



Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Faculdade de Medicina de Botucatu

Ryane Schmidt Brock

**Retalho ósseo de gálea e periósteo
preenchido com pó de osso.
Estudo em coelhos.**

Botucatu

2012

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Faculdade de Medicina de Botucatu

Ryane Schmidt Brock

Retalho ósseo de gálea e periósteo preenchido com pó de osso.

Estudo em coelhos.

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, para obtenção do
título de Mestre em Bases Gerais da
Cirurgia.

Área de concentração: Bases da
Cirurgia.

Orientador: Prof. Adj. Fausto Viterbo

Botucatu

2012

Catálogo na Publicação
Serviço de Documentação
Faculdade de Medicina de Botucatu

Brock, Ryane Schmidt

Retalho ósseo de gálea e periósteo preenchido com pó de osso. Estudo em coelhos.

Osseus flap of galea and periosteum filled with bone fragments. Study in rabbits.

Orientador: Fausto Viterbo

Botucatu, 2012.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Bases Gerais da Cirurgia).

Área de Concentração: Bases da Cirurgia

Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”

1.Osso. 2. Calvária. 3. Retalhos. 4. Reconstrução. 5. Face. 6. Enxerto ósseo.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ryane Schmidt Brock

Retalho ósseo de gálea e perióstio preenchido com pó de osso. Estudo em coelhos.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", para obtenção do título de Mestre em Bases Gerais da Cirurgia.

Área de concentração: Bases da Cirurgia.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico aos meus pais,

Roger Brock e Emmy Schmidt Brock,

pelo apoio e compreensão em todos os meus objetivos e
pelo exemplo de força, perseverança e trabalho que vou respeitar e seguir
sempre.

Dedico aos meus irmãos,

Romy Schmidt Brock Zacharias e Roger Schmidt Brock,

pelo companheirismo e amizade fundamentais para esta trajetória.

Agradecimentos

Agradeço ao

Prof. Dr. Fausto Viterbo de Oliveira Neto,

meu orientador,

pelo incentivo, apoio e confiança sempre presentes e fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Agradecimentos

Ao Dr. Silvio Zanini pela colaboração e sabedoria que contribuíram para a realização deste trabalho.

À Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues, professora e responsável pelo Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista - UNESP, pela atenção e auxílio, fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Cirurgia e Ortopedia pelo auxílio e dedicação aos alunos e aos animais do biotério.

Cuidados e atenção essenciais para o sucesso dos trabalhos científicos.

Ao funcionário Lucas, do Laboratório de Urologia, pela contribuição na confecção das lâminas para o estudo histológico.

À Eloisa Elena Paschoalinotte, pela atenção e contribuição na análise estatística.

Ao aluno de iniciação científica Guilherme Capel e aos residentes de cirurgia plástica Jaime Eduardo Pachon Suarez e Renato Castro Monzón pelo auxílio prestado.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Lista de figuras e tabelas

Resumo

Summary

1.	Introdução	1
	1.1 Enxertos ósseos	2
	1.2 Retalhos	2
	1.3 Materiais aloplásticos	4
	1.4 Substitutos ósseos	4
	1.5 Engenharia tecidual	5
	1.6 Fáscia muscular e periósteo	7
2.	Objetivo	9
3.	Método	10
4.	Resultados	15
	4.1 Análise radiográfica	15
	4.2 Análise macroscópica	17
	4.3 Análise microscópica	17
5.	Discussão	19
	5.1 Análise radiográfica	20
	5.2 Análise macroscópica	21
	5.3 Análise microscópica	22
6.	Conclusão	26
7.	Figuras e tabelas	27
8.	Referências bibliográficas	45
9.	Artigo	53

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS:

UNESP – Universidade Estadual Paulista

g – grama

mg - miligrama

Kg – kilograma

ml - mililitros

mm – milímetro

BMP - bone morphogenetic protein

OP-1 - proteína osteogênica-1

PRP – Plasma rico em plaquetas

PDGF – Platelet-derived growth factor (Fator de crescimento derivado de plaqueta)

TGF- β – Transforming growth factor beta (Fator de crescimento de transformação beta)

VEGF – Vascular endothelial growth factor (Fator de crescimento endotelial vascular)

IGF-I – Insulin growth factor (Fator de crescimento semelhante a insulina tipo I)

EGF – Epidermal growth factor (Fator de crescimento epidérmico)

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

μ m - micrômetro

Gc – Grupo Controle

Gt – Grupo Tratado

LISTA DE FIGURAS E TABELAS:

- Figura 1 - Preparo e posicionamento do coelho com realização da tricotomia e marcação do local da incisão mediana. _____ 27
- Figura 2 - Incisão mediana, dissecação e levantamento de retalhos cutâneos até a gálea. _____ 27
- Figura 3 - Medida da incisão mediana de 6 cm e medida do retalho de 15 mm x 30 mm. _____ 27
- Figura 4 - Identificação dos vasos do pedículo vascular, os vasos temporais, que serão responsáveis pela vascularização do retalho de gálea e periósteo. _____ 28
- Figura 5 - Dissecação de gálea e periósteo e levantamento do retalho medindo 15 x 30 mm. _____ 28
- Figura 6 - Confeção de retalho tubular de gálea e periósteo, com este voltado para dentro. Dissecação e levantamento de gálea e periósteo do lado contralateral expondo a calota craniana, onde será retirado o pó de osso. _29
- Figura 7 - Raspagem da cortical da calota craniana do lado esquerdo, com lâmina nº 23, confeccionando o pó de osso que será introduzido no retalho tubular. _____ 29
- Figura 8 - Introdução do pó de osso no retalho tubular, sutura e fixação na porção anterior da gálea. _____ 30
- Figura 9 - Os animais foram submetidos à exames radiográficos da calota craniana após anestesia. _____ 30
- Figura 10 - Exame radiográfico de um animal no pré-operatório, evidenciando o aspecto normal da calota craniana do coelho, em incidências dorso-ventral (A) e perfil (B). _____ 31
- Figura 11 - Imagem radiográfica do animal nº 28, em perfil, onde é possível verificar uma imagem hiperdensa na região superior à calota craniana. Este

foi um dos animais nos quais se comprovaram a neoformação óssea nas análises histológicas. _____ 31

Figura 12 - Imagem macroscópica de formação espiculada no interior do retalho após 60 dias de pós operatório. _____ 32

Figura 13 - Imagem macroscópica de massa de tecido neoformado na análise do coelho nº 19 (A). Imagem de análise macroscópica de coelho nº 26 antes e após a abertura do retalho, evidenciando massa irregular e disforme (B e C). _____ 32

Figura 14 - Análise microscópica do coelho nº 40, pertencente do Grupo controle, demonstrando imagem óssea de aspecto trabecular, irregular. __ 33

Figura 15 - Imagem de lâmina corada com Tricrômio de Massom do coelho nº 39, com 5x de aumento, com formação óssea de aspecto trabecular e proliferação osteoblástica ao redor. _____ 33

Figura 16 - Análise microscópica do coelho nº 26 (Gt), com aumento de 2,5x, corado com hematoxilina-eosina, demonstrando formação óssea organizada e bem delimitada. _____ 34

Figura 17 - Imagem microscópica do coelho nº 3, com aumento de 2,5x, corado com Tricrômio de Massom. Demonstra-se a imagem de tecido ósseo, de coloração bem azulada e bem delimitada. _____ 34

Figura 18 - Imagem microscópica do coelho nº 20, com aumento de 10x, em coloração de Tricrômio de Massom (A) e hematoxilina-eosina (B). Evidencia-se a formação de neovasos no interior da imagem óssea, indicando neovascularização. _____ 35

Figura 19 - Lâmina corada com hematoxilina-eosina do coelho nº 19, evidenciando-se imagem óssea organizada, bem delimitada, bordos regulares e vasos no interior da formação óssea. _____ 35

Figura 20 - Resultados comparativos em porcentagem (%) entre as análises radiográficas de 30 e 60 dias e análise anátomo-patológica no Grupo controle. _____ 36

Figura 21 - Resultados comparativos em porcentagem (%) entre as análises radiográficas de 30 e 60 dias e análise anátomo-patológica no Grupo tratado. _____	36
Figura 22 - Diferença no diagnóstico radiográfico entre os examinadores nos Grupos controle e tratado. _____	37
Figura 23 - Diferença do diagnóstico de formação óssea pelo exame histológico entre os grupos Gc e Gt. _____	37
Tabela 1 - Distribuição da massa dos animais do Grupo controle e do Grupo tratado medido em g (gramas). _____	38
Tabela 2 - Massa inicial dos animais do Grupo tratado e análise de formação óssea no exame microscópico. _____	39
Tabela 3 - Avaliação radiográfica após 30 dias de pós-operatório dos animais do Gc realizada pelos examinadores 1, 2 e 3. _____	39
Tabela 4 - Índice de concordância Kappa. _____	40
Tabela 5 - Avaliação radiográfica dos animais do Gc aos 60 dias. _____	40
Tabela 6 - Avaliação radiográfica após 30 dias de pós-operatório dos animais do Gt realizada pelos examinadores 1, 2 e 3. _____	41
Tabela 7 - Avaliação radiográfica dos animais do Gt aos 60 dias. _____	42
Tabela 8 - Avaliação macroscópica do Gc e do Gt, quanto ao sangramento do campo operatório, sangramento do retalho e presença de massa de tecido neoformado visível à abertura do retalho. Os animais de número 1 a 30 pertencem ao Gt e os animais de número 31 ao 40 pertencem ao Gc. ____	43
Tabela 9 - Valores das áreas e perímetros das imagens ósseas presentes nas análises histológicas dos animais do Grupo tratado. _____	44
Tabela 10 - Valores das áreas e perímetros das imagens ósseas presentes nas análises histológicas do Grupo controle. _____	44

RESUMO:

Introdução: Defeitos ósseos decorrentes de traumas, ressecções de tumores ou mesmo malformações congênitas, são encontrados com frequência na prática médica. O tratamento destas deformidades é feito mediante reconstruções cirúrgicas, principalmente na cirurgia plástica, proporcionando aos pacientes melhor qualidade de vida.

Os defeitos ósseos são corrigidos preferencialmente com enxertos ósseos autólogos por não causarem rejeição, mas estes apresentam como desvantagens a morbidade das áreas doadoras e a grande porcentagem de absorção dos enxertos, com diminuição ou perda do resultado final.

Outros métodos de reconstrução, como o uso de materiais aloplásticos, são utilizados mas, muitas vezes, evoluem com rejeição e extrusão ou infecção, e necessitam ser retirados. Retalhos livres, compostos de osso com músculo ou derme e subcutâneo, em casos graves, representam a melhor opção. Entretanto, este método requer preparo específico da equipe cirúrgica, maior tempo de cirurgia e, muitas vezes, apresenta trombose vascular e perda do retalho.

Objetivo: Avaliar a viabilidade e a formação óssea em retalho gáleo-periosteal preenchido com pó de osso em calota craniana de coelhos.

Método: Foram estudados 40 coelhos divididos em dois grupos, o primeiro com retalho gáleo-periosteal e o segundo com o mesmo retalho, porém preenchido com pó de osso.

Resultados: Os resultados demonstraram neoformação óssea em ambos, mas com diferenças na estrutura e conformação óssea.

Conclusão: O retalho gáleo-periosteal preenchido com pó de osso em calota craniana de coelhos é viável. A formação óssea ocorreu em ambos os grupos, preenchido ou não com pó de osso. A maturidade do tecido ósseo foi maior nos retalhos preenchidos com pó de osso.

Palavras-chave: osso, calvária, retalhos, reconstrução, face, enxerto ósseo.

SUMMARY

Introduction: Osseus defects from traumas, tumor resections or congenital malformations are usual in medical practice. The treatment of these deformities has been made with reconstructive surgeries, specially in plastic surgery, to give the patients better quality of life.

The osseus defects are usually corrected with autologous bone grafts. These grafts are used because they do not cause rejection. However, they have disadvantages like the donor site morbidity, the high number of absorption of these grafts and the final result partial or total lost.

Other reconstruction methods like alloplastic materials are used, but they have high percentage of rejection and extrusion or even infection of these materials, which need to be taken off. Flaps of bone and muscle or dermis and subcutaneous are considered the best choice in difficult cases. However, this method needs specific training of the medical group, longer surgeries and, sometimes, presents the flap necrosis after vascular thrombosis.

Purpose: To study the viability and bone neoformation in a vascularized galea and periosteum flap filled with bone fragments.

Method: Fourty rabbits were studied, and divided into two groups. One had a simple galea and periosteum flap done and the other had the same flap done but filled with bone fragments of the calvaria.

Results: The results demonstrated bone formation in both groups, but with differences in the bone form and structure.

Conclusion: The galea-periosteum flap filled with bone dust at rabbit's calvaria is viable. The bone formation happened in both groups, with or without bone dust. Bone maturity was higher in the flaps filled with bone dust.

Key words: bone, calvaria, flap, reconstruction, face, graft.

1. INTRODUÇÃO:

Defeitos ósseos resultantes de ressecções tumorais, malformações congênitas ou traumas requerem uma reconstrução adequada para restabelecer a parte funcional como a deglutição, fala e respiração, além do fator estético dos pacientes¹⁻⁵.

Tumores na face como tumores ósseos de maxila ou mandíbula precisam de extensa ressecção e causam grandes deformidades. Muitas vezes são neoplasias que necessitam tratamento adjuvante como a radioterapia. A radioterapia age no local do tumor e tecidos adjacentes com repercussões na cicatrização resultando em maior fibrose e menor vascularização local. A toxicidade da radioterapia afeta o desenvolvimento ósseo, o remodelamento e a cicatrização de fraturas, devido ao aumento da apoptose e comprometimento da vascularização o que também dificulta as futuras reconstruções e proporciona seqüelas com alterações na fala e mastigação^{6,7}. Além disso, estas deformidades pós-operatórias causam também repercussões sociais, pois esses pacientes apresentam falhas e cicatrizes faciais, dificuldades na fala e alimentação que prejudicam a socialização^{6,7}.

Malformações congênitas como Síndromes de Franceschetti, Goldenhar e Crouzon, fissuras faciais, hipoplasia de maxila e mandíbula, estão entre as deformidades faciais congênitas que requerem tecido ósseo para o tratamento, visando aprimoramento funcional, proporcionando crescimento adequado e a inclusão social destas crianças^{8,9}.

Outra grande causa de deformidades faciais são os traumas, principalmente decorrentes de acidentes de trânsito. Muitas vezes, apenas a correção de fraturas não é suficiente, pois pode ocorrer perda de tecidos moles e ósseos, que necessitam reparação cirúrgica para preenchimento destas perdas teciduais^{5,10}.

Para tais deformidades, diversas técnicas de reparação tem sido descritas como enxertos ósseos autólogos, retalhos locais, retalhos

microcirúrgicos, materiais aloplásticos, substitutos ósseos e engenharia tecidual^{3-6,11-13}.

1.1. Enxertos ósseos autólogos:

O enxerto ósseo é muito utilizado em reconstruções cirúrgicas e pode ser retirado principalmente da calota craniana, costela e crista ilíaca. Possui como vantagens a boa integração óssea sem risco de rejeição por ser tecido autólogo, isto é, originário do próprio paciente. No entanto, apresenta grau variável de absorção, que modifica o resultado pós-operatório. Enxertos ósseos de cortical apresentam menor absorção que aqueles compostos pela medular, e sua viabilidade, segundo alguns autores, diminui se o osso for exposto ao ar ambiente por um período maior que 30 minutos ou imerso em solução salina por mais de uma hora^{3,5}.

Além disso, devem-se considerar outras desvantagens como a morbidade da área doadora e a dificuldade de conformação do enxerto ósseo para corrigir a deformidade^{2,5,12,14-24}.

O osso frontal de calota craniana foi utilizado em 1982, por Tessier, para reparar deformidades craniofaciais, no entanto, a região parietal é preferencial devido à maior espessura e menor risco de morbidade na área doadora^{23,25}.

1.2. Retalhos:

Os retalhos locais são utilizados em defeitos menores e que possuam tecido viável ao seu redor. Utilizam vascularização local, próxima à área da lesão.

O retalho de fáscia têmporo-parietal, introduzido por Golovine em 1898, é muito utilizado nas reconstruções faciais por apresentar vantagens como uma fina e resistente cobertura para tecido ósseo ou cartilaginoso e com o suprimento sangüíneo necessário para a viabilidade destes tecidos. O pedículo vascular contém a artéria e a veia temporal superficial. Mas, apesar

de pouca morbidade da área doadora, fica restrito para a utilização apenas em áreas próximas como zigoma, órbita e maxila. Por ser pediculado não alcança deformidades inferiores como as localizadas na mandíbula e pescoço²⁶⁻²⁸.

Os retalhos compostos de fáschia têmporo-parietal e calvária promovem bom volume e cobertura de tecido nas reconstruções de defeitos faciais, mantém a vascularização pelo pedículo que o torna mais resistente a infecções e com menor absorção óssea. Podem ser usados em reconstruções de maxila, assoalho de órbita e zigoma. O osso da calota craniana utilizado é, preferencialmente, o parietal, e pode ser usado em toda sua espessura ou apenas a tábua externa, que proporciona menor morbidade. A retirada do fragmento ósseo pode apresentar 10% de risco de exposição da dura-máter, mas a incidência de seqüela neurológica é menor que 1%²⁹.

Os retalhos vascularizados de calota craniana são superiores aos enxertos ósseos de calvária, tanto histologicamente como anatomicamente, e a superioridade está na menor taxa de absorção deste tecido transferido^{18,29}.

Os retalhos de calota craniana são capazes de manter maior massa óssea, maior quantidade de osteócitos viáveis, minimizam a absorção e aumentam a integração óssea, com menores taxas de infecção²⁹.

Os retalhos livres não tem limitação quanto à distância da área receptora. São vascularizados, permitindo menor absorção tecidual no pós-operatório. São utilizados em reconstruções mais complexas, onde outros métodos não estão disponíveis ou não são suficientes.

A limitação desta técnica é basicamente a ocorrência de trombose arterial ou venosa, o que determina a perda total do retalho. Esta técnica necessita equipamentos específicos como materiais e fios delicados, microscópio e equipe treinada em microcirurgia. Há também número limitado de áreas doadoras e algumas podem apresentar seqüelas importantes quando ressecadas^{2,3,7,15,17,18,30-36}.

O osso é o único órgão que tem a capacidade de regeneração própria, independente de outros tecidos⁹.

Segmentos ósseos vascularizados foram implantados em diversos tecidos como músculo, grande omento, perióstio e fáscia. Todos apresentaram capacidade de irrigação do tecido ósseo, mas apenas o perióstio demonstrou ser um meio capaz de promover a formação óssea³³.

O perióstio é uma membrana vascularizada que recobre o osso e possui uma rica fonte de células com grande importância na cicatrização óssea. Estudos mostram que o perióstio pode induzir a formação tanto de cartilagem, quanto de tecido ósseo dependendo de fatores do meio como oxigenação e níveis de proteína presentes, sendo um componente necessário para o crescimento, cicatrização e remodelamento ósseo. Ele promove a vascularização e possui osteoblastos e osteoclastos, importantes nestes processos^{9,33,37}.

O perióstio é um tecido membranoso que cobre os ossos exceto nas articulações. Na camada interna contém células tronco mesenquimais com potencial de diferenciação em osteoblastos, condroblastos, adipócitos e miócitos. Na camada externa, contém fibroblastos e células tronco mesenquimais. Os fibroblastos e os osteoblastos produzem uma matriz colágena^{9,18}.

Quando o perióstio é retirado a cicatrização óssea é prolongada⁹.

O osso membranoso, presente na calota craniana, mandíbula e maxila é formado diretamente de células tronco mesenquimais que diferenciam-se em osteoblastos⁹.

Existem diferenças morfológicas e na reparação entre o perióstio de ossos intramembranosos e endocondrais (ossos longos). Nos ossos intramembranosos, o perióstio possui células tronco mais ativas metabolicamente do que no perióstio de ossos endocondrais⁹.

1.3. Materiais aloplásticos:

Materiais aloplásticos como placas e parafusos de titânio, implantes de polimetilmetacrilato, polietileno poroso, hidroxiapatita, cerâmicas e siloxanos polimerizados ou silicone, também podem ser utilizados nas reconstruções, mas apresentam desvantagens como maior risco de infecção, extrusão, rejeição e absorção do osso subjacente por compressão óssea. Além de tornarem-se instáveis com o crescimento ósseo quando utilizados em deformidades craniofaciais infantis^{2,11,20,21,23,38,39}.

1.4. Substitutos ósseos:

Os substitutos ósseos são substâncias comercialmente utilizadas que tem propriedades como biocompatibilidade óssea, osteocondução e osteoindução. Podem ser de origem humana, cerâmica (hidroxiapatita, tricálcio-fosfato), vidro bioativo, sulfato de cálcio ou polímeros. São capazes de fazer a reparação óssea, mas apresentam absorção e não mantém a espessura óssea necessária para um bom resultado¹³.

1.5. Engenharia tecidual:

Avanços nas técnicas de engenharia tecidual possibilitam novos procedimentos em cirurgia reparadora. Um molde ideal, de tamanho apropriado, que permita a migração celular em uma matriz adequada, pode promover o crescimento de tecidos para reconstruções minimizando ou evitando a agressão da área doadora.

As células tronco mesenquimais foram diferenciadas experimentalmente em linhagens de tecidos conectivos e mesenquimais por Caplan em 1991 e Pittenger e col. em 1999. Estas células têm a capacidade de neoformação ou regeneração de estruturas craniofaciais. As células adultas mesenquimais são derivadas de diversos tecidos como a medula óssea, tecido celular subcutâneo, músculo, polpa dentária, sinóvia e cordão umbilical, que são potenciais doadores para a terapia celular^{2,3,6,12,40-44}.

O tecido adiposo é composto por adipócitos maduros e células vasculares estromais heterogêneas e a medula óssea é composta por múltiplas células incluindo adipócitos, células hematopoiéticas, células

osteoprogenitoras e estromais, necessárias para a hematopoiese. O tecido adiposo e a medula óssea contêm células tronco mesenquimais com potencial de diferenciação celular em múltiplas linhagens. As células tronco mesenquimais da medula óssea são capazes de diferenciarem-se em células ósseas quando em condições adequadas. São consideradas células multipotentes, capazes de diferenciar-se em osteoblastos, condrócitos, adipócitos e miócitos^{2,3,6,12,40-45}.

Células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo, isoladas por Zuk e col. (2001), são mais acessíveis e abundantes. Podem ser coletadas de fragmentos de subcutâneo ou através de lipoaspiração. Estudos demonstraram que também podem ser utilizadas para formar tecido ósseo em defeitos recentes de calota craniana de animais, causam regeneração óssea quando administradas em osteonecrose de cabeça de fêmur e podem ser cultivadas *in vitro*^{25,40,43,46-49}.

Proteínas como a BMP (bone morphogenetic protein) e a proteína osteogênica-1 (OP-1) tem grande importância na formação óssea. A BMP tem papel fundamental no crescimento e diferenciação de diversos tipos celulares como os osteoblastos. A OP-1 promove maturação e diferenciação de células da medula óssea em osteoblastos. Estudos como os de Sampath e col. (1992) e Yeh e col. (2004) demonstraram que a OP-1, adicionada à cultura de células ósseas enriquecidas com osteoblastos em diferentes estágios de diferenciação, estimulam a proliferação celular, a formação de colágeno e a síntese de osteocalcina, um peptídeo não colagenoso encontrado no osso, secretado por osteoblastos maduros e que tem papel na mineralização e homeostase de íons de cálcio no organismo⁵⁰⁻⁵³.

Moldes de hidroxiapatita, silicone ou materiais cerâmicos como o tricálcio fosfato poroso, podem servir de moldes tridimensionais para os meios de cultivo celular, no entanto, assim como outros materiais aloplásticos, tem desvantagens como infecção e rejeição^{2,3,21,54,55}.

No entanto, o uso de células tronco necessita de centros especializados capazes de coletá-las e prepará-las em meios ideais, capazes de proporcionar a neoformação celular. Isto limita a sua utilização^{6,12}.

O papel fisiológico das plaquetas na cicatrização e os fatores de crescimento (PDGF, TGF- β , EGF) presentes nos alfa-grânulos plaquetários criam um ambiente propício para a cicatrização. Por este motivo vem sendo utilizado o plasma rico em plaquetas, uma amostra de plasma com concentração de plaquetas acima do nível basal, maior que $1,1 \times 10^6$ plaquetas/ μL ⁵⁶.

O plasma rico em plaquetas é considerado uma fonte natural de fatores de crescimento que influenciam a regeneração óssea. Estudos *in vitro* mostraram que o plasma rico em plaquetas aumenta a produção de colágeno, leva as células tronco mesenquimais a diferenciarem-se em condrócitos e aumentam a deposição de colágeno tipo II^{56,57}.

Muitos autores utilizaram o plasma rico em plaquetas (PRP), associado ou não a enxertos ósseos, para melhorar o reparo de tecidos moles e ósseos. Sabe-se que são fonte de diversos fatores de crescimento como PDGF, TGF- β , VEGF, IGF-I e EGF, mas ainda não há consenso entre a concentração ideal de plaquetas. Tem como vantagens a natureza adesiva, hemostasia e baixa rejeição⁵⁷⁻⁶⁰.

1.6. Fáscia muscular e periósteo:

A fáscia muscular e o periósteo já foram utilizados na confecção de retalhos ósseos vascularizados para defeitos teciduais complexos tridimensionais, pois esses tecidos possuem capacidade de irrigação de enxertos ósseos. Mas estudos mostraram que apenas o periósteo é capaz de proporcionar a formação óssea^{33,37}.

Alguns estudos demonstraram que o osso morcelizado preenchendo retalho de fáscia muscular e retalho de periósteo demonstrou que apenas a vascularização do retalho não é suficiente para a formação de tecido ósseo, pois houve formação óssea no grupo do periósteo e não no retalho fascial.

Acredita-se que a presença de fatores de crescimento presentes na matriz óssea morcelizada, assim como proteínas da família do fator de crescimento de fibroblastos, associado ao periósteo promoveu a osteogênese e resultou em formação óssea^{33,61}.

Imaginamos, então, um retalho de gálea e periósteo baseado nos vasos temporais, o qual seria invertido formando um cilindro com o periósteo para dentro e preenchido com pó de osso retirado da cortical do crânio. Este retalho poderia ser transposto sem microcirurgia e utilizado nas reconstruções de mandíbula, zigoma, malar ou órbita. Eventualmente poderia ser transferido como um retalho livre tendo os vasos temporais anastomosados em um vaso receptor. Seria uma técnica com pouca morbidade na área doadora, formação óssea capaz de preencher defeitos teciduais e com possível confecção tridimensional do tecido para reconstruir a área desejada com mais exatidão.

2. OBJETIVO:

Avaliar a viabilidade e a formação óssea em retalho gáleo-periodal preenchido com pó de osso em calota craniana de coelhos.

3. MÉTODO:

Esse estudo experimental foi realizado no período de junho de 2010 a março de 2012, no Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, tendo sido previamente aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, com o protocolo número 773.

Foram utilizados 40 coelhos da linhagem Norfolk, de aproximadamente 70 dias de vida, todos machos. Os animais tinham massa de 1730 g a 3915 g (média de 2655,75 g (+/-480,12) e foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP) - "Campus" de Botucatu.

Os coelhos foram divididos em 2 grupos: Grupo Controle (Gc) com 10 animais e Grupo Tratado (Gt) com 30 animais.

A massa inicial dos animais do Grupo controle variou de 2102 g a 2715 g, média de 2409,30 g (+/- 179,29) e no Grupo tratado a massa inicial dos animais variou de 1850 g a 3915 g, média de 2737,90 g (+/- 521,63) (Tabela 1).

Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico após anestesia com Ketamina 10% - 10mg/kg (Dopalen[®]) e Xilazina 2% - 3mg/kg (Anasedan[®]) via endovenosa, pela veia marginal da orelha, com manutenção anestésica local com Lidocaína 1% - 0,5 ml^{62,63}.

Foi realizada tricotomia na região cefálica superior com aparelho Oster[®], posicionamento ventral, seguida de marcação da incisão mediana de 6 cm (Fig. 1). Através da incisão cefálica mediana foram levantados dois retalhos cutâneos laterais e realizada dissecação até exposição da gálea (Fig. 2). Na gálea foi feita nova incisão mediana. O retalho foi previamente medido e marcado com o tamanho padrão de 15 mm de largura e 30 mm de comprimento em todos os animais (Fig. 3).

No Gc foi levantado retalho gáleo-periosteal de metade da calota craniana, do lado direito, através de descolamento subperiosteal com lâmina de

bisturi nº 23. Foram identificados os vasos temporais (Fig. 4). O retalho foi levantado nas medidas pré determinadas e invertido formando um cilindro de 30 mm de extensão com o perióstio voltado para dentro (Fig. 5). Uma sutura contínua com fio multifilamentar, absorvível, de ácido poliglicólico (Vicryl® - Ethicon/ Johnson & Johnson) 5.0, com agulha cilíndrica, foi realizada para fechar o cilindro e o mesmo foi fixado anteriormente no perióstio não manipulado, que foi mantido na calota craniana, permitindo uma orientação e localização exata do retalho nas análises realizadas. Foi realizada sutura contínua da pele com fio monofilamentar de Mononylon 5.0 (Ethicon/ Johnson & Johnson).

No Gt o mesmo procedimento foi realizado, mas neste grupo, a outra metade do perióstio foi também elevada na forma de um retalho de 15 mm x 30 mm para exposição da calota craniana, sem secção da porção lateral. Com o uso de uma lâmina nº 23 foi feita a raspagem da cortical do osso desta metade da calota craniana, obtendo-se pó de osso (Figs. 3, 4, 5, 6 e 7).

Após verificação da luz do cilindro confeccionado com a gálea e perióstio do lado direito da calota craniana, e perviedade deste com uma das extremidades de uma pinça Addison sem dente, este cilindro foi preenchido com o pó de osso retirado da cortical do lado esquerdo (Figs. 7 e 8). A quantidade de pó de osso utilizada foi a necessária para preencher todo o interior do retalho. Como todos os retalhos mantiveram um tamanho padrão, consideramos o volume de pó de osso semelhante entre as amostras. O volume exato do pó de osso utilizado para preencher cada cilindro não foi medido por dificuldade técnica e perda destes fragmentos ósseos durante a manipulação. Não houve perda ou escape do pó de osso através da sutura previamente realizada.

Após isso, o cilindro foi fechado em sua porção distal onde continha o orifício por onde foi introduzido o pó de osso e fixado em local semelhante ao Gc. O lado esquerdo teve o retalho de perióstio fixado com o mesmo fio no perióstio em sua posição anterior, restabelecendo-se em seu local anatômico. A pele foi fechada como no Gc.

Os animais foram mantidos em ambiente próprio com água e ração *ad libitum*.

Após 30 dias, os animais foram novamente anestesiados e submetidos a raio X em duas incidências, dorso-ventral e perfil, para avaliar a formação óssea do retalho pela presença de imagem hiperdensa na região cranial direita (Fig. 9).

As radiografias dos animais de ambos os grupos foram comparadas à imagem radiográfica considerada normal da calota craniana de um animal no pré-operatório, sem qualquer intervenção cirúrgica, em ambas as incidências (Fig. 10). As imagens foram avaliadas por três profissionais, cirurgiões plásticos, para comparação e diagnóstico radiográfico. A avaliação foi cega, sem conhecimento de qual grupo pertencia o animal avaliado.

Após 60 dias, este exame foi repetido com os animais anestesiados, nas mesmas duas incidências e foram repetidas as avaliações pelos três examinadores. Após o raio X, a incisão mediana foi realizada novamente e o retalho foi identificado. Neste momento, foi feita avaliação do sangramento do campo operatório, verificação do sangramento do retalho mediante abertura do cilindro de gálea e periósteo, avaliando, assim, a manutenção da vascularização deste retalho através do pedículo temporal, e visibilização de material ósseo no interior do retalho. O material foi ressecado e colocado em frasco com formol a 10% para posterior preparo de lâminas para estudo histológico. Após este procedimento os animais foram sacrificados com doses elevadas de Ketamina 10% - 80mg/kg (Dopalen[®]) e Xilazina 2% - 30mg/kg (Anasedan[®]) via endovenosa⁶³.

O retalho foi, então, enviado para avaliação histológica, sendo fixado em formol tamponado, não mais que 72h, preparado em blocos de parafina, cortados em fragmentos de 5 µm, e então corado com hematoxilina-eosina e Tricrômio de Masson.

Após a confecção das primeiras 22 lâminas, foi realizada a descalcificação com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) por 2 horas antes do preparo em blocos de parafina, devido à grande dificuldade

encontrada no corte e preparo das lâminas nas primeiras amostras. O uso do EDTA não alterou os resultados encontrados nas lâminas com a presença ou não de osso, apenas apresentava coloração mais clara, menos calcificada do tecido ósseo formado.

As lâminas foram avaliadas em microscópio *Leica DMLS*, em aumentos de 2,5x, 5x, 10x e 20x, com as imagens fotografadas e registradas em programa *Sigma Scan Pro 5*. A análise foi dividida em avaliação qualitativa celular, com a presença de osteócitos e osteoblastos e avaliação das medidas de área e perímetro da estrutura óssea neoformada, aferidas em ambos os grupos, somando todas as imagens de tecido ósseo presentes nas lâminas. Os perímetros do tecido ósseo foram aferidos em mm e as áreas em mm², através do programa *Sigma Scan Pro 5*, após calibração adequada em aumento de 2,5x. Na coloração de Tricrômio de Massom, foi realizada a análise de formação óssea através da coloração azulada, distribuição dos elementos celulares e formação trabecular ou organizada.

Análise Estatística:

Os dados foram apresentados por meio de estatística descritiva e gráfica envolvendo distribuições de frequência e gráficos de barras. Foram avaliadas frequências, médias, medianas, desvio padrão, valores mínimos e máximos.

Foram utilizados os testes de Qui-quadrado e, quando necessário, o teste exato de Fischer.

Para a comparação do peso do animal e a formação óssea foi utilizada regressão logística por tratar-se de variáveis distintas, uma variável quantitativa contínua e outra qualitativa.

A comparação dos examinadores que realizaram a análise dos resultados radiográficos foi realizada através do índice de concordância Kappa.

Para a comparação dos valores da área e perímetro entre os Gc e Gt foi utilizada a análise de variância (ANOVA) após realização do teste de normalidade.

Para todas as análises foi considerado nível de significância $p < 0,05$.

O programa utilizado para as análises estatísticas foi o SAS *for Windows* versão 9.2.

4. RESULTADOS:

Foram operados 40 coelhos no período de junho de 2010 a março de 2012. Destes, houve um óbito em um animal do Grupo tratado durante a anestesia para realização do raio X com 30 dias de pós-operatório. Vinte e nove animais, então, permaneceram no Gt e 10 animais no Gc.

A massa inicial dos animais variou de 1730 g a 3915 g, com média de 2655,75 g (+/-480,12) e a massa final variou de 3070 g a 4540 g, com média de 3634,54 g (+/-476,94). Todos os animais ganharam massa.

O Grupo controle apresentou massa inicial dos animais de 2102 g a 2715 g (média de 2409,30 g (+/- 179,29) e no Grupo tratado a massa inicial dos animais variou de 1850 g a 3915 g (média de 2737,90 g +/- 521,63). Não houve diferença estatística entre os valores das massas dos animais nos dois grupos ($p=0,0599$). A maior variação de massa foi evidenciada no Grupo tratado, mas não houve correlação dos extremos de medidas com a formação óssea apresentada na análise microscópica final (Tabela 2). Estatisticamente não houve significância entre a medida da massa do animal e a formação óssea avaliada no exame microscópico ($p=0,9677$).

4.1. Análise radiográfica:

Os trinta e nove animais submetidos a raio X após 30 e 60 dias do procedimento cirúrgico foram avaliados e as imagens radiológicas foram analisadas e comparadas a um raio X de calota craniana de um coelho, realizado antes dos procedimentos, considerado, então, como exame normal (Fig. 10).

Nas imagens radiológicas de 30 dias, a análise dos examinadores foi muito variável (Tabela 3). O Gc apresentou imagem hiperdensa em região cranial que sugeria formação óssea na radiografia de perfil, que variou de um animal (10%) a nove animais (90%). Os animais restantes do grupo não apresentaram alterações nos exames radiológicos em ambas incidências. A concordância entre os examinadores 1 e 2 e entre o 1 e 3, foram ligeiras (0,02), e entre os examinadores 2 e 3 foi excelente (1,0), conforme o índice de concordância Kappa (Tabela 4).

Após 60 dias, a avaliação dos examinadores também foi variável, de três animais (30%) a 100 % da amostra apresentaram imagem hiperdensa na radiografia de perfil (Tabela 5). A concordância entre os examinadores 1 e 2 e entre 1 e 3 foi ligeira (0,11) e entre 2 e 3 foi excelente (1,0), conforme índice de Kappa.

As imagens radiológicas aos 30 dias, do Gt apresentaram-se hiperdensas em 10 animais na incidência de perfil (34,48%) pelo examinador 1, em 24 animais (82,76%) pelo examinador 2 e em 25 (86,20%) pelo examinador 3. A concordância entre os examinadores 1 e 2 e entre 1 e 3 foi ligeira (0,19 e 0,15, respectivamente) e entre 2 e 3 foi excelente (0,86) (Tabela 6).

Após 60 dias, 21 animais avaliados pelo examinador 1 (72,41%), 26 animais pelo examinador 2 (89,65%) e 27 animais (93,10%) pelo examinador 3, apresentaram a mesma imagem na região do retalho preenchido com pó de osso, na mesma incidência. A concordância entre os examinadores 1 e 2 foi considerável (0,25), entre 1 e 3 foi ligeira (0,10) e entre 2 e 3 foi substancial (0,78) (Tabela 7).

Esses resultados sugerem a formação de tecido ósseo, hiperdenso, na região da calvária onde foi realizado o retalho proposto (Fig. 11). Na incidência radiográfica dorso-ventral não foi visibilizada nenhuma imagem sugestiva de tecido ósseo em ambos os grupos.

Aos 30 dias, os resultados obtidos das imagens radiológicas não demonstraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e tratado para nenhum dos examinadores ($p=0,2282$, $p=1,0000$, $p=1,0000$, respectivamente para examinadores 1, 2 e 3). Após 60 dias a presença de imagem hiperdensa foi significativamente maior no Gt, onde foi usado o pó de osso ($p= 0,0266$), na análise do examinador 1. Para os examinadores 2 e 3, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,5558$ e $p=1,0000$, para os examinadores 2 e 3, respectivamente).

Quando comparados os diferentes tempos no Gc, não houve diferença entre o diagnóstico de imagem hiperdensa com 30 e 60 dias ($p=0,2636$, $p=0,4795$, $p=0,4142$, respectivamente para os examinadores 1, 2 e 3). No Gt houve diferença estatisticamente significativa, sendo maior o diagnóstico de imagem hiperdensa após 60 dias de pós-operatório, na análise do examinador 1 ($p=0,0038$). Para os demais examinadores não houve diferença entre os dois tempos.

4.2. Análise macroscópica:

Após 60 dias do procedimento, os animais foram novamente anestesiados e a região operada foi reabordada, verificando-se a presença do retalho confeccionado e o sangramento. Todos os animais, de ambos os grupos (100%), apresentaram o retalho visível, em local fixado previamente, e presença de sangramento no campo operatório e no próprio retalho, mesmo quando levantados e mobilizados, demonstrando ausência de absorção do tecido utilizado na feitura do retalho e boa vascularização, através do pedículo formado pelos vasos temporais (Tabela 8).

O retalho foi ressecado e analisado macroscopicamente. Dos 39 retalhos ressecados, onze apresentaram formação tecidual no seu interior. Esse tecido apresentou-se espiculado, estreito e de consistência frágil em oito animais. Nos outros três aparentava apenas uma massa disforme, amolecida, sendo que um destes animais pertencia ao Gc (Figs. 12, 13 e tabela 8).

4.3. Análise microscópica:

A análise histológica dos tecidos ressecados do Gc demonstrou a presença de osso, caracterizado pela presença de material eosinofílico, osteoblastos e fibroblastos. O aspecto era de osso trabecular e irregular, em cinco lâminas (50%). Apresentavam uma imagem mais centralizada de osteócitos circundadas por proliferação osteoblástica (Fig. 14, 15). As demais lâminas apresentaram apenas tecido conjuntivo e células adiposas, correspondentes ao tecido fascial do retalho ressecado.

No Gt, vinte e uma lâminas (72,41%) apresentaram material eosinofílico, de aspecto calcificado, principalmente nas primeiras lâminas em

que não foi realizada a descalcificação com EDTA. Não houve diferença estatística entre o material realizado com EDTA e sem EDTA ($p= 1,0000$). A presença de osteoblastos foi evidente nestas amostras. Neste Grupo, as formações apresentaram-se com aspecto de tecido ósseo mais formado, organizado e estruturado. Em quatro destas amostras (19,05%), havia a presença de formação vascular em seu interior. Em nenhuma destas lâminas foi evidenciada a atividade de proliferação ao redor da formação óssea, com osteoblastos e fibroblastos, como observado no Gc (Fig. 16 -19). As demais lâminas apresentaram apenas tecido conjuntivo e células adiposas, correspondentes ao tecido fascial do retalho ressecado.

Ambos os grupos apresentaram formação óssea, mas esta não apresentou diferença estatisticamente significativa entre eles ($p= 0,4459$), sendo a principal diferença entre os grupos, a conformação e organização desta estrutura óssea formada.

A comparação entre as imagens ósseas na radiografia de 60 dias e no estudo histológico não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os métodos ($p=0,7945$ para examinador 1, $p=0,5377$ para o examinador 2 e $p=0,5439$ para o examinador 3), que mostra semelhança diagnóstica entre eles, enfatizando a formação óssea (Fig. 20, 21, 22, 23).

Os valores das áreas da estrutura óssea formada do Gc variaram entre 2,44 e 321,75 mm², com média de 90,51 mm² (+/-131,33) e no Gt variaram entre 20,60 e 3041,71 mm² com média de 428,97 mm² (+/-684,39), não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,2888$). O perímetro foi medido em mm e apresentou valores entre 0,225 e 5,04 mm, com média de 1,82 mm (+/-1,88), no Gc e valores entre 0,79 e 18,448 mm, com média de 3,42 mm (+/-4,0), no Gt. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,3979$) (Tabelas 9 e 10).

5. DISCUSSÃO:

Os coelhos foram os animais escolhidos nesta pesquisa por apresentarem a calvária de tamanho adequado para a manipulação proposta, maior que a de ratos, e tecido bem vascularizado pelos vasos temporais, apto para a confecção de retalho. Outros autores também utilizaram este animal em estudos sobre reconstrução óssea^{38,64}.

Foram usados somente animais machos para evitar alteração hormonal, comum em fêmeas⁶⁵.

O número da amostra foi determinado por um estudo piloto prévio de 10 animais e calculado para que fosse o menor número capaz de determinar resultados significantes, além de basear-se em estudos prévios experimentais que estudaram neoformação óssea e variaram de 12 a 39 animais por estudo. Foi definido um grupo controle com 10 animais para preservar o uso de animais na realização de um método com pouca intervenção e um grupo tratado com 30 animais, baseado nos números amostrais de estudos experimentais da literatura^{2,3,12,18,30,33}.

A literatura demonstrou que o osso morcelizado utilizado em retalhos vascularizados apresenta células ósseas e proteínas da família dos fatores de crescimento de fibroblastos que são necessárias para a indução das células progenitoras presentes no periósteo, formando então o tecido ósseo. Este tecido é considerado um biomaterial ideal para a formação óssea por ser uma matriz protéica de células viáveis e proteínas bioativas^{33,37}.

Optou-se, então, pelo uso de pó de osso da cortical da calota craniana por apresentar as células ósseas e proteínas essenciais para a indução da formação óssea anteriormente referidas, apresentarem origem embrionária de osso membranoso, além de proporcionar mínima lesão ou morbidade da área doadora que, por usar apenas a cortical como área doadora, não apresenta riscos de lesão cerebral. Além disso, a cicatrização desta camada é rápida e sem deformidade residual, conforme foi evidenciado na calota craniana do lado doador de todos os animais estudados.

O perióstio foi escolhido para ser o meio receptor do pó de osso utilizado neste estudo por ser um tecido altamente vascularizado que contém células progenitoras, capaz de induzir à formação de cartilagem ou osso dependendo dos níveis de proteína presentes e quantidade de oxigênio. O retalho formado por perióstio e gálea da calvária do coelho, com pedículo vascular através dos vasos temporais, foi selecionado por apresentar o aporte sanguíneo necessário para manter o tecido ósseo introduzido no tubo formado e induzir a formação de osteoblastos através de células presentes no perióstio^{9,33}.

A escolha de utilizar o retalho de perióstio e calvária em coelho foi pelo importante pedículo vascular através dos vasos temporais, que permitem bom arco de rotação e flexibilidade. O segmento ósseo de calota craniana foi substituído por pó de osso por proporcionar menor morbidade na área doadora e maior mobilidade, permitindo futura modelagem na forma tridimensional desejada.

5.1. Análise radiográfica:

Estudos que procuram novos métodos de reconstrução óssea como o uso de tecido ósseo morcelizado em retalho de fásia e retalho de perióstio demonstraram imagem radiopaca em radiografias realizadas após 4 semanas, mas após 8 semanas as imagens ósseas foram mais evidentes no grupo do retalho de perióstio. Outros estudos prévios que utilizaram este método como mais uma forma de medida para a análise de formação óssea também demonstraram maior índice de formação após 9 semanas e 3 meses^{44,53}.

Neste estudo optou-se pela avaliação radiológica após 30 e 60 dias após o procedimento cirúrgico, conforme estudo prévio na literatura, e foi possível evidenciar formação óssea sugestiva pela imagem hiperdensa na calota craniana dos coelhos em ambos os grupos.

A avaliação realizada por três examinadores diferentes, todos profissionais médicos, demonstrou diferenças nas análises, o que comprova a subjetividade dos resultados de exames radiográficos. Mas a grande

semelhança entre dois dos examinadores comprova os resultados de formação óssea demonstrados no estudo.

A imagem hiperdensa foi verificada nos animais do Gt aos 30 dias em 34,48%, 82,76% e 86,20% pelos examinadores 1, 2 e 3, respectivamente. Após 60 dias, houve significativo aumento desta formação neste grupo com porcentagem de 72,41%, 89,65% e 93,10% (examinadores 1, 2 e 3), que equivale aos dados da literatura (Tabela 6, 7)^{44,66}. Mas apenas um examinador mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os dois tempos.

No Gc, a avaliação variou de um animal com imagem hiperdensa na radiografia de 30 dias (10%) a nove animais (90%), de acordo com os examinadores 2 e 3. Aos 60 dias, apresentaram imagens sugestivas de formação óssea, três (30%) a dez animais (100%) (Tabela 3, 5).

A maior evidência de imagem sugestiva de formação óssea nas imagens radiográficas foram no Gt e com diferença estatística entre 30 e 60 dias, em porcentagem maior aos 60 dias, para um dos examinadores, sugerindo a formação de tecido ósseo no retalho gáleo-periosteal preenchido com pó de osso. Provavelmente a evolução da formação óssea viesse a aumentar com maior tempo de observação, como demonstrou Ferreira e col. (2004) que comparou 1, 3 e 6 meses⁵³.

Na incidência radiográfica dorso-ventral não foi visibilizada nenhuma imagem sugestiva de tecido ósseo em nenhum dos grupos. Este resultado pode ser encontrado devido a grande superposição óssea do crânio do coelho.

5.2. Análise macroscópica:

Todos os retalhos apresentaram-se viáveis e com sangramento ativo. Provavelmente isto se deve ao fato do retalho utilizado possuir pedículo bem vascularizado pela artéria e veia temporais.

Na retirada do retalho e avaliação de seu conteúdo, foi encontrada formação tecidual amarelo-esbranquiçada em um animal do Gc (10%) e em

dez animais do Gt (34,48%). Esta formação tinha aspecto espiculado e frágil em 8 amostras, todos pertencentes ao Gt. Os outros três, tinham formato irregular e amolecido, sendo dois do Gt e um do Gc. Este aspecto irregular nos sugeriu processo inflamatório exacerbado ou infecção, mas apenas em uma das amostras do Gt foi comprovada no estudo histológico a presença de intenso processo inflamatório. As outras duas amostras não apresentaram alterações histológicas.

Estas imagens macroscópicas apresentaram correlação com 81,82% de animais que apresentaram imagem radiográfica hiperdensa após avaliação de 60 dias em concordância de todos os examinadores. Em um dos animais que apresentaram imagem macroscópica de massa de tecido neoformado, foi diagnosticada imagem hiperdensa na radiografia de 60 dias, por dois examinadores e no outro animal com presença de formação tecidual, a imagem foi positiva à radiografia no diagnóstico de apenas um examinador. No entanto, estes retalhos apresentaram formação óssea no estudo histológico. Consideramos então que pode ter havido erro durante a análise radiográfica.

5.3. Análise microscópica:

O material ressecado foi corado com hematoxilina-eosina e Tricrômio de Masson para análise histológica, também utilizado em estudos experimentais anteriores que analisaram a formação óssea em calota craniana de animais⁶².

Na coloração de Tricrômio de Masson, foi realizada a análise de neoformação óssea através da coloração azulada, que demonstra a presença de colágeno e tecido ósseo, como também evidenciado em estudos da literatura que pesquisam novas técnicas de reconstrução óssea²¹.

A análise microscópica do Gc demonstrou a presença de osteoblastos e fibroblastos, imagens ósseas, com material eosinofílico, que indica processo de neoformação óssea, mas com aspecto de osso trabecular, mais irregular em cinco lâminas (50%). As lâminas apresentaram imagem central com osteócitos circundadas por proliferação osteoblástica que demonstra a

atividade proliferativa de novas células. Não foi possível demonstrar formação vascular no interior destas imagens e também não houve maior formação vascular ao redor destas formações ósseas, o que indica que ainda não está formado um osso maduro. As demais lâminas apresentaram apenas tecido conjuntivo e células adiposas, correspondentes ao tecido fascial do retalho ressecado.

No Gt, 72,41% da amostra apresentou material eosinofílico, de aspecto mais calcificado nas primeiras lâminas em que não foi realizada a descalcificação com EDTA. Houve a presença de osteoblastos e as formações apresentaram-se com aspecto de tecido ósseo mais formado, organizado e estruturado. Em quatro destas amostras (19,05%) havia a presença de formação vascular em seu interior, o que demonstra maior maturidade da neoformação, além de serem essenciais para a diferenciação de células pluripotentes em osteoblastos³⁹. Em nenhuma destas lâminas foi evidenciada a atividade de proliferação ao redor, com osteoblastos e fibroblastos, como evidenciado no Gc, possivelmente por já ter passado por esta etapa de neoformação. As demais lâminas também apresentaram apenas tecido conjuntivo e células adiposas, correspondentes ao retalho ressecado.

Duas lâminas apresentaram quadro de abscesso, mas não foram observadas alterações na análise macroscópica. Apenas uma amostra que evidenciou intensa formação inflamatória no exame microscópico foi coincidente com a visibilização de massa amarelada, disforme e amolecida na avaliação macroscópica.

Um estudo com uso de material aloplástico (hidroxiapatita) e outro com uso de enxerto bovino em ratos demonstraram a presença de células inflamatórias no estudo histológico^{22,39}. Demonstra-se que o uso de material aloplástico, heterólogo, ou mesmo o tecido autólogo, como foi utilizado neste estudo, apresentam reação inflamatória do local manipulado, sendo esta reação decorrente, não apenas pelo tecido estranho ao organismo, mas também pela manipulação e trauma do local operado.

Comprovou-se neste trabalho a capacidade de formação óssea ou indução de neoformação pelo perióstio, fato referido em outros estudos^{33,37,65}.

Demonstrou-se também a formação osteogênica mais madura e organizada, com a capacidade indutiva e proliferativa do perióstio acrescentada por células ósseas presentes no pó de osso da cortical de tecido ósseo membranoso. Estudos da literatura especificam as características celulares histológicas de neoformações ósseas com a presença de osteoblastos, tecido conectivo e células inflamatórias, que corroboram nossos achados^{21,44,59}.

O estudo da área e do perímetro foram muito variáveis em ambos os grupos e esses valores não demonstraram diferenças significativas entre os mesmos ($p=0,2888$ para a área e $p=0,3979$ para o perímetro).

Na literatura, a avaliação da área foi feita apenas nos estudos que realizaram defeitos ósseos antes de testarem a técnica de neoformação óssea e avaliaram esta formação no defeito criado^{57,60,66}.

O percentual de animais com formação óssea, as medidas de áreas e perímetros não demonstraram diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos. Somente a análise histológica permitiu diferenciar os grupos, com ou sem pó de osso, quanto a forma, estrutura e organização celular.

Conforme a literatura, este estudo mostrou a capacidade de formação óssea do perióstio^{9,18}. Entretanto, ao adicionar-se pó de osso houve formação óssea mais organizada, de melhor qualidade.

A análise objetiva de contagem celular não foi realizada pela diferença de estruturas formadas e cortes diferentes, transversais e longitudinais das lâminas, o que não traria resultados confiáveis para análise.

A ausência de absorção e o baixo índice de processos inflamatórios também confirmam os dados da literatura que dão preferência aos materiais autólogos e vascularizados^{12,14,18,29}.

Os resultados obtidos indicam ser esta uma nova e importante linha de pesquisa. Novos estudos com tempo mais longo de observação e o acréscimo

de tecidos ou substâncias ao pó de osso, como fatores de crescimento, plasma rico em plaquetas ou células tronco mesenquimais, poderão otimizar os achados aqui encontrados.

6. CONCLUSÃO:

Com o modelo experimental utilizado foi possível concluir que:

- 1) O retalho gáleo-periostal preenchido com pó de osso em calota craniana de coelhos é viável.
- 2) A formação ocorreu em ambos os grupos, preenchido ou não com pó de osso.
- 3) A maturidade óssea foi maior nos retalhos preenchidos com pó de osso.

7. FIGURAS E TABELAS:



Figura 1: Preparo e posicionamento do coelho com realização da tricotomia e marcação do local da incisão mediana.



Figura 2: Incisão mediana, dissecação e levantamento de retalhos cutâneos até a gálea.

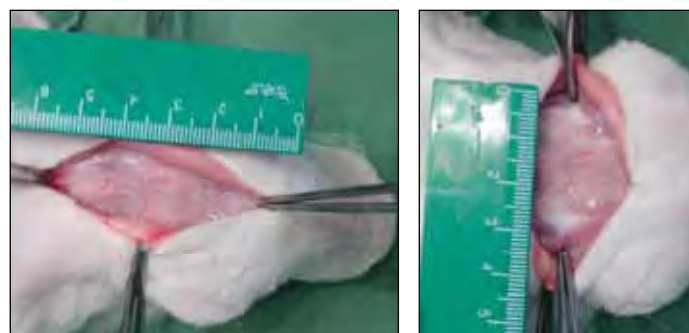


Figura 3: Medida da incisão mediana de 6 cm e medida do retalho de 15 mm x 30 mm.

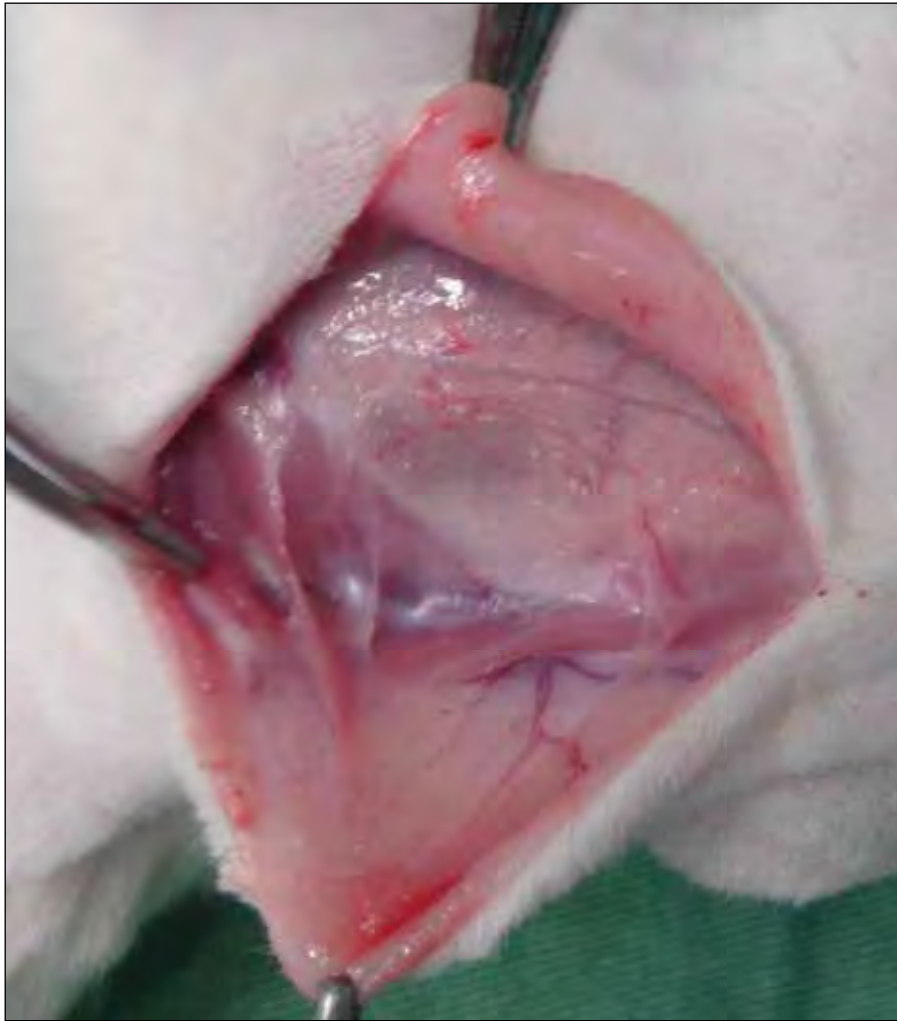


Figura 4: Identificação dos vasos do pedículo vascular, os vasos temporais, que serão responsáveis pela vascularização do retalho de gálea e periósteo.

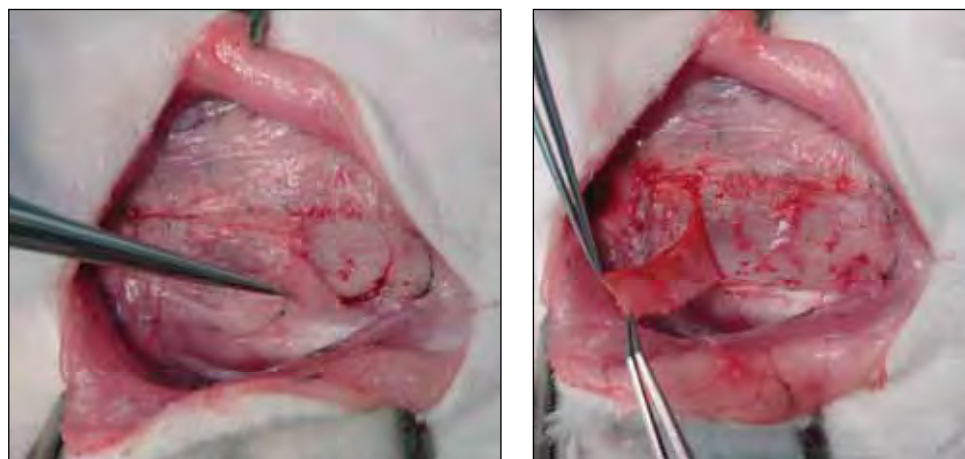


Figura 5: Dissecção de gálea e periósteo e levantamento do retalho medindo 15 x 30 mm.

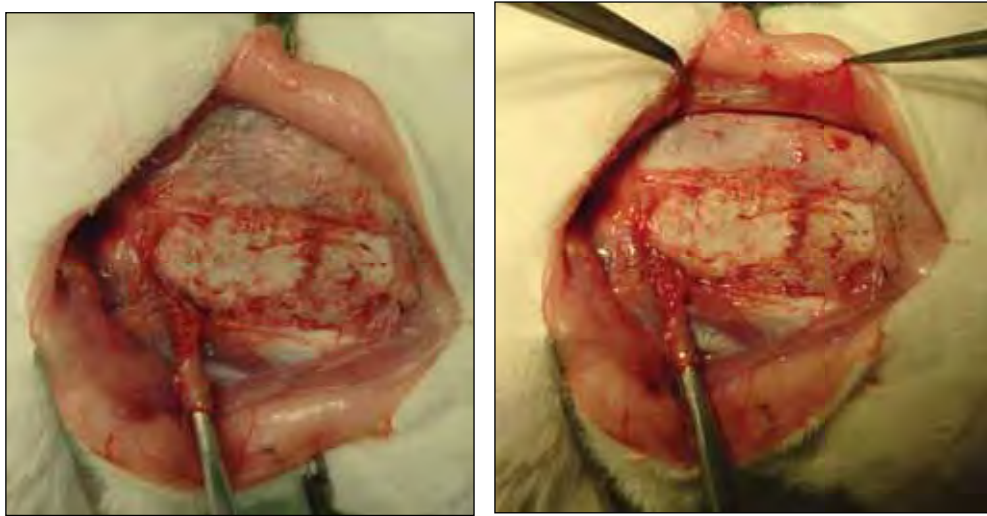


Figura 6: Confeção de retalho tubular de gálea e periósteo, com este voltado para dentro. Dissecção e levantamento de gálea e periósteo do lado contralateral expondo a calota craniana, onde será retirado o pó de osso.

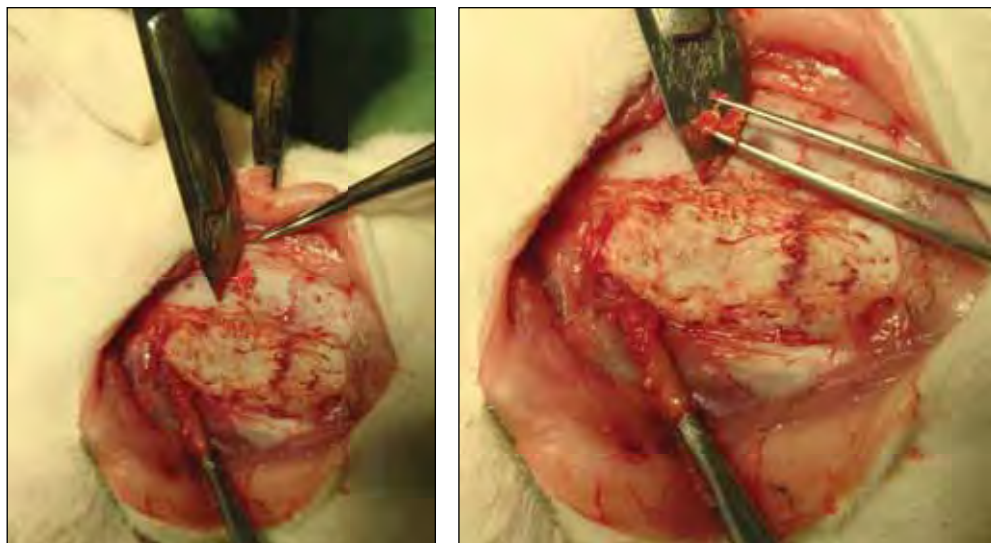


Figura 7: Raspagem da cortical da calota craniana do lado esquerdo, com lâmina nº 23, confeccionando o pó de osso que será introduzido no retalho tubular.

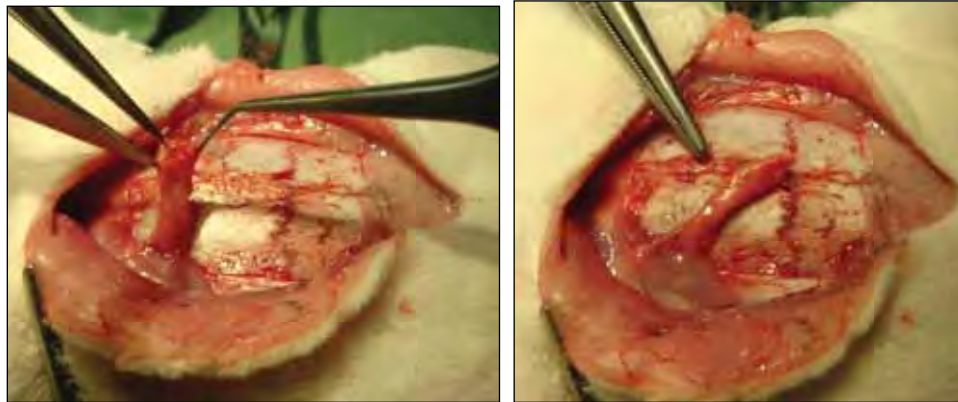


Figura 8: Introdução do pó de osso no retalho tubular, sutura e fixação na porção anterior da gálea.



Figura 9: Os animais foram submetidos a exames radiográficos da calota craniana após anestesia.

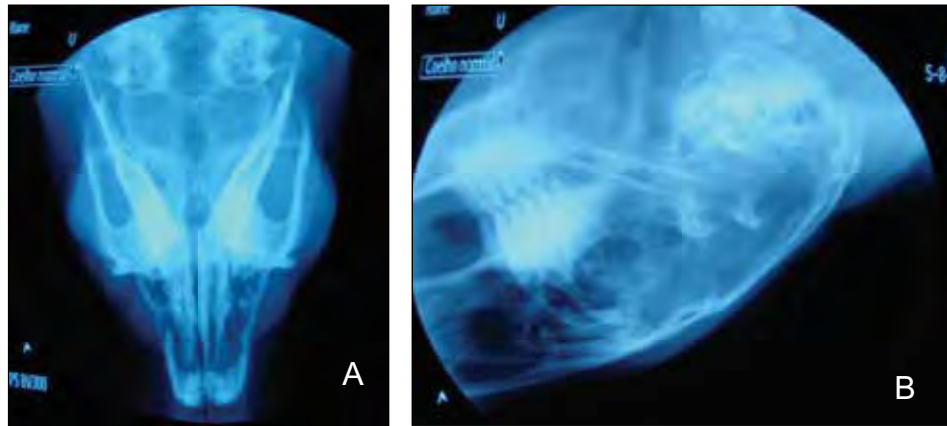


Figura 10: Exame radiográfico de um animal no pré-operatório, evidenciando o aspecto normal da calota craniana do coelho, em incidências dorso-ventral (A) e perfil (B).

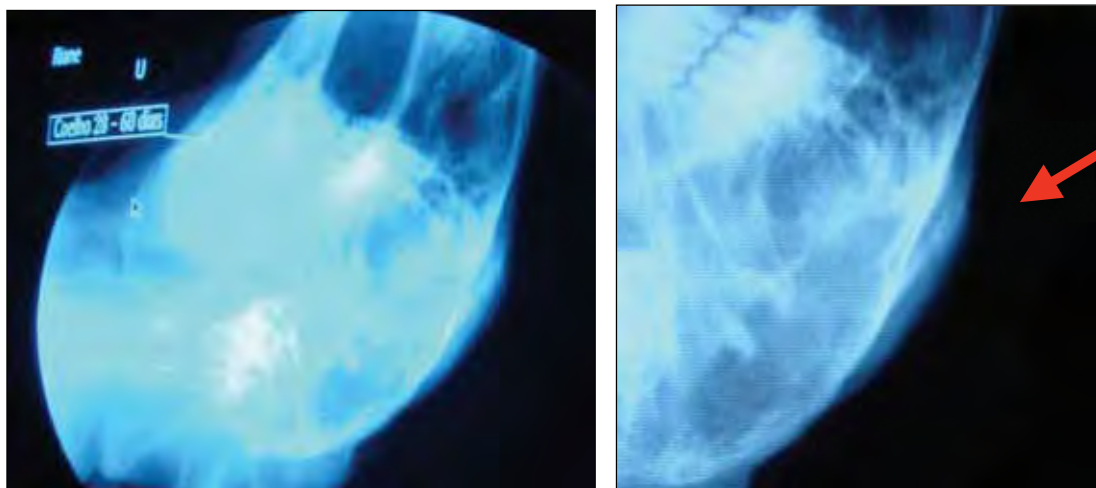


Figura 11: Imagem radiográfica do animal n° 28, em perfil, onde é possível verificar uma imagem hiperdensa na região superior à calota craniana. Este foi um dos animais nos quais se comprovaram a neoformação óssea nas análises histológicas.



Figura 12: Imagem macroscópica de formação espiculada no interior do retalho após 60 dias de pós-operatório.



Figura13: Imagem macroscópica de massa de tecido neoformado na análise do coelho 19 (A). Imagem de análise macroscópica de coelho 26 antes e após a abertura do retalho, evidenciando massa irregular e disforme (B e C).

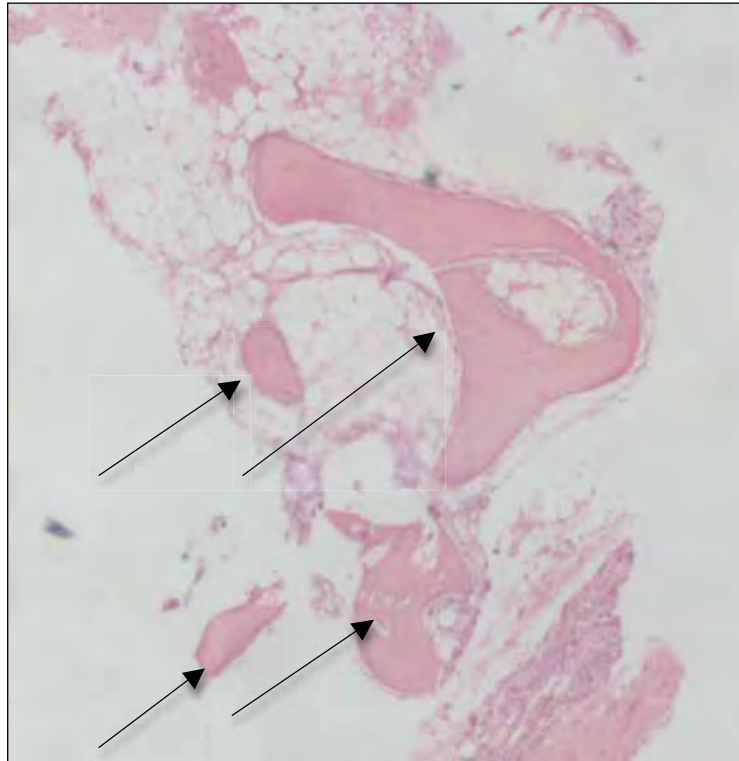


Figura 14: Análise microscópica do coelho nº 40, pertencente do Gc, demonstrando imagem óssea de aspecto trabecular, irregular.

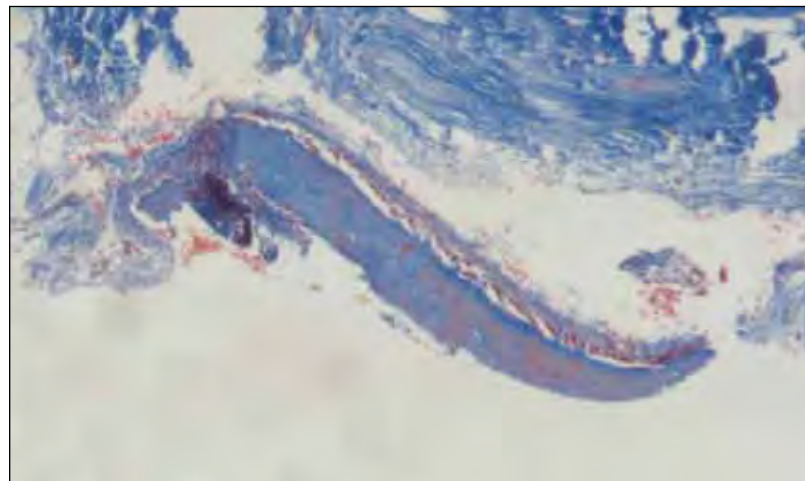


Figura 15: Imagem de lâmina corada com Tricrômio de Massom do coelho nº 39 (Gc), com 5x de aumento, com formação óssea de aspecto trabecular e proliferação osteoblástica ao redor.

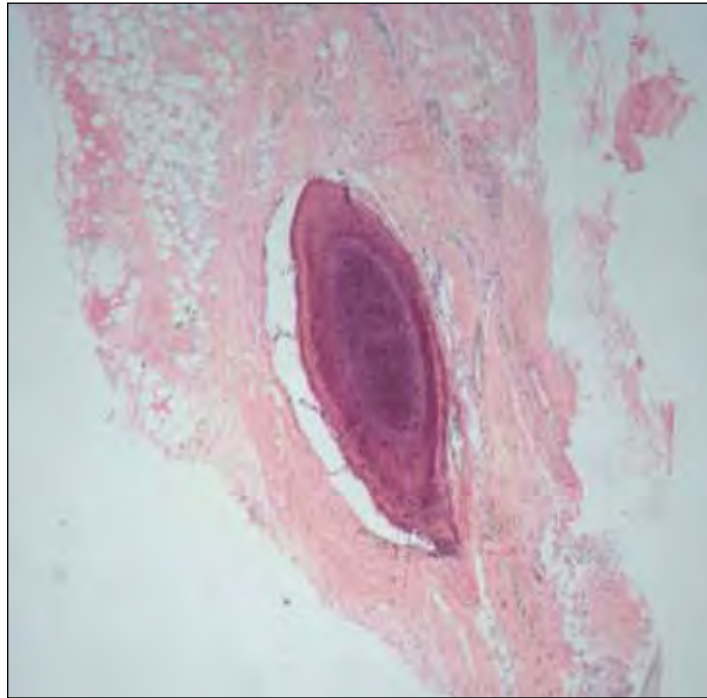


Figura 16: Análise microscópica do coelho n° 26 (Gt), com aumento de 2,5x, corado com hematoxilina-eosina, demonstrando formação óssea organizada e bem delimitada.

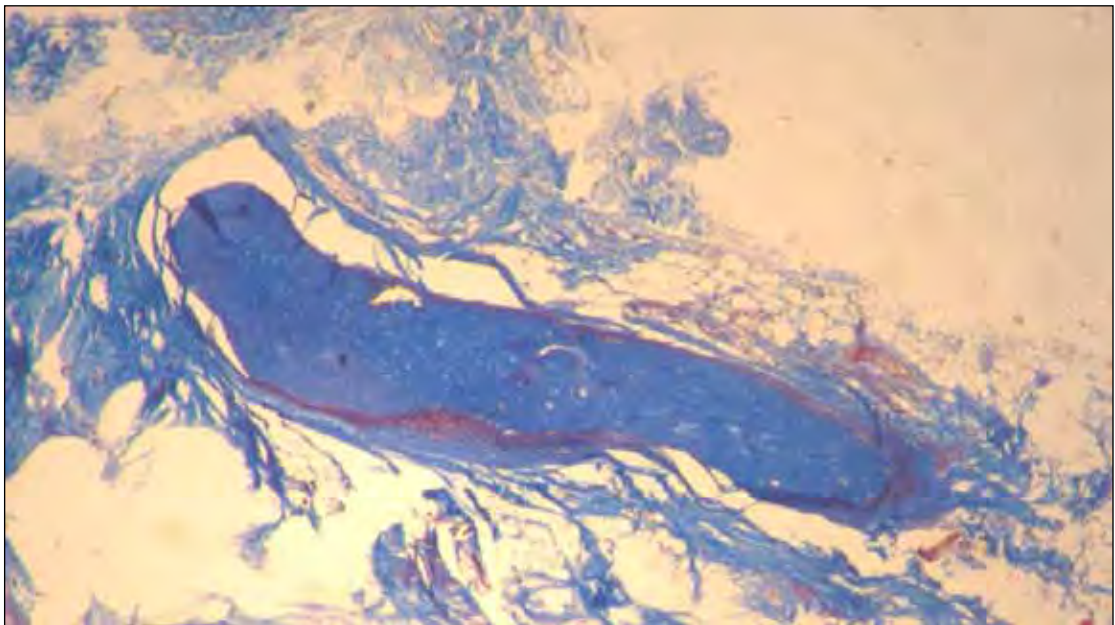


Figura 17: Imagem microscópica do coelho n° 3, com aumento de 2,5x, corado com Tricrômio de Massom. Demonstra-se a imagem de tecido ósseo, de coloração bem azulada e bem delimitada.

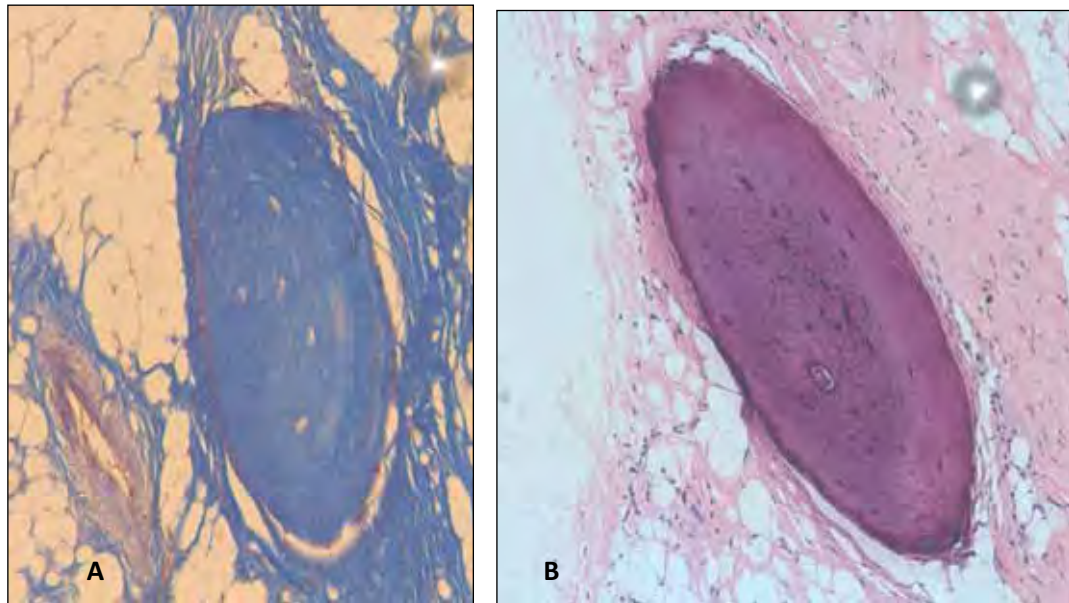


Figura 18: Imagem microscópica do coelho nº 20, com aumento de 10x, em coloração de Tricrômio de Massom (A) e hematoxilina-eosina (B). Evidencia-se a formação de neovasos no interior da imagem óssea, indicando neovascularização.

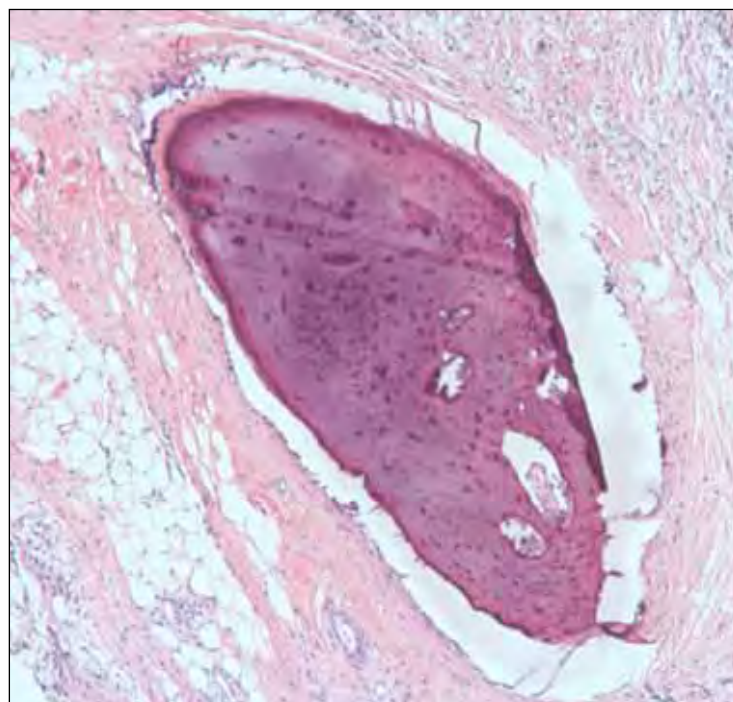


Figura 19: Lâmina corada com hematoxilina-eosina do coelho nº 19, evidenciando-se imagem óssea organizada, bem delimitada, bordos regulares e vasos no interior da formação óssea.

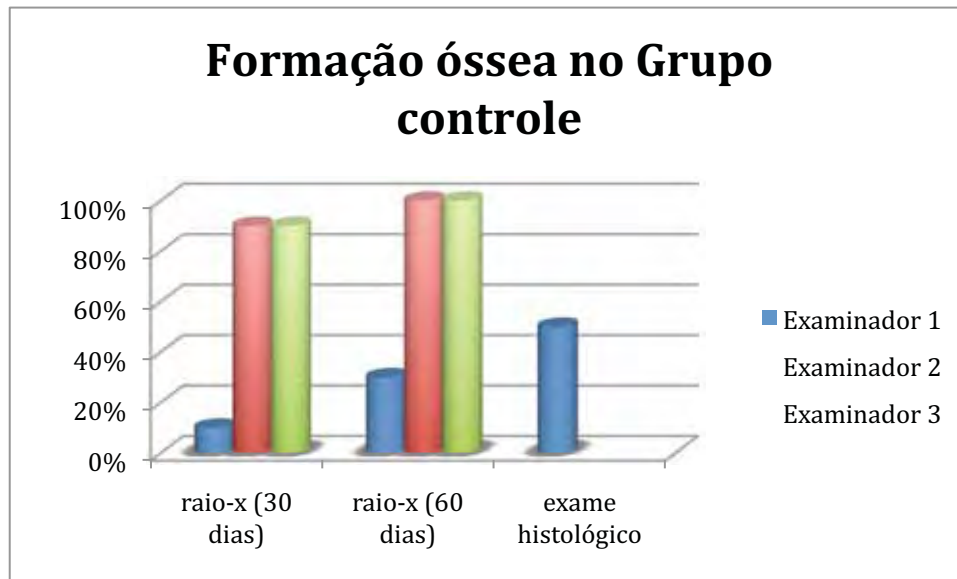


Figura 20: Resultados comparativos em porcentagem (%) entre as análises radiográficas de 30 e 60 dias e análise anátomo-patológica no Grupo controle.

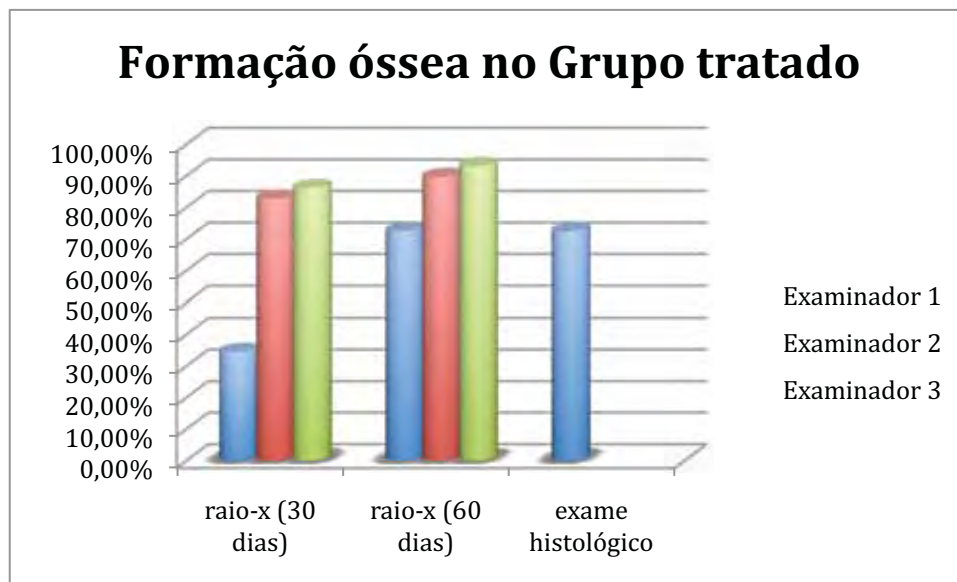


Figura 21: Resultados comparativos em porcentagem (%) entre as análises radiográficas de 30 e 60 dias e análise anátomo-patológica no Grupo tratado.

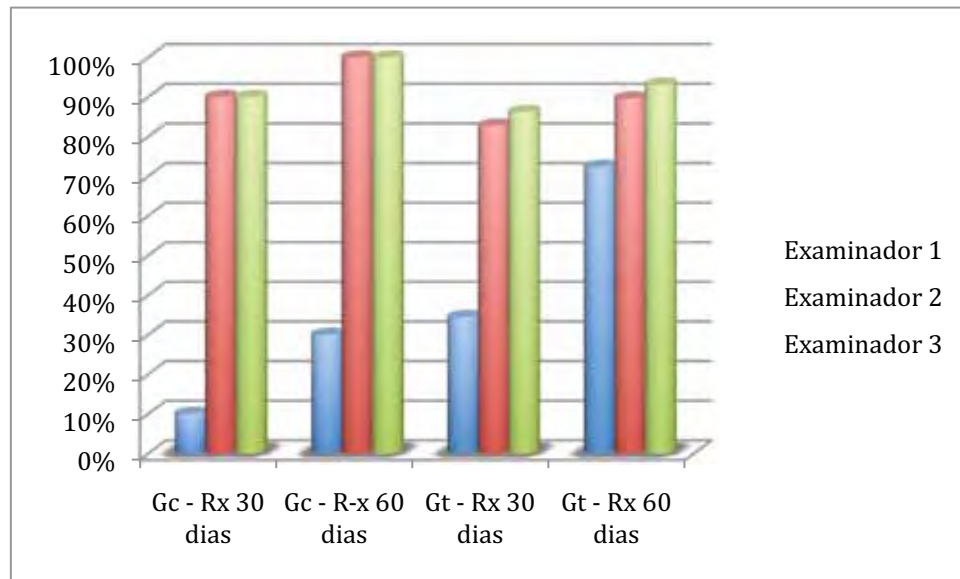


Figura 22: Diferença no diagnóstico radiográfico entre os examinadores nos Grupos controle e tratado.

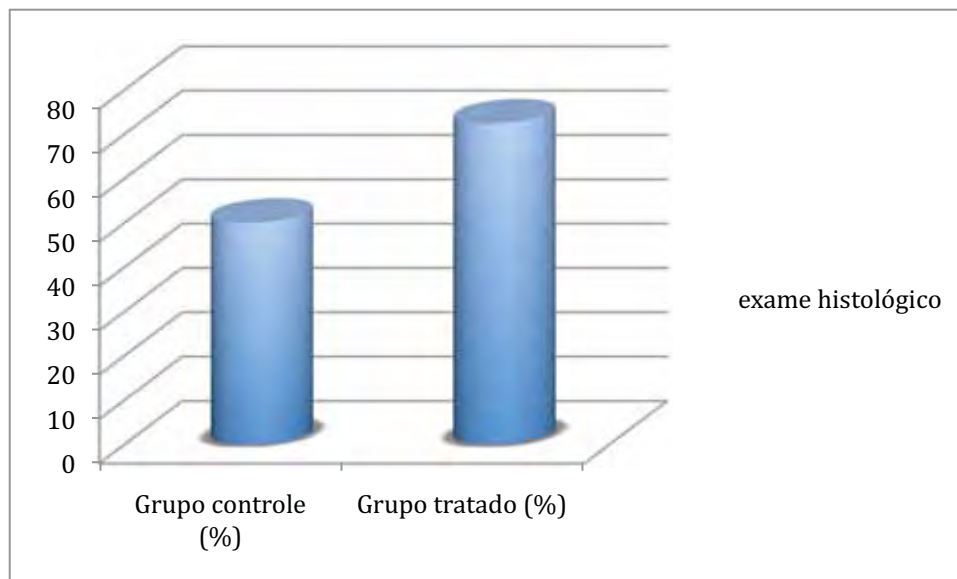


Figura 23: Diferença do diagnóstico de formação óssea pelo exame histológico entre os grupos Gc e Gt.

Tabela 1: Distribuição da massa dos animais do Grupo controle e do Grupo tratado medido em g (gramas).

Coelhos Grupo tratado	Massa Grupo tratado (g)	Coelhos Grupo controle	Massa Grupo controle (g)
1	2270	31	2640
2	1850	32	2715
3	1730	33	2437
4	2995	34	2272
5	3128	35	2477
6	2239	36	2460
7	2148	37	2305
8	2881	38	2314
9	3400	39	2371
10	3070	40	2102
11	2940		
12	2933		
13	2950		
14	2200		
15	2930		
16	2970		
17	2792		
18	2522		
19	2830		
20	3025		
21	3374		
22	3294		
23	3915		
24	2845		
25	3176		
26	2492		
27	3050		
28	2142		
29	2046		
30	2000		

Tabela 2: Massa inicial dos animais do Grupo tratado e análise de formação óssea no exame microscópico.

Coelhos	Lâmina - formação óssea	Massa (g)
1	não	2270
2	sim	1850
3	sim	1730
4	sim	2995
5	sim	3128
6	não	2239
7	sim	2148
8	sim	2881
9	Óbito	3400
10	sim	3070
11	sim	2940
12	não	2933
13	sim	2950
14	não	2200
15	sim	2930
16	sim	2970
17	sim	2792
18	não	2522
19	sim	2830
20	sim	3025
21	não	3374
22	sim	3294
23	sim	3915
24	sim	2845
25	não	3176
26	sim	2492
27	não	3050
28	sim	2142
29	sim	2046
30	sim	2000

Tabela 3: Avaliação radiográfica após 30 dias de pós-operatório dos animais do Gc realizada pelos examinadores 1, 2 e 3.

Coelhos	Examinador 1	Examinador 2	Examinador 3
31	não	sim	sim
32	não	não	não
33	não	sim	sim
34	não	sim	sim
35	não	sim	sim
36	sim	sim	sim
37	não	sim	sim
38	não	sim	sim
39	não	sim	sim
40	não	sim	sim

Tabela 4: Índice de concordância Kappa.

Valor de kappa	Concordância
0	Pobre
0 – 0,20	Ligeira
0,21 – 0,40	Considerável
0,41 – 0,60	Moderada
0,61 – 0,80	Substancial
0,81 – 1	Excelente

Tabela 5: Avaliação radiográfica dos animais do Gc aos 60 dias.

Coelhos	Examinador 1	Examinador 2	Examinador 3
31	sim	sim	sim
32	não	sim	sim
33	sim	sim	sim
34	não	sim	sim
35	não	sim	sim
36	não	sim	sim
37	não	sim	sim
38	sim	sim	sim
39	não	sim	sim
40	não	sim	sim

Tabela 6: Avaliação radiográfica após 30 dias de pós-operatório dos animais do Gt realizada pelos examinadores 1, 2 e 3.

Coelhos	Examinador 1	Examinador 2	Examinador 3
1	não	sim	sim
2	sim	sim	sim
3	não	sim	sim
4	não	não	não
5	sim	sim	sim
6	não	não	não
7	não	não	não
8	não	sim	sim
10	sim	sim	sim
11	não	sim	sim
12	não	sim	sim
13	sim	sim	sim
14	não	sim	sim
15	sim	sim	sim
16	sim	sim	sim
17	não	sim	sim
18	não	sim	sim
19	não	sim	sim
20	não	não	sim
21	não	sim	sim
22	não	sim	sim
23	sim	sim	sim
24	sim	sim	sim
25	não	sim	sim
26	não	sim	sim
27	sim	sim	sim
28	sim	sim	sim
29	não	sim	sim
30	não	não	não

Tabela 7: Avaliação radiográfica dos animais do Gt aos 60 dias.

Coelhos	Examinador 1	Examinador 2	Examinador 3
1	sim	sim	sim
2	sim	não	não
3	sim	sim	sim
4	sim	sim	sim
5	sim	sim	sim
6	sim	sim	sim
7	não	sim	sim
8	sim	sim	sim
10	sim	sim	sim
11	não	sim	sim
12	sim	sim	sim
13	não	não	não
14	não	sim	sim
15	sim	sim	sim
16	sim	sim	sim
17	não	não	sim
18	não	sim	sim
19	não	sim	sim
20	sim	sim	sim
21	sim	sim	sim
22	sim	sim	sim
23	não	sim	sim
24	sim	sim	sim
25	sim	sim	sim
26	sim	sim	sim
27	sim	sim	sim
28	sim	sim	sim
29	sim	sim	sim
30	sim	sim	sim

Tabela 8: Avaliação macroscópica do Gc e do Gt, quanto ao sangramento do campo operatório, sangramento do retalho e presença de massa de tecido neoformado visível à abertura do retalho. Os animais de número 1 a 30 pertencem ao Gt e os animais de número 31 ao 40 pertencem ao Gc.

Coelhos	Sangramento do campo operatório	Sangramento do retalho	Massa no interior do retalho
1	Sim	Sim	Sim
2	Sim	Sim	Sim
3	Sim	Sim	Não
4	Sim	Sim	Sim
5	Sim	Sim	Não
6	Sim	Sim	Sim
7	Sim	Sim	Não
8	Sim	Sim	Sim
10	Sim	Sim	Sim
11	Sim	Sim	Não
12	Sim	Sim	Não
13	Sim	Sim	Não
14	Sim	Sim	Não
15	Sim	Sim	Sim
16	Sim	Sim	Não
17	Sim	Sim	Não
18	Sim	Sim	Não
19	Sim	Sim	Sim
20	Sim	Sim	Não
21	Sim	Sim	Não
22	Sim	Sim	Não
23	Sim	Sim	Não
24	Sim	Sim	Não
25	Sim	Sim	Não
26	Sim	Sim	Sim
27	Sim	Sim	Não
28	Sim	Sim	Sim
29	Sim	Sim	Não
30	Sim	Sim	Não
31	Sim	Sim	Sim
32	Sim	Sim	Não
33	Sim	Sim	Não
34	Sim	Sim	Não
35	Sim	Sim	Não
36	Sim	Sim	Não
37	Sim	Sim	Não
38	Sim	Sim	Não
39	Sim	Sim	Não
40	Sim	Sim	Não

Tabela 9: Valores das áreas e perímetros das imagens ósseas presentes nas análises histológicas dos animais do Grupo tratado.

Coelho	Área (mm ²)	Perímetro (mm)
2	477,159	2,855
3	104,578	1,723
4	32,649	1,123
5	559,192	3,066
7	876,568	7,559
8	418,955	2,475
10	40,927	1,855
11	27,611	0,993
13	153,49	2,107
15	3041,709	18,448
16	208,703	1,955
17	20,604	1,168
19	364,32	2,632
20	1371,672	9,02
22	23,294	0,982
23	148,932	2,405
24	24,469	0,79
26	394,077	2,966
28	259,288	3,21
29	75,142	1,604
30	385,06	2,866

Tabela 10: Valores das áreas e perímetros das imagens ósseas presentes nas análises histológicas do Grupo controle.

Coelho	Área (mm ²)	Perímetro (mm)
32	2,447	0,225
33	39,04	1,074
37	23,409	1,025
39	65,912	1,748
40	321,754	5,04

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Baumeister S, Peek A, Friedman A, Levin L S, Marcus J R. Management of Postneurosurgical Bone Flap Loss Caused by Infection. *Plast Reconstr Surg.* 2008, 122(6): 195-208.
2. Casabona F, Martin I, Muraglia A, Berrino P, Santi P, Cancedda R, Quarto R. Prefabricated engineered bone flaps: An experimental model of tissue reconstruction in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg.* 1998, 101(3):577-81.
3. Alam I, Asahina I, Seto I, Oda M, Enomoto S. Prefabricated vascularized bone flap: A tissue transformation technique for bone reconstruction. 2001, 108(4):952-58.
4. Goiato MC, Santos, DM, Haddad MF, Pesqueira AA, Carvalho Dekon SF, Zavanelli AC. Most frequent tumors in maxillofacial area rehabilitated through surgical reconstruction and prostheses. *J Craniofac Surg.* 2010, 21(2):396-99.
5. Hara T, Santos CA, Farias A, Costa MJM, Cruz RJLC. Cranioplastia: Parietal versus prótese customizada. *Rev Bras Cir Plast.* 2011, 26(1): 32-6.
6. Mao JJ, Giannobile WV, Helms JA, Hollister SJ, Krebsbach PH, Longaker MT, Shi S. Craniofacial tissue engineering by stem cells. *J Dent Res.* 2006, 85(11): 966-79.
7. Yano T, Tanaka K, Kishimoto S, Iida H, Okazaki M. Review of skull base reconstruction using locoregional flaps and free flaps in children and adolescents. *Skull Base.* 2011, 21:359–64.
8. Posnick JC. Treacher Collins syndrome: Evaluation and treatment. In *Craniofacial and Maxillofacial Surgery in Children and Young Adults*, 1st Ed. Philadelphia: Saunders, 2000.
9. Soltan M, Smiler D, Soltan C. The inverted periosteal flap: A source of stem cell enhancing bone regeneration. *Implant Dentistry.* 2009, 18(5): 373-79.
10. Mascarenhas MDM, Silva MMA, Malta DC, Moura L, Goes PSA, Moyses ST, Neto OLM. Perfil epidemiológico dos atendimentos de emergência por

lesões bucodentais decorrentes de causas externas, Brasil, 2006 e 2007. *Cad Saúde Pública*. 2012, 28:S124-S132.

11. Kumar AR, Bradley JP, Harshbarger R, Stevens F, Bell R, Moores L, Armonda R. Warfare-related craniectomy defect reconstruction: Early success using custom alloplast implants. *Plast Reconstr Surg*. 2011, 127(3):1279-87.

12. Chang SH, Tung KY, Wang YJ, Tsao YP, Ni TS, Liu HK. Fabrication of vascularized bone grafts of predetermined shape with hydroxyapatite-collagen gel beads and autogenous mesenchymal stem cell composites. *Plast Reconstr Surg*. 2010, 125(5):1393-1402.

13. Laureano Filho JR, Castelo Branco BL, Andrade ESS, Barbosa JRA. Comparação histológica entre o osso desmineralizado e polímero de mamona sobre a regeneração óssea. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2007, 73(2): 186-92.

14. Netscher, DT, Stal S, Shenaq S. Management of residual cranial vault deformities. *Clin Plast Surg*. 1992, 19: 301.

15. Grant GA, Jolley M, Ellenbogen RG, Roberts TS, Gruss JR, Loeser JD. Failure of autologous bone-assisted cranioplasty following decompressive craniectomy in children and adolescents. *J Neurosurg*. 2004, 100(2):163-8.

16. Park HK, Dujovny M, Agner C, Diaz FG. Biomechanical properties of calvarium prosthesis. *Neurol Res*. 2001. 23(2-3): 267-76.

17. Gosain AK, McCarthy JG, Staffenberg D, Glat PM, Simmons DJ. The histomorphologic changes in vascularized bone transfers and their interrelationship with the recipient sites: A 1-year study. *Plast Reconstr Surg*. 1996, 97(5):1001-13.

18. Vögelin E, Jones NF, Lieberman JR, Baker JM, Tsingotjidou AS, Brekke JH. Prefabrication of bone by use of a vascularized periosteal flap and bone morphogenetic protein. *Plast Reconstr Surg*. 2002, 109(1): 190-98.

19. Gosain AK, Song L, Santoro, TD, Amarante MTJ, Simmons DJ. Long-term remodeling of vascularized and nonvascularized onlay bone grafts: A

macroscopic and microscopic analysis. *Plast Reconstr Surg.* 1999, 103(5):1443-50.

20. Saska S, Hochuli-Vieira E, Pereira Filho VA, Gabrielli MAC, Oliveira CF, Cancian DCJ. Implantes de polietileno poroso em calota de Coelho. Análise histological comparativa. *Rev Cir Traumatol Boco-Maxilofac.* 2007, 7(3):49-58.

21. Schofer MD, Roessler PP, Schaefer J, Theisen C, Schlimme S, Heverhagen JT, Voelker M, Dersch R, Agarwal S, Fuchs-Winkelmann S, Paletta JRJ. Electrospun PLLA nanofiber scaffolds and their use in combination with BMP-2 for reconstruction of bone defects. *Plos One.* www.plosone.org. 2011, 6(9):1-9.

22. Marins LV, Cestari TM, Sottovia AD, Granjeiro JM, Taga R. Radiographic and histological study of perennial bone defect repair in rat calvaria after treatment with blocks of porous bovine organic graft material. *J Appl Oral Sci.* 2004, 12(1): 62-9.

23. Agrawal A, Baisakhiya N, Bholá N. Split calvarial graft to repair the large frontal bone defect. *J Maxilofac Oral Surg.* 2010, 9(2): 166-9.

24. Agrawal A, Garg LN. Split calvarial bone graft for the reconstruction of skull defects. *Journal of Surgical Technique and Case Report.* 2011, 3(1): 13-16.

25. Camelo-Nunes JM, Rodrigues UP, Goldenberg S. The use of the external layer of the calvaria's frontal bone to repair craniofacial skeleton injuries in Macaca mulatta (Rhesus). *Acta Cirurgica Brasileira.* 2003, 18(3): 76-80.

26. Jaquet Y, Higgins K, Enepekides D. The temporoparietal fascia flap: A versatile tool in head and neck reconstruction. *Current Opinion in Otolaryngology & Head & Neck Surgery.* 2011, 19(4): 235-41.

27. Lai A, Cheney ML. Temporoparietal fascial flap in orbital reconstruction. *Arch Facial Plast Surg.* 2000, 2:196-201.

28. Raposo-do-Amaral CE, Raposo-do-Amaral CA, Guidi MC, Buzzo CL. Aplicabilidade do retalho de fásia têmporo-parietal nas reconstruções

secundárias de orelha e esqueleto craniofacial. *Rev Bras Cir Craniomaxilofac.* 2010, 13(1): 1-6.

29. Davison SP, Mesbahi AN, Clemens MW, Picken CA. Vascularized calvarial bone flaps and midface reconstruction. *Plast Reconstr Surg.* 2008, 122(1): 10e-18e.

30. Aspoas AR, Wilson GR, McLean NR, Mendelow AD, Crawford PJ. Microvascular reconstruction of complex craniofacial defects. *Ann R Coll Surg Engl.* 1997, 79:278-83.

31. Chang KP, Lai CH, Chang CH, Lin CL, Lai CS, Lin SD. Free flap options for reconstruction of complicated scalp and calvarial defects: Report of a series of cases and literature review. *Microsurgery.* 2010, 30(1):13-8.

32. Pusic AL, Chen CM, Patel S, Cordeiro PG, Shah JP. Microvascular reconstruction of the skull base: A clinical approach to surgical defect classification and flap selection. *Skull Base.* 2007, 17(1):5-15.

33. Brey EM, Cheng MH, Allori A, Atterfield W, Chang DW, Patrick Jr CW, Miller MJM. Comparison of guided bone formation from periosteum and muscle fascia. *Plast Reconstr Surg.* 2007, 119(4):1216-22.

34. Lin CT, Leung JKW, Chen JS, Yang KC. Combined free fibular osteocutaneous-lateral calcaneal fasciocutaneous flap for reconstruction of composite oromandibular defects. *Annals Plast Surg.* 2004, 53(5):442-48.

35. Guo L, Pribaz JJ. Clinical flap prefabrication. *Plast Reconstr Surg.* 2009, 124(6):340e-50e.

36. Chang DW, Satterfield WC, Son D, Neto N, Madewell JE, Raymond AK, Patrick CW, Miller MJ, Costelloe CM, Weber KL. Use of Vascularized Periosteum or Bone to Improve Healing of Segmental Allografts after Tumor Resection: An Ovine Rib Model. *Plast Reconstr Surg.* 2009, 123(1): 71-8.

37. Cheng MH, Brey EM, Ulusal BG, Wei FC. Mandible augmentation for osseointegrated implants using tissue engineering strategies. *Plast Reconstr Surg.* 2006, 118(1):1e-4e.
38. Hassanein AH, Arany PR, Couto RA, Clune JE, Glowacki J, Rogers GF, Mulliken JB, Greene AK. Cranial particulate bone graft ossifies calvarial defects by osteogenesis. *Plast Reconstr Surg.* 2012, 129(5): 796e-802e.
39. Costa NMF, Melo BR, Brito RT, Fernandes GVO, Bernardo VG, Fonseca EC, Conz MB, Soares GA, Granjeiro JM. Quality and intensity of the tissue response to two synthetic granular hydroxyapatite implanted in critical defects of rat calvaria. *Materials Research.* 2009, 12(2): 145-51.
40. Chen Y, Wang G, Zeng L. Adipose tissue or bone marrow, store for purchasing mesenchymal stem cells? *Official Journal of the Japanese Circulation Society.* 2011, 75: 2060-61.
41. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991, 9:641-50.
42. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cell. 1999, 284 (5411): 143-47.
43. Orbay H, Tobita M, Mizuno H. Mesenchymal stem cells isolated from adipose and other tissues: Basic biological properties and clinical applications. *Stem Cells International.* 2012, 2012: 1-9.
44. Hamajima S, Hayashi T, Sato Y, Sasaki K, Kawai T. Osteoanagenesis after transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells using polyvinylidene chloride film as a scaffold. *Dental Materials Journal.* 2011, 30(5): 707–716.
45. Wang Y, Han Z, Song Y, Han ZC. Safety of mesenchymal stem cells for clinical application. *Stem Cells International.* 2012, 2012: 1-4.
46. Levi B, James AW, Nelson ER, Peng M, Wan DC, Commons GW, Lee M, Wu B, Longaker MT. Acute skeletal injury is necessary for human adipose-

derived stromal cell mediated calvarial regeneration. *Plastic Reconstr Surg.* 2011, 127(3): 1118-29.

47. Pak J, Autologous adipose tissue-derived stem cells induce persistent bone-like tissue in osteonecrotic femoral heads. *Pain Physician.* 2012, 15:75-85.

48. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001, 7(2): 211–28.

49. Levi B, James AW, Nelson ER, Hu S, Sun N, Peng M, Wu J, Longaker MT. Migration and participation in repair of systemically injected adipose-derived stromal cells to sites of cranial skeletal injury. *Plast Reconstr Surg.* 2011, 127(3): 1130–40.

50. Togashi AY, Cirano FR, Marques MM, Pustiglioni FE, Lima LAPA. Characterization of bone cells obtained from the calvaria of neonatal rats (osteo-1) after serial subculture. *Journal of Applied Oral Science.* 2007, 15(5): 442-7.

51. Sampath TK, Maliakal J, Hauschka PV, Jones WK, Sasak H, Tucker RF, White KH, Coughlin JE, Tucker MM, Pang RHL, Corbett C, Özkaynak E, Oppermann H, Rueger DC. Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *Journal of Biological Chemistry.* 1992, 267(28):20352-62.

52. Yeh L-CC, Tsai AD, Zavala MC, Lee JC. Cartilage-derived morphogenetic proteins enhance the osteogenic protein-1-induced osteoblastic cell differentiation of C2C12 cells. *J Cell Physiology.* 2004, 201:401-8.

53. Ferreira GR, Cestari TM, Granjeiro JM, Taga R. Lack of repair of rat skull critical size defect treated with bovine morphometric protein bound to microgranular bioabsorbable hydroxyapatite. *Braz Dent J.* 2004, 15(3): 175-80.

54. Reichert JC, Wullschleger ME, Cipitria A, Lienau J, Cheng TK, Schültz MA, Duda GN, Nöth U, Eulert J, Hutmacher DW. Custom-made composite scaffolds for segmental defect repair in long bones. *International Orthopedics*. 2011, 35: 1229-36.
55. Hamajima S, Hayashi T, Sato Y, Sasaki K, Kawai T. Osteoanagenesis after transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells using polyvinylidene chloride film as a scaffold. *Dental Materials Journal*. 2011, 30(5): 707–16.
56. Mason JM, Grande DA, Barcia M, Grant R, Pergolizzi RG, Breitbart AS. Expression of human bone morphogenic protein 7 in primary rabbit periosteal cells: potential utility in gene therapy for osteochondral repair. *Gene Therapy*. 1998, 5: 1098-1104.
57. Jiang Z, Liu H, Zhang L, Wu Z, Shang D. Repair of calvarial defects in rabbits with platelet-rich plasma as the scaffold for carrying bone marrow stromal cells. *Oral and Maxillofacial Surgery*. 2012, 113(3): 327-33.
58. Oliveira Filho MA, Nassif PAN, Malafasia O, Ribas Filho JM, Ribas CAPM, Camacho AC, Stieven Filho E, Giovanini AF. Effects of a highly concentrated platelet-rich plasma on the bone repair using non-critical defects in the calvaria of rabbits. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2010, 25(1): 28-33.
59. Rocha FS, Ramos LMA, Batista JD, Zanetta-Barbosa D, Dechichi P. Organic bovine graft associated with PRP in Rabbit's calvaria. *Arq Int Otorrinolaringol*. 2011, 15(2): 208-13.
60. Andrade MGS, Moreira DC, Dantas DB, Sá CN, Bittencourt TCBSC, Sadigursky M. Pattern of osteogenesis during onlay bone graft healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010, 110:713-9.
61. Hutmacher DW, Sittinger M, Periosteal cells in bone tissue engineering. *Tissue Eng*. 2003, 9(1):S45.

62. Damy SB, Camargo RS, Chammas R, Figueiredo LFP. Aspectos fundamentais da experimentação animal – aplicações em cirurgia experimental. Rev Assoc Med Bras. 2010, 56(1): 103-11.
63. Oliveira HP. Protocolos anestésicos. <https://www.ufmg.br/bioetica/cetea>. 19 July, 2012, 21:52.
64. Parro F, Viterbo F, Viterbo BG, Ueda A, Pinca F, Zanini S. Histological and radioisotopical analysis of the skull graft: An experimental study in rabbits. J Craniofac. Surg. 1992, 3(4): 203-206.
65. Ptaszynska M, Hospools L. Reprodução de coelhos. Compendio de reprodução animal, 311-25. www. abspecplan.com.br/Compendio_Reproducao.pdf.
66. Paulo AO, Castro-Silva II, Oliveira DF, Machado MEL, Bonetti-Filho I, Granjeiro JM. Repair of critical-size defects with autogenous periosteum-derived cells combined with bovine anorganic apatite/collagen: An experimental study in rat calvaria. Braz Dent J. 2011, 22(4): 322-8.

EXPERIMENTAL STUDY

Osseus flap of galea and periosteum filled with bone fragments. Study in rabbits¹.

Retalho ósseo de gálea e periósteo preenchido com pó de osso.
Estudo em coelhos.

Ryane Schmidt Brock^I; Fausto Viterbo^{II}; Guilherme Capel^{III}; Maria Aparecida Custodio Domingues^{IV}; Eloísa Elena Paschoalinotte^V.

I. MD, Plastic Surgeon, Master Student of São Paulo State University.

II. MD, PhD, Head of Plastic Surgery Department, Botucatu Medical School, São Paulo State University.

III. Medical Student, Botucatu Medical School, São Paulo State University.

IV. MD, Head of Patology Department, Botucatu Medical School, São Paulo State University.

V. Estatistical Analyst, Botucatu Medical School, São Paulo State University.

ABSTRACT

Introduction: Osseus defects from traumas, tumor resections or congenital malformation are usual in medical practice, and its treatment with reconstructive surgeries are common, especially in plastic surgery, that gives the patients better quality of life. **Purpose:** To study the viability of a vascularized galea and periosteum flap filled with bone fragments, as a substitute of the bone graft in facial reconstructive surgery. **Method:** Forty rabbits were studied, and divided in two groups. One had a simple galea and periosteum flap done and the other had the same flap done and filled with bone fragments of the calvaria. **Results:** The results demonstrated bone neoformation in both groups with differences in bone morphology and structure. **Conclusion:** This study demonstrated osseous formation in both groups of galea and periosteum flaps, with and without bone fragments. **Key words:** bone, calvaria, flap, reconstruction, face, graft.

RESUMO

Introdução: Defeitos ósseos decorrentes de traumas, ressecções de tumores ou mesmo malformações congênitas são muito encontrados na prática médica e o tratamento destas deformidades através de reconstruções cirúrgicas são freqüentes, principalmente na cirurgia plástica, proporcionando aos pacientes melhor qualidade de vida. **Objetivo:** Estudar a viabilidade de um retalho de gálea e periósteo preenchido com pó de osso, vascularizado, que seja viável e capaz de substituir o enxerto ósseo nas reconstruções, principalmente nos defeitos faciais. **Método:** Foram estudados 40 coelhos divididos em dois grupos, o primeiro com retalho gáleo-periosteal e o segundo com o mesmo retalho, porém preenchido com pó de osso. **Resultados:** Os resultados demonstraram formação óssea em ambos os grupos com diferenças na estrutura e morfologia óssea. **Conclusão:** O estudo mostrou a formação de tecido ósseo em ambos os grupos de retalhos de gálea e periósteo, com e sem pó de osso. **Descritores:** Osso, calvária, retalhos, reconstrução, face, enxerto ósseo.

Introduction:

Facial osseous defects caused by tumor resection, congenital malformation or trauma need reconstruction to recover the functional aspects of these lesions, like speech, breath, swallow, and also the aesthetic aspect of these patients¹⁻⁵.

Facial tumors that demand extensive resection and even adjuvant treatments like radiotherapy, lead to function deformities and social problems because of the deformed appearance. The radiotherapy, necessary to complete the cancer treatment, interferes at the fracture healing and remodeling because it stimulates apoptosis and affects the blood supply^{6,7}.

Congenital malformations like Franceschetti, Crouzon and Goldenhar Syndromes, facial clefts or mandible hypoplasia are even important as they need osseous tissue to reconstruct the defects. These malformations interfere at the social development of these children^{8,9}.

Traumas are other important and usual reason of facial defects. Many times, only fracture correction is not enough to treat these patients. Some of them can lose an extensive part of soft and osseous tissue that demands more specific reconstructive techniques.

Many reconstructive techniques are used like autologous bone graft, local flaps, free flaps with microsurgical technology, alloplastic materials, bone substitutes and tissue engineering^{3-6,10-12}.

The bone graft is the most used procedure because it is autologous, has no rejection, but it has variable absorption rate at the post operative that may interferes at the final result. Besides, it leads to a donor site morbidity^{2,5,11,13-18}.

The temporoparietal fascia flap has demonstrated its adaptability to various reconstructive defects. It is a thin, pliable and resistant coverage to cartilage or osseous tissue and has an important blood supply by the superficial temporal vessels. It has a vascular pedicle and its length allows the

flap to reach the ipsilateral defects of the orbitomaxillary region, oral cavity and mandible¹⁹.

Free flaps are used in difficult reconstructions. They provide reliable, well-vascularized soft tissue and less tissue absorption. However, its complications like arterial or venous thrombosis can lead to a total flap necrosis. Besides, it demands a proper medical team trained on microsurgery technique and special surgical tools^{2,3,7,14,16,17,20}.

Alloplastic materials such as titanium, polymers, porous ceramics, hydroxyapatite, collagen sponges or hydrogels can also be used in reconstructive procedures, but there are risks like infection, they do not fully osseointegrate, can become unstable with cranial growth, leads to inflammatory response as a foreign body reaction and may occur extrusion^{10,21-24}.

Recent advances in tissue-engineering techniques have enabled new procedures to be developed for bone regeneration, and these procedures have the potential to improve on the present clinical strategies. Mesenchymal stem cells were differentiated into connective and mesenchymal tissue by Caplan (1991) and Pittenger et al. (1999). These cells neof ormation and regeneration capacity, special in craniofacial structures are natural. The adult mesenchymal cells derived from bone marrow, subcutaneous tissue, muscle, dental pulp, synovia and umbilical cord are potential donor for cellular therapy. The mesenchymal stem cell is multipotent and differentiates into osteoblasts, chondrocytes, adipocytes and myocytes^{2,3,6,11,25-30}.

However, the tissue-engineering techniques demand a specific laboratory, materials and prepared professional team.

Purpose:

Evaluate the viability of the galea and periosteum flap filled with bone fragments of the rabbit's calvaria.

Methods:

The experimental study was performed from June 2010 to March 2012, at the Experimental Surgery Laboratory of Surgery and Orthopedic Department, Botucatu Medical School – UNESP, with previous approval of the Animal Ethics Committee of Botucatu Medical School – UNESP.

Forty male, Norfolk rabbits of 70 days of life with 1730 g to 3915 g (mean 2655,75 g +/- 179,29), were divided into two groups. Control Group (CG), with 10 animals, had a galea and periosteum cylinder flap done at the right side of calvaria (Fig. 1).

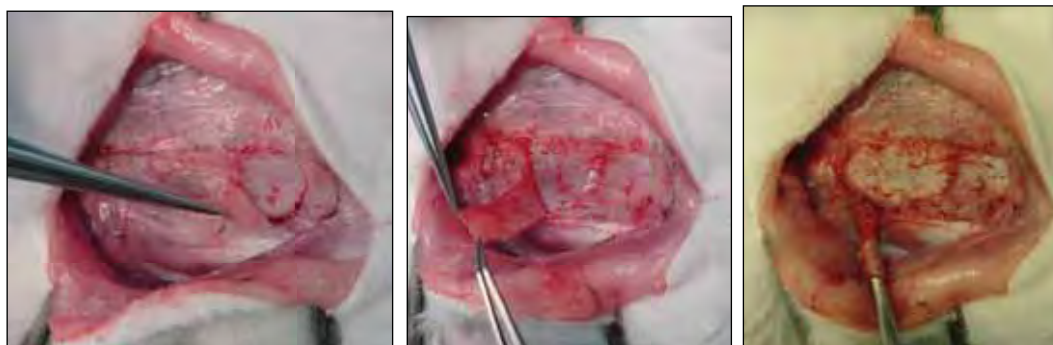


Figure 1: Galea and periosteum dissection and the cylinder confection.

The treated Group (TG), with 30 animals, had the same flap done and filled with fragments of bone harvested with an n° 23 surgical blade, from the other side of the cortical calvarial bone (Fig. 2). All animals had venous anesthesia with Ketamina 10% - 10mg/kg (Dopalen®) and Xilazina 2% - 3mg/kg (Anasedan®).

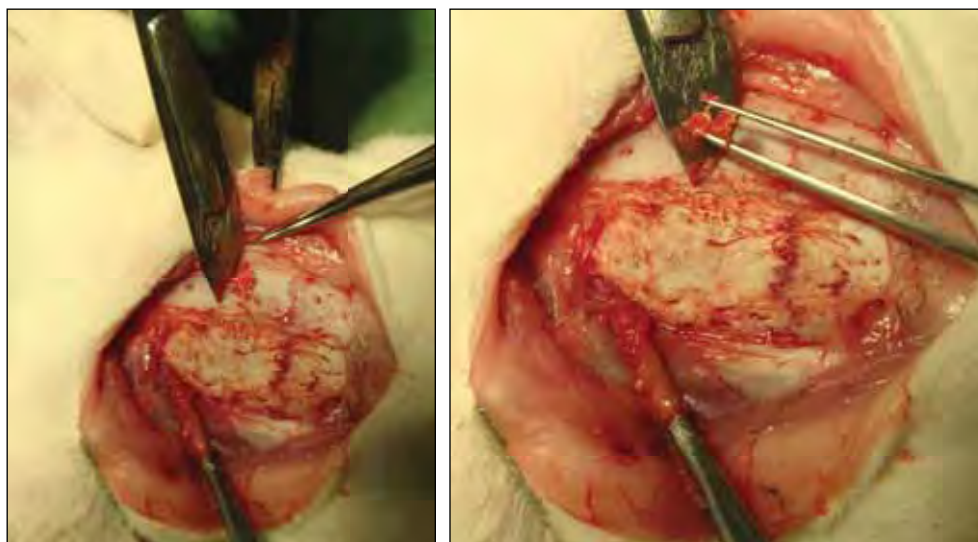


Figure 2: Galea and periosteum cylinder confection filled with bone fragments.

After 30 and 60 days post operative all animals were submitted to cranial radiographic exams in two different positions, dorsoventral and lateral views, and evaluated by three different examiners. The radiographies were compared to a normal one of an animal without any intervention (Fig. 3).

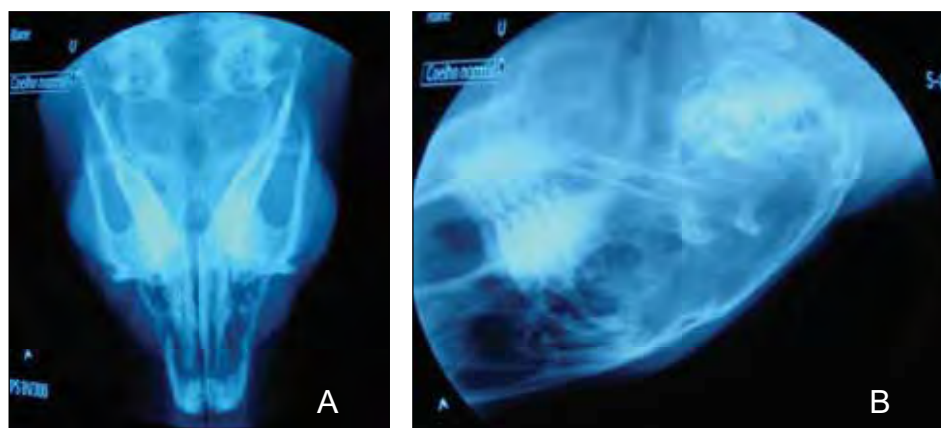


Figure 3: Dorsoventral and lateral radiographies of a normal animal.

After this period, the animals were submitted to surgical procedure to evaluate the flap, if it was bleeding or had some material inside it. After that

they were killed with venous anesthesia of Ketamina 10% - 80mg/kg (Dopalen[®]) e Xilazina 2% - 30mg/kg (Anasedan[®]).

The flap was resected and sent to histological analysis, stained with hematoxylin and eosin and Masson trichrome. The analysis was done with Leica DMLS microscope.

The statistical analysis used chi-square tests and, when necessary, Fischer test. To compare the animal weight and bone formation, it was used logistic regression. To evaluate the examiners analysis was used the index of coincidence (Kappa) and ANOVA test was used to compare the area and perimeter values. It was considered $p < 0,05$.

The analysis was done in S.A.S 9.3 software for Windows.

Results:

All animals were submitted to surgical procedures and only one from TG, died at the anesthesia for the 30th day radiography.

The animal's initial weight at CG was 2102 g to 2715 g, mean 2409,30 g (+/- 179,29), and at TG was 1850 g to 3915 g, mean 2737,90 g (+/- 521,63). There was no statistical difference between the values ($p=0,0599$).

Thirty-nine rabbits had a radiographic exam at 30 days postoperative. The analysis had an important variation between the examiners. Control Group had from one animal (10%) to 90% of radiopacity at the lateral exam (Table 1). The examiner 1 and 2, and examiner 1 and 3 had low coincidence (kappa – 0,02). Examiner 2 and 3 had high coincidence (kappa – 1,0). It suggests bone formation.

Table 1: Radiography analysis at 30 days postoperative of CG.

Rabbits	Examiner 1	Examiner 2	Examiner 3
31	no	yes	yes

32	no	no	no
33	no	yes	yes
34	no	yes	yes
35	no	yes	yes
36	yes	yes	yes
37	no	yes	yes
38	no	yes	yes
39	no	yes	yes
40	no	yes	yes

At 60 days radiographies, three animals (30%) to 10 (100%) had the same image at the lateral exam (Table 2). The examiner 1 and 2, and examiner 1 and 3 had low coincidence (kappa – 0,11). Examiner 2 and 3 had high coincidence (kappa – 1,0). No image was identified at dorsoventral view.

Table 2: Radiopacity at lateral view at 60th day x-ray of CG animals.

Rabbits	Examiner 1	Examiner 2	Examiner 3
31	yes	yes	yes
32	no	yes	yes
33	yes	yes	yes
34	no	yes	yes
35	no	yes	yes
36	no	yes	yes
37	no	yes	yes
38	yes	yes	yes
39	no	yes	yes
40	no	yes	yes

In Treated Group, 34,48%, 82,76% and 86,20% of the animals presented radiopacity at 30 days (Table 3). The coincidence of examiner 1 and 2, and 1 and 3, was low (kappa – 0,19 and 0,15). The coincidence of examiner 2 and 3 was high (kappa – 0,86).

Table 3: Radiography analysis at 30 days postoperative of TG.

Rabbits	Examiner 1	Examiner 2	Examiner 3
1	no	yes	yes
2	yes	yes	yes
3	no	yes	yes
4	no	no	no
5	yes	yes	yes
6	no	no	no
7	no	no	no
8	no	yes	yes
10	yes	yes	yes
11	no	yes	yes
12	no	yes	yes
13	yes	yes	yes
14	no	yes	yes
15	yes	yes	yes
16	yes	yes	yes
17	no	yes	yes
18	no	yes	yes
19	no	yes	yes
20	no	no	yes
21	no	yes	yes
22	no	yes	yes
23	yes	yes	yes
24	yes	yes	yes
25	no	yes	yes
26	no	yes	yes
27	yes	yes	yes
28	yes	yes	yes
29	no	yes	yes
30	no	no	no

At 60th days radiography, 72,41%, 89,65% e 93,10% of the animals had radiopacity image, all at the same lateral incidence (Table 4). The coincidence of examiner 1 and 3, was low ($\kappa = 0,10$), 1 and 2 was considerable ($\kappa = 0,25$) and the coincidence of examiner 2 and 3 was substantial ($\kappa = 0,78$). No image was identified at dorsoventral view.

Table 4: Radiopacity at lateral view in 60th day x-ray of TG animals.

Rabbits	Examiner 1	Examiner 2	Examiner 3
1	yes	yes	yes
2	yes	no	no
3	yes	yes	yes
4	yes	yes	yes
5	yes	yes	yes
6	yes	yes	yes
7	no	yes	yes
8	yes	yes	yes
10	yes	yes	yes
11	no	yes	yes
12	yes	yes	yes
13	no	no	no
14	no	yes	yes
15	yes	yes	yes
16	yes	yes	yes
17	no	no	yes
18	no	yes	yes
19	no	yes	yes
20	yes	yes	yes
21	yes	yes	yes
22	yes	yes	yes
23	no	yes	yes
24	yes	yes	yes
25	yes	yes	yes
26	yes	yes	yes
27	yes	yes	yes
28	yes	yes	yes
29	yes	yes	yes
30	yes	yes	yes

There was no significant difference of bone formation between the groups at 30 days ($p=0,2282$, $p=1,0000$, $p=1,0000$).

After 60 days, the lateral radiographic images demonstrated significant higher rates of radiopacity at TG ($p=0,0266$) for only one examiner. The other two examiners had no statistical difference between 30 and 60 days radiographies ($p=0,5558$, $p=1,0000$).

At the 60 days surgical procedure, all animals from both groups demonstrated good vascularized flaps and no tissue absorption, which suggests good vascular perfusion.

Eleven flaps, from the total thirty-nine animals, demonstrated a yellow tissue inside them; ten were from TG and one from CG. It was thin and spiky in eight and soft and irregular in three of them. The one from CG was soft and irregular (Figs. 4 and 5).



Figure 4: Macroscopic image of a spiky tissue formation inside the flap.

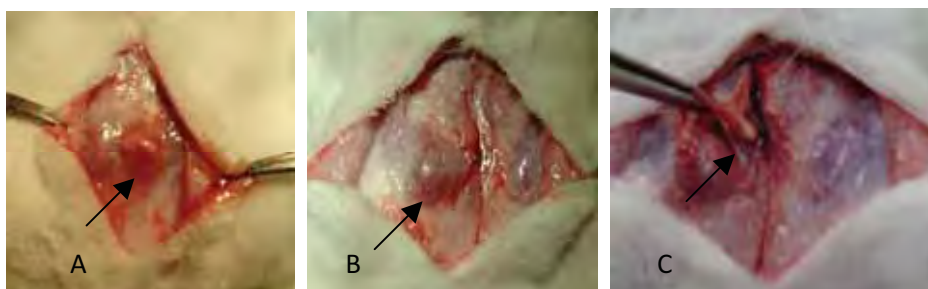


Figure 5: Macroscopic image of a yellow and irregular tissue inside the flaps of animal 19 (A) and 26 (B, C).

The histological analysis of CG demonstrated bone image with an eosinophilic material, osteoblasts and fibroblasts in five samples (50%). The bone aspect was irregular and trabecular with osteoblast proliferation around it (Fig. 6).

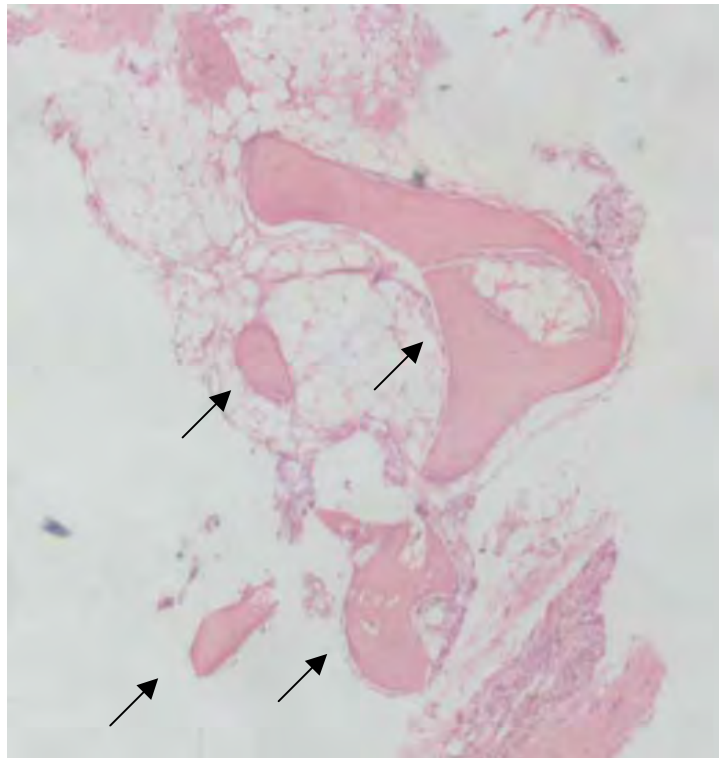


Figure 6: Histological analysis of animal n° 40, from CG, with an irregular and trabecular bone neoformation.

At TG histological analysis, twenty samples (68.97%) had eosinophilic material with osteoblasts in more organized and regular form. Four images (20%) had vascular formation inside it (Fig. 7).

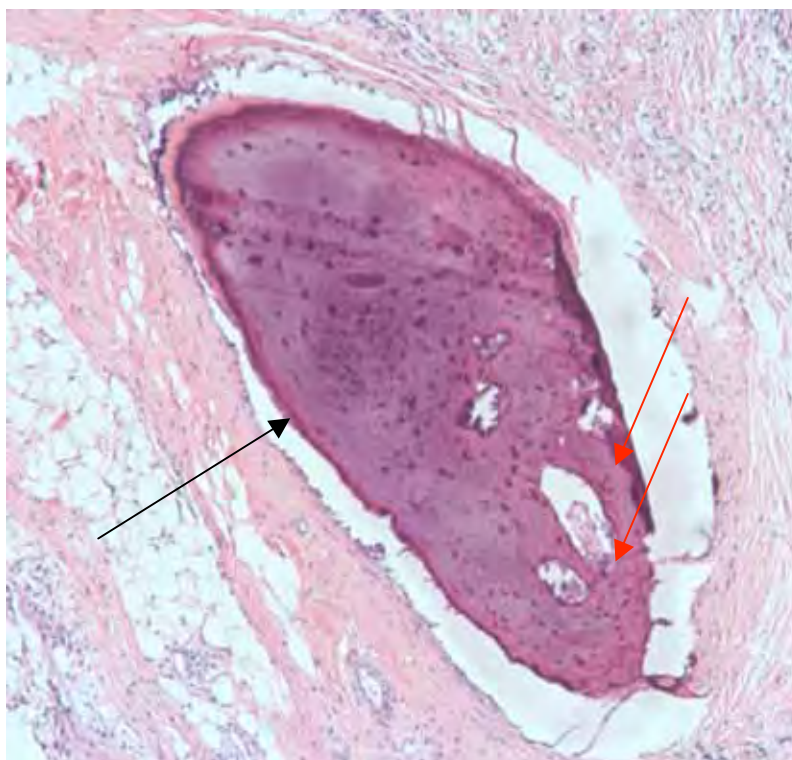


Figure 7: Animal n° 19, from TG, with a regular bone formation (black arrow) and vascular formation inside it (red arrow).

However, bone neof ormation had no significant difference between the two groups ($p=0,4459$).

The osseus image area and perimeter were measured in all histological samples. At CG, the area was 2,447 to 321,751 mm² (mean = 90,512 mm²) and perimeter was 0,225 to 5,04 mm (mean = 1,82 mm). In TG, the area was 20,604 to 3041,709 mm² (mean = 450,419 mm²) and the perimeter was 0,79 to 18,448 mm (mean=3,59 mm). There was no significant difference between the group's values ($p=0,3979$).

Discussion:

The choice to use rabbits as experimental animals was made because it has an adequate calvaria size, larger than rats and it has a vascularized tissue by the temporal artery and vein. The rabbit has been used as experimental animal to bone defects and cranial reconstruction studies^{24,31}.

The morcelized bone graft used into vascularized flaps demonstrated that the osseous cells and proteins from growth factor family are necessary to progenitor cells induction of the periosteum. It is considered an ideal biomaterial to bone neoformation because it is a complement of growth factors stored in the noncalcified matrix of morcellized bone graft, such as bone morphogenetic proteins and proteins of the fibroblast growth factor family, induce progenitor cells within the periosteum to an osteogenic phenotype and result in new bone formation within the chambers^{32,33}.

For this reason, it was used bone dust, fragments of the cortical calvarial bone, because it has osseous cells and essential proteins to bone formation induction, and minimum donor site morbidity.

The vascularized calvarial flaps are better than bone grafts because it has less absorption, better osseous integration and less infection rate^{17,34}.

The periosteum is a vascularized membrane that covers the bone and is important at osseous healing. Studies demonstrated that the periosteum induces cartilage and bone formation, depending on the oxygen tension and protein levels. The fibroblasts from the outer layer of the periosteum and the osteoblasts from the inner layer provide a collagen matrix important at the healing process^{9,32,33}.

The choice to use periosteum and calvaria flap was done because of the temporal vascular pedicle, which is flexible, can reach local areas and can be shaped in different forms, besides the regeneration capacity of the periosteum.

Macroscopic analysis demonstrated 100% vascularized tissue, no absorption of the flap and images inside the flap that suggested bone neoformation, one at CG (10%) and ten at TG (34,48%).

The radiographic results suggest osseous formation at the top of the calvaria where the flap was made, in lateral position images. At the dorsoventral view, there was no suggestive image of neoformed bone, may

be because the osseous superposition of the rabbit calvaria that makes it difficult to differentiate osseous structures.

The histological analysis confirmed bone formation in both groups. However, the structure of this neoformed osseous tissue was different. In CG, 50% of the samples had irregular eosinophilic images with osteoblasts, which characterized a trabecular bone. And in TG, the eosinophilic image was organized, with regular borders and osteoblasts, characteristics of a more mature bone formation.

The area and perimeter had a large variety of values and did not demonstrate statistical difference between the groups. For this reason the bone was not considered by quantity but it was considered by quality and histological differences.

At this study, it was possible to demonstrate bone formation in vascularized flaps of galea and periosteum of rabbit's calvaria and it was possible to differ tissue formation in two kinds of surgical techniques. However, the real viability analysis of this galea and periosteum flap filled with bone fragments could not be proved and demands more studies to reach a real conclusion.

Conclusion:

This study demonstrated osseous formation in both groups, with and without bone fragments.

References:

1. Baumeister S, Peek A, Friedman A, Levin L S, Marcus J R. Management of Postneurosurgical Bone Flap Loss Caused by Infection. *Plast Reconstr Surg.* 2008, 122(6): 195-208.
2. Casabona F, Martin I, Muraglia A, Berrino P, Santi P, Cancedda R, Quarto R. Prefabricated engineered bone flaps: An experimental model of tissue reconstruction in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg.* 1998, 101(3):577-81.
3. Alam I, Asahina I, Seto I, Oda M, Enomoto S. Prefabricated vascularized bone flap: A tissue transformation technique for bone reconstruction. 2001, 108(4):952-58.
4. Goiato MC, Santos, DM, Haddad MF, Pesqueira AA, Carvalho Dekon SF, Zavanelli AC. Most frequent tumors in maxillofacial area rehabilitated through surgical reconstruction and prostheses. *J Craniofac Surg.* 2010, 21(2):396-99.
5. Hara T, Santos CA, Farias A, Costa MJM, Cruz RJLC. Cranioplastia: Parietal versus prótese customizada. *Rev Bras Cir Plast.* 2011, 26(1): 32-6.
6. Mao JJ, Giannobile WV, Helms JA, Hollister SJ, Krebsbach PH, Longaker MT, Shi S. Craniofacial tissue engineering by stem cells. *J Dent Res.* 2006, 85(11): 966-79.
7. Yano T, Tanaka K, Kishimoto S, Iida H, Okazaki M. Review of skull base reconstruction using locoregional flaps and free flaps in children and adolescents. *Skull Base.* 2011, 21:359–64.
8. Posnick JC. Treacher Collins syndrome: Evaluation and treatment. In *Craniofacial and Maxillofacial Surgery in Children and Young Adults*, 1st Ed. Philadelphia: Saunders, 2000.
9. Soltan M, Smiler D, Soltan C. The inverted periosteal flap: A source of stem cell enhancing bone regeneration. *Implant Dentistry.* 2009, 18(5): 373-79.

10. Kumar AR, Bradley JP, Harshbarger R, Stevens F, Bell R, Moores L, Armonda R. Warfare-related craniectomy defect reconstruction: Early success using custom alloplast implants. *Plast Reconstr Surg.* 2011, 127(3):1279-87.
11. Chang SH, Tung KY, Wang YJ, Tsao YP, Ni TS, Liu HK. Fabrication of vascularized bone grafts of predetermined shape with hydroxyapatite-collagen gel beads and autogenous mesenchymal stem cell composites. *Plast Reconstr Surg.* 2010, 125(5):1393-1402.
12. Laureano Filho JR, Castelo Branco BL, Andrade ESS, Barbosa JRA. Comparação histológica entre o osso desmineralizado e polímero de mamona sobre a regeneração óssea. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2007, 73(2): 186-92.
13. Netscher, DT, Stal S, Shenaq S. Management of residual cranial vault deformities. *Clin Plast Surg.* 1992, 19: 301.
14. Grant GA, Jolley M, Ellenbogen RG, Roberts TS, Gruss JR, Loeser JD. Failure of autologous bone-assisted cranioplasty following decompressive craniectomy in children and adolescents. *J Neurosurg.* 2004, 100(2):163-8.
15. Park HK, Dujovny M, Agner C, Diaz FG. Biomechanical properties of calvarium prosthesis. *Neurol Res.* 2001. 23(2-3): 267-76.
16. Gosain AK, McCarthy JG, Staffenberg D, Glat PM, Simmons DJ. The histomorphologic changes in vascularized bone transfers and their interrelationship with the recipient sites: A 1-year study. *Plast Reconstr Surg.* 1996, 97(5):1001-13.
17. Vögelin E, Jones NF, Lieberman JR, Baker JM, Tsingotjidou AS, Brekke JH. Prefabrication of bone by use of a vascularized periosteal flap and bone morphogenetic protein. *Plast Reconstr Surg.* 2002, 109(1): 190-98.
18. Gosain AK, Song L, Santoro, TD, Amarante MTJ, Simmons DJ. Long-term remodeling of vascularized and nonvascularized onlay bone grafts: A macroscopic and microscopic analysis. *Plast Reconstr Surg.* 1999, 103(5):1443-50.

19. Jaquet Y, Higgins K, Enepekides D. The temporoparietal fascia flap: A versatile tool in head and neck reconstruction. *Current Opinion in Otolaryngology & Head & Neck Surgery*. 2011, 19(4): 235-41.
20. Aspoas AR, Wilson GR, McLean NR, Mendelow AD, Crawford PJ. Microvascular reconstruction of complex craniofacial defects. *Ann R Coll Surg Engl*. 1997, 79:278-83.
21. Saska S, Hochuli-Vieira E, Pereira Filho VA, Gabrielli MAC, Oliveira CF, Cancian DCJ. Implantes de polietileno poroso em calota de Coelho. Análise histological comparativa. *Rev Cir Traumatol Boco-Maxilofac*. 2007, 7(3):49-58.
22. Schofer MD, Roessler PP, Schaefer J, Theisen C, Schlimme S, Heverhagen JT, Voelker M, Dersch R, Agarwal S, Fuchs-Winkelmann S, Paletta JRJ. Electrospun PLLA nanofiber scaffolds and their use in combination with BMP-2 for reconstruction of bone defects. *Plos One*. www.plosone.org. 2011, 6(9):1-9.
23. Agrawal A, Baisakhiya N, Bhola N. Split calvarial graft to repair the large frontal bone defect. *J Maxilofac Oral Surg*. 2010, 9(2): 166-9.
24. Hassanein AH, Arany PR, Couto RA, Clune JE, Glowacki J, Rogers GF, Mulliken JB, Greene AK. Cranial particulate bone graft ossifies calvarial defects by osteogenesis. *Plast Reconstr Surg*. 2012, 129(5): 796e-802e.
25. Chen Y, Wang G, Zeng L. Adipose tissue or bone marrow, store for purchasing mesenchymal stem cells? *Official Journal of the Japanese Circulation Society*. 2011, 75: 2060-61.
26. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991, 9:641-50.
27. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cell. 1999, 284 (5411): 143-47.

28. Orbay H, Tobita M, Mizuno H. Mesenchymal stem cells isolated from adipose and other tissues: Basic biological properties and clinical applications. *Stem Cells International*. 2012, 2012: 1-9.
29. Hamajima S, Hayashi T, Sato Y, Sasaki K, Kawai T. Osteoanagenesis after transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells using polyvinylidene chloride film as a scaffold. *Dental Materials Journal*. 2011, 30(5): 707–716.
30. Wang Y, Han Z, Song Y, Han ZC. Safety of mesenchymal stem cells for clinical application. *Stem Cells International*. 2012, 2012: 1-4.
31. Parro F, Viterbo F, Viterbo BG, Ueda A, Pinca F, Zanini S. Histological and radioisotopical analysis of the skull graft: an experimental study in rabbits. *J Craniofac Surg*. 1992, 3(4): 203-6.
32. Brey EM, Cheng MH, Allori A, Atterfield W, Chang DW, Patrick Jr CW, Miller MJM. Comparison of guided bone formation from periosteum and muscle fascia. *Plast Reconstr Surg*. 2007, 119(4):1216-22.
33. Cheng MH, Brey EM, Ulusal BG, Wei FC. Mandible augmentation for osseointegrated implants using tissue engineering strategies. *Plast Reconstr Surg*. 2006, 118(1):1e-4e.
34. Davison SP, Mesbahi AN, Clemens MW, Picken CA. Vascularized calvarial bone flaps and midface reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. 2008, 122(1): 10e-18e.

Correspondence to

Ryane Schmidt Brock

Rua Jandiatuba, 630, sala 227.

São Paulo – SP

Phone: (11) 99112 3993, (11) 3476 3136.

Fax: (11) 3476 3136

e-mail: rybrock@ig.com.br

Conflict of interest: none.

Financial source: FAPESP – auxílio a pesquisa (2011/ 18935-0)

1. Study developed in the Experimental Surgery Laboratory , Surgery and Orthopedics Department, Medical School of Botucatu, São Paulo State University. Master degree thesis, Postgraduate Program in General Surgery Basis, Medical School of Botucatu, São Paulo State University, Brazil. Tutor: Prof. Fausto Viterbo.