

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA ANGIOGÊNESE EM XENOENXERTOS
COLHIDOS DE OSSOS BOVINOS IMPLANTADOS EM
SÍTIOS INTRACORPÓREOS DE COELHOS (*Oryctolagus
cuniculus*) COMO MODELO DE BIORREATOR *IN-VIVO***

Gabriel Luiz Montanhim

Médico Veterinário

2019

**D
I
S
S.

/

M
O
N
T
A
N
H
I
M

G.
L.

2
0
1
9**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA ANGIOGÊNESE EM XENOENXERTOS
COLHIDOS DE OSSOS BOVINOS IMPLANTADOS EM
SÍTIOS INTRACORPÓREOS DE COELHOS (*Oryctolagus
cuniculus*) COMO MODELO DE BIORREATOR *IN-VIVO***

Discente: Gabriel Luiz Montanhim

Orientadora: Profa. Dra. Paola Castro Moraes

Coorientador: Prof. Dr. Luis Gustavo Gosuen Gonçalves Dias

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para obtenção do título de Mestre
em Cirurgia Veterinária.

2019

M764a	Montanhim, Gabriel Luiz Avaliação da angiogênese em xenoenxertos colhidos de ossos bovinos implantados em sítios intracorpóreos de coelhos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) como modelo de biorreator in-vivo / Gabriel Luiz Montanhim. -- Jaboticabal, 2019 64 p. : il., tabs., fotos + 1 CD-ROM Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientadora: Paola Castro Moraes Coorientador: Luis Gustavo Gosuen Gonçalves Dias 1. Enxerto xenólogo. 2. Neovascularização. 3. Osteoindução. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DA ANGIOGÊNESE EM XENOENXERTOS COLHIDOS DE OSSOS BOVINOS IMPLANTADOS EM SÍTIOS INTRACORPÓREOS DE COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*) COMO MODELO DE BIORREATOR *IN-VIVO*

AUTOR: GABRIEL LUIZ MONTANHIM

ORIENTADORA: PAOLA CASTRO MORAES

COORDENADOR: LUIS GUSTAVO GOSUEN GONÇALVES DIAS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / Unesp - Jaboticabal

Prof. Dr. SILVIO HENRIQUE DE FREITAS
Departamento de Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais-FZEA/USP / Pirassununga/SP

Profa. Dra. VIRGINIA TESSARINE BARBOSA
Médica Veterinária - Responsável Técnica / FCAV/UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 25 de fevereiro de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Gabriel Luiz Montanhim, natural de Cedral – SP, nascido no dia 29 de agosto de 1990. Formado em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP Câmpus de Jaboticabal, graduação feita entre 2010 – 2014. Realizou Residência em Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP Câmpus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Andrigo Barboza De Nardi (2015 – 2017). Atualmente é aluno do curso de Mestrado (ingresso em março de 2017) do Programa de pós-graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP Câmpus de Jaboticabal, com orientação da Profa. Dra. Paola Castro Moraes e bolsista pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Atua junto aos Serviços de Cirurgia Geral e Oncologia Veterinária e coordenador da Liga Acadêmica de Cirurgia Veterinária.

“Sonhar é acordar para dentro”

Mario Quintana

AGRADECIMENTOS

Obrigado à Deus pela vida, saúde, força de vontade, perseverança e oportunidades que me deu até agora. Obrigado por cada vez que eu pensei que não fosse dar certo e o Senhor estava ali!

Obrigado minha família, em especial minha mãe Vera, meu pai Pedro, minha irmã Graziela, meu cunhado Ricardo e minha cachorra Belinha (Perfeita B). Desde muito cedo meus pais ensinaram para mim e minha irmã o valor do trabalho, da honestidade e do dinheiro. Ensinaram que por mais difícil que a coisa seja, não podemos desistir até porque “se fosse fácil, não seria para você”. Obrigado por todos os esforços e por todas as vezes que tiraram deles para nos dar e nos proporcionar um berço de ouro, dentro das nossas condições. Obrigado por nos proporcionar a chance do privilégio do estudo, diferentes de tantos jovens brasileiros. Obrigado por sempre me dar um lar para me chamar de meu.

Obrigado para minha orientadora e amiga, Profa. Dra. Paola Castro Moraes pela paciência, pelos ensinamentos e conselhos, pelas oportunidades e por tudo que a senhora representa para mim. Obrigado ao meu coorientador Prof. Dr Luis Gustavo Gosuen Gonçalves Dias, por todos puxões de orelhas ao longo desses anos e ao senhor um dia me considerar uma das laranjas que o senhor apertava. Obrigado aos professores do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, em especial os da Cirurgia e Clínica de Pequenos Animais.

Obrigado aos amigos que tanto me acompanharam ao longo desses anos, ouvindo os desabafos e angústia, rindo de coisas bobas, tomando uma cerveja fora de hora, fazendo com que vários momentos se tornassem eternos. Obrigado Siriema (Kelly), Estevam, Pimpolha (Ana Elisa), Bavaria (Catarina), Pixanga (Natália), Pêga (Luana), Jay-jay (Paola), Pernil (Pernil), Pati (Patrícia), Pimentinha (Ana Luisa), Mordelão (Gabriel), Pomba (Maria Alice), Et (Luciana), Pigméia (Renata), Yes-baby (Ana Carolina), Baxada (Nathália), Ki-assou (Arthur), O-próprio (Gustavo), Perdigão (Guilherme), Papa (Lúcia), Hugo, aos queridos da vet10 e tantos outros que a veterinária me proporcionou. Obrigado a família CCPA Thuanny, Pedro, Andréia, Mareliza, Rodrigo, Juliana, Levi, Carlos, Mônica, Guilherme e Cynthia, vocês foram e são essenciais para mim.

Aos amigos que a residência e o mestrado me deram Isa (isabela), Igor, Celso, Malê (Maria Alessandra), Amanda, Grazi (Graziela), Bruno, Denner, Fogs (Daniela), Paulinha (Paula), Pão (Daniele), Pâmela, Laura, Ste (Stefânie) e Paloma. Aos amigos dos setores da Ortopedia e Neurologia, Cirurgia Geral, Oncologia Veterinária, Anestesiologia, Cardiologia e Oftalmologia o meu muito obrigado.

Obrigado os amigos Matheus, Duda (Maria Eduarda) e Aladin (Thiago) que fizeram o máximo para que a fase experimental acontecesse e não mediram esforços até que ela acabasse. Sem vocês, a data de hoje não seria comemorada. Obrigado Prof. Dr. Alexandre Hataka e Profa. Dra. Pâmela Reina pelo auxílio nas leituras de cada lâmina do trabalho.

Obrigado a UNESP - Jaboticabal por tudo que me ofereceu, por tudo que conquistei aqui dentro, por todas as portas abertas e por tudo o que representa para mim. Obrigado ao Hospital Veterinário e todos seus funcionários pelas horas inesgotáveis de batalhas e aprendizados vividos ali dentro.

Obrigado a FAPESP e CAPES / Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo processo nº 2017/04142-5 pelo fomento do trabalho e oportunidade à pesquisa científica. Obrigado a CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo fomento inicial a minha pesquisa.

Obrigado as dificuldades e pedras no caminho, que me fizeram uma pessoa e profissional melhor e que me mostraram que a vida vai muito além do que eu achava que fosse.

Obrigado aos pacientes que tive o prazer de cuidar e com eles aprender.

E meu muito obrigado aos animais que fizeram parte desse experimento.

SUMÁRIO

CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIações	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
3.1 Aspectos Éticos	7
3.2 Animais e Grupos Experimentais	7
3.3. Implantes Ósseos Esponjosos Bovinos	8
3.4 Procedimento Cirúrgico	9
3.5 Avaliação Pós-Operatória	13
3.6 Avaliação Macroscópica	13
3.7 Avaliação Histopatológica	14
3.8 Análise Estatística	16
4. RESULTADOS.....	16
4.1. Avaliação Macroscópica	16
4.2. Avaliação Histopatológica	19
4.2.1. Grupo Bolsa de Omento	19
4.2.2. Grupo Intermuscular	21
4.2.3. Grupo Subperiosteal	22
4.3. Resultados Estatísticos	23
5. DISCUSSÃO	31
6. CONCLUSÃO	40
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40
8. REFERÊNCIAS	40

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “**Avaliação da revascularização de fragmentos ósseos de bovino autoclavados e implantados em sítios intracorpóreos de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) como modelo de bioreator in-vivo**”, protocolo nº 7.903/16, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luís Gustavo Gosuen Gonçalves Dias, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 02 de junho de 2016.

Vigência do Projeto	01/07/2016 a 01/04/2018
Espécie / Linhagem	<i>Oryctolagus cuniculus</i> / Nova Zelândia branco
Nº de animais	30 animais
Peso / Idade	Jovem adulto / 3 kg
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Biotério da Unesp - Botucatu

Jaboticabal, 02 de junho de 2016.


Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

**AVALIAÇÃO DA ANGIOGÊNESE EM XENOENXERTOS
COLHIDOS DE ÓSSOS BOVINOS IMPLANTADOS EM SÍTIOS
INTRACORPÓREOS DE COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)
COMO MODELO DE BIORREATOR *IN-VIVO***

RESUMO - É crescente a procura por materiais naturais ou sintéticos que auxiliem na formação de novo tecido ósseo. Para isso o uso de enxertos para correção de falhas ósseas por exemplo, ganha cada vez mais destaque. Com o presente trabalho, objetivou-se avaliar a neovascularização e posterior osteoindução de xenoenxertos bovinos implantados em sítios intracorpóreos de coelhos, tidos como biorreator. Para tal, foram utilizados 30 coelhos distribuídos em seis grupos, de acordo como tempo de avaliação (sete, 15, 30, 45 e 60 dias) na qual cada animal recebeu em três sítios intracorpóreos diferentes (A1 – bolsa de omento; A2 – espaço intermuscular do quadríceps femoral; A3 – subperiosteal do osso ílio), os implantes xenógenos. As avaliações foram feitas com análises macroscópicas e histopatológicas, quantificando células inflamatórias, tecido ósseo neoformado, presença de células gigantes e neoangiogênese. As análises histopatológicas mostraram intensa neoangiogênese em todos os implantes, presença de infiltrado inflamatório e células gigantes no local A1 e presença de neoformação óssea no local A3. Ao mesmo tempo pode-se notar degeneração dos implantes e formação de cápsula fibrosa. As análises estatísticas na comparação da interação do local com os dias de análises, mostrou não haver diferença significativa ($p \leq 0.05$) em nenhum tempo de análise de neovascularização e mostrando diferença significativa ($p \geq 0.05$) nas demais comparações. O omento é órgão ricamente vascularizado contendo em sua estrutura células inflamatórias e fatores de crescimento endotelial, o que justifica ser o local que pode-se observar a maior presença de neovasos e células inflamatórias. O periósteo possui em sua camada mais interna precursores osteoblásticos, favorecendo assim a formação de novo tecido ósseo a partir do momento que o implante foi revascularizado. Por conter partículas antigênicas o organismo reconheceu o xenoenxerto implantado como um corpo estranho, iniciando uma reação de corpo estranho asséptica, o que evoluiu para degeneração de partes do biomaterial.

Palavras-chaves: enxerto xenólogo, neovascularização e osteoindução.

EVALUATION OF ANGIOGENESIS IN XENOGRAFTS COLLECTED FROM BOVINE BONE IMPLANTED AT INTRACORPOREAL SITES OF RABBITS (*Oryctolagus cuniculus*) AS AN IN VIVO MODEL OF BIOREACTOR

ABSTRACT - There is increasing demand for natural or synthetic materials that aid in the formation of new bone tissue. For this, the use of grafts for correction of bone failures, for example, gains more and more prominence. The aim of this study was to evaluate the neovascularization and subsequent osteoinduction of bovine xenografts implanted in intracorporeal sites of rabbits, considered as bioreactor. To do this, 30 rabbits were distributed in six groups, according to the evaluation time (seven, 15, 30, 45 and 60 days) in which each animal received three different intracorporeal sites (A1 - omentum pouch; intermuscular of the femoral quadriceps, A3 - subperiosteal of the ilium bone), the xenogenes implants. The evaluations were made with macroscopic and histopathological analyzes, quantifying inflammatory cells, neoformed bone tissue, presence of giant cells and neoangiogenesis. Histopathological analyzes showed intense neoangiogenesis in all implants, presence of inflammatory infiltrate and giant cells at the A1 site and presence of bone neoformation at the A3 site. At the same time it can be noticed degeneration of the implants and formation of fibrous capsule. Statistical analyzes in the comparison of site interaction with the days of analysis showed no significant difference ($p \leq 0.05$) at any time of neovascularization analysis and showed a significant difference ($p \geq 0.05$) in the other comparisons. The omentum is a richly vascularized organ containing in its structure inflammatory cells and endothelial growth factors, which justifies being the place that one can observe the greater presence of neovasal and inflammatory cells. The periosteum has in its innermost layer osteoblastic precursors, thus favoring the formation of new bone tissue from the moment the implant was revascularized. By containing antigenic particles the body recognized the xenograft implanted as a foreign body, initiating an aseptic foreign body reaction, which evolved to degenerate parts of the biomaterial.

Keywords: neovascularization, osteoinduction and xenografts.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagem fotográfica dos implantes a partir de ossos de escápula bovina. Após todo preparo, os implantes foram autoclavados. Serviço de Ortopedia e Neurocirurgia e Serviço de Cirurgia Geral – UNESP Câmpus de Jaboticabal 9
- Figura 2.** Imagens fotográficas dos coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) após tricotomia ampla de toda área cirúrgica. Em A observa-se o sítio A1 e o acesso venoso na orelha (seta). Em B visibilizam-se os sítios A2 e A3. Serviço de Ortopedia e Neurocirurgia e Serviço de Cirurgia Geral – UNESP Câmpus de Jaboticabal 10
- Figura 3.** Imagens fotográficas de implantação de osso xenógeno (implante) em bolsa confeccionada com omento. A: O omento dos coelhos é intimamente ligado ao baço (seta preta), desta maneira os implantes foram alojados de tal maneira que fosse deixado espaço para que a bolsa fosse confeccionada sem prejudicar a vascularização esplênica. B: A bolsa de omento realizada dobrando partes das bordas do órgão em cima dos implantes. Serviço de Ortopedia e Neurocirurgia e Serviço de Cirurgia Geral – UNESP Câmpus de Jaboticabal 11
- Figura 4.** Imagens fotográficas de implantação de osso xenógeno (implantes) no espaço intermuscular. A: Após incisão de pele, observam-se os músculos bíceps e vasto femorais separados. B: Implantes alojados no espaço intermuscular. UNESP Câmpus de Jaboticabal..... 12
- Figura 5.** Imagens fotográficas de implantação de osso xenógeno subperiosteal (implantes) A: Após incisão da fáscia muscular, o periósteo (seta amarela) do osso ilíaco direito foi separado com auxílio de descolador de Freer. B: Implantes alocados entre o periósteo o osso. Serviço de Ortopedia e Neurocirurgia e Serviço de Cirurgia Geral – UNESP Câmpus de Jaboticabal 13
- Figura 6.** Presença de seroma (seta verde) no terceiro dia de pós-operatório, no sítio de implantação A3 (subperiosteal). Serviço de Ortopedia e Neurocirurgia e Serviço de Cirurgia Geral – UNESP Câmpus de Jaboticabal 17
- Figura 7.** Avaliação macroscópica no subgrupo A2 (intermuscular); as setas pretas evidenciam o local onde os implantes foram colocados, localizados por meio da sutura da fáscia muscular. A: Hematoma moderado aos 7 dias de pós-operatório. B: Hematoma discreto aos 15 dias pós-operatórios. C: Hematoma ausente aos 30 dias de pós-operatório. Serviço de Ortopedia e Neurocirurgia e Serviço de Cirurgia Geral – UNESP Câmpus de Jaboticabal 18

- Figura 8.** Avaliação macroscópica no subgrupo A3 (subperiosteal), evidenciando formação de hematoma moderado (A) nas amostras coletadas aos sete dias e hematoma discretos nos tempos 15 (B) e 30 dias (C) pós-operatórios. Serviço de Ortopedia e Neurocirurgia e Serviço de Cirurgia Geral – UNESP Câmpus de Jaboticabal 18
- Figura 9.** Avaliação macroscópica aos 15 dias de pós-operatório no subgrupo A1 (bolsa omental). A seta amarela sinaliza o local onde o implante está alojado dentro da bolsa de omento, da amostra coletada aos 15 dias. A: não houve aderência de nenhum outro órgão na bolsa ou sinais de hemorragia, necrose ou infecção. B: o implante pode ser visto através do órgão, evidenciando a delicadeza dos vasos sanguíneos ao redor de todo xenoenxerto (seta). Serviço de Ortopedia e Neurocirurgia e Serviço de Cirurgia Geral – UNESP Câmpus de Jaboticabal 19
- Figura 10.** Fotomicrografia do implante em local A1 (bolsa omental) no tempo sete dias. Nota-se presença do implante (I) rodeado com cápsula de tecido conjuntivo (seta) permeado de células inflamatórias e neovasos, tendo sua origem da bolsa de omento (OM). Coloração Hematoxilina & Eosina, objetiva de 10x. Serviço de Ortopedia e Neurocirurgia e Serviço de Cirurgia Geral – UNESP Câmpus de Jaboticabal 20
- Figura 11.** Fotomicrografia do implante em local A1 (bolsa omental) nos tempos sete (A) e 30 dias (B). A: Implante ósseo (seta longa) circundado de tecido conjuntivo repleto de células inflamatórias e neovascularização (setas curtas); Coloração Hematoxilina & Eosina, objetiva de 10x. B: Presença de reação inflamatória linfocitária (setas curtas) e as células gigantes do tipo corpo estranho (setas longas) ao redor da matriz óssea em processo de degeneração; Coloração Hematoxilina & Eosina, objetiva de 20x. Serviço de Ortopedia e Neurocirurgia e Serviço de Cirurgia Geral – UNESP Câmpus de Jaboticabal 21
- Figura 12.** Fotomicrografia do implante em local A2 (intermuscular) nos tempos 15 (A) e 30 dias (B). A: Presença de neovascularização (setas curtas) e a matriz óssea do implante em processo de degeneração (setas longas); Coloração Hematoxilina & Eosina, objetiva de 20x. B: Presença de infiltrado inflamatório neutrofílico próximo ao do implante ósseo (*) aos 30 dias; Coloração Hematoxilina & Eosina, objetiva de 40x. Serviço de Ortopedia e Neurocirurgia e Serviço de Cirurgia Geral – UNESP Câmpus de Jaboticabal 19
- Figura 13.** Fotomicrografia do implante em local A3 (subperiosteal) nos tempos 30 (A) e 45 dias (B). A: Presença de células gigantes do tipo corpo estranho ao redor da matriz óssea (seta); Coloração Hematoxilina & Eosina, objetiva de 20x. B: Proliferação de tecido conjuntivo (TC) entre o perióstio (P) e o implante (I); Coloração Hematoxilina & Eosina, objetiva de 10x. Serviço de Ortopedia e Neurocirurgia e Serviço de Cirurgia Geral – UNESP Câmpus de Jaboticabal 23

Figura 14. Média dos escores do tempo de análise em cada local de implante do enxerto. A1: bolsa de omento intra-abdominal; A2: espaço intermuscular do quadríceps femoral; A3: subperiosteal. Serviço de Ortopedia e Neurocirurgia e Serviço de Cirurgia Geral – UNESP Câmpus de Jaboticabal	24
Figura 15: Mediana dos scores de células inflamatórias em todos os tempos de análise em todos os grupos. Serviço de Ortopedia e Neurocirurgia e Serviço de Cirurgia Geral - UNESP Câmpus de Jaboticabal.....	24
Figura 16: Mediana dos scores de tecido ósseo em todos os tempos de análise em todos os grupos. Serviço de Ortopedia e Neurocirurgia e Serviço de Cirurgia Geral - UNESP Câmpus de Jaboticabal.....	26
Figura 17: Mediana dos scores de células gigantes em todos os tempos de análise em todos os grupos. Serviço de Ortopedia e Neurocirurgia e Serviço de Cirurgia Geral - UNESP Câmpus de Jaboticabal.....	28
Figura 17: Mediana dos scores de neovascularização em todos os tempos de análise em todos os grupos. Serviço de Ortopedia e Neurocirurgia e Serviço de Cirurgia Geral - UNESP Câmpus de Jaboticabal.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Escores quanto à resposta celular inflamatória.....	12
Tabela 2. Escores quanto à formação de novo tecido ósseo.....	12
Tabela 3. Escores quanto à presença de células gigantes inflamatórias (reação de corpo estranho).....	13
Tabela 4. Escores quanto à presença de neovascularização.....	13
Tabela 5. p-valor para cada análise comparativa de cada tempo de análise de células inflamatórias entre as mediana dos scores.....	24
Tabela 6. p-valor para cada análise comparativa de cada tempo de análise de tecido ósseo entre as mediana dos scores.....	25
Tabela 7. p-valor para cada análise comparativa de cada tempo de análise células gigantes entre as mediana dos scores.....	27
Tabela 8. p-valor para cada análise comparativa de cada tempo de análise de neovascularização entre as mediana dos scores.....	28

LISTA DE ABREVIATÖES

BMP's:	Proteínas Morfogênicas Ósseas
cm:	centímetros
cm ³ :	centímetros cúbicos
EGF:	Fator de Crescimento Endotelial
IM:	intramuscular
kg:	kilograma
min:	minutos
PDGF:	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
TGF-β:	Fator de Crescimento Transformador Beta

1. INTRODUÇÃO

Estudos sobre a consolidação óssea ganham cada vez mais ênfase na ortopedia, principalmente no que concerne à diminuição no tempo de consolidação, fato que ainda é um desafio (Crocì et al., 2003). Relativamente à Ortopedia Veterinária, esta necessidade se torna ainda maior, visto que são comuns relatos de casos por falha da técnica operatória, seja por falta de repouso do paciente, falha do implante ou material usado inadequadamente.

A reconstituição de grandes falhas ósseas ainda é desafiadora na medicina veterinária e pode ocorrer devido à falha de implantes, instabilidade, não uniões, dentre outros, culminando, em casos mais graves, na amputação do membro acometido em algumas situações. Desta forma, faz-se necessário o emprego de alternativas que minimizem tais problemas e, nesse contexto, o uso de biomateriais ou implementação de métodos e técnicas terapêuticas que incrementam e aceleram a reparação óssea, além do restabelecimento total da função motora são fundamentais.

Desde épocas passadas, o homem tem-se preocupado em restaurar ou substituir partes danificadas do tecido ósseo humano. Em meados do século XVII, Fallopius implantou uma placa de ouro para restaurar um defeito craniano e, a partir daí, tem-se usado os implantes para a substituição de partes danificadas do sistema ósseo (Abhay e Haines, 1997).

Nesse contexto, a área de pesquisa relacionada à engenharia de biomateriais vem crescendo significativamente na busca de materiais que facilitem a regeneração óssea em fraturas ou em casos de falhas ósseas decorrentes de não uniões e neoplasias, por exemplo. Apesar do grande número de estudos relacionados a esses materiais, ainda não foi descrito um produto que seja ideal quando utilizado isoladamente (Moraes, 2006).

O sistema de biorreatores *in vivo* tem sido bastante estudado, dentro da área de engenharia de materiais, com resultados satisfatórios, pois aumenta a adesão celular e estimula, desta maneira, a formação de tecido ao redor do implante, produzindo material de melhor qualidade do que os biorreatores *in vitro*. Desta forma, o incremento de células autógenas ao implante faz com que este sistema funcione para posterior aplicação em outro local, como por exemplo, nos casos onde estão presentes grandes falhas ósseas, decorrentes

de fraturas cominutivas, complicações pós-operatórias ou ainda neoplasias ósseas.

Métodos para acelerar e estimular a ação dos biomateriais são bastante relatados na literatura; os omentos são reflexões peritoneais largas, amplamente vascularizados, com várias aplicações em diversas técnicas operatórias. De obtenção simples, é um órgão que pode colaborar com o incremento de tecido ao redor de um implante, favorecendo sua biocompatibilidade.

A utilização de osso xenógeno já é frequentemente reportada na literatura, com resultados bastante satisfatórios. Pela facilidade de obtenção e possibilidade de estoque, é um promissor material para o preenchimento de falhas ósseas. No entanto, sua associação com fatores autógenos (omento, por exemplo), poderia auxiliar acelerando todo o processo. Dessa forma, poderiam ser criados biorreatores *in vivo* para futuras aplicações, principalmente na reconstrução de grandes falhas ósseas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

É crescente o número de pesquisas sobre o uso de biomateriais na cirurgia ortopédica, traumatológica e bucomaxilofacial, particularmente dos substitutos ósseos por meio de enxertos (Gutierrez et al., 2005).

Biomaterial consiste em um material responsável por conectar sistemas biológicos, com a função de avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função que foi perdido de um organismo. Ao ser implantando, deve manter suas propriedades e características e ao mesmo tempo, substituir a função qual for destinado. Além disso, deve ter boa adesão celular, apresentar resistência mecânica, não possuir propriedades oncogênicas, ser esterilizável, tendo ao mesmo tempo, acessibilidade no custo de sua produção e implantação (Gutierrez et al., 2016).

A engenharia de tecidos, principalmente o ramo que envolve a neoformação de tecidos musculoesquelético, depende do condicionamento *in vitro* de células especializadas. Porém, tal fato depende de estímulos *in vivo*, para recriar tecido igual ao de origem, que se equivalha em composição, propriedade biomecânicos e fisiológicos (Badylak e Nerem, 2010; McCullen et al., 2011). No entanto, sistemas *in vitro* tendem a ter limitação em sua

capacidade de recriar condições verdadeiras *in vivo*, para isso a engenharia de tecidos usa um sítio ectópico de produção celular, caracterizado como biorreator (McCullen et al., 2011).

Um biorreator é um sistema que aumenta a distribuição celular, fornecendo-as meios de nutrição e estímulo para o tecido em desenvolvimento (Huang et al., 2013). Na grande maioria das vezes o sistema de biorreator *in vivo* produz tecidos neoformados substitutos melhores que os sistemas *in vitro* (McCullen et al., 2011). Biorreatores *in vivo* têm sido utilizados em diversas pesquisas para promover a colonização celular recém-implantada, aumentar e criar nova rede vascular local e para regenerar diversos tecidos, como o osso, gordura, cartilagem e músculo (Stevens et al., 2005; Uriel et al., 2008; Huang et al., 2013).

O local em que são colocados alguns implantes nos biorreatores é capaz de produzir tecido funcional, através do microambiente em que está envolto. A escolha dos sítios de implantação deve ser feita minuciosamente, uma vez que os tecidos vizinhos ao implante podem interferir na geração da vascularização funcional, no recrutamento celular, bem como no nível da resposta inflamatória (Shastri, 2009; McCullen et al., 2011).

Os enxertos ósseos são biomateriais indicados em casos de osteomielites, não união de fraturas, como meio de estimulação de consolidação, na preservação de membros e para complemento de osteotomias corretivas (Keatin e Mcqueen, 2001; Padilha Filho et al., 2008). O tecido ósseo pode ser considerado ideal para enxertos, uma vez que pode ser colocado de um local para outro ou de um indivíduo para outro, com sucesso (Eimantas, 1997).

Para ocorrer regeneração tecidual é necessária a presença de células capazes de formar novo tecido ósseo (osteogênese). Estas novas células, devem conseguir aderir, crescer e atravessar todo o material (osteocondução) e no local, devem estar presentes alguns fatores que estimulem a sua diferenciação fenotípica em osteoblastos (osteoindução) (Müller et al., 1987).

Os materiais osteogênicos têm a capacidade de formar tecido ósseo, devido à presença de osteócitos ou osteoblastos, que são capazes de produzir a matriz óssea. Os materiais osteoindutores estimulam as células do local receptor a se converterem para os tipos osteoprogenitoras, tendo a capacidade de formarem tecido ósseo. Os materiais osteocondutores não têm capacidade

para formar osso ou induzem a sua formação, eles apenas fornecem arcabouço biocompatível inerte, que o tecido ósseo local pode utilizar para se regenerar. Porém ainda não existe nenhum substituto nem enxerto ósseo, que engloba todas estas qualidades. (Keating e Mcqueen, 2001).

Biomateriais osteogênicos são aqueles que possuem células vivas que podem se diferenciar em tecido ósseo. Elas estão presentes na medula óssea, periósteo e tecidos moles peritrabeculares (Müller et al., 1987). A melhor opção para o tratamento de falhas ósseas é a utilização de enxertos autógenos (colhidos do próprio indivíduo), pois são osteogênicos, osteoindutores, osteocondutores com alta biocompatibilidade (Boden, 2000; Keating e Mcqueen, 2001) porém, sua morbidade cirúrgica e o pouco volume que podem oferecer acabam sendo inconvenientes da técnica (Banwart et al., 1995). Desta maneira, lança-se mão do uso de biomateriais que contenham propriedades osteogênicas para incrementar a reparação óssea (De Freitas et al., 2008).

Os aloenxertos (provenientes de doador da mesma espécie) são opções, porém possuem baixa osteogenicidade, aumento da imunogenicidade local e maiores chances de reabsorção (Keating e Mcqueen, 2001). São utilizados nas formas frescas, congeladas ou liofilizadas, porém na maiorias das vezes necessitam de tratamento prévio (Keating e Mcqueen, 2001). Os frescos são raramente utilizados devido à forte resposta imunitária causada, além do risco de transmissão de doenças. Os tipos congelados e liofilizados são osteocondutores, porém possuem fraca ação osteoindutora (Keating e Mcqueen, 2001; Gutierrez et al., 2005). Portanto, na maioria dos aloenxertos não existe células viáveis para conferir propriedades osteogênicas.

Outra opção são os xenoenxertos, ou seja, oriundos de espécies animais diferentes (Castro-Silva et al., 2009). Eles são predominantemente de origem bovina, porém podem ser coletados de suínos, equinos e podem ser obtidos de ossos longos, tendões, pericárdio, submucosa intestinal, entre outros (Suchkow et al., 1999; Oliveira et al., 2004; De Lima Taga et al., 2008). Dentre os implantes xenogênicos de origem bovina, os produzidos com o osso esponjoso são os mais utilizados, devido à sua arquitetura constituída de poros biologicamente planejados que favorecem a invasão celular e vascular até o centro do defeito (Zambuzzi et al., 2006).

A resposta histopatológica dos tecidos frente aos materiais implantados é aspecto fundamental para os pesquisadores, podendo ocorrer reações inflamatórias em diferentes graus, reações do tipo corpo estranho e encapsulamento fibroso ao implante (Anderson, 2001).

Após a implantação de um biomaterial, a resposta biológica inicia-se com a formação de hematoma e glicoproteínas, que adere e reveste todo o implante. Neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos são recrutados para o local por fatores quimiotáticos, levando à reação do tipo corpo estranho (Davies e Hosseini, 2000). As células de defesa, além de iniciarem ação fagocitária, estimulam a atuação de linfócitos, fibroblastos, osteoclastos e células polimorfonucleares. Após o estímulo celular, a angiogênese começa com a migração e proliferação de células endoteliais, formando uma rede de capilares, que dará suporte para a vascularização local. A diferenciação de células mesenquimatosas pluripotentes em matriz óssea e osso imaturo, acontece devido à ação de citocinas (IL-1 e IL-2) e fatores de crescimento (TGF- β), fator de crescimento transformado como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento endotelial (EGF), proteínas morfogênicas ósseas (BMP's). A maturação e remodelamento que marcam o fim do processo se assemelham à formação de calo ósseo (Anderson, 2001; Gutierrez et al., 2005). Muitas vezes, a inflamação é tida como evento negativo, porém, é um dos principais componentes da angiogênese e da formação do tecido de remodelação (Chan e Mooney, 2008).

Com o avanço da biotecnologia é crescente o uso de estímulos biológicos para aproveitar o potencial regenerativo intrínseco a cada tecido endógeno, com músculo, gordura e medula óssea (Miao et al., 2017). O músculo esquelético tem grande habilidade de formar osso. Característica vista principalmente em afecções como a ossificação heterotópica, miosite ossificante e nos distúrbios genéticos mais graves, como a Fibrodissplasia Ossificante Progressiva, nas quais as células musculares se transformam em osteófitos espontaneamente, além das neoplasias musculoesqueléticas (Bosch et al., 2000; Shore e Kaplan, 2008). Sabe-se que o músculo contém células progenitoras que podem ser recrutadas para função osteogênica e os fragmentos musculares oferecem suporte para preenchimento no espaço implantado (Bosch et al., 2000; Miao et al., 2017).

A formação de osso a partir de tecidos diferentes do de origem depende da presença de das BMP's (presentes na matriz óssea) que são secretas a partir de fatores inflamatórios, porém para se obter melhores resultados, elas são implantadas juntamente com enxerto em questão (Urist et al., 1965; Urist et al., 1983; O'Connor, 1998).

O uso do omento em técnicas cirúrgicas vem sendo relatado desde as guerras do tempo de Napoleão I, quando De Lamballe (1829) registrou que o uso do órgão para proteção contra infecções, devido à adesão que ele fazia no intestino recém-operado, minimizava ocorrência de peritonite (Liebermann-Meffert et al., 1983). Desde então seu uso vem sendo cada vez mais estudado (Liebermann-Meffert, 2000).

O omento vem sendo utilizado para promover neovascularização e reparação de tecidos isquêmicos devido à sua propriedade angiogênica (Silverman, 1988; Zhang et al., 1997). Por ser flexível e facilmente moldável, o omento oferece grande superfície de contato com vascularização adequada. Devido à sua vascularização intrínseca, é capaz de aumentar o fluxo sanguíneo na região em que foi ancorado. Tal fluxo permite o aumento do suporte de oxigênio, além de fatores humorais, como neutrófilos, macrófagos, fibroblastos e células endoteliais, que ajudam na prevenção e combate de infecções, bem como acelera a reparação tecidual (O'Shaughnessy, 2007; Ferrigno et al., 2010).

Huyghe et al. (2016), caracterizaram a estrutura microscópica do omento do cão, que é composto predominantemente por células adiposas, além de possuir células mesoteliais, fibras de colágeno, células de defesa como macrófagos, neutrófilos e linfócitos B. Observaram ainda que sua estrutura é toda fenestrada, característica importante para garantir a função de gerar aderência no tecido lesionado ou infeccionado, propiciando proteção ao local.

Estudos *in vivo* em odontologia demonstraram que as células periosteais podem levar à formação óssea em defeitos extensos, bem como a formação óssea ectópica (Kanou et al., 2005; Cicconetti et al., 2007).

O periósteo fica intimamente ligado às superfícies das corticais dos ossos à matriz óssea, pelas fibras de Sharpey, que são estruturas feitas de colágeno. Possui três camadas principais, sendo a mais externa composta de fibroblastos, tendo a finalidade de proteção da superfície. É dessa camada que as fibras de colágeno se originam para se inserirem na cortical. A camada central é rica em

vasos que se direcionam para a superfície óssea. Por fim, a camada mais interna, possui osteoblastos, pré-osteoblastos, células osteoprogenitoras, células-tronco teciduais e osteoclastos, entre outras (Squier et al., 1990).

Quando o periósteo é lesionado, acaba sendo estimulado a realizar sua função osteogênica, em sua camada mais interna. Todas as células que são osteoprogenitoras e os pré-osteoblastos se diferenciam em osteoblastos, ativando a neoformação óssea. Tal neoformação se organiza em camadas subperiosteais (Consolaro, 2014).

Com o presente estudo objetivou-se avaliar a capacidade angiogênica e osteoindutora de fragmentos ósseos xenógenos implantados em diferentes sítios intracorpóreos de coelhos. Tais sítios atuariam como biorreatores *in vivo*, proporcionando, de forma autógena, em estudos futuros, a possibilidade de serem utilizados para revitalização óssea de enxertos xenógenos para serem utilizados a posteriori em grandes defeitos ósseos críticos do mesmo paciente.

Caso ocorra a comprovação que o uso de material ósseo xenógeno autoclavado, implantando no próprio paciente (que possui a falha óssea), utilizando-o como um biorreator (*in vivo*), foi capaz de se tornar vascularizado, podemos dizer que fisiologicamente ele é capaz de fazer osteoindução e osteocondução equivalente ao material ósseo autógeno. Desta maneira, maximizará a probabilidade que seu posterior uso no local da falha óssea promova chances maiores de consolidação da fratura.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Câmpus de Jaboticabal, com protocolo número 7903/16 e segue conforme predito pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.2 Animais e Grupos Experimentais

Foram utilizados 30 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) adultos jovens, 15 fêmeas e 15 machos, da raça Nova Zelândia Branco com peso corpóreo

aproximado de 3 kg. Os animais, provenientes do Biotério Central da UNESP/Botucatu, foram mantidos no setor de Cunicultura da UNESP/Jaboticabal, acondicionados em gaiolas isoladas, com ração, água e gramíneas à vontade.

Os 30 animais foram distribuídos em cinco grupos contendo seis coelhos cada (três machos e três fêmeas), de acordo com o tempo de avaliação pós-operatória (sete, 15, 30, 45 e 60 dias) e o sítio de implante do xenoenxerto.

3.3 Implantes Ósseos Esponjosos Bovinos

Os implantes foram obtidos de escápula bovina de animais abatidos em frigorífico. Toda musculatura foi retirada da escápula, ato contínuo foi limpa com jato de água morna pressurizada e manualmente foram removidos todos os tecidos moles aderidos ao periósteo.

As áreas de maior abundância de osso esponjoso foram delimitadas e cortes retangulares seguidos de cortes em cubos, foram feitos (Figura 1). Como padronização, todos os animais do estudo foram submetidos à implantação de dois fragmentos ósseos esponjosos de bovino (xenógeno), denominados “implantes”, com dimensões aproximadas de 0,5 x 0,5 x 0,5 cm, autoclavados¹ em baixo ciclo (121°C por 15 min esterilização e 15 min de secagem).

¹ Autoclave Phoenix Luferco - Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Ltda. Araraquara-SP



Figura 1. Imagem fotográfica dos implantes a partir de ossos de escápula bovina. Após todo preparo, os implantes foram autoclavados. Serviço de Ortopedia e Neurocirurgia e Serviço de Cirurgia Geral - UNESP Câmpus de Jaboticabal.

Cada animal recebeu dois implantes em três locais, denominados de subgrupos (Figura 2):

A1: implante recoberto por omento intra-abdominal em uma “bolsa” confeccionada cirurgicamente com o referido órgão.

A2: espaço intermuscular da coxa, especificamente entre os músculos do quadríceps, sob a fáscia lata, feito por acesso entre tais músculos.

A3: região subperiosteal do osso íliaco direito.

3.4 Procedimento Cirúrgico

Os animais foram preparados um dia antes do procedimento, com tricotomia ampla dos locais dos acessos cirúrgicos (Figura 2). Não foi necessário jejum prévio devido ao alto metabolismo da espécie em tela, além de não fazerem êmese (Flecknell, 1996).

Foram submetidos à anestesia geral seguindo o protocolo do Setor de Anestesiologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP Câmpus de Jaboticabal com uso de acepromazina² 0,2% (0,05 mg/kg IM) como

² Aceproven 0,2%® Venco, Saude Animal, Londrina – PR.

medicação pré-anestésica, cetamina³ (70 mg/kg IM), e xilazina⁴ (9 mg/kg IM) como anestesia e controle analgésico no transoperatório. Os coelhos tiveram a veia auricular esquerda canulada com cateter 22G⁵ para que recebessem fluidoterapia no transoperatório, além de possuírem via de acesso viável em caso de emergência (Figura 2A). Todas as medicações foram administradas no membro pélvico esquerdo, uma vez que o direito fora um dos sítios de implante. Previamente ao ato operatório, foi realizada rigorosa antissepsia com clorexidine⁶ a 2%, seguida de álcool⁷ 70%.

No pós-operatório imediato realizou-se terapia antimicrobiana com enrofloxacin⁸ 2,5% na dose de 10 mg/kg (medicação diluída antes da aplicação), por via subcutânea e analgesia com cloridrato de tramadol⁹ na dose de 4 mg/kg pela mesma via. As medicações foram mantidas no pós-operatório, sendo que a enrofloxacin era aplicada a cada 12 horas durante 10 dias e o cloridrato de tramadol aplicado a cada 12 horas durante cinco dias.

O curativo das feridas cirúrgicas foram realizados diariamente com solução de NaCl¹⁰ a 0,9% e rifamicina spray¹¹ até a remoção da síntese cutânea que ocorreu aos 10 dias de pós operatório.

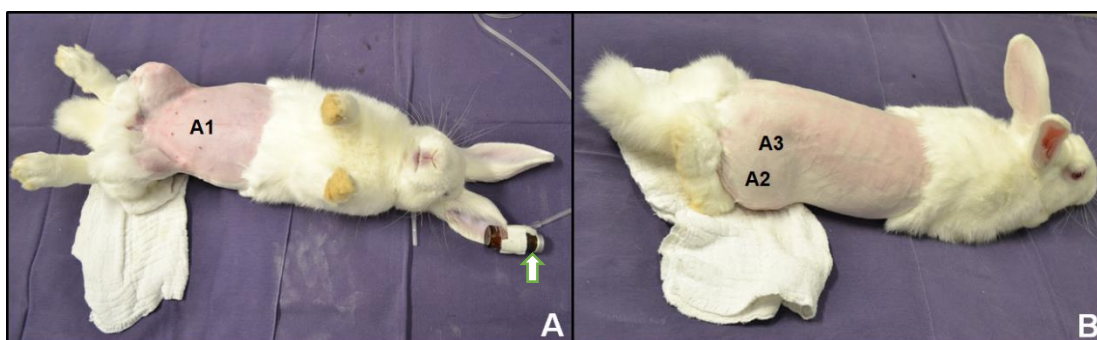


Figura 2. Imagens fotográficas dos coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) após tricotomia ampla de toda área cirúrgica. Em A observa-se o sítio A1 e o acesso venoso na orelha (seta). Em B visibilizam-se os sítios A2 e A3. Serviço de Ortopedia e Neurocirurgia e Serviço de Cirurgia Geral - UNESP Câmpus de Jaboticabal.

³ Dopalen® Ceva, Saúde Animal Ltda, Paulínia – SP

⁴ Xilazin 2%®, Syntec, Santana do Parnaíba – SP

⁵ BD Autoguard®, Juíz de Fora – MG

⁶ Riohex® Rioquímica, São José do Rio Preto – SP

⁷ Rialcool 70® Rioquímica, São José do Rio Preto – SP

⁸ Chemitril 2,5%® Chemitec Agro-Veterinária, São Paulo – SP

⁹ Medicação Genérica, laboratório União Química – Farmacêutica Nacional S/A, São Paulo - SP

¹⁰ JP Industria Farmacêutica S/A, Ribeirão Preto - SP

¹¹ Rifotrat® - Natulab Laboratório S/A, São Paulo - SP

A seguir são descritos os procedimentos cirúrgicos para cada subgrupo.

A1: foi realizado acesso abdominal por celiotomia na região pré-umbilical e, após localização do omento, confeccionou-se com este órgão uma “bolsa”, onde os implantes foram depositados e, em seguida, a bolsa foi fechada por meio de sutura com fio inabsorvível nylon 4-0¹². Desta forma, o implante ficou totalmente envolto pelo omento, com a mínima movimentação possível dentro deste (Figura 3). Ato contínuo o abdome foi suturado utilizando fio nylon 4-0 com padrão de Sultan, a aproximação do tecido subcutâneo em padrão zigzague e a dermorrafia em padrão Wolf interrompido com nylon 4-0.

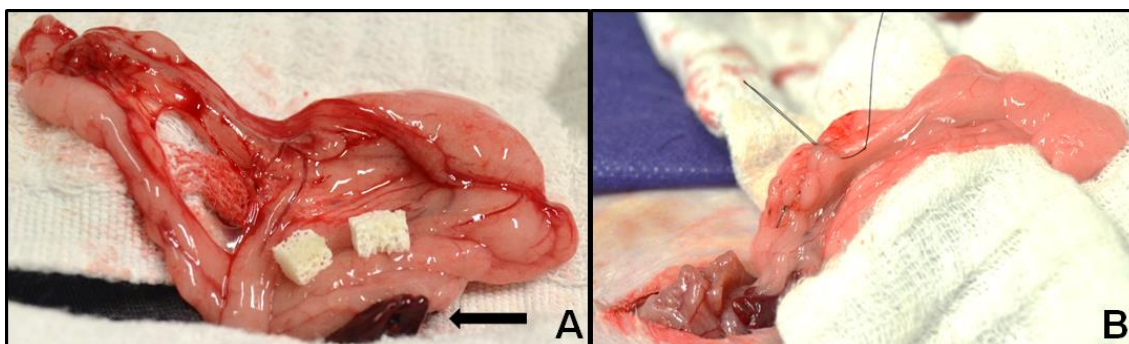


Figura 3. Imagens fotográficas de implantação de osso xenógeno (implante) em bolsa confeccionada com omento. A: O omento dos coelhos é intimamente ligado ao baço (seta preta), desta maneira os implantes foram alojados de tal maneira que fosse deixado espaço para que a bolsa fosse confeccionada sem prejudicar a vascularização esplênica. B: A bolsa de omento realizada dobrando partes das bordas do órgão em cima dos implantes. Serviço de Ortopedia e Neurocirurgia e Serviço de Cirurgia Geral - UNESP Câmpus de Jaboticabal.

A2: o membro pélvico direito foi incisado para acesso cirúrgico à diáfise femoral (Piermattei e Johnson, 2004). Após abertura da fáscia lata, os fragmentos ósseos (implantes) foram inseridos entre os músculos bíceps e vasto femorais (Figura 4). A fáscia lata foi suturada com padrão simples contínuo com nylon 4-0. O tecido subcutâneo e pele da mesma maneira que o grupo anterior.

¹² Sutura de Mononylon ETHILON® - Johnson & Johnson Ltda., São Paulo – SP

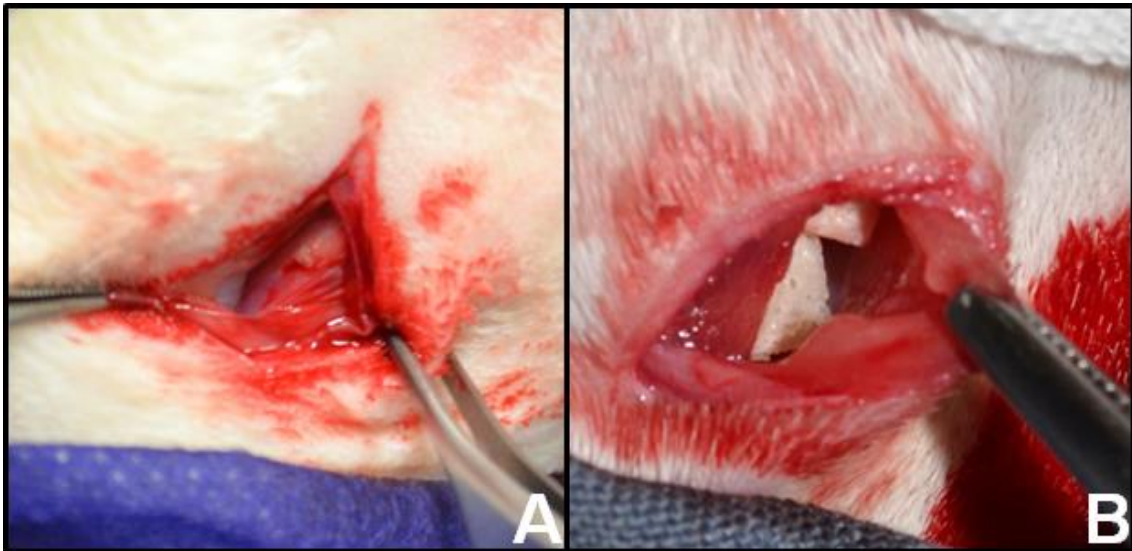


Figura 4. Imagens fotográficas de implantação de osso xenógeno (implantes) no espaço intermuscular. A: Após incisão de pele, observam-se os músculos bíceps e vasto femorais separados. B: Implantes alojados no espaço intermuscular. Serviço de Ortopedia e Neurocirurgia e Serviço de Cirurgia Geral - UNESP Câmpus de Jaboticabal.

A3: A crista ilíaca direita fora abordada por acesso descrito por Piermattei e Johnson (2004). Utilizando-se instrumento delicado, o periósteo da face lateral do osso ilíaco direito foi elevado, porém permaneceu aderido à musculatura adjacente e ao osso ilíaco ventrolateralmente. Os implantes foram alojados entre o osso ilíaco e o periósteo (Figura 5). Suturas em padrão simples separado com nylon 4-0 foram confeccionadas aproximando as bordas dorsais da musculatura e periósteo, promovendo aumento do contato entre o fragmento e os dois tecidos (periósteo e osso), e em seguida, sutura da pele com o mesmo tipo de fio.

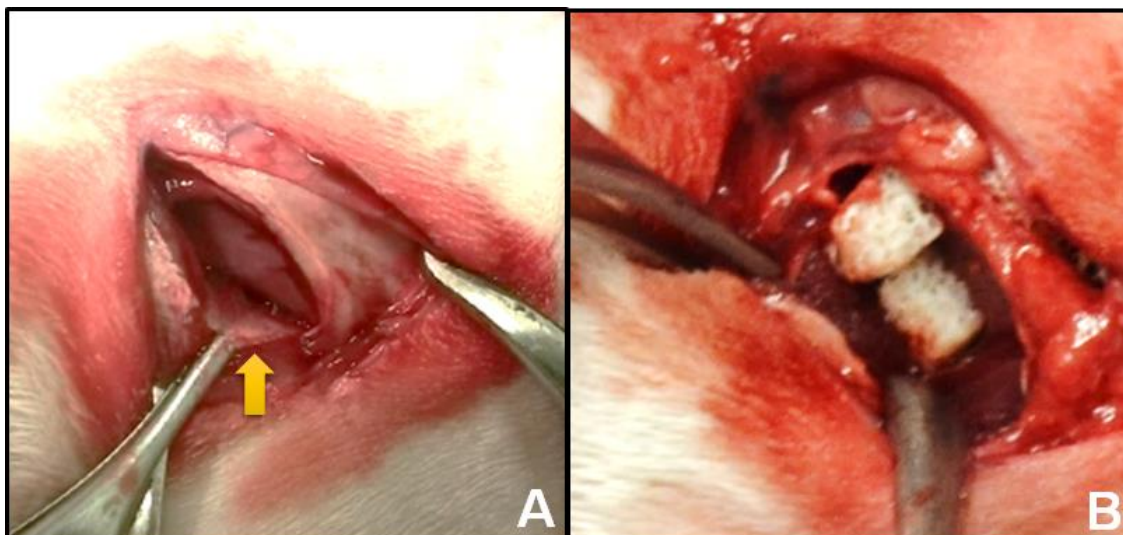


Figura 5. Imagens fotográficas de implantação de osso xenógeno subperiosteal (implantes) A: Após incisão da fáscia muscular, o periósteo (seta amarela) do osso ilíaco direito foi separado com auxílio de descolador de Freer. B: Implantes alocados entre o periósteo o osso. Serviço de Ortopedia e Neurocirurgia e Serviço de Cirurgia Geral - UNESP Câmpus de Jaboticabal.

3.5 Avaliação Pós-Operatória

Os animais foram observados diariamente até o momento da eutanásia verificando-se as condições clínicas, e das feridas cirúrgicas. Não houve nenhum óbito no período pós-operatório.

Ao final de cada período, os animais foram submetidos à eutanásia com propofol¹³ intravenoso na dose 10 mg/kg e cloreto de potássio¹⁴ a 10% na dose de 1 mL por kg de peso vivo. Ato contínuo, as amostras foram coletadas de maneira asséptica, evitando contaminação.

3.6 Avaliação Macroscópica

As amostras, foram analisadas com relação ao seu aspecto macroscópico. A ocorrência de deiscência de sutura, formação de seroma ao redor do sítio de implantação, presença de cápsula ao redor, hematomas e sua coloração, aderência do tecido subcutâneo e órgãos cavitários ao local de implante, foram analisadas e graduadas em: ausente, discreto, moderado e intenso.

¹³ Provive® 1% - Laboratório Claris, Barueri - SP

¹⁴ Equiplex® Aparecida de Goiânia - GO

3.7 Avaliação Histopatológica

Imediato à coleta, as amostras foram acondicionadas para fixação em formol 10% tamponado¹⁵ por período de 48 horas. Após a fixação, as peças foram descalcificadas em solução de ácido nítrico P.A.¹⁶ a 10% durante sete dias. Após descalcificação as amostras foram lavadas em água corrente *overnight*. Posteriormente, foram desidratadas em álcool 70%⁷, 80%⁷ e absoluto¹⁷ P.A. I, II e III, 60 minutos em cada.

A seguir, foram diafanizadas em xilol absoluto P.A. I, II e III, por 50 minutos cada. E finalmente impregnadas e incluídas em parafina histológica I e II, 60 minutos cada. Ato contínuo foram emblocadas e cortes histológicos foram realizados em micrótomo semiautomático com quatro micrômetros de espessura¹⁸.

Os cortes foram colhidos em lâminas histológicas e corados pela técnica de Hematoxilina & Eosina, logo após os cortes foram cobertos com resina histológica e lamínula de vidro.

As colorações foram feitas de acordo como os protocolos estabelecidos no Laboratório de Pesquisa do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ – UNESP – Campus de Botucatu – SP. Todas foram avaliadas pelos patologistas veterinários Prof. Dr. Alexandre Hataka (UNESP – Botucatu) e Profa. Dra. Pâmela Rodrigues Reina Moreira (UNIRP – São José do Rio Preto/SP).

O grau de inflamação foi determinado a partir da contagem de células inflamatórias (linfócitos, macrófagos, granulócitos e plasmócitos) presentes na área de análise, seguindo, após adaptação dos critérios de Noetzel et al. (2006) e Panzarini et al. (2007) (Tabela 1).

¹⁵ QuimiSul – Produtos Químicos e laboratório, Joinville - SC

¹⁶ Dinâmica® Produtos Químicos, Diadema, SP

¹⁷ Rioalcohol Absoluto 99,3%® Rioquímica, São José do Rio Preto – SP.

¹⁸ LEICA® RM 2155. Leica Biosystems Inc. Buffalo Grove - IL, USA.

Tabela 1: Escores quanto à resposta celular inflamatória.

Resposta Celular Inflamatória	Caracterização
Escore 0	Ausência de células inflamatórias no local de análise.
Escore 1	Inflamação discreta - menos de 25 células inflamatórias presentes na área de análise.
Escore 2	Inflamação moderada - entre 25-50 células inflamatórias presentes na área de análise.
Escore 3	Inflamação severa - entre 51-75 células inflamatórias presentes na área de análise.

A formação de novo tecido ósseo junto ao implante foi categorizado seguindo, após adaptação, os critérios de Moretton et al. (2000) (Tabela 2).

Tabela 2: Escores quanto a formação de novo tecido ósseo.

Tecido Ósseo Neoformado	Caracterização
Escore 0	Ausência de formação de novo tecido ósseo.
Escore 1	Discreto - Presença de pequenas trabéculas ósseas, cobrindo menos de 25% da área do implante.
Escore 2	Moderado - Novo tecido ósseo formado, cobrindo pelo menos 50% da área do implante.
Escore 3	Extenso - Cobertura completa da área do implante, com a formação de uma ponte óssea em torno do material testado.

A reação à presença de corpo estranho (células gigantes inflamatórias próximas aos implantes) também foi caracterizada, seguindo, após adaptação, os critérios de Saghiri et al. (2015) (Tabela 3).

Tabela 3: Escores quanto à presença de células gigantes inflamatórias (reação de corpo estranho) (Tabela 4).

Células Gigantes Inflamatórias	Caracterização
Escore 0	Ausência de células gigantes inflamatórias.
Escore 1	Presença de células gigantes inflamatórias próxima ao implante.

A presença de neovasos foi avaliado tanto peri quanto intra-implante, após adaptação aos critérios de Saghiri et al. (2015), Tabela 4.

Tabela 4: Escores quanto à presença de neovascularização.

Células Gigantes Inflamatórias	Caracterização
Escore 0	Ausência de neovascularização
Escore 1	Presença de neovascularização

3.9 Análise estatística

Os dados referentes das avaliações histológicas (Escore) foram submetidos à análise descritiva de dados em planilha eletrônica (Microsoft Office Excel®) e posteriormente foram confrontados pelo teste de Friedman e pós-teste de Dunns utilizando o software R (RTM *Foundation for Statistical Computing*, Áustria).

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação Macroscópica

Foi observada presença de seroma (Figura 6) em dois coelhos nos primeiros dias de pós-operatório que, após drenagem asséptica, apresentaram resolução completa.



Figura 6. Presença de seroma (seta verde) no terceiro dia de pós-operatório, no sítio de implantação A3 (subperiosteal). Serviço de Ortopedia e Neurocirurgia e Serviço de Cirurgia Geral - UNESP Câmpus de Jaboticabal.

A presença de hematoma (Figuras 7 e 8) foi observada em graduação moderada/discreta nos tempos de eutanásia de sete e 15 dias, em todos os coelhos nos sítios A2 e A3.

Em A3 notou-se hematoma discreto aos 30 e 45 dias de análise em todos os animais, sendo que aos 60 dias não era mais observado.

Os demais parâmetros não foram observados em nenhum dos coelhos. As Figuras 7, 8 e 9 ilustram os achados macroscópicos mais relevantes.

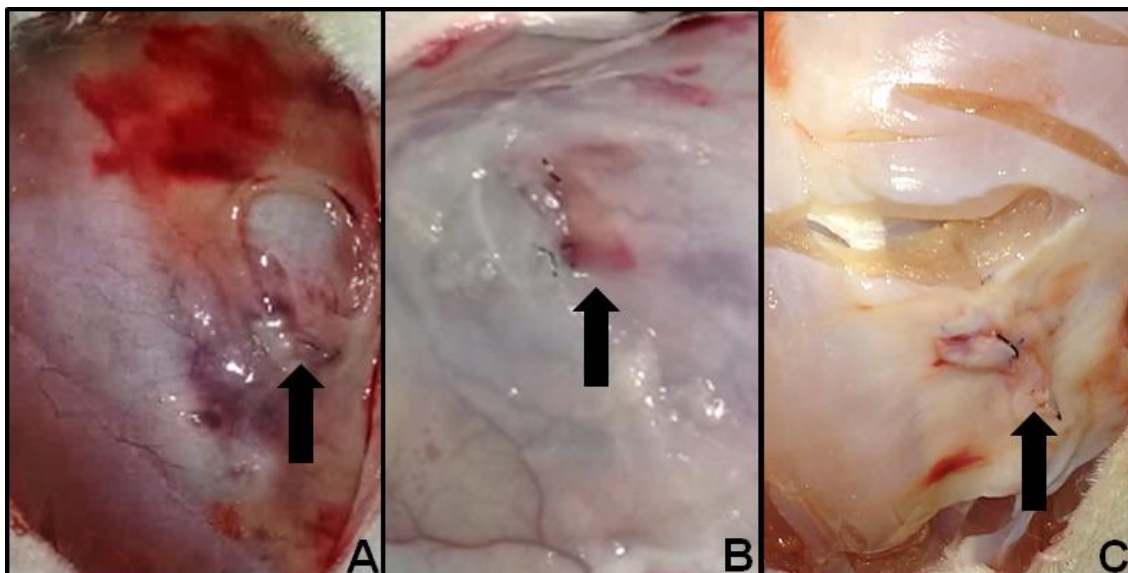


Figura 7. Avaliação macroscópica no subgrupo A2 (intermuscular); as setas pretas evidenciam o local onde os implantes foram colocados, localizados por meio da sutura da fáscia muscular. A: Hematoma moderado aos 7 dias de pós-operatório. B: Hematoma discreto aos 15 dias pós-operatórios. C: Hematoma ausente aos 30 dias de pós-operatório. Serviço de Ortopedia e Neurocirurgia e Serviço de Cirurgia Geral - UNESP Câmpus de Jaboticabal.

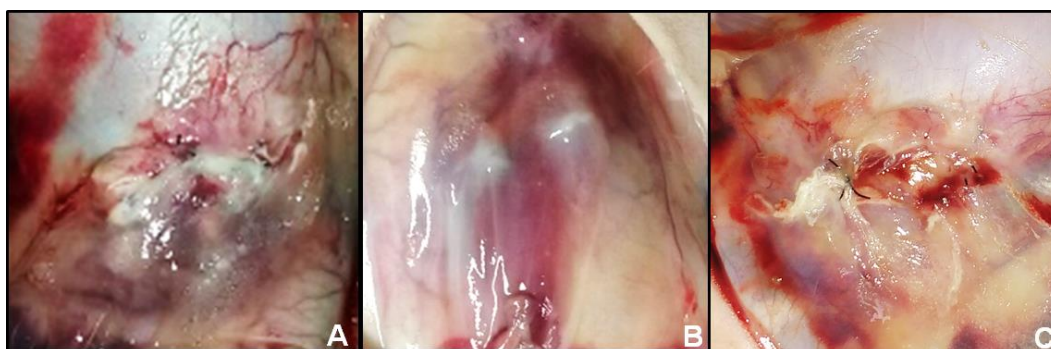


Figura 8. Avaliação macroscópica no subgrupo A3 (subperiosteal), evidenciando formação de hematoma moderado (A) nas amostras coletadas aos sete dias e hematoma discretos nos tempos 15 (B) e 30 dias (C) pós-operatórios. Serviço de Ortopedia e Neurocirurgia e Serviço de Cirurgia Geral - UNESP Câmpus de Jaboticabal.

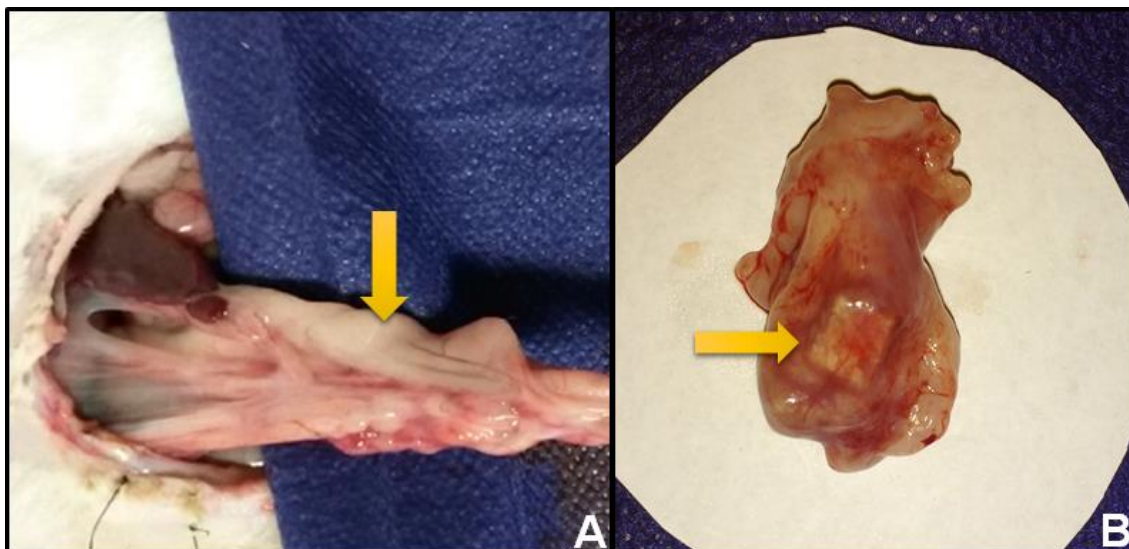


Figura 9. Avaliação macroscópica aos 15 dias de pós-operatório no subgrupo A1 (bolsa omental). A seta amarela sinaliza o local onde o implante está alojado dentro da bolsa de omento, da amostra coletada aos 15 dias. A: não houve aderência de nenhum outro órgão na bolsa ou sinais de hemorragia, necrose ou infecção. B: o implante pode ser visto através do órgão, evidenciando a delicadeza dos vasos sanguíneos ao redor de todo xenoenxerto (seta). Serviço de Ortopedia e Neurocirurgia e Serviço de Cirurgia Geral - UNESP Câmpus de Jaboticabal.

Importante ressaltar que as amostras não puderam ser manipuladas excessivamente, pois tal ação poderia intervir nas análises histopatológicas. Com a manipulação, os novos vasos poderiam ser danificados, alterando o resultado final. Desta maneira, todas as amostras foram colhidas “em bloco” e acondicionadas em frascos de formol 10%.

4.2 Avaliação Histopatológica

De maneira geral foram visibilizadas as mesmas estruturas desde o primeiro tempo de avaliação (sete dias de pós-operatório) até o último 60 dias de pós-operatório, porém com intensidades diferentes ao longo dos tempos.

4.2.1 A1 – Bolsa de Omento

Aos sete dias, houve presença de cápsula de tecido fibroso imaturo, composta por várias camadas de fibroblastos ativos e fibras colágenas imaturas ao redor de todo o implante ósseo (Figura 10). A cápsula ficou mais espessa a

partir dos 15 dias. Observou-se intensa neovascularização, que foi diminuindo a partir dos 30 dias (Figura 11A).

Pode-se notar tanto na cápsula, quanto no tecido conjuntivo dentro do implante, a presença de infiltrado inflamatório crônico ativo composto por eosinófilos, linfócitos, plasmócitos, monócitos, macrófagos e células gigantes (Figura 11B). O infiltrado inflamatório estava presente em todos os tempos de análise e com o passar do tempo tornou-se predominantemente linfocitário.

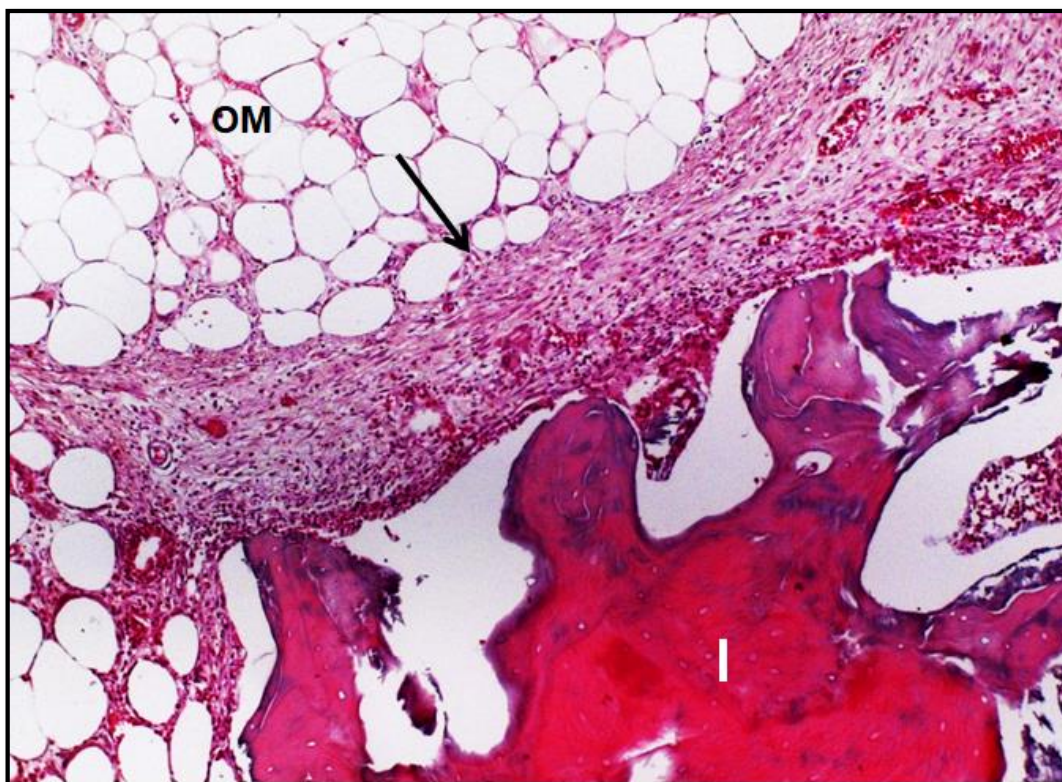


Figura 10. Fotomicrografia do implante em local A1 (bolsa omental) no tempo sete dias. Nota-se presença do implante (I) rodeado com cápsula de tecido conjuntivo (seta) permeado de células inflamatórias e neovasos, tendo sua origem da bolsa de omento (OM). Coloração Hematoxilina & Eosina, objetiva de 10x. Serviço de Ortopedia e Neurocirurgia e Serviço de Cirurgia Geral - UNESP Câmpus de Jaboticabal.

No interior das trabéculas ósseas do implante, também havia o tecido conjuntivo fibroso, áreas hemorrágicas e rede de fibrina, com neovascularização evidente, que foi diminuindo a partir dos 30 dias. A matriz óssea do implante foi encontrada em processo de degeneração e fragmentação ao longo das análises.

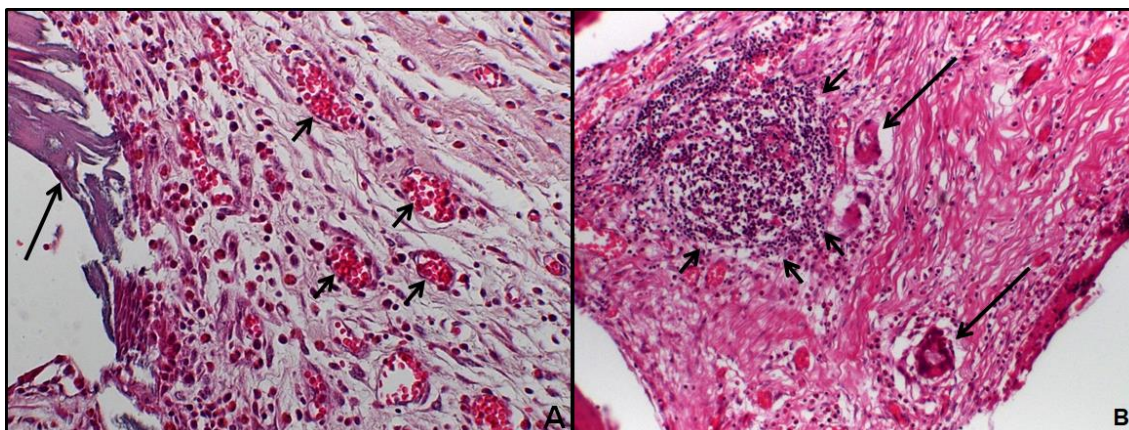


Figura 11. Fotomicrografia do implante em local A1 (bolsa omental) nos tempos sete (A) e 30 dias (B). A: Implante ósseo (seta longa) circundado de tecido conjuntivo repleto de células inflamatórias e neovascularização (setas curtas); Coloração Hematoxilina & Eosina, objetiva de 10x. B: Presença de reação inflamatória linfocitária (setas curtas) e as células gigantes do tipo corpo estranho (setas longas) ao redor da matriz óssea em processo de degeneração; Coloração Hematoxilina & Eosina, objetiva de 20x. Serviço de Ortopedia e Neurocirurgia e Serviço de Cirurgia Geral - UNESP Câmpus de Jaboticabal.

4.2.2. A2 – Grupo Intermuscular

Pode-se notar presença de cápsula de tecido conjuntivo ao redor do implante desde o primeiro tempo de análise (sete dias) que foi ficando mais densa ao passar do tempo. Sua neovascularização era evidente aos primeiros tempos de análise (Figura 12A), sendo vista ainda em menor quantidade no último (60 dias).

Dentro do implante pode ser visto tecido conjuntivo, com a presença de infiltrado de células inflamatórias compostas por eosinófilos, linfócitos, plasmócitos, monócitos, macrófagos e células gigantes (Figura 12B). Todos esses tipos celulares foram vistos até os 60 dias, porém em menor intensidade. Além disso, com o passar do tempo, o tecido conjuntivo dentro do implante mostrou-se menos denso.

A neovascularização intra implante só ficou evidente a partir dos 15 dias e perdurou ao longo de todas as análises. A matriz óssea do implante estava

presente, porém mostrou-se em processo de degeneração ao passar do tempo de análises, não mostrando sinais de osteogênese.

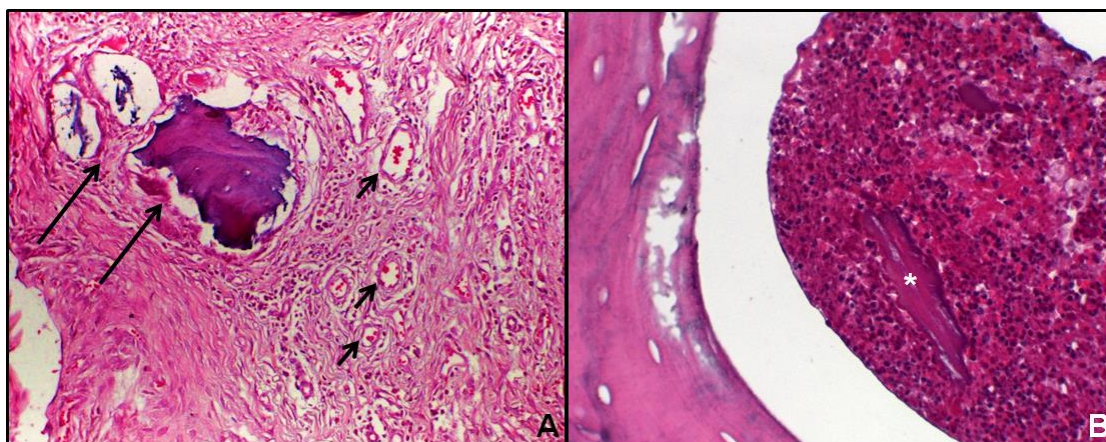


Figura 12. Fotomicrografia do implante em local A2 (intermuscular) nos tempos 15 (A) e 30 dias (B). A: Presença de neovascularização (setas curtas) e a matriz óssea do implante em processo de degeneração (setas longas); Coloração Hematoxilina & Eosina, objetiva de 20x. B: Presença de infiltrado inflamatório neutrofílico próximo ao do implante ósseo (*) aos 30 dias; Coloração Hematoxilina & Eosina, objetiva de 40x. Serviço de Ortopedia e Neurocirurgia e Serviço de Cirurgia Geral - UNESP Câmpus de Jaboticabal.

4.2.3. A3 – Grupo Subperiosteal

Aos sete dias havia exuberante proliferação de células mesenquimais imaturas, fibroblastos e neovascularização, principalmente ao redor do implante ósseo. A partir dos 15 dias pode-se notar organização em cápsula de tecido conjuntivo com intensa neovascularização, com depósito de colágeno entre o periósteo e implante. Aos 45 dias, ficou evidente que o mesmo tecido conjuntivo que permeava o implante a partir do periósteo, estava presente dentro dele (Figura 13B).

Dentro do implante, notou-se a partir dos 15 dias, tecido conjuntivo imaturo composto por fibroblastos, pequena quantidade de fibras colágenas e infiltrado inflamatório crônico ativo (neutrófilos, linfócitos, plasmócitos, monócitos, macrófagos e células gigantes) (Figura 13A). Com o passar dos tempos das análises, esse tecido conjuntivo tornou-se mais organizado, porém menos vascularizado.

A neovascularização intra implante só ficou evidente a partir dos 15 dias. A matriz óssea do implante estava presente, porém mostrou-se em processo de degeneração ao passar do tempo de análises.

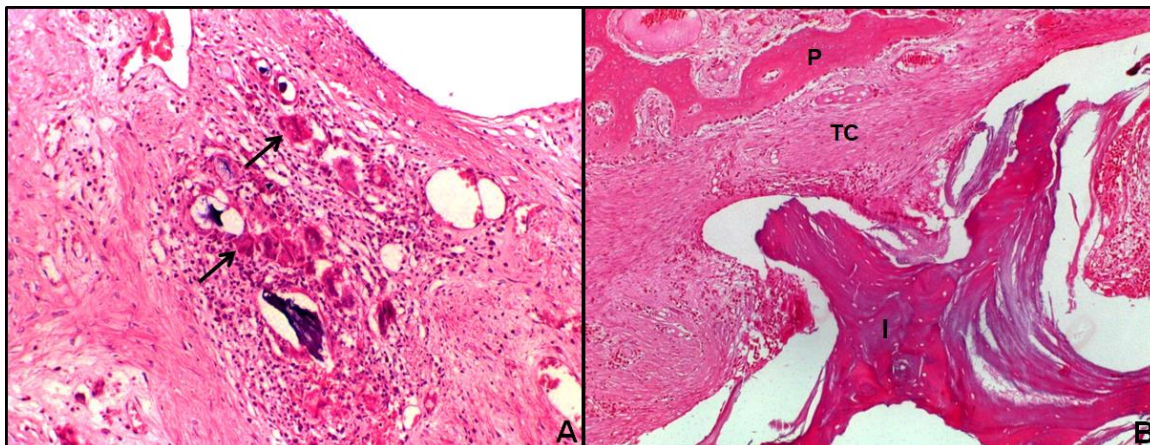


Figura 13. Fotomicrografia do implante em local A3 (subperiosteal) nos tempos 30 (A) e 45 dias (B). A: Presença de células gigantes do tipo corpo estranho ao redor da matriz óssea (seta); Coloração Hematoxilina & Eosina, objetiva de 20x. B: Proliferação de tecido conjuntivo (TC) entre o periósteo (P) e o implante (I); Coloração Hematoxilina & Eosina, objetiva de 10x. Serviço de Ortopedia e Neurocirurgia e Serviço de Cirurgia Geral - UNESP Câmpus de Jaboticabal.

4.3 Resultados Estatísticos

Com base na avaliação histopatológica quantitativa, fora feita a média dos escores de cada análise que estão apresentados na Figura 14. Foi realizada com auxílio do software R (RTM *Foundation for Statistical Computing*, Áustria). Os dados foram comparados entre o Local, os dias após a lesão e a interação destes fatores pelo teste de Friedman e pós-teste de Dunns, apresentando seus resultados como a mediana $\pm$ IQR (faixa interquartil). A significância (p-valor) foi fixada para todos os testes em 5% ($p < 0,05$).

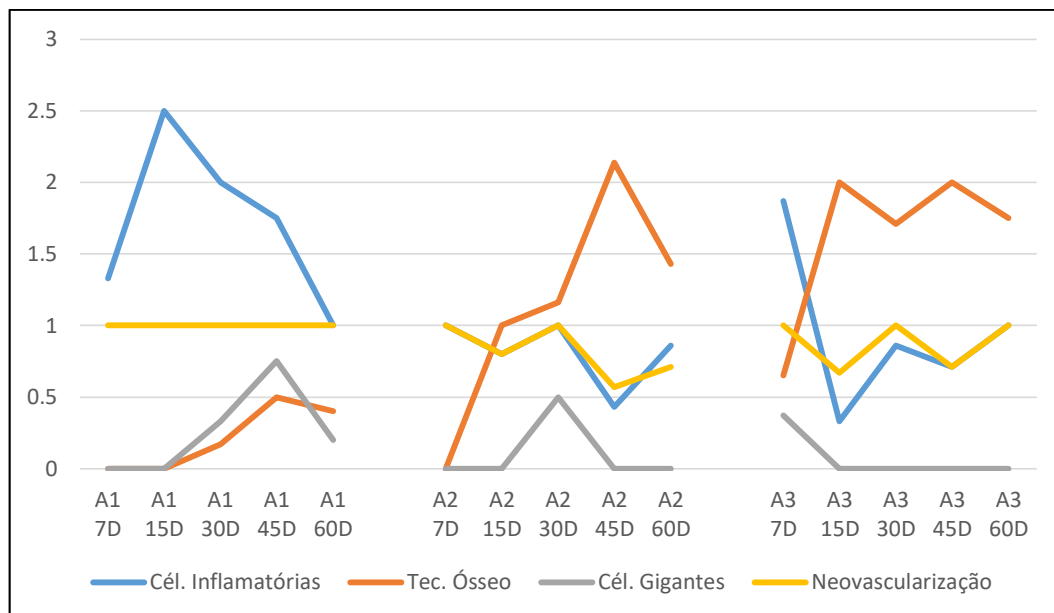


Figura 14. Média dos escores do tempo de análise em cada local de implante do enxerto. A1: bolsa de omento intra-abdominal; A2: espaço intermuscular do quadríceps femoral; A3: subperiosteal. Serviço de Ortopedia e Neurocirurgia e Serviço de Cirurgia Geral - UNESP Câmpus de Jaboticabal.

A contagem de células inflamatórias foi maior no grupo A3 no sétimo dia e no grupo A1 no 15º, 30º e 45º dia do que nos demais grupos ($p=0,0149$) e equiparou-se no 60º dia (Figura 15 e Tabela 5).

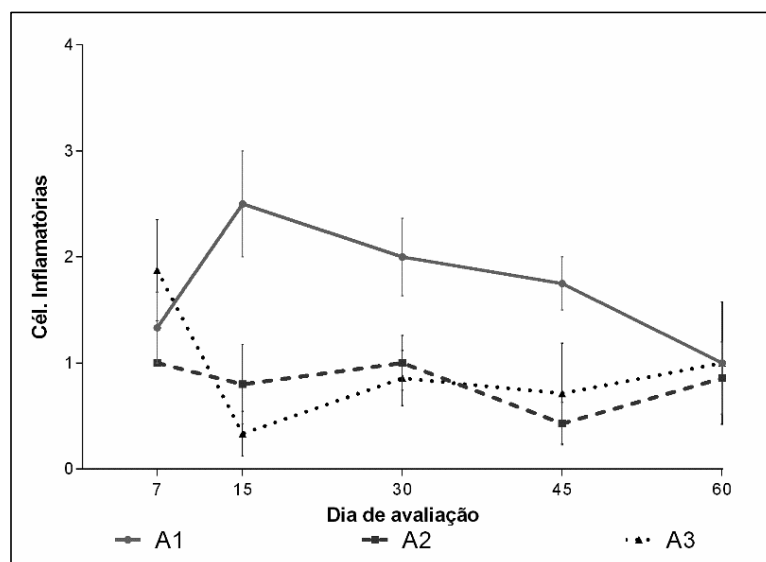


Figura 15. Mediana dos scores de células inflamatórias em todos os tempos de análise em todos os grupos. Serviço de Ortopedia e Neurocirurgia e Serviço de Cirurgia Geral - UNESP Câmpus de Jaboticabal.

Tabela 5: p-valor para cada análise comparativa de cada tempo de análise de células inflamatórias entre as medianas dos scores.

Local	A1					p-valor		
Dia	7	15	30	45	60	Local	Dia	LXD
Mediana	1 ^{abcd}	2 ^a	2 ^{ab}	2 ^{abc}	1 ^{bcd}	0,0431	0,5271	0,0149
IQR	0,5	0,5	1,5	0,25	0,0			
Local	A2							
Dia	7	15	30	45	60			
Mediana	1 ^{bcd}	1 ^{cd}	1 ^{bcd}	0 ^d	1 ^{cd}			
IQR	0,0	1,0	0,0	1	1,5			
Local	A3							
Dia	7	15	30	45	60			
Mediana	2,5 ^{abc}	0 ^d	1 ^{cd}	0 ^d	1 ^{bcd}			
IQR	2,25	0,75	0,5	1	2			

A1: bolsa de omento; A2: espaço intermuscular; A3: espaço subperiosteal; IQR: faixa interquartil; LXD: local x dia.

A formação do tecido ósseo foi maior no grupo A3 no 15° e 60° quando comparado ao local A2 e menor do 15° ao 60° dia no grupo A1 ($p < 0,0001$) (Figura 16 e Tabela 6).

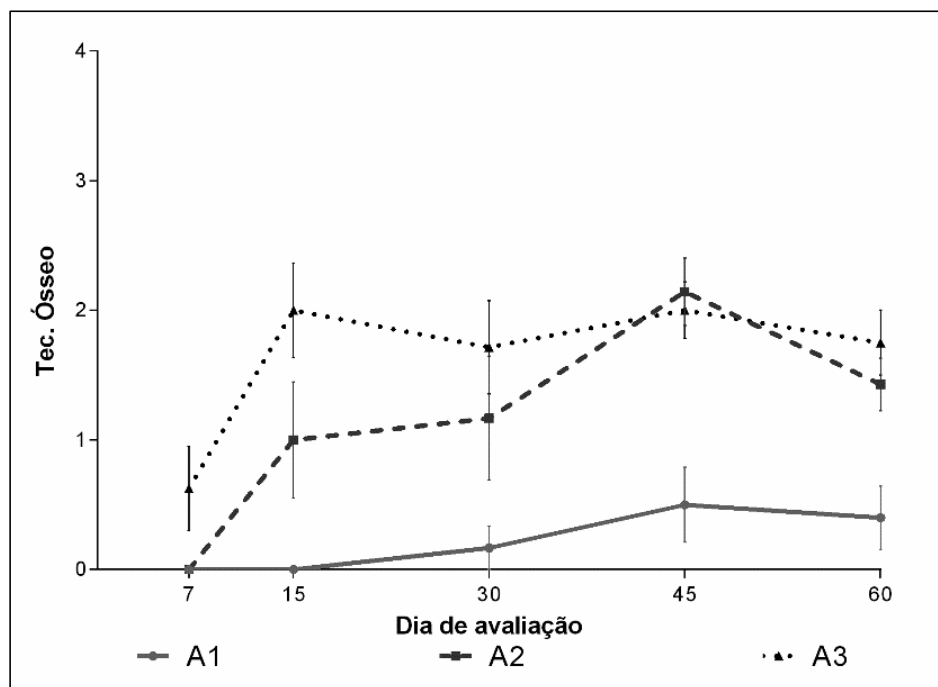


Figura 16. Mediana dos scores de tecido ósseo em todos os tempos de análise em todos os grupos. Serviço de Ortopedia e Neurocirurgia e Serviço de Cirurgia Geral - UNESP Câmpus de Jaboticabal.

Tabela 6: p-valor para cada análise comparativa de cada tempo de análise de tecido ósseo entre as medianas dos scores.

Local	A1					p-valor		
Dia	7	15	30	45	60	Local	Dia	LXD
Mediana	0,0 ^d	0,0 ^d	0,0 ^d	0,5 ^{cd}	0,0 ^{cd}	<0,0001	0,0002	<0,0001
IQR	0,0	0,0	0,0	1,0	1,0			
Local	A2							
Dia	7	15	30	45	60			
Mediana	0,0 ^d	1,0 ^{bc}	1,0 ^{bc}	2,0 ^a	1,0 ^{ab}			
IQR	0,0	2,0	1,5	0,5	1,0			
Local	A3							
Dia	7	15	30	45	60			
Mediana	0,0 ^{cd}	2,0 ^a	1,0 ^{ab}	2,0 ^a	2,0 ^{ab}			
IQR	1,25	1,5	1,5	0,0	0,25			

A1: bolsa de omento; A2: espaço intermuscular; A3: espaço subperiosteal; IQR: faixa interquartil; LXD: local x dia.

Houve um maior número de células gigantes no grupo A2 no 45° dia e no local A1 no 30° dia quando comparados aos demais grupos ($p=0,0046$) (Figura 17 e Tabela 7).

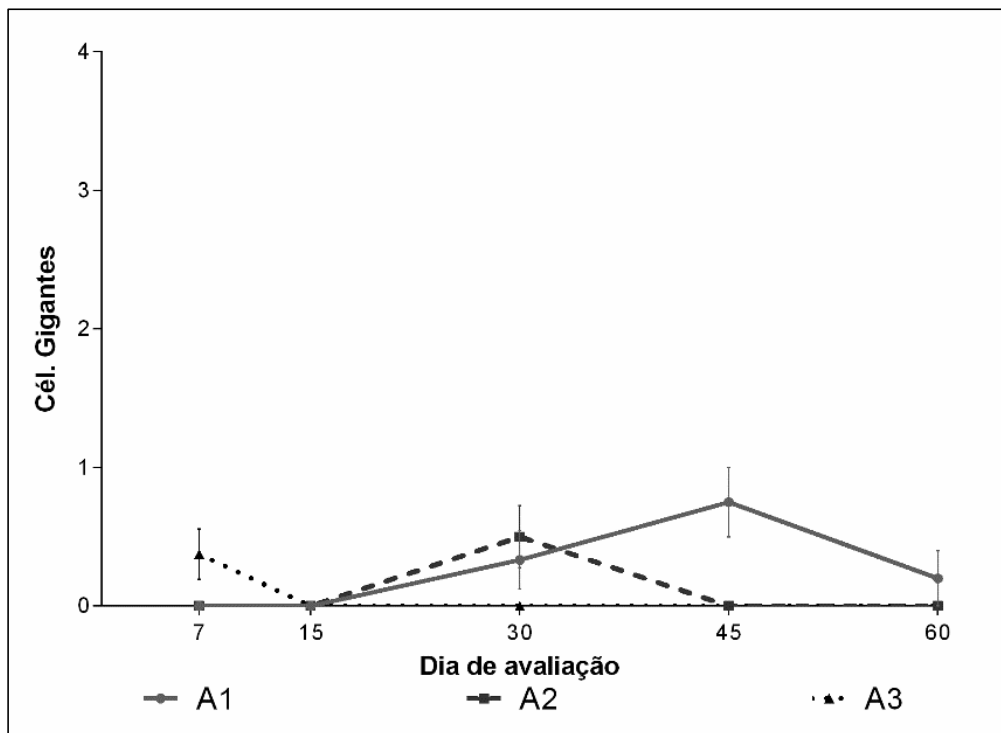


Figura 17. Mediana dos scores de células gigantes em todos os tempos de análise em todos os grupos. Serviço de Ortopedia e Neurocirurgia e Serviço de Cirurgia Geral - UNESP Câmpus de Jaboticabal.

Tabela 7: p-valor para cada análise comparativa de cada tempo de análise células gigantes entre as mediana dos scores.

Local		A1					p-valor		
Dia	7	15	30	45	60	Local	Dia	LXD	
Mediana	0,0 ^c	0,0 ^c	0,0 ^{bc}	1,0 ^a	0,0 ^{bc}	0,6193	0,6231	0,0046	
IQR	0,0	0,0	0,75	0,25	0,0				
Local		A2							
Dia	7	15	30	45	60				
Mediana	0,0 ^c	0,0 ^c	0,5 ^{ab}	0,0 ^c	0,0 ^c				
IQR	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0				
Local		A3							
Dia	7	15	30	45	60				
Mediana	0,0 ^c	0,0 ^c	0,0 ^c	0,0 ^c	0,0 ^c				
IQR	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0				

A1: bolsa de omento; A2: espaço intermuscular; A3: espaço subperiosteal; IQR: faixa interquartil; LXD: local x dia.

A neovascularização foi similar em todos os grupos durante o período avaliado ($p > 0,05$) (Figura 18 e Tabela 8).

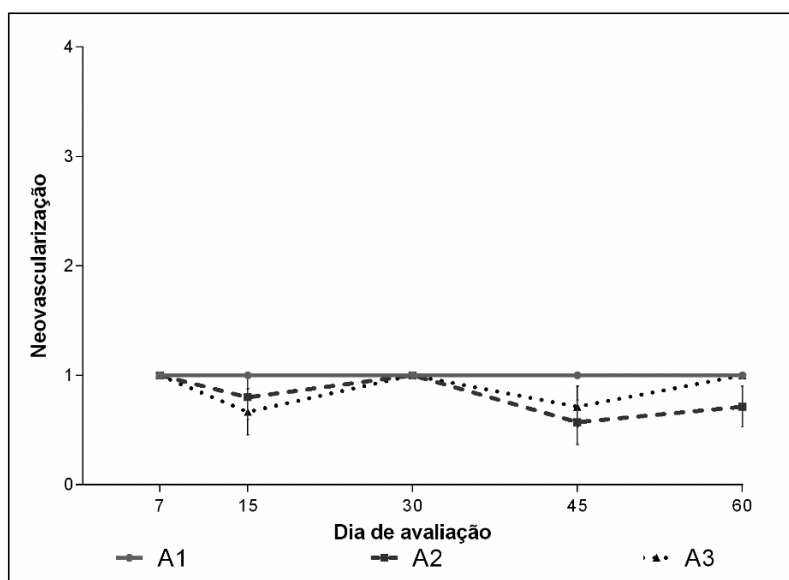


Figura 18. Mediana dos scores de neovascularização em todos os tempos de análise em todos os grupos. Serviço de Ortopedia e Neurocirurgia e Serviço de Cirurgia Geral - UNESP Câmpus de Jaboticabal.

Tabela 8: p-valor para cada análise comparativa de cada tempo de análise de neovascularização entre as medianas dos scores.

Local	A1					p-valor		
Dia	7	15	30	45	60	Local	Dia	LXD
Mediana	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0928	0,1263	0,1593
IQR	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0			
Local	A2							
Dia	7	15	30	45	60			
Mediana	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0			
IQR	0,0	0,0	0,0	1,0	0,5			
Local	A3							
Dia	7	15	30	45	60			
Mediana	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0			
IQR	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0			

A1: bolsa de omento; A2: espaço intermuscular; A3: espaço subperiosteal; IQR: faixa interquartil; LXD: local x dia.

5. DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a angiogênese em xenoenxertos bovinos implantados em sítios intracorpóreos de coelhos para utilização como substituto ósseo. O uso de biomateriais na reparação óssea é amplamente relatado em odontologia para correção de falhas de origens periodontais. Em Medicina Veterinária, o uso de enxertos ósseos ganha destaque para correções de grandes falhas ósseas originárias de grandes defeitos, falha na execução da técnica cirúrgica levando a possível falha dos implantes ou no preenchimento de correções de osteotomias corretivas e na ressecção de neoplasmas ósseos. A busca por materiais que auxiliem em situações como as acima descritas foi o propósito da presente pesquisa.

A depender de suas propriedades e modo de aplicação e preparo, os enxertos aumentam o poder de reparação tecidual do organismo receptor, por meio de mecanismos osteoindutores, osteocondutores ou osteogênicos (Roberts e Rosenbaum, 2012). Muitos fatores estão envolvidos no sucesso para remodelamento dos enxertos, incluindo o tipo de material usado, a preparação do local de implantação, sua força mecânica, a porosidade do enxerto e a vascularização local (Kao e Scott, 2007).

Biorreator é um sistema que aumenta a distribuição celular, fornecendo os meios de nutrição e estímulo para o tecido em desenvolvimento (Huang et al., 2013). Biorreatores *in vivo* têm sido utilizados em diversas pesquisas para promover a colonização celular recém-implantada, aumentar e criar nova rede vascular local e para regenerar diversos tecidos, como osso, gordura, cartilagem e músculo (Stevens et al., 2005; Uriel et al., 2008; Huang et al., 2013). Na grande maioria das vezes, o sistema de biorreator *in vivo* produz tecidos neoformados substitutos, melhor que os sistemas *in vitro* (McCullen et al., 2011), porém não reproduzem a mesma rede vascular que o tecido de origem (Baumert et al., 2007).

No presente estudo foi preconizado o coelho como modelo de biorreator, pois se aproxima mais das condições naturais para uso clínico do biomaterial implantado e modificado dentro deles. Sendo assim, condições como suprimento sanguíneo adequado, células inflamatórias, fatores inflamatórios e de

crescimento, naturais do próprio organismo estarão sendo mantidas, podendo ter respostas mais fidedignas.

No presente trabalho, os fragmentos ósseos oriundos de ossos esponjosos bovinos, foram preparados pela equipe como modelo de *scaffold*, na qual sua estrutura mecânica foi respeitada em forma geométrica de cubo 3D. Dessa maneira, características essenciais para formação de tecido ósseo foram mantidas, como descrito por Liu e Ma (2004), Liu et al. (2007) e Roberts e Rosenbaum (2012). Qualquer biomaterial usado para fins de substituição óssea deve ser biocompatível, proporcionando superfície porosa de ancoragem para as células que irão se desenvolver e, ao passar do tempo, deve ser reabsorvido lentamente, sendo substituído por novo tecido ósseo formado (Athanasίου et al., 2009). O ideal é que esses poros tenham ao mínimo 100 µm (Acoorsi-Mendonça et al., 2008).

Xenoenxertos bovinos são de fácil acesso, caracterizando-se como uma fonte de enxerto ilimitada. Seu uso em cirurgia foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), desde que tenham preparo adequado, evitando assim transmissão de doenças como a Encefalopatia Espongiforme Bovina. Além disso, para evitar transmissão de príons, os xenoenxertos para utilização em humanos devem ser coletados de animais com menos de seis meses idade, pois são menos susceptíveis à infecções priônicas (Athanasίου et al., 2009). Coelhos não são isentos de alterações causadas por príons, sendo necessário cuidado no preparo dos enxertos, antes de serem implantados nesta espécie (Chianini et al., 2012).

Os ossos utilizados neste estudo e preparados pela equipe foram coletados de frigorífico comercial e, portanto, não apresentavam a idade acima descrita. Além disso, foram preparados em altas temperaturas, o que garante a desativação de qualquer patógeno presente, como príons. De maneira geral, ainda não existe uma padronização literária do preparo de xenoenxertos bovinos tanto para uso experimental, quanto clínico.

No presente estudo, o método de desproteinização antigênica, bem como esterilização do biomaterial desenvolvido pela equipe, foi a autoclavagem em baixo ciclo, compreendendo exposição de 15 minutos na temperatura de 121° C. Os xenoenxertos comerciais são preparados a partir da desproteinização de todo componente orgânico, feita por meio de altas temperaturas. Bio-Oss® (Geistlich

Biomaterials, Wolhusen, Suíça) é um dos implantes mais estudados e utilizados, preparado sob temperaturas de 300°C. Gen-Ox® (Baumer SA, São Paulo, Brasil) é outro implante comercial tratado com temperaturas que variam de 950 a 1000° C (Acoorsi-Mendonça et al., 2008).

Ao serem submetidos a altas temperaturas, os xenoenxertos perdem sua capacidade osteindutora, visto que parte das proteínas morfogênicas ósseas (BMP's) são desnaturadas. As BMP's iniciam a diferenciação de células cartilaginosas e progenitoras ósseas, dando início à formação de novo tecido ósseo por meio da ossificação endocondral (Huang et al., 2005). Elas são proteínas especialmente solúveis, dissipando-se facilmente onde são inseridas, o que diminui sua eficácia (Roberts e Rosenbaum, 2012).

Oliveira et al. (2003) compararam a biocompatibilidade de xenoenxerto bovino preparado por sua equipe e desproteinizado a 100° C com um comercial (Gen-Ox®) na qual passou por uma temperatura de 1000° C para haver a desproteinização. Ao final das análises concluiu-se que ambos os enxertos foram biocompatíveis e poderiam ser usados como substitutos ósseos, no entanto o que foi preparado a 1000° C apresentou melhores resultados, uma vez que, com a desproteinização completa, a resposta tecidual frente ao biomaterial implantando foi menor, não levando a tantas perdas teciduais e nem tanta reação de corpo estranho. Mesmo assim, o xenoenxerto preparado a 100°C foi considerado apto para ser usado como material osteocondutor, uma vez que, por não perder toda sua matéria orgânica, parte das proteínas morfogênicas ósseas (BMP's) não foram desnaturadas. Dessa maneira, podemos sugerir que o mesmo aconteceu com o presente estudo, visto que em temperaturas semelhantes, resultou em resultados similares ao autor citado, principalmente frente à resposta inflamatória observadas em cada análise, como discutido a seguir.

Para que haja reparação tecidual dentro do enxerto é necessário que ocorra vascularização no novo tecido implantado, uma vez que junto com os neovasos, ocorre a deposição mineral. A osteocondução do biomaterial está diretamente ligada à quantidade de neovasos formados no tecido não mineralizado (Galindo-Moreno et al., 2018). Além disso, a vascularização formada é responsável por encaminhar fatores de crescimento e citocinas, que

irão atuar no enxerto como promotores do remodelamento (Athanasίου et al., 2009).

No presente estudo, por meio da análise estatística, foi constatado que a variável neovascularização foi similar em todos os grupos (A1, A2 e A3) durante todos os períodos de avaliação, não apresentando valor significativo. Porém, na análise histopatológica, fora confirmada a presença de neovascularização em todos os tempos e locais de análise. Athanasίου et al. (2009) ao compararem vários tipos de enxertos incluindo xenoenxertos industrializados (Bio-Oss®), identificaram quantidade significativa de vasos sanguíneos na análise histopatológica. Além disso, foi visto também que com o passar do tempo de suas análises, os vasos iam diminuindo sua quantidade, corroborando os achados do presente estudo.

Simion et al. (2007) e Araújo et al. (2009) ao utilizarem xenoenxertos industrializados (Bio-Oss®) para preenchimento de defeitos periodontais, também encontraram grande presença de neovascularização nas análises histopatológicas. Mardas, Chadha e Donos (2010) compararam xenoenxerto industrializado com enxertos cerâmicos, ambos combinados com membrana colágena, na qual todos tiveram neoformação óssea, acompanhado da formação de neoangiogênese por meio de análises histopatológicas seriadas.

A neovascularização deste estudo estava presente tanto no tecido peri quanto no intra-implante, sendo mais evidente no local A1 (bolsa de omento), seguido dos locais A3 (espaço subperiosteal) e A2 (espaço intermuscular). O omento é um importante órgão intraperitoneal que contém propriedades importantes na proteção de toda cavidade peritoneal. É um órgão extremamente versátil que, quando manipulado, pode ser levado até extremidades de membros em cão (Ferrigno et al., 2010). No coelho, essa mobilidade é limitada, pois o órgão é pequeno e muito aderido ao baço.

Além disso, omento possui intensa capacidade imunológica, angiogênica, absorviva, adesiva e de armazenamento de adipócitos (Huyghe et al., 2016). Sua capacidade angiogênica é dada pela presença do Fator de Crescimento Endotelial Vascular, que um dos principais precursores do desenvolvimento de vasos no organismo (Zhang et al., 1997). Desta maneira, explica-se o motivo da neoangiogênese estar presente em maior quantidade no sítio de implante A1 – bolsa omental.

De maneira geral, em todos os grupos, a quantidade de vasos recém-formados variou de acordo com o tempo de análise. No primeiro tempo (sete dias) havia uma rede vascular que se intensificou ao passar dos tempos (15 e 30 dias). Junto com ela, pode-se notar consolidação de uma cápsula de tecido conjuntivo e da presença de infiltrado inflamatório agudo. Nos últimos tempos (45 e 60 dias) essa rede vascular era presente, porém em menor intensidade, bem como a presença de cápsula conjuntiva menos densa e menor quantidade de infiltrado inflamatório, tido como crônico. Resultados similares estavam presentes em outros estudos de biocompatibilidade (Oliveira et al., 2003; Simion et al., 2007; Araújo et al., 2009).

Já análise da formação de tecido ósseo mostrou diferença significativa entre os locais A3 (subperiosteal) e A2 (intermuscular), sendo que houve maior presença de tecido ósseo recobrendo os implantes também nesses locais, na avaliação histopatológica. Esses dados podem ser comparados em conjunto com a quantidade de células inflamatórias, visto que os resultados das análises são semelhantes, sugerindo que a formação óssea, bem como fatores que culminam na reabsorção em xenoenxertos está intimamente ligada com a reação inflamatória formada no biomaterial e ao redor dele.

Em meados de 1986 Tang e Chai demonstraram as diferenças das camadas que compõe o periósteo, sendo que a mais interna é mais vasta e composta por osteoblastos, pré-osteoblastos, células osteoprogenitoras, células-tronco teciduais e osteoclastos. A camada central é composta por vasos sanguíneos e a mais externa por fibras colágenas (Squier et al., 1990). A partir de então, inúmeros estudos utilizam o periósteo como fonte osteoindutora, uma vez que contém todos os precursores para formação de tecido ósseo (Hutmacher e Sittinger, 2003; Cuthbert et al., 2014; Chen et al., 2015). Com isso, sugere-se que no presente estudo ao fornecer células precursoras ósseas somada a neovascularização presente nos xenoenxertos implantados, pode haver crescimento ósseo. Além disso, sugerimos a ação de proteínas morfogênicas ósseas, como será discutido posteriormente.

Ao usar um implante ósseo como biomaterial em modelo experimental não se deve atentar apenas na estrutura que será modificada, mas sim todas as células que fazem parte da sua nova constituição. A celularidade do implante é o parâmetro que mostra como o remodelamento do enxerto está acontecendo.

A parte óssea que contém os componentes celulares e vasculares estão presentes na medula óssea ou também chamada de compartimento ósseo não mineralizado, que são essenciais para homeostase óssea, reparação e maturação (Galindo-Moreno et al., 2018).

A presença de células inflamatórias é um dos preditores mais importantes da biocompatibilidade e da quantidade de inflamação que acometeu o biomaterial implantado. A quantidade de células inflamatórias, tais como linfócitos, macrófagos, granulócitos, plasmócitos, monócitos, entre outras, foram mensuradas em análises histopatológicas no presente estudo, mostrando maior quantidade no sítio de implante A1 (omento). Porém na análise estatística, houve diferença significativa quando comparados os locais de implantes A3 (subperiosteal) e A1, sendo que em A3 havia maior número de células inflamatórias, principalmente no primeiro tempo de análise (sete dias).

Tal resultado pode ser explicado, pois o acesso ao osso ílio e posterior descolamento do periósteo para alojamento do implante, requer técnica cirúrgica mais cruenta quando comparado aos outros dois locais de implantação. Além disso, o tempo de sete dias, foi o que mais mostrou hematomas na avaliação macroscópica, o que justifica ainda mais a presença de maior quantidade de células inflamatória neste primeiro momento de análise.

A análise de células gigantes mostrou que o local onde houve maior contagem foi A1, com diferença significativa na comparação de tempos dentre os locais A1 e A2. O omento é um órgão muito vascularizado que pode carrear com mais facilidade células inflamatórias, provavelmente por esse motivo houve maior quantidade de células gigantes nesse período. Ainda não há consenso da origem das células gigantes em sítios de implante e nos biomateriais implantados, porém é sabido que elas possuem ácidos orgânicos que podem atuar na dissolução mineral do material (Sicca et al., 2014).

Ao implantar materiais em tecidos moles, geralmente é iniciada resposta inflamatória do tipo corpo estranho levando à formação de cápsula de tecido colágeno. O colágeno pode ser considerado como ótimo substrato para neoangiogênese, deposição de minerais e iniciação do remodelamento ósseo (Athanasίου et al., 2009). Essa reação do tipo corpo estranho aguda leva à formação de tecido de granulação e fibrose, formando a cápsula que circunda todo material, o que pode ser relacionado com a biocompatibilidade do implante

(Kyrikides et al., 1999). Com a análise histopatológica do presente estudo, pode-se observar a presença de cápsula fibrosa em todos os implantes. Tal cápsula ficou mais evidente e espessa a partir do décimo quinto de análise, sugerindo o início de uma reação do tipo corpo estranho.

Após a implantação de um biomaterial, o organismo do hospedeiro inicia uma série de reações que incluem lesão, interações entre o sangue o material implantando, formação de matriz temporária, inflamação aguda e crônica, formação de tecido de granulação, reação de corpo estranho com posterior formação de fibrose ou cápsula fibrosa (Anderson et al., 2008).

A inflamação aguda é quantificada de acordo com o grau de lesão que foi feito para alocar o implante, geralmente se resolvendo em uma semana, e é comprovada pela presença de neutrófilos, leucócitos e demais células do sistema fagocitário polimorfonuclear. A inflamação crônica tem um curso de aproximadamente de duas semanas quando o material é totalmente compatível, tendo como características celulares principais a presença de monócitos, linfócitos, plasmócitos e células gigantes, esta última geralmente recrutada pelas interleucinas liberadas pela degranulação de mastócitos na fase aguda. Ao cessar as fases inflamatórias o tecido de granulação que antecede a formação de cápsula é encontrado junto a macrófagos, fibroblastos e neovascularização no tecido formado, caracterizando uma reação de corpo estranho. Persistindo as características inflamatórias por mais de três semanas, é sinal que possa haver infecção (Anderson et al., 2008).

Com o passar do tempo das análises do presente trabalho, principalmente a partir do décimo quinto dia, pode-se observar que o infiltrado inflamatório tornou-se predominantemente linfocitário. Juntamente a este dado, notou-se que a cápsula fibrosa foi ficando mais densa, com considerável deposição de colágeno e presença de fibroblastos. Com isso, corrobora-se a fala de Anderson et al. (2008), na qual com o passar de duas a três semanas a inflamação é caracterizada como crônica.

Reações do tipo corpo estranho são consideradas reações imunomediadas inespecíficas, podendo ter como início ativação do sistema complemento inato com a participação de linhagens de macrófagos e monócitos (Trindade et al., 2016). Elas se formam com a instalação da inflamação crônica e acontece quando há a presença de células gigantes na interface do

biomaterial. As células gigantes multinucleadas são derivadas da linhagem monocítica, sendo associadas a doença granulomatosa, lise óssea, tumores e inflamação crônica. Osteoclastos e macrófagos são considerados como células gigantes multinucleadas (Sheikh et al., 2015).

A reação de corpo estranho depende da constituição química, da forma e do local de implante do biomaterial. Geralmente implantes com grandes volumes e porosos, acabam apresentando em suas análises maiores quantidades de macrófagos e células gigantes que os demais (Sheikh et al., 2015).

Muitas vezes o sistema imunológico é tido como fator negativo para reparação tecidual, porém estudos mostram que sua modulação pode estimular a regeneração (Chan et al., 2008). Com a modulação do sistema imune, o remodelamento tecidual pode ser melhorado, como demonstrado por Yin et al. (2003) onde a ação dos macrófagos modulados diretamente em nervos ópticos lesionados de ratos, melhorou a reparação tecidual.

Araújo et al. (2009) ao criarem falhas periodontais em ossos de cães, implantaram xenoenxertos bovinos industrializados para analisar sua atividade osteoindutora sem preparo prévio dos locais de implante. Ao analisar cada amostra histológica, foi visto que houve reparação e remodelamento tardio dos sítios onde havia o xenoenxerto, podendo ser influenciado pelas células inflamatórias que circundavam o local do implante. O autor sugeriu tal influência, pois nos sítios onde não foram implantados nenhum material e que as falhas ósseas não foram preenchidas, houve formação de tecido ósseo imaturo mais eficaz que no local do biomaterial.

Simion et al (2007) e Araújo et al (2009) relataram que a presença da reabsorção e posterior eliminação dos xenoenxertos, a depender do tempo de análises, sugere que as células inflamatórias multinucleadas eram osteoclastos. Vignery (2000) propõe que células do sistema mononuclear fagocitário como os macrófagos, a depender do material que precisa ser fagocitado, fundem-se entre si diferenciando-se em osteoclastos ou células gigantes multinucleadas. Tais estímulos para esta fusão, tais como fatores inflamatórios, de crescimento, citocinas, estão principalmente em material ósseo da superfície de tumores ou corpos estranhos, por exemplo. Anderson et al. (2008) conseguiram mimetizar a fusão de macrófagos *in vitro*, por meio de estímulos, citocinas e interleucinas

inflamatórias. Desse modo, macrófagos são responsáveis diretos para perda óssea durante uma reação de corpo estranho (Trindade et al., 2016).

Macrófagos são capazes de secretar fatores de crescimento, angiogênicos e pró-fibrogênicos que regulam a fibrose e neoangiogênese local. Geralmente eles se aderem à superfície do implante, modulando a formação de cápsula fibrosa, que pode auxiliar ou prejudicar a função do biomaterial implantado (Anderson et al., 2008). Eles respondem a grande maioria dos tipos de biomateriais, se aderindo as paredes, porém ainda não chegou à conclusão de como esse mecanismo ocorre (Sheikh et al., 2015).

Com as análises histopatológicas das amostras do presente ensaio clínico, é possível afirmar que dentre as células inflamatórias estão os macrófagos e células gigantes. A saber das funções e possibilidades que essa linhagem fagocitária é capaz, sugerimos que ela pode ter influência direta nos resultados, uma vez que é possível observar a presença de células gigantes que pode estar ligada com a fusão celular dos macrófagos. Com isso, explica-se o fato de ocorrer degeneração dos implantes ao passar dos tempos análise.

A formação da cápsula fibrosa marca o fim das reações inflamatórias frente ao biomaterial, sendo esta geralmente composta de uma fina camada de colágeno, pouca vascularização, inervação e densidade celular. Histologicamente pode haver a presença de monócitos e/ou macrófagos, fibroblastos e até mesmo células gigantes (Anderson et al., 2008; Trindade et al., 2016). Com o passar dos tempos de análises no presente estudo, pode-se notar que além do infiltrado inflamatório ficar predominante crônico, houve a formação de densa cápsula fibrosa, com vascularização moderada e presença de células gigantes. Além disso, notou-se que partes dos implantes estavam em estado de degeneração. Tais fatos mostram que o sistema imune reconheceu o xenoenxerto como um corpo estranho, levando a caminhos de sua destruição. Porém, ao longo das análises, notou-se que houve neoangiogênese nesses materiais implantados e pouca formação óssea, sugerindo a presença de BMP's que se mantiverem intactas ao longo do processo de preparo dos implantes.

Devido a formação encapsulada, considera-se que a reação de corpo estranho foi ativada por partículas antigênicas presentes na matriz óssea que não totalmente desproteínizada. O método de desproteínização e esterilização em auto clave de baixo ciclo (121°C em 15 minutos) foi o suficiente para que não

houvesse infecção bacteriana nos sítios de implantes, visto que as reações foram todas assépticas, porém a antigenicidade fora mantida em partes.

6. CONCLUSÃO

O modelo de biorreator *in vivo* tem importante relevância clínica, visto que com este estudo obteve-se a vascularização desejada nos xenoenxertos bovinos, possibilitando que este método auxilie em ensaios futuros na expansão de material ósseo autólogo, por exemplo.

Nas condições que o projeto foi realizado, pode-se concluir que é possível ocorrer neovascularização em xenoenxertos bovinos implantados em biorreatores *in vivo*. Dos locais testados, conclui-se que o espaço subperiosteal é o que oferece melhores resultados.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao manter o ensaio clínico, porém com xenoenxertos, são necessários mais estudos para que seja alcançado um implante que cause reação imunogênica equilibrada o suficiente para formação de novo tecido ósseo, somado à neoangiogênese e inflamação tecidual.

Além disso, para confirmação de células precursoras ósseas são necessária análises mais avançadas, como microscopia eletrônica e imunohistoquímica. Porém, somente com a avaliação histopatológicas, pode-se chegar a resultados satisfatórios dentro do proposto.

8. REFERÊNCIAS

- Abhay S, Haines SJ (1997) Repairing holes in the head: a history of cranioplasty. **Neurosurgery** 40(3), 588-603.
- Accorsi-Mendonça T, Conz MB, Barros TC, Sena LÁD, Soares GDA, Granjeiro J M (2008) Physicochemical characterization of two deproteinized bovine xenografts. **Brazilian oral research** 22(1), 5-10.
- Anderson JM (2001) Biological responses to materials. **Annual review of materials research** 31.1: 81-110
- Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT (2008) Foreign body reaction to biomaterials. In Seminars in immunology. **Academic Press** 20(2),86-100.

Araújo M, Linder E, Lindhe J (2009) Effect of a xenograft on early bone formation in extraction sockets: an experimental study in dog. **Clinical Oral Implants Research** 20(11)1-6.

Athanasίου VT, Papachristou DJ, Panagopoulos A, Saridis A, Scopa CD, Megas P (2009) Histological comparison of autograft, allograft-DBM, xenograft, and synthetic grafts in a trabecular bone defect: an experimental study in rabbits. **Medical Science Monitor** 16(1), 24-31.

Badylak SF, Nerem RM (2010) Progress in tissue engineering and regenerative medicine. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 107(8), 3285-3286.

Banwart JC, Asher MA, Hassanein RS (1995) Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. **Spine** 20(9), 1055-1060.

Baumert H, Simon P, Hekmati M, Fromont G, Levy M, Balaton A, Molinié V, Malavaud B (2007) Development of a seeded scaffold in the great omentum: feasibility of an in vivo bioreactor for bladder tissue engineering. **European urology** 52(3), 884-892.

Boden SD (2000) Biology of lumbar spine fusion and use of bone graft substitutes: present, future, and next generation. **Tissue engineering** 6(4), 383-399.

Bosch P, Musgrave DS, Lee JY, Cummins J, Shuler F, Ghivizzani SC, Evans C, Robbins PD, Huard J (2000) Osteoprogenitor cells within skeletal muscle. **Journal of Orthopaedic Research** 18(6), 933-944

Castro-Silva II, Zambuzzi WF, Granjeiro JM (2009) Panorama atual do uso de xenoenxertos na prática odontológica. **J Biomater Esthet** 4(3), 70-5.

Chan G, Mooney DJ (2008) New materials for tissue engineering: towards greater control over the biological response. **Trends in biotechnology** 26(7), 382-392.

Chan G, Mooney DJ (2008) New materials for tissue engineering: towards greater control over the biological response. **Trends in biotechnology** 26(7), 382-392.

Chen K, Lin X, Zhang Q, Ni J, Li J, Xiao J, Wang Y, Ye Y, Chen L, Jin K, Chen L (2015) Decellularized periosteum as a potential biologic scaffold for bone tissue engineering. **Acta biomaterialia** 19:46-55.

Chianini F, Fernández-Borges N, Vidal E, Gibbard L, Pintado B, de Castro J, Priola AS, Scott H, Samantha LE, Finlayson J, Pang Y, Steele P, Reid HW, Dagleish MP, Castilha J (2012) Rabbits are not resistant to prion infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 201120076.

Cicconetti A, Sacchetti B, Bartoli A, Michienzi S, Corsi A, Funari A, Robey PG, Riminucci M (2007) Human maxillary tuberosity and jaw periosteum as sources of osteoprogenitor cells for tissue engineering. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology** 104(5), 618-e1.

Consolaro A (2014) O papel do perióstio nos procedimentos ortopédicos como exemplo de sua capacidade reparatória. **Revista Clínica de Ortodontia Dental Press**, 13(2).

Croci TA, Bitar G, Pereira SLB, Moreira M, Freitas SD (2003) Efeito do concentrado de plasma em falhas ósseas provocadas em fêmures de camundongos como estimulação de formação óssea. Estudo experimental. **Acta Ortopédica Brasileira** 11(4).

Cuthbert RJ, Churchman SM, Tan HB, McGonagle D, Jones E, Giannoudis PV (2013) Induced periosteum a complex cellular scaffold for the treatment of large bone defects. **Bone** 57(2)484-492.

Davies JE, Hosseini MM (2000) Histodynamics of endosseous wound healing. **Bone engineering** 1, 1.

De Freitas SH, Dória RGS, De Souza FM, Neto JE, De Camargo LM (2008) Aspecto radiológico de heteroenxerto ósseo cortical fragmentado na reparação de falhas ósseas em coelhos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária** 15(3).

De Lima Taga ML, Granjeiro JM, Cestari TM, Taga R. (2008) Healing of critical-size cranial defects in guinea pigs using a bovine bone-derived resorbable membrane. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants** 23(3).

Eimantas GC (1997) **Reparação e estabilização de fraturas femorais distais em cães e gatos jovens Com a utilização de fíbula de cão conservada em glicerina: estudo experimental**. 110 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Unesp, Jaboticabal.

Ferrigno CRA, Ito KC, Caquias DFI, Mariani TC, Nina MID, Ferraz VCDM, Cunha O, Romano L (2010) Retalho de omento maior para indução de vascularização e consolidação óssea em cão. **Ciência Rural** 40(9).

Flecknell PA, Laber LK, Swindle MM (1996) Anaesthesia and analgesia for rodents and rabbits. In: **Handbook of Rodent and Rabbit Medicine**, Pergamon Press, Butterworth Heineman, Newton, MA, pp. 219-37.

Galindo-Moreno P, de Buitrago JG, Padial-Molina M, Fernández-Barbero JE, Ata-Ali J, O' Valle F. (2018) Histopathological comparison of healing after maxillary sinus augmentation using xenograft mixed with autogenous bone versus allograft mixed with autogenous bone. **Clinical oral implants research** 29(2), 192-201.

Gutierrez M, Lopes MA, Hussain NS, Cabral AT, Almeida L, Santos JD (2005) Substitutos Ósseos: conceitos gerais e estado actual. **Arquivos de medicina** 19(4), 153-162.

Huang JJ, Yang SR, Chu IM, Brey EM, Hsiao H, Cheng MH (2013) A comparative study of the chondrogenic potential between synthetic and natural scaffolds in an in vivo bioreactor. **Science and technology of advanced materials** 14(5), 054403.

Huang YC, Kaigler D, Rice KG, Krebsbach PH, Mooney DJ (2005) Combined angiogenic and osteogenic factor delivery enhances bone marrow stromal cell-driven bone regeneration. **Journal of Bone and Mineral Research** 20(5), 848-857.

Hutmacher DW, Sitterling M (2003) Periosteal cells in bone tissue engineering. **Tissue engineering** 9(4, Supplement 1)45-64.

Huyghe S, De Rooster H, Doom M, Van Den Broeck W (2016) The microscopic structure of the omentum in healthy dogs: the mystery unravelled. **Anatomia, histologia, embryologia** 45(3), 209-218.

Kanou M, Ueno T, Kagawa T, Fujii T, Sakata Y, Ishida N, Fukunaga J, Sugahara T (2005) Osteogenic potential of primed periosteum graft in the rat calvarial model. **Annals of plastic surgery** 54(1), 71-78.

Kao ST, Scott DD (2007) A review of bone substitutes. **Oral and maxillofacial surgery clinics of North America** 19(4)513-521.

Keating JF, McQueen MM (2001) Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma. **The Journal of bone and joint surgery. British volume** 83(1), 3-8.

Kyriakides TR, Leach KJ, Hoffman AS, Ratner BD, Bornstein P (1999) Mice that lack the angiogenesis inhibitor, thrombospondin 2, mount an altered foreign body reaction characterized by increased vascularity. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 96(8), 4449-4454.

Liebermann-Meffert D (2000) The greater omentum: anatomy, embryology, and surgical applications. **Surgical clinics of north America** 80(1), 275-293.

Liebermann-Meffert D, White H, Vaubel E (1983) The greater omentum: anatomy, physiology, pathology, surgery, with an historical survey. **Springer Verlag**.

Liu C, Xia Z, Czernuszka JT (2007) Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. **Chemical Engineering Research and Design** 85(7)1051-1064.

Liu X, Ma PX (2004) Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. **Annals of biomedical engineering** 32(3)477-486.

Mardas N, Chadha V, Donos N (2010) Alveolar ridge preservation with guided bone regeneration and a synthetic bone substitute or a bovine-derived xenograft: a randomized, controlled clinical trial. **Clinical oral implants research** 21(7) 688-698.

McCullen SD, Chow AG, Stevens MM (2011) In vivo tissue engineering of musculoskeletal tissues. **Current opinion in biotechnology** 22(5), 715-720.

Miao C, Zhou L, Tian L, Zhang Y, Zhang W, Yang F, Liu T, Tang S, Liu F (2017) Osteogenic differentiation capacity of in vitro cultured human skeletal muscle for expedited bone tissue engineering. **BioMed research international** 2017.

Moraes PC (2006) **O uso do ultra-som pulsado de baixa intensidade em falhas ósseas produzidas experimentalmente em rádio de coelhos, preenchidas ou não com cimento de fosfato de cálcio.** Dissertação (Doutorado em Cirurgia Veterinária) – Unesp, Jaboticabal.

Moretton TR, Brown Jr CE, Legan JJ, Kafrawy AH (2000) Tissue reactions after subcutaneous and intraosseous implantation of mineral trioxide aggregate and ethoxybenzoic acid cement. **Journal of biomedical materials research** 52(3), 528-533.

Müller G, Behrens JUGEN, Nussbaumer U, Böhlen P, Birchmeier, W (1987) Inhibitory action of transforming growth factor beta on endothelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 84(16), 5600-5604.

Noetzel J, Özer K., Reissbauer BH, Anil A, Rössler R, Neumann K, Kielbassa AM (2006) Tissue responses to an experimental calcium phosphate cement and mineral trioxide aggregate as materials for furcation perforation repair: a histological study in dogs. **Clinical oral investigations** 10(1), 77.

O'shaughnessy BA, Dumanian GA, Liu JC, Ganju A, Ondra SL (2007) Pedicled omental flaps as an adjunct in the closure of complex spinal wounds. **Spine** 32(26), 3074-3080.

O'connor JP (1998). Animal models of heterotopic ossification. **Clinical orthopaedics and related research** (346), 71-80.

Oliveira RCD, Menezes R, Cestari TM, Taga EM, Taga R, Buzalaf MAR, Granjeiro JM (2004) Tissue response to a membrane of demineralized bovine cortical bone implanted in the subcutaneous tissue of rats. **Brazilian dental journal** 15(1), 3-8.

Oliveira RCD, Sicca CM, Silva TL, Cestari TM, Kina JR, Oliveira DT, Buzalaf MAR, Taga R, Taga EM, Granjeiro JM (2003) Avaliação histológica e bioquímica da resposta celular ao enxerto de osso cortical bovino previamente submetido a altas temperaturas. Efeito da temperatura no preparo de enxerto xenógeno. **Rev. Bras. Ortop.** 38(9), 551-560.

Padilha Filho JG, De Carvalho Penha LH, De Souza SF (2008) Uso do enxerto ósseo cortical bovino conservado em glicerina a 98% na osteotomia femoral em gatos. **Ciência Animal Brasileira** 9(4), 1071-1078.

Panzarini SR, Holland R, De Souza V, Poi WR, Sonoda CK, Pedrini D (2007) Mineral trioxide aggregate as a root canal filling material in reimplanted teeth. Microscopic analysis in monkeys. **Dental Traumatology** 23(5), 265-272.

Piermattei DL, Johnson KA (2004) An atlas of surgical approaches to the bones and joints of the dog and cat. Elsevier, 4ed.

Roberts TT, Rosenbaum AJ (2012) Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics: the bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing. **Organogenesis** 8(4)114-124.

Saghiri MA, Orangi J, Tanideh N, Asatourian A, Janghorban K, Garcia-Godoy F, Sheibani N (2015) Repair of bone defect by nano-modified white mineral trioxide

aggregates in rabbit: A histopathological study. **Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal** 20(5), e525.

Shastri VP (2009) In vivo engineering of tissues: Biological considerations, challenges, strategies, and future directions. **Advanced Materials** 21(32-33), 3246-3254.

Sheikh Z, Brooks P, Barzilay O, Fine N, Glogauer M (2015) Macrophages, foreign body giant cells and their response to implantable biomaterials. **Materials** 8(9)5671-5701.

Shore EM, Kaplan FS (2008) Insights from a rare genetic disorder of extra-skeletal bone formation, fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). **Bone** 43(3), 427-433.

Sicca CM, Oliveira RD, Silva TD, Cestari TM, Oliveira DT, Buzalaf MAR, Kina JR (2000) Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos. Efeito do tamanho da partícula. **Rev Fac Odontol Bauru** 8(1/2)1-10.

Silverman KJ, Lund DP, Zetter BR, Lainey LL, Shahood JA, Freiman DG, Folkman J, Barger AC (1988) Angiogenic activity of adipose tissue. **Biochemical and biophysical research communications** 153(1), 347-352.

Simion M, Fontana F, Rasperini G, Maiorana C (2007) Vertical ridge augmentation by expanded-polytetrafluoroethylene membrane and a combination of intraoral autogenous bone graft and deproteinized anorganic bovine bone (Bio Oss). **Clinical oral implants research** 18(5)620-629.

Squier CA, Ghoneim S, Kremenak CR (1990) Ultrastructure of the periosteum from membrane bone. **Journal of anatomy** 171, 233.

Stevens MM, Marini RP, Schaefer D, Aronson J, Langer R, Shastri VP (2005) In vivo engineering of organs: the bone bioreactor. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 102(32), 11450-11455.

Suckow MA, Voytik-Harbin SL, Terril LA, Badylak SF (1999) Enhanced bone regeneration using porcine small intestinal submucosa. **Journal of Investigative Surgery** 12(5), 277-287.

Tang XM, CHAI BF (1986) Ultrastructural investigation of osteogenic cells. **Chinese Medical Journal** 99:950-956.

Trindade R, Albrektsson T, Tengvall P, Wennerberg A (2016) Foreign body reaction to biomaterials: on mechanisms for buildup and breakdown of osseointegration. **Clinical implant dentistry and related research** 18(1)192-203.

Uriel S, Huang JJ, Moya ML, Francis ME, Wang R, Chang SY, Brey EM (2008) The role of adipose protein derived hydrogels in adipogenesis. **Biomaterials** 29(27), 3712-3719.

Urist MR (1965) Bone: formation by autoinduction. **Science**, 150(3698), 893-899.

Urist MR, DeLange RJ, Finerman GA (1983) Bone cell differentiation and growth factors. **Science** 220(4598), 680-686.

Vignery A (2000) Osteoclasts and giant cells: macrophage–macrophage fusion mechanism. **International journal of experimental pathology** 81(5)291-304.

Yin Y, Cui Q, Li Y, Irwin N, Fischer D, Harvey AR, Benowitz LI (2003) Macrophage-derived factors stimulate optic nerve regeneration. **Journal of Neuroscience** 23(6)2284-2293.

Zambuzzi WF, Oliveira RCD, Pereira FL, Cestari TM, Taga R, Granjeiro JM (2006) Rat subcutaneous tissue response to macrogranular porous anorganic bovine bone graft. **Brazilian dental journal** 17(4), 274-278.

Zhang QX, Magovern CJ, Mack CA, Budenbender KT, Ko W, Rosengart TK (1997) Vascular endothelial growth factor is the major angiogenic factor in omentum: mechanism of the omentum-mediated angiogenesis. **Journal of Surgical Research** 67(2), 147-154.

Zhang QX, Magovern CJ, Mack CA, Budenbender KT, Ko W, Rosengart TK (1997) Vascular endothelial growth factor is the major angiogenic factor in omentum: mechanism of the omentum-mediated angiogenesis. **Journal of Surgical Research** 67(2)147-154.