; YANG, X.B. Long bone defect models for tissue engineering

applications: criteria for choice. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v.16, p.263-271, 2010.

HUMMERS, W.S.; OFFEMAN, R.E. Preparations of graphitic Oxide. **Journal of the American Chemical Society**, v.80, n.6, p.1339, 1958.

INTROINI, S.O. **Avaliação do Reparo Tecidual em Defeito Ósseo por Microtomografia Tridimensional por Raios-X**. 2011. 72 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koongan, 2013. 556p.

KALBACOVA, M.; BROZ, A.; KONG, J.; KALBAC, M. Graphene substrates promote adherence of human osteoblasts and mesenchymal stromal cells. **Carbon**, v.48, p. 4323–4329, 2010.

KHAN, S.N.; LANE J.M. Spinal fusion surgery: animal models for tissue-engineered bone constructs. **Biomaterials**, v.25, p.1475-1485, 2004.

KURANTOWICZ, N.; SAWOSZ, E.; HALIK, G.; STROJNY, B.; HOTOWY, A.; GRODZIK, M.; RADOSŁAW, P.; PASANPHAN, W.; CHWALIBOG, A. Toxicity studies of six types of carbon nanoparticles in a chicken-embryo model. **International Journal of Nanomedicine**, v.12, p.2887–2898, 2017.

LIU, H.; CHENG, J.; CHEN, F.; BAI, D.; SHAO, C.; WANG, J.; XI, P.; ZENG, Z., Gelatin functionalized graphene oxide for mineralization of hydroxyapatite: biomimetic and in vitro evaluation. **Nanoscale**, v. 6, p. 5315-5322, 2014.

LIU, H.; XI, P.; XIE, G.; SHI, Y.; HOU, F.; HUANG, L.; CHEN, F.; ZENG, Z.; SHAO, C.; WANG, J., Simultaneous reduction and surface functionalization of graphene oxide for hydroxyapatite mineralization. **The Journal of Physical Chemistry C**, v.116, p.3334-3341, 2012.

LIU, T.; TANG, H.Q.; CAI, X.M.; ZHAO, J.; LI, D.J.; LI, R.; SUN, X.L. A study on bactericidal properties of Ag coated carbon nanotubes. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v.264, n.2, p.282–286, 2007.

MACEDO, N.G. **Estudo e desenvolvimento de grafite como agente anti-chama para PVC**. 2011. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

MELLONIG J.T. Porous particulate hydroxyapatite in a human periodontal osseous defect: a case report. *Int. J. Periodontics Restorative Dent.* v. 11, p.217-223, 1991.

MEHRALI, M.; MOGHADDAM, E.; SHIRAZI, S.F.S.; BARADARAN, S. MEHRALI, M.; LATIBARI, S.T.; METSELAAR, H.S.C.; KADRI, N.A.; ZANDI, K.; OSMAR, N.A.A. Synthesis, mechanical properties, and in vitro biocompatibility with osteoblasts of calcium silicate-reduced graphene oxide composites. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v.6, n.6, p.3947–3962, 2014.

MISRA, S.K.; KONDAIAH, P.; BHATTACHARYA, S.; RAO, C.N.R. Graphene as a Nanocarrier for tamoxifen induces apoptosis in transformed cancer cell lines of different origins. **Small**, v.8, p. 131–143, 2012.

MOHAN, B.G.; SHENOY, S.; BABU, S.S.; VARMA, H.K.; JOHN A. 2013. Strontium calcium phosphate for the repair of leporine (*Oryctolagus cuniculus*) ulna segmental defect. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.101, p.261–271, 2013.

MORATO, G.O. **Osso esponjoso liofilizado de cão utilizado como enxerto puro e associado a plasma rico em plaquetas ou medula óssea em falhas ósseas induzidas em coelhos – estudo experimental.** 2013. 80f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal – SP, 2013.

NATHER, A.; DAVID, V.; TENG, J.W.; LEE, C.W.; PEREIRA B.P. Effect of autologous mesenchymal stem cells on biological healing of allografts in critical-sized tibial defects simulated in adult rabbits. **Annals Academy of Medicine.** v.39, n.8, p. 599-606, 2010.

NOVOSELOV, K.S.; GEIM, A.K.; MOROZOV, S.V.; JIANG, D.; ZHANG, Y.; DUBONOS, S.V.; GRIGORIEVA, I.V.; FIRSOV, A.A. Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. **Science**, v.306, p.666–669, 2004.

NUNAMAKER, V.M.D. Experimental model of fracture repair. **Clinical Orthopaedics and Related Research.** v.355, p.57-65, 1998.

OLIVEIRA, G.K.; RAISER, A.G.; OLSSON, D.; SALBEGO, F.Z.; MARTINS, D.B.; DEZENGRINE, R.; SANTOS JUNIOR, E.B.; RAPPETI, J.; TRINDADE, L.B.; TOGNOLI, G.K.; PIPPI, N.L.; SAUSEN, L. Células-tronco mononucleares autólogas e proteína óssea morfogenética na cicatrização de defeitos tibiais experimentalmente induzidos em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.1, p.72–79, 2010.

PANZARINI, E.; VERGALLO, C.; MARIANO, S. A study on Biocompatibility of Carbon Nanoparticles in HeLa Cells is Dictated by Synthesis and Sterilization Procedures. **Nanoscience and Nanometrology**, v.2, n.1, p.1–7, 2016.

PARK, S.; RUOFF, R.S. Chemical methods for the production of graphenes. **Nature nanotechnology**, v. 4, p.45–47, 2009.

PEARCE, S.G. Animal Models for Bone Repair. **European Cells and Materials**, v.14, suppl.1, p.42, 2007.

PENG, S.; FENG, P.; WU, P.; HUANG, W.; YANG, Y.; GUO, W.; GAO, C.; SCHUAI, C. Graphene oxide as an interface phase between polyetheretherketone and hydroxyapatite for tissue engineering scaffolds. **Scientific Reports**, v.7, 2017.

POTIER, E.; PETITE, H. Utilisation thérapeutique the cellules souches en orthopedie. **Pathologie Biologie**, v.53, p.142-148, 2005.

REN, N.; LI, J.; QIU, J.; YAN, M.; LIU, H.; JI, D.; HUANG, J.; YU, J.; LIU, H. Growth and accelerated differentiation of mesenchymal stem cells on graphene-oxide-coated titanate with dexamethasone on surface of titanium implants. **Dental Materials**, v.33, n.5, p. 25–535, 2017.

RIBEIRO, F.R.; TAVARES, F.G.; SOUZA, C.K.; SOUZA, M.M.; WAISBERG, J. Resposta Osteogênica Sistêmica no Estímulo Medular ósseo. *Acta Ortopédica Brasileira*. v.17, n.2, p.29-34, 2008.

RICCI, R.; LEITE, N.C.S.; Da-SILVA, N.S.; PACHECO-SOARES, C.; CANEVARI, R.A.; MARCIANO, F.R., WEBSTER, T.J.; LOBO, A.O. Graphene oxide nanoribbons as nanomaterial for bone regeneration: Effects on cytotoxicity, gene expression and bactericidal effect. **Materials Science and Engineering C**, v. 78, p. 341–348, 2017.

ROCHA, L.M. Introdução a Tomografia Computadorizada e Ressonância Magnética. In: FELICIANO, M.A.R.; CANOLA, J.C.; VICENTE, W.R.R. **Diagnóstico por Imagem em Cães e Gatos**. São Paulo: Medvet, p.23-53, 2015.

SALVATIERRA, R.V.; DOMINGUES, S.H.; OLIVEIRA, M.M.; ZARBIN, A.J. Z. Tri-layer graphene films produced by mechanochemical exfoliation of graphite. **Carbon**, v.57, p.410-415, 2013.

SAMUELSON, D.A. Cartilagem e Osso. In: SAMUELSON, D.A. **Tratado de Histologia Veterinária**. Rio de Janeiro, Brasil: Elsevier,. p.97–124, 2007.

SILVA, A.M.H. **Análise Morfométrica 2D e 3d DE Amostras de Osso Trabecular Utilizando Microtomografia Tridimensional por Raios-X.** 2009. 77f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

STAUDENMAIER, L. Verfahren zur Darstellung der Graphitsäure, **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v.31, p.1481-1487, 1898.

SUPRONOWICZ, P.R.; AJAYAN, P.M.; ULLMAN, K.R.; ARULANANDAM, B.P.; METZGER, D.W.; BIZIOS, R.J. Novel current-conducting composite substrates for exposing osteoblasts to alternating current stimulation. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.59, n.3, p. 499– 506, 2002.

TAVARES, F.G.; CAFALLI, F.A.S.; SILVA, M.M.; SOUZA, L.F.; BELLOTE, M.R.; SCARPE, R.A. Resposta osteogênica por lesão esquelética à distância: estudo experimental em coelho. **Revista Brasileira de Ortopedia**. V.29, n.6, p.416-20,1994.

TSAI L.W, LIN Y.C, PEREVEDENTSEVA E., LUGOVTSOV A., PRIEZZHEV A., CHENG CL. Nanodiamonds for Medical Applications: Interaction with Blood in Vitro and in Vivo. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17, n.7, 2016.

VALLÉS, C.; DRUMMOND, C.; SAADAOU, H.; FURTADO, C. A.; HE, M.; ROUBEAN, D.; ORTOLANI, L.; MONTHIOUX, M., PENICAUD, A. Solutions of negatively charged grapheme sheets and ribbons. **Journal of the American Chemical Society**, v.130, n.47, 2008.

VIZARD, D.L.; WOOD, D.O.; PAPINENI, R.V.L.; FEKE, G.D.; ORTON, S.P.; MCLAUGHLIN, W.E. Analytical radiography for planar radiographic images implemented with a multi-modal system. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**. v.99, p.88-97, 2010.

YAMAMOTO, Y.; WASHIMI, Y.; KANAJI, A.; TAJIMA, K.; ISHIMURA, D.; YAMADA, H. The effect of bisphosphonate and intermittent human parathyroid hormone 1-34 treatments on cortical bone allografts in rabbits. **Journal of Endocrinological Investigation**. v.35, p.139-145, 2012.

YANG, K.; FENG, L.; SHI, X.; LIU, Z. Nano-graphene in biomedicine: Theranostic applications. **Chemical Society Reviews**, v.42, n.2, p.530–547, 2013.

ZANCANELA, D.C.; SIMAO, A.M.S.; FRANCISCO, C.G.; DE FARIA, A.N.; RAMOS, A.P.; GONÇALVES, R.R.; MATSUBARA, E.Y.; ROSOLEN, J.M.; CIANCAGLINI, P. Graphene oxide and titanium: synergistic effects on the

biomineralization ability of osteoblast cultures. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.27, n.4, p. 1–9, 2016.

ZARBIN, A.J.G.; OLIVEIRA, M.M. Nanoestruturas de carbono (nanotubos, grafeno): Quo Vadis? **Química Nova**, v.36, n.10, 2013.

ZHANG, W.; ZHAO, F.; HUANG, D.; FU, X.; LI, X.; CHEN, X. Strontium-Substituted Submicrometer Bioactive Glasses Modulate Macrophage Responses for Improved Bone Regeneration. **ACS applied materials & interfaces**. V.8, n.45, p.1-38,2016.