

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA  
FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

***CAMPUS DE JABOTICABAL***

**Osso esponjoso liofilizado de cão utilizado como enxerto  
puro e associado a plasma rico em plaquetas ou medula  
óssea em falhas ósseas induzidas em coelhos – estudo  
experimental.**

**Gláucia de Oliveira Morato**

Médica Veterinária

Jaboticabal - São Paulo - Brasil

Fevereiro - 2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA  
FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

**CAMPUS DE JABOTICABAL**

**Osso esponjoso liofilizado de cão utilizado como enxerto  
puro e associado a plasma rico em plaquetas ou medula  
óssea em falhas ósseas induzidas em coelhos – estudo  
experimental.**

**Gláucia de Oliveira Morato**

**Orientador: Prof. Dr. João Guilherme Padilha Filho**

**Coorientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Paola Castro Moraes**

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

Jaboticabal - São Paulo - Brasil

Fevereiro - 2013

M831o Morato, Gláucia de Oliveira  
Osso esponjoso liofilizado de cão utilizado como enxerto puro e associado a plasma rico em plaquetas ou medula óssea em falhas ósseas induzidas em coelhos – estudo experimental. – Jaboticabal, 2013  
xxi, 80 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013  
Orientador: João Guilherme Padilha Filho  
Coorientadora: Paola Castro Moraes  
Banca examinadora: Bruno Watanabe Minto, Gustavo Garkalns de Souza Oliveira  
Bibliografia

1. Cirurgia. 2. Enxerto ósseo esponjoso. 3. Liofilização. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:617:636.92

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.  
e-mail: arnold@cnpso.embrapa.br

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

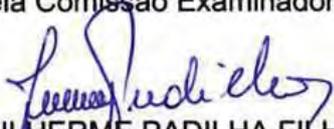
**TÍTULO:** OSSO ESPONJOSO LIOFILIZADO DE CÃO UTILIZADO COMO ENXERTO PURO E ASSOCIADO A PLASMA RICO EM PLAQUETAS OU MEDULA ÓSSEA EM FALHAS ÓSSEAS INDUZIDAS EM COELHOS - ESTUDO EXPERIMENTAL

**AUTORA:** GLÁUCIA DE OLIVEIRA MORATO

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. JOAO GUILHERME PADILHA FILHO

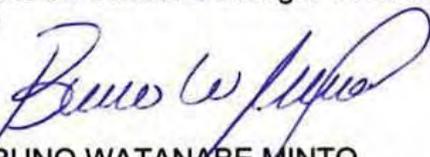
**CO-ORIENTADORA:** Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. JOAO GUILHERME PADILHA FILHO

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. BRUNO WATANABE MINTO

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. GUSTAVO GARKALNS DE SOUZA OLIVEIRA

Centro Universitário Barão de Mauá / Ribeirão Preto/SP

Data da realização: 27 de fevereiro de 2013.

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**GLÁUCIA DE OLIVEIRA MORATO** - nascida em 7 de dezembro de 1984, em Piumhi-MG. Médica Veterinária formada pela Universidade Federal de Viçosa - MG, em janeiro de 2009. Realizou residência em Clínica Cirúrgica e Anestesiologia de Pequenos Animais de 2009 a 2011 no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV/ UNESP – Jaboticabal - SP. Em março de 2011 ingressou no Mestrado pelo Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária da FCAV – UNESP – *Campus* de Jaboticabal – SP, onde atua no Setor de Cirurgia de Pequenos Animais e desenvolve diversos projetos de pesquisa.

*Dedico este trabalho aos meus pais,  
que são tão puros no seu amor incondicional,  
e ao meu querido amor Artur.*

## Agradecimentos

- A Deus, que sempre me ajuda nas minhas escolhas,
- A meus pais e meu irmão, que me deram força durante toda minha jornada em Jaboticabal. Amo muito vocês e suas forças me ajudaram a progredir e a superar todos os obstáculos que encontrei,
- A minha equipe de trabalho: Denisa, Paulet, Pâmela, Michele e Artur. Obrigada pela participação de vocês nesta pesquisa,
- Ao Professor João Guilherme Padilha Filho, meu orientador, que é uma inspiração para mim na arte da cirurgia. Obrigada pelos seus ensinamentos, pelas boas conversas e pela confiança, os quais permitiram meu amadurecimento profissional,
- Ao Professor José Antônio Marques, que teve papel fundamental para que fosse possível realizar esta pesquisa. Obrigada pelo apoio financeiro e pela confiança,
- Ao Professor Júlio Carlos Canola, por ter permitido que o setor de radiologia fosse utilizado neste estudo. Ao João do Raio-x, por se mostrar disponível para radiografar meus coelhos!
- Ao Sr. Orandi, por ter voltado ao Departamento de Morfologia para confeccionar minhas lâminas,
- Ao Professor Delphim, por emprestar o densitômetro digital
- Ao Professor João Ademir que me ajudou tão prontamente na análise estatística deste trabalho,
- À EMBRARAD, que realizou gratuitamente a esterilização dos enxertos ósseos utilizados nesta pesquisa,
- À FAPESP, pela bolsa de mestrado, sem a qual seria impossível a realização desta pesquisa,
- Ao meu querido amor Artur Gouveia Rocha. Meu companheiro sempre. Esteve comigo em todas as etapas desta pesquisa, em todas as incertezas e medos que tive e em todas as alegrias, risadas e aventuras que tivemos. Sempre juntos .... Te amo muito!!!

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xviii
RESUMO .....	xxi
ABSTRACT .....	xi
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1 Regeneração Óssea .....	3
2.2 Enxertos ósseos .....	5
2.2.1 Classificações.....	5
2.2.2 Funções.....	6
2.2.3 Coleta dos enxertos.....	8
2.3 Liofilização .....	9
2.4 Medula óssea .....	10
2.5 Plasma rico em plaquetas .....	12
3. OBJETIVOS .....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	17
4.1 Instalações .....	17
4.2 Animais.....	17
4.3 Obtenção do enxerto ósseo esponjoso de cão .....	17
4.4 Grupos experimentais .....	20
4.5 Implantação do enxerto .....	21
4.5.1 Pré-operatório .....	21
4.5.2 Anestesia .....	21
4.5.3 Procedimento Cirúrgico .....	22
4.5.4 Pós-operatório .....	26
4.6 Avaliações pós- implantação .....	28
4.6.1 Avaliação Clínica .....	28
4.6.2 Avaliação Radiográfica.....	28
4.6.3 Avaliação Histológica .....	30
4.6.4 Análise estatística.....	31
5. RESULTADOS .....	32
5.1 Avaliação Clínica .....	32

5.2 Avaliação radiográfica .....	32
5.2.1 Avaliação da incorporação do enxerto .....	32
5.2.2 Avaliação da formação de ponte óssea .....	36
5.2.3 Reabsorção do enxerto.....	41
5.2.4 Achados radiográficos qualitativos no grupo controle no grupo controle....	41
5.2.5 Índice de mineralização das falhas ósseas (preenchimento) .....	43
5.3 Análise morfológica .....	46
5.3.1 Achados macroscópicos .....	46
5.3.2 Achados histológicos .....	46
5.3.2.1 Qualidade da união .....	48
5.3.2.2 Formação de ponte óssea/córtex.....	51
5.3.2.3 Incorporação do enxerto.....	53
5.3.2.4 Achados histológicos do grupo controle.....	57
6. DISCUSSÃO .....	59
7. CONCLUSÃO .....	68
8. REFERÊNCIAS.....	69
Anexo I .....	77
Anexo II .....	79
Anexo III .....	80

## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

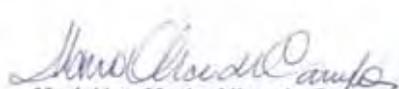
## CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 018421/11 do trabalho de pesquisa intitulado "**Uso de enxerto ósseo esponjoso liofilizado de cão associado a plasma rico em plaquetas ou medula óssea em falhas ósseas induzidas em coelhos – estudo experimental**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. João Guilherme Padilha Filho está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 02 de Setembro de 2011.

Jaboticabal, 05 de Setembro de 2011.



**Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui**  
Presidente - CEUA



**Med. Vet. Maria Alice de Campos**  
Secretária - CEUA

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela</b>		<b>Página</b>
Tabela 1	Descrição da escala de graduação utilizada para avaliação histológica (somatório geral de 0 a 14). Fonte: Salkeld et al. (2001) modificada.	79
Tabela 2	Resultados da contagem plaquetária das amostras sanguíneas coletadas dos animais do GEPRP para preparo do PRP e quantidade plaquetas e volume obtido após seu processamento.	80
Tabela 3	Frequência de observações dos escores em relação à integração do enxerto nas interfaces dos grupos GE, GEM e GEPRP e em cada momento pós-operatório.	33
Tabela 4	Frequência dos escores observados em relação à integração do enxerto nas interfaces de cada grupo tratado e em cada grupo tratado nos diferentes tempos pós-operatórios.	36
Tabela 5	Frequência das observações em relação à formação de ponte óssea nas interfaces de cada grupo tratado nos diferentes tempos pós-operatórios.	40
Tabela 6	Médias gerais do índice de mineralização (IM) dos grupos GE, GEM, GEPRP e C em relação aos momentos de observação: pós-operatório imediato, 45 dias e 90 dias após a cirurgia, e valor mínimo e máximo do IM em cada momento.	44
Tabela 7	Médias gerais do índice de mineralização, incluindo todos os tempos, em cada grupo experimental e, valor mínimo e máximo do IM de cada grupo.	44
Tabela 8	Resumo da análise de variância do índice de mineralização observado entre momentos e grupos e da interação entre momento x grupo.	44
Tabela 9	Resumo da diferença do índice de mineralização observado entre momentos de cada grupo.	45

Tabela 10	Graduação histológica da consolidação óssea nos grupos tratados em cada período pós-cirúrgico.	47
Tabela 11	Escore gerais dos grupos tratados incluindo todos os períodos de avaliação histológica por grupo (45 dias e 90 dias).	47
Tabela 12	Medianas dos escores do grupo controle.	57

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figuras</b>		<b>Página</b>
Figura 1	Processamento de osso esponjoso de cão para enxertia. A) Enxertos ósseos imersos em solução de etanol e clorofórmio (1:1). B) Tecido ósseo esponjoso canino após processamento.	19
Figura 2	Osso esponjoso de cão liofilizado e esterilizado por irradiação gama.	20
Figura 3	Confecção de falha óssea em coelhos seguida de enxertia. A) Tricotomia do membro torácico direito do coelho. B) Posicionamento do animal para o procedimento cirúrgico: decúbito dorsal com membro tracionado caudalmente. C) Remoção segmento ósseo com o periósteo (seta) após osteotomia. D) Aspecto da falha óssea do rádio após osteotomia. E/F) Falha óssea preenchida com enxerto ósseo esponjoso de cão (seta).	23
Figura 4	Reidratação (A) e moldagem (B) do enxerto ósseo prévias ao momento da enxertia. Em B, notar a semelhança do enxerto com segmento removido do rádio (seta).	24
Figura 5	Obtenção de PRP em coelhos. (A) Posicionamento do animal para punção jugular. (B) Amostra sanguínea após primeira centrifugação. (C) Volume de plasma obtido, acondicionado em outro tubo. (D) Aspecto do plasma após a segunda centrifugação e descarte do sobrenadante. (E) Aspecto do PRP envolvendo o enxerto ósseo esponjoso no trans-operatório.	27
Figura 6	Exemplo de cálculo do Índice de Mineralização (IM). A: área mais radiopaca da radiografia (média). B: área mais radiolúcida da radiografia (média). C: Média da densitometria óptica obtida na falha óssea (1.04). D: Valor do IM obtido = 6,8.	30

- Figura 7 Aspecto radiográfico da evolução da consolidação do defeito segmentar produzido no rádio dos animais dos grupos tratados e da integração do enxerto. Notar que no pós-operatório imediato é possível delimitar o contorno dos enxertos ósseos e a transição enxerto/rádio. Aos 45 dias após a enxertia, enxerto incorporado em pelo menos uma das interfaces e aos 90 dias após a cirurgia, enxerto completamente integrado. P.O.: pós-operatório imediato. GE, GEM e GEPRP: grupos experimentais. 34
- Figura 8 Aspecto radiográfico da falha óssea demonstrando ausência de incorporação do enxerto. As imagens mostram a primeira e a última avaliação radiográfica a qual os animais foram submetidos. Em A/B e C/D, observar a presença de linha radiolucida em ambas as interfaces 90 dias após a enxertia. Em E/F, da mesma forma observa-se linha radiolucida (seta) 90 dias pós-operatórios e discreta reabsorção do enxerto. Em G/H, notar linha radiolucida (seta) em uma das interfaces aos 45 dias pós-operatórios e incorporação moderada na outra interface. P.O.: pós-operatório imediato. GE, GEM e GEPRP: grupos experimentais. 35
- Figura 9 Frequência de observações dos escores em relação à formação de ponte óssea nas interfaces dos grupos tratados e em cada momento pós-operatório. 37
- Figura 10 Aspecto radiográfico da formação de ponte óssea aos 45 dias pós-operatórios em animais do grupo GE. P.O.: pós-operatório imediato. 37
- Figura 11 Aspecto radiográfico da formação de ponte óssea aos 45 dias pós-operatórios em animais do grupo GEM. P.O.: pós-operatório imediato. 38

- Figura 12 Aspecto radiográfico da formação de ponte óssea aos 45 dias pós-operatórios em animais do grupo GEPRP. P.O.: pós-operatório imediato. 38
- Figura 13 Aspecto radiográfico da formação de ponte óssea aos 45 dias e 90 dias pós-operatórios. Observar ponte óssea classificada em moderada (seta, C) em animal do GE aos 90 dias e, em “não observada” aos 45 dias (B), muito embora houvesse a presença de reação óssea no rádio sugestiva de início de formação de ponte. Nos animais dos grupos GEM e GEPRP é possível observar intensa formação de ponte óssea aos 45 dias que se remodela aos 90 dias. 39
- Figura 14 Aspecto radiográfico da falha óssea dos animais do grupo controle, em projeção médio-lateral, imediatamente após a cirurgia. 41
- Figura 15 Aspecto radiográfico da consolidação óssea dos animais do grupo controle com acompanhamento até o 90º dia pós-operatório. Em A e B, imagens da falha óssea do coelho 37 aos 45 e 90 dias pós-operatórios, respectivamente. Em C e D, imagens da falha óssea do coelho 38 aos 45 e 90 dias pós-operatórios respectivamente. 42
- Figura 16 Aspecto radiográfico da consolidação óssea dos animais do grupo controle com acompanhamento até o 45º dia pós-operatório. A, B e C mostram o grau de consolidação óssea dos coelhos 40, 41 e 42 respectivamente, aos 45 dias após a cirurgia. Notar falta de preenchimento completo da falha óssea em A e C. Em B formação intensa de ponte óssea com halo sem preenchimento remanescente na região interóssea. 42

- Figura 17 Radiografia de membro torácico de coelho do grupo GE 43  
destacando a região da falha óssea submetida à densitometria óptica. “A” representa a falha óssea preenchida com enxerto ósseo esponjoso canino e os círculos demonstram os locais onde a densidade óptica foi mensurada.
- Figura 18 Aspecto macroscópico do enxerto ósseo esponjoso canino 46  
implantado em rádio de coelho, 90 dias após a cirurgia. A musculatura foi rebatida proximalmente (direita) para expor o local da enxertia. Notar a continuidade rádio-enxerto.
- Figura 19 Escores atribuídos para “*qualidade da união*” (0-4 - eixo x) dentro 48  
dos grupos tratados GE, GEM e GEPRP (n=12). Dentro de cada grupo, as primeiras 6 colunas representam os escores dos animais eutanasiados aos 45 dias (n=6) e o restante daqueles eutanasiados aos 90 dias (n=6), ambos em ordem crescente.
- Figura 20 Aspecto histológico da união com prevalência de tecido 49  
fibrocartilaginoso. Fotomicrografia óptica da interface osso/enxerto. Observar união fibrocartilaginosa entre a região do enxerto e rádio de coelho (GEM aos 45 dias). Notar o avanço de medula óssea em direção às trabéculas do enxerto. Coloração HE. R: rádio; U: ulna; C: cortical do rádio de coelho; E: enxerto ósseo canino; F: tecido fibrocartilaginoso.
- Figura 21 Aspecto histológico da união óssea. Fotomicrografia óptica da 50  
interface osso/enxerto, de animais dos grupos GEM (1) e GEPRP (2) 90 dias após a enxertia. Notar osso hospedeiro (C) contínuo com osso novo (N) formado por entre as trabéculas do enxerto (E). Na imagem 1 é possível visibilizar trabéculas remanescentes do enxerto e em 2, o enxerto já substituído por osso novo. A linha identifica a transição entre o osso do coelho e a falha óssea preenchida com enxerto. OE: ossificação endocondral. Coloração HE.

- Figura 22 Escores atribuídos para “*formação de ponte óssea*” (0-4 - eixo x) dentro dos grupos tratados GE, GEM e GEPRP (n=12). Dentro de cada grupo, as primeiras 6 colunas representam os escores dos animais de 45 dias (n=6) e o restante de animais de 90 dias (n=6), ambos em ordem crescente. 51
- Figura 23 Aspecto histológico da formação de ponte óssea. Acima, fotografia da lâmina histológica permitindo visualização do rádio (R) contínuo com o enxerto ósseo esponjoso canino e a ulna (U) do coelho do grupo GEPRP, 45 dias após a enxertia. Abaixo, fotomicrografia óptica da interface osso/enxerto. Observar a formação da ponte óssea (sentido indicado pelas setas) composta por grande quantidade de osso novo. Nota-se o fechamento sub-total da ponte restando apenas discreta quantidade de tecido fibroso (F) interposto ao osso novo. Notar a grande quantidade de osso novo (N) e resquícios do enxerto (E). Coloração HE. OE: ossificação endocondral; M: medula óssea. 52
- Figura 24 Escores atribuídos para “*incorporação do enxerto*” (0-6 - eixo x) dentro dos grupos tratados GE, GEM e GEPRP (n=12). Dentro de cada grupo, as primeiras 6 colunas representam os escores dos animais sacrificados aos 45 dias (n=6) e o restante daqueles sacrificados aos 90 dias (n=6), ambos em ordem crescente. 53
- Figura 25 Aspecto histológico da incorporação do enxerto e formação de osso novo. Acima, fotografia da lâmina em coelho do grupo GEM 45 dias após a enxertia. Abaixo, fotomicrografia óptica da região central do enxerto. Notar presença de linhas de osteoblastos (setas pretas) e união entre o osso novo produzido e enxerto ósseo (círculo). Observar o crescimento de vasos dentro das trabéculas do enxerto (seta amarela). Notar ainda, osteoclasto realizando reabsorção óssea (seta verde). Coloração HE. F: tecido fibroso; N: osso novo; E: enxerto ósseo canino; R: rádio; 54

U: ulna;

- Figura 26 Aspecto histológico da incorporação do enxerto e formação de osso novo. Animal do grupo GEPRP, 45 dias após a enxertia. A imagem mostra área com excelente incorporação do enxerto (E) com o osso novo (N) formado ao longo de suas trabéculas e reorganização medular em meio ao tecido ósseo neoformado. Coloração HE (1) e TM (2). M: medula óssea. 55
- Figura 27 Fotomicrografias da região do enxerto de animal do grupo GE, 45 dias após a enxertia. Na imagem 1, notar a intensa vascularização formada em meio às trabéculas do enxerto. A imagem 2 mostra início de organização de medula óssea (\*) no tecido fibroso presente no interior das trabéculas. Coloração HE. F: tecido fibrosocartilaginoso; N: osso neoformado; V: vaso sanguíneo; E: enxerto ósseo canino. 56
- Figura 28 Aspecto histológico da falha óssea de animal do grupo controle, 45 dias após a cirurgia. Acima, fotografia da lâmina histológica mostrando rádio (R), tecido formado na falha óssea e ulna (U). Abaixo, fotomicrografia óptica da interface do osso do coelho (C) e com a falha óssea permitindo visualizar seu preenchimento com tecido fibroso (F). M: medula óssea/ canal medular. Coloração HE. 58

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP: adenosina difosfato

atm: atmosfera

ATP: adenosina trifosfato

C: grupo controle

cm: centímetros

CP: concentrado de plaquetas

CTGF: fator de crescimento de tecido conjuntivo

DO: Densitometria Óptica

EGF: fator de crescimento epidermal

FC: fatores de crescimento

FCF: fator de crescimento fibroblástico

GE: Grupo experimental enxerto ósseo esponjoso puro, sem associações

GEM: Grupo experimental enxerto ósseo esponjoso associado à medula óssea

GEPRP: Grupo experimental enxerto ósseo esponjoso associado ao plasma rico em plaquetas

HE: hematoxilina e eosina

IGF-I: fator semelhante a insulina

IL-1: interleucina um

IL-2: interleucina dois

IM: Índice de mineralização

Kg: kilogramas

KGy: kilo grey

kV: Kilovoltagem

mA: miliamperagem

mAs: miliamperagem por segundo

mm: milímetros

MSCs: Células-tronco mesenquimais (do inglês *mesenchymal stem cells*)

PDGF: fator de crescimento derivado da plaqueta

PO: pós-operatório imediato

PPP: plasma pobre em plaquetas

PRP: plasma rico em plaquetas

RPM: rotações por minuto

TGF-  $\alpha$ : fator de crescimento de transformação alfa

TGF-  $\beta$ : fator de crescimento e transformação beta

TM: Tricrômio de Masson

TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa

VEGF: fator de crescimento vascular endotelial

## RESUMO

Este estudo objetivou descrever a reparação óssea ao se utilizar enxerto esponjoso liofilizado de cão, e determinar se a associação de plasma rico em plaquetas (PRP) ou medula óssea autógena (MO) ao enxerto seria benéfica ao processo de regeneração óssea. Foi feita ostectomia segmentar no rádio de 42 coelhos machos, da raça Nova Zelândia Branco, com 160 a 170 dias de idade e peso variando de 2,6 a 3,5Kg. Os grupos experimentais foram divididos de acordo com o preenchimento da falha: GE, enxerto puro; GEM, enxerto associado a MO; GEPRP, enxerto associado ao PRP e, controle, falha vazia. Para análise histológica foi feita eutanásia de metade dos animais de cada grupo 45 dias após a cirurgia e o restante aos 90 dias. Obtiveram-se radiografias no pós-operatório imediato, aos 45 e 90 dias. No período de acompanhamento não foram observadas fístulas ou secreções. Ocorreu integração do enxerto e formação de ponte óssea radiográfica em 84,2 % e 75% das interfaces, respectivamente. O preenchimento ósseo foi maior nos animais dos grupos tratados em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ), o qual apresentou atividade óssea, porém, com preenchimento incompleto das falhas em cinco animais ( $n=6$ ). Histologicamente observou-se predominância de união óssea e cartilagem mineralizada (20,  $n=36$ ), boa integração do enxerto (28,  $n=36$ ) e grande quantidade de osso novo formado. A associação de MO ou PRP ao osso liofilizado foi benéfica ao processo de consolidação, gerando maior formação de ponte óssea entre o enxerto e o osso hospedeiro em comparação ao GE ( $p > 0,05$ ). A adição de MO induziu maior preenchimento do enxerto, radiograficamente perceptível, em relação demais grupos aos 45 dias ( $p < 0,05$ ). O GEPRP apresentou maior quantidade de osso novo aos 45 dias e maior substituição do enxerto pelo osso novo em relação aos grupos experimentais GE e GEM. A liofilização e esterilização forneceram enxertos com baixa antigenicidade e livres de contaminações. O enxerto ósseo esponjoso canino liofilizado mostrou-se osteointegrável e com propriedades de osteocondução e osteoindução. Ainda, atuou como bom preenchedor de falhas ósseas guiando o processo de regeneração.

**Palavras-chave:** cirurgia, enxerto ósseo esponjoso, liofilização.

## ABSTRACT

This study aimed to describe the bone repair using canine freeze-dried cancellous bone graft, and determine whether the association of platelet rich plasma (PRP) or autogenous bone marrow (BM) graft would be beneficial to the process of bone healing. Segmental osteotomy was made on the radio of 42 male rabbits, New Zealand White, with 160 and 170 days of age and weighing 2.6 to 3.5 kg. The experimental groups were divided according to the filling gap: GE, only cancellous bone graft; GEM, cancellous bone graft with MO; GEPRP, cancellous bone graft with PRP, and control, empty gap. For histological analysis euthanasia was performed on one half of the animals in each group 45 days after surgery and in the remaining it was made 90 days after. Radiographs were obtained in the immediate postoperative period, at 45 and 90 days. In the follow-up period there were no fistulas or secretions. Cancellous bone graft integration and radiographic bridging occurred in 84.2% and 75% of the interfaces, respectively. The bone fill was greater in GE, GEM e GEPRP than in control group ( $p < 0,05$ ), which showed bone activity, however, with incomplete filling of gaps in five animals ( $n=6$ ). Histologically there was predominance of mineralized cartilage and bone union (20,  $n = 36$ ), good graft integration (28,  $n = 36$ ) and large amount of new bone formed. The association of PRP or MO to the graft was beneficial to bone healing process, creating bone bridging between the graft and host bone greater than GE ( $p > 0.05$ ). The addition of bone marrow induced higher radiographically graft filling than the other groups at day 45 ( $p < 0.05$ ). GEPRP had higher amounts of new bone at 45 days and increased replacement by new bone graft than others experimental groups. Freeze-drying and gamma irradiation provided low antigenic grafts and free of contamination. The freeze-dried canine cancellous bone graft showed to be osteointegrative as well as osteoconductive and osteoinductive properties. Furthermore, it served as good bone gaps filler guiding the healing process.

**Keywords:** surgery, cancellous bone graft, freeze- drying.

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de enxertos ou substitutos ósseos representa um procedimento frequentemente utilizado para acelerar a regeneração óssea em uma extensa gama de condições na ortopedia bem como em cirurgias bucomaxilofaciais, incluindo as não-uniões, uniões atrasadas, preenchimento de falhas ósseas resultantes de fraturas cominutivas ou fraturas não reconstrutíveis, preenchimento alveolar após extração dentária, preenchimento de lesões ósseas císticas, dentre outros (FINKEMEIER, 2002).

Os enxertos diferem entre si de acordo com sua estrutura e composição podendo basicamente prover um ou mais dos componentes essenciais como matriz óssea osteocondutora; proteínas osteoindutoras e células vivas osteogênicas (DINOPOULOS; DIMITRIOU; GIANNOUDIS, 2012). Para agregar funções ao enxerto, é comum sua combinação com outros componentes que estimulem a regeneração óssea como, por exemplo, plasma rico em plaquetas, que fornece fatores de crescimento e medula óssea, que fornece células osteoprogenitoras (HERNIGOU et al., 2005; MAIA; SOUZA, 2009).

Atualmente, um grande número de enxertos e substitutos ósseos está disponível para utilização, variando do enxerto autógeno a implantes produzidos pela engenharia de biomateriais (DINOPOULOS; DIMITRIOU; GIANNOUDIS, 2012).

Embora o enxerto ósseo autógeno mantenha-se como “padrão ouro” para estimular a reparação óssea, a dor e recuperação pós-operatórias associadas ao sítio de coleta, necessidade de intervenção cirúrgica adicional e fornecimento muitas vezes insuficiente de enxerto associada a esta técnica, gera a necessidade de se buscar diferentes estratégias e substitutos ósseos. Uma alternativa utilizada em detrimento ao enxerto autógeno é a enxertia alógena, ou seja, oriunda de outros indivíduos, porém da mesma espécie (FINKEMEIER, 2002).

Enxertos alógenos e xenógenos podem ser armazenados em bancos de ossos, tornando-se facilmente disponíveis durante o ato cirúrgico em grandes quantidades. Ademais, não causam danos às estruturas ósseas do hospedeiro não

havendo necessidade de cuidados pós-operatórios relacionados à coleta do enxerto (FINKEMEIER, 2002).

Para formação de banco de ossos é necessário que este tecido seja devidamente processado e armazenado (ROOS; CAMISA JÚNIOR; MICHELIN, 2000). A liofilização tem se mostrado cada vez mais um método eficiente na conservação de tecidos para uso em longo prazo (GALIA et al., 2005). Trata-se de um método de preservação por desidratação causando mínima alteração bioquímica do tecido (BOSS, 2004).

O osso esponjoso liofilizado é rotineiramente armazenado em bancos de ossos na medicina e utilizado como enxerto. Sua aplicação é feita tanto de maneira alógena como xenógena tendo em vista a semelhança físico-química apresentada por estes ossos de diferentes origens após a liofilização (GALIA et al., 2009). Após o processamento, o osso esponjoso mantém propriedades osteocondutoras e osteoindutoras (DINOPOULOS; DIMITRIOU; GIANNOUDIS, 2012). Por ser facilmente adaptável ao leito receptor, já que pode ser esculpido ou triturado em pequenos pedaços, mostra-se uma alternativa útil para preenchimento de falhas ósseas ou mesmo para somar à quantidade de enxerto autólogo quando o suprimento deste é limitado (FINKEMEIER, 2002).

Embora na medicina veterinária existam necessidades semelhantes às aquelas encontradas na medicina no que diz respeito à enxertia, o osso liofilizado esponjoso ainda é pouco utilizado na veterinária (MILLIS; MARTINEZ, 2007).

Este estudo propôs avaliar radiográfica e histologicamente o comportamento do osso esponjoso canino liofilizado na consolidação óssea, utilizando o coelho como modelo experimental. Adicionalmente, foram avaliados os possíveis benefícios à consolidação óssea resultantes da associação do osso esponjoso liofilizado canino ao plasma rico em plaquetas e à medula óssea autógena.

Espera-se, através dos resultados obtidos, evidenciar os benefícios do uso de ossos esponjoso canino na ortopedia veterinária. Estas informações serão de grande valia para a produção de bancos de ossos esponjosos no futuro.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Regeneração óssea

A reparação óssea é um processo complexo, porém bem ordenado, iniciado em resposta a injúrias, resultando em reestabelecimento da estrutura e função do esqueleto (DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNOUDIS, 2005).

Em termos clássicos, a consolidação óssea é dividida em primária ou direta e secundária ou indireta (DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNOUDIS, 2005).

Na maioria das vezes o tipo de consolidação que ocorre é indireto. Neste processo, assim como na regeneração de outros tecidos, são identificadas fases distintas e que se sobrepõem, sendo estas: fase inflamatória, fase reparadora e fase remodeladora (CROSS, 2012).

Quando ocorre a injúria ao osso, há ruptura de vasos e formação de hematoma, que inicia então a fase inflamatória. Há influxo de células inflamatórias e liberação de interleucinas (IL-1 e IL-6) e TNF- $\alpha$  os quais têm efeito quimiotático para outras células inflamatórias (KON et al., 2001). Células mesenquimais pluripotenciais oriundas do periósteo e tecidos moles adjacentes são induzidas a se diferenciarem em fibroblastos, condroblastos e osteoblastos que iniciarão a reparação óssea. Estas células produzirão tecido fibroso, cartilagem e tecido ósseo respectivamente, de acordo com a via de ossificação que a consolidação assumir (TSIRIDIS; UPADHYAY; GIANNOUDIS, 2007; CROSS, 2012). A angiogênese é estimulada por diversos fatores de crescimento e é crítica na manutenção do processo de reparação (GERSTENFELD et al., 2003).

A consolidação secundária ocorre por meio da formação de calo ósseo formado por tecidos progressivamente mais rígidos e com maior capacidade de estabilizar o foco da lesão (CROSS, 2012). Quando da consolidação secundária a reparação óssea pode ocorrer por meio de ossificação intramembranosa ou endocondral de acordo com a estabilização mecânica interfragmentária. Quando há relativa estabilidade, a diferenciação de células mesenquimais pode ser diretamente para o fenótipo osteoblástico, havendo assim a produção rápida e direta de osso

novo formando um calo ósseo rígido. A ossificação endocondral ocorre em sítios mecanicamente menos estáveis. Neste caso as células mesenquimais se diferenciam em condroblastos, havendo a produção primeiramente de cartilagem que posteriormente se calcifica (calo ósseo macio) (DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNOUDIS, 2005).

À medida que o processo reparativo progride até seu vago ponto final, há sua sobreposição ao processo de remodelação no qual há reabsorção óssea e lento reestabelecimento do sistema Haversiano. Ao longo de anos o osso continua esta remodelação se aproximando de sua forma original (CROSS, 2012).

Para que ocorra consolidação primária dois requisitos físicos devem estar presentes, incluindo ambiente interfragmentário estável, com deformidade angular interfragmentária (do inglês “*strain*”) menor que 2% e menos de 1 mm de distância entre os fragmentos ósseos (CROSS, 2012).

Durante este processo pouca ou nenhuma resposta periosteal e formação de calo ósseo é percebida (TSIRIDIS; UPADHYAY; GIANNOUDIS, 2007).

Quando há 1 mm ou menos entre os fragmentos ósseos, há a formação de osso lamelar o qual preenche o pequeno espaço interfragmentário. O osso lamelar é orientado de forma transversal em relação ao eixo ósseo longitudinal. Por volta da terceira semana após a injúria óssea pode ser observado o remodelamento longitudinal Haversiano através do osso lamelar (CROSS, 2012).

Quando há ausência de espaço e movimentação interfragmentária, não há a formação de osso lamelar entre os fragmentos. O reestabelecimento dos canais Haversianos ocorre diretamente através da linha de fratura restaurando a continuidade óssea (CROSS, 2012).

Estas classificações remetem a eventos histológicos observados durante a reparação óssea. Ainda assim, estudos relacionados a este tema fornecem entendimentos mais profundos no aspecto bioquímico – molecular que estão, contudo, além do escopo da presente pesquisa.

## 2.2 Enxertos Ósseos

Quando o cirurgião ortopédico se depara com a necessidade de reposição óssea, frequentemente faz o uso de enxertos ósseos dos mais diferentes tipos ou mesmo de substitutos ósseos. Atualmente, enxertos ósseos são utilizados em aproximadamente 2,2 milhões de procedimentos ortopédicos anualmente na medicina e, na veterinária da mesma forma sua utilização é cada vez mais presente na rotina do cirurgião ortopédico (MILLIS; MARTINEZ, 2007; DINOPOULOS; DIMITRIOU; GIANNOUDIS, 2012).

Os enxertos ósseos possuem diferentes propriedades sendo que a escolha do cirurgião a respeito de qual o tipo adequado a ser utilizado deve ser baseada no que será requerido do enxerto (suporte estrutural, formação óssea, ambos), na disponibilidade do enxerto, na condição do leito receptor e, por fim, o custo deve ser ponderado. Ademais, é necessário ter em mente que fixação estável é necessária independente do enxerto para se obter bom resultado no tocante à regeneração óssea (FINKEMEIER, 2002).

### 2.2.1 Classificações

Os enxertos ósseos são classificados de acordo com seu local de origem e composição. De acordo com Denny e Butterworth, (2006), enxertos ósseos podem ser obtidos do próprio indivíduo (autólogo/autógeno), de indivíduos da mesma espécie (homólogo/alógeno) ou ainda de indivíduos de espécies diferentes (heterólogo/ xenógeno), sendo que os dois últimos devem passar por algum tipo de processamento para conservação e estocagem em banco de ossos previamente a implantação no hospedeiro.

Em relação à composição, tecidos ósseos esponjosos, corticais, corticoesponjosos e osteocondrais, podem ser utilizados para enxertia. O tecido esponjoso consiste de tecido ósseo trabecular removido do interior de ossos longos na região metafisária, sendo mais comumente utilizado para preenchimento de falhas ósseas. Já o tecido cortical é composto por osso compacto, que promove principalmente suporte estrutural. O cortico-esponjoso é a associação dos dois

anteriores, enquanto que o tecido osteocondral resulta da associação entre cartilagem articular e osso subcondral (MILLIS; MARTINEZ, 2007).

### 2.2.2 Funções

As características biológicas de cada enxerto variam, fazendo que os mesmo apresentem diferentes propriedades de osteoindução, osteocondução, osteogênese e suporte estrutural (DINOPOULOS; DIMITRIOU; GIANNOUDIS, 2012).

A osteoindução é o processo pelo qual células tronco mesenquimais pluripotenciais e células osteoprogenitoras são induzidas a diferenciarem-se em osteoblastos, que então proliferam e produzem matriz mineralizada. Esta indução ocorre após exposição das células mesenquimais à matriz óssea e a várias moléculas incluindo a proteína óssea morfogênica (BMP) e outros fatores de crescimento (CAVASSANI; MORAES; PADILHA FILHO, 2001; MILLIS; MARTINEZ, 2007; DINOPOULOS; DIMITRIOU; GIANNOUDIS, 2012).

A osteoindução está presente em maior intensidade em enxertos frescos. Após serem submetidos ao congelamento ou liofilização, os enxertos corticais alógenos ou xenógenos perdem a capacidade osteoindutora. No caso dos ossos esponjosos a capacidade osteoindutora também é reduzida pelo processamento, muito embora haja certa manutenção desta função (DINOPOULOS; DIMITRIOU; GIANNOUDIS, 2012).

Outra propriedade importante dos enxertos ósseos é a osteocondução, processo tridimensional de crescimento de capilares, tecidos perivasculares e células osteoprogenitoras do leito receptor para o interior do enxerto, o qual servirá de molde para o intracrescimento desses tecidos (GOLDBERG; STEVENSON, 1987; CORNELL; LANE, 1998; MARTINEZ; WALKER, 1999; FINKEMEIER, 2002). A osteocondução é dependente da arquitetura do enxerto, sendo mais rápida em tecido esponjoso do que em tecido cortical, devido à maior porosidade do primeiro (CORNELL; LANE, 1998).

A osteogênese é a formação de osso novo por células do enxerto que sobreviveram à transferência do local doador para o leito receptor. Por resultar da transferência de células vivas, só ocorre em enxertos autógenos (MILLIS;

MARTINEZ, 2007; DINOPOULOS; DIMITRIOU; GIANNOUDIS, 2012). Alguns estudos *in vitro* sugerem que 60% das células transplantadas, mantidas em solução salina à temperatura ambiente podem sobreviver até três horas após a coleta (MILLIS; MARTINEZ, 2007).

O osso esponjoso autógeno é mais osteogênico em comparação ao enxerto cortical autógeno. Embora os enxertos preservados não possam produzir osso imediatamente devido à ausência de células vivas viáveis, enxertos frescos e preservados podem contribuir para regeneração óssea por meio da osteoindução e osteocondução (FINKEMEIER, 2002; MILLIS; MARTINEZ, 2007).

O suporte estrutural é outra propriedade que um enxerto pode apresentar. É uma característica observada apenas nos enxertos corticais, autógenos ou não, os quais têm basicamente a função de prover suporte estrutural e osteocondução (WEIGEL, 1996; ZILLOTTO et al., 2003; MILLIS; MARTINEZ, 2007; PADILHA FILHO; PENHA; SOUZA, 2008). Eles conferem primariamente sustentação mecânica, agindo como preenchedores de espaço ou escoras de sustentação de peso, juntamente com o dispositivo de fixação interna rígida que o fixa ao leito receptor (FINKEMEIER, 2002). Os aloimplantes corticais são excelentes meios de suporte mecânico, possuem potencial osteocondutor embora este seja maior em ossos esponjosos, porém, estimulam pouca resposta osteogênica por serem acelulares. A dificuldade encontrada frente ao uso desta técnica é a grande variação dos tamanhos dos esqueletos dos animais, o que reduz consideravelmente a possibilidade de se encontrar um doador que seja compatível com a conformação física do animal receptor.

Osso esponjoso, tanto autógeno quanto alógeno, é um bom preenchedor de lacunas e falhas ósseas, contudo não proporciona substancial suporte estrutural imediato. Alguns autores afirmam que este tipo de enxerto pode fornecer algum suporte mecânico em relação à compressão (FINKEMEIER, 2002; DINOPOULOS; DIMITRIOU; GIANNOUDIS, 2012).

### 2.2.3 Coleta dos enxertos

O enxerto ósseo esponjoso pode ser colhido da metáfise de qualquer osso longo e pode ser implantado de maneira autógena. Os sítios de coleta mais comuns incluem a crista ilíaca, úmero proximal e tibia proximal. Porém, esta técnica muitas vezes fornece quantidade insuficiente de material, além de aumentar o risco de infecções cirúrgicas, de dor pós-operatória e a ocorrência de transtornos durante o procedimento para reposicionamento do animal para coleta (SANTOS; RAHAL, 2004; DINOPOULOS; DIMITRIOU; GIANNOUDIS, 2012).

O osso cortical autógeno tem seu uso limitado, devido à dificuldade que se enfrenta em encontrar um local doador que não cause prejuízo pós-operatório ao paciente. Segmentos ósseos corticais autógenos podem ser coletados da ulna ou das costelas, por exemplo, sem maiores complicações. Ainda assim, permanecem os inconvenientes de um segundo procedimento cirúrgico, reposicionamento do paciente, aumento do tempo de anestesia e dor e necessidade de cuidados pós-operatórios relacionados ao sítio de coleta (DENNY; BUTTERWORTH, 2006).

Quando se trata de enxertos corticais e esponjosos alógenos ou xenógenos, sua coleta deve ser feita em animais jovens, porém, esqueleticamente maduros, livres de doenças neoplásicas ou infecto-contagiosas. O doador pode ter sido submetido à eutanásia ou ter vindo a óbito desde que a coleta dos enxertos seja realizada imediatamente (DENNY; BUTTERWORTH, 2006). Estes são armazenados em bancos de tecido ósseo para enxertia.

Bancos de ossos fornecem comodidade e praticidade ao cirurgião visto que possibilitam a rápida obtenção de fragmentos ósseos em grandes quantidades e formas variadas para serem utilizados como enxerto no procedimento cirúrgico (ROOS; CAMISA JUNIOR; MICHELIN, 2000).

Os enxertos obtidos em bancos de ossos devem ser processados e conservados de forma que possam ficar armazenados até o momento do procedimento cirúrgico no qual serão utilizados. Existem diversos métodos de conservação de ossos tais como glicerina, mel, congelamento, tintura de iodo a 2%, liofilização e esterilização em óxido de etileno e irradiação gama (ALIEVI, 2006).

Devido ao fato de tais ossos terem sido retirados de outros indivíduos para uso alógeno ou mesmo xenógeno, há o risco de transmissão de doenças e contaminação dos enxertos durante a manipulação. Sendo assim, quando da escolha do doador, há a necessidade de se seguir rigorosamente os critérios de inclusão para doação de ossos no tocante a ausência de doença infecciosa sistêmica ou neoplásica do doador, sendo também necessária a escolha de métodos confiáveis de conservação de tecidos visto que alguns deles não apresentam eficiência na eliminação de todos os tipos de micro-organismos, sobretudo de formas esporuladas (ALIEVI, 2006; ROOS; CAMISA JUNIOR; MICHELIN, 2000).

Tendo em vista que durante a estocagem dos ossos por longos períodos pode haver contaminação destes tecidos, é imperativa a realização de avaliações microbiológicas periódicas a fim de averiguar a integridade dos enxertos (FARRINGTON et al. 1998).

### **2.3 Liofilização**

Para o procedimento cirúrgico de enxertia é necessário que os ossos para implante sejam previamente retirados do animal doador e preservados de uma forma adequada (PAPAS, 1968; ROOS; CAMISA JUNIOR; MICHELIN, 2000). Diferentes métodos de processamento e armazenamento de tecido ósseo têm sido propostos e intensamente estudados. Entre esses métodos está a liofilização, que permite o processamento, a esterilização e o armazenamento de enxertos ósseos (FEOFILOFF; GARCIA, 1996).

A técnica de liofilização consiste basicamente no congelamento rápido do osso, previamente lavado e desengordurado, seguida da retirada da umidade do tecido. Esta desidratação ocorre pelo fenômeno da sublimação, ou seja, passagem da água do estado sólido diretamente para o gasoso, sem passar pelo estado líquido. Este fenômeno é obtido por meio do liofilizador, o qual mantém em seu interior condições de baixa temperatura e pressão necessárias para que ocorra a sublimação. Desta forma ocorre mínima alteração bioquímica do tecido e preservação de sua estrutura celular, o que não ocorreria no processo de desidratação convencional por evaporação (CRENSHAW, 1991; BOSS, 2004).

Por não se tratar de um processo estéril, o material liofilizado requer subsequente esterilização o que permite desta forma seu uso com segurança para posterior enxertia cirúrgica. A esterilização é realizada preferencialmente por irradiação gama ou autoclavagem (FEOFILOFF; GARCIA, 1996; HACHIYA et al., 1999; CORNU et al., 2000). Segundo alguns autores, tanto a liofilização como o processo de esterilização resultam em alterações biomecânicas e maior fragilidade do enxerto ósseo (STEVENSON, 1998, CORNU et al., 2000). Ainda assim, vale ressaltar que alguns autores afirmam que o processo conjunto de liofilização e reidratação do osso não altera sua propriedade biomecânica de compressão (MACEDO et al., 1999), sendo necessários mais estudos a respeito.

A liofilização tem se mostrado cada vez mais um método eficiente na conservação de tecidos para uso em longo prazo (GALIA et al., 2005; VULCANI; MACORIS; PLEPIS, 2008). O osso liofilizado pode ser armazenado por um período de aproximadamente cinco anos (CRENSHAW, 1991), além disso, pode permanecer em temperatura ambiente (PAPAS, 1968; TOMFORD et al., 1983). Esses fatores facilitam sobremaneira o manuseio transoperatório, o envio do material para hospitais de diferentes localidades e sua estocagem, que pode ser feita em pacotes ou pequenos frascos de vidro bastando que sejam acondicionados em locais limpos e secos (OLIVEIRA et al., 2007).

O processo de liofilização óssea proporciona diminuição da antigenicidade do enxerto e conseqüentemente menor risco de rejeição pelo receptor. Adicionalmente, a liofilização, associada à esterilização, é considerada um dos processamentos de tecidos com menor risco de transmissão de doenças (KÜBLER et al., 1993), propriedade esta de suma importância tanto na medicina, quanto na veterinária.

## **2.4 Medula óssea**

A medula óssea tem como uma das principais e mais conhecidas funções a hematopoiese de células eritróides, granulocíticas, megacariocíticas e linfocitárias. Nos animais em crescimento, o tecido medular e conseqüentemente a hematopoiese ocorre no interior dos ossos longos e chatos. À medida que o animal envelhece, ocorre sua substituição por tecido adiposo, confinando a medula ativa nos locais

onde há osso esponjoso, tais como, epífises e metáfises de ossos longos e crista ilíaca (MULLER et al., 2009).

No estroma medular são encontradas células tronco hematopoiéticas as quais são pluripotentes, com capacidade de diferenciação em células sanguíneas e células do sistema imunológico (HERNIGOU et al., 2005).

Adicionalmente, a medula óssea contém em seu estroma precursores de células osteogênicas. Também conhecidas como células-tronco mesenquimais (MSCs) ou unidades formadoras de colônias fibroblásticas, tratam-se de células tronco não-hematopoiéticas multipotentes que têm a capacidade de se renovar e diferenciar em várias linhagens de tecido conjuntivo, incluindo osso, cartilagem, tecido adiposo, tendão e músculo, o que a torna uma esperança para o tratamento de diversas doenças (MULLER et al., 2009).

Sabe-se que as MSCs desempenham papel fundamental durante a consolidação óssea, sendo recrutadas de diversos tecidos, incluindo a medula óssea, periósteo, endósteo, tecidos moles adjacentes para se diferenciarem em células da linhagem osteogênica (osteoblastos) e gerando assim a formação óssea (DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNOUDIS, 2005).

A redução do número de células progenitoras na medula óssea, decorrente de alguma alteração fisiológica nos animais, ou em fumantes e alcoólatras no caso de humanos, está associado a atrasos na consolidação óssea (POULTON et al., 1993; HERNIGOU et al., 2005).

Amostras de medula óssea de tíbia apresentando não-união óssea possuem quantidade significativamente menor de células progenitoras comparadas com a medula óssea de pacientes normais (HERNIGOU; BEAUJEAN, 1997). Esta deficiência pode também ocorrer mediante trauma, infecção, falhas teciduais e comprometimento vascular, assim como é observado em não-uniões. Desta forma, a reparação normal do tecido ósseo pode ser limitada pelo decréscimo na população de MSCs locais, sendo importante nestes casos a incorporação de celularidade multipotente ao sítio de reparação (HERNIGOU et al., 2005).

A capacidade osteogênica da medula óssea foi inicialmente demonstrada em coelhos por Goujon (1869). Em virtude disso, aspirados de medula óssea têm sido utilizados para estimular a formação óssea por meio da provisão de MSCs e de

fatores de crescimento secretados por estas células. Este potencial têm sido explorado por meio de seu uso isoladamente ou em associação com enxertos (FINKEMEIER, 2002; HERNIGOU et al., 2005; DINOPOULOS; DIMITRIOU; GIANNOUDIS, 2012).

A colheita de medula óssea pode ser realizada na crista ilíaca, no trocânter maior do fêmur, na área transilíaca, e na região epifisária proximal do úmero. O material deve ser coletado em condições assépticas, com o paciente sob anestesia geral e devem ser utilizadas seringas contendo anticoagulantes para realizar a sucção do estroma medular (MULLER et al., 2009). O aspirado de medula óssea pode ser submetido à centrifugação com intuito de promover a separação entre as células medulares e o restante do plasma (DINOPOULOS; DIMITRIOU; GIANNOUDIS, 2012).

Injeções de medula óssea autógena possuem diversas vantagens: é uma técnica segura, relativamente simples e de baixo custo; está associada a poucas complicações no sítio de coleta e, a possibilidade de ser aplicada por via percutânea pode encorajar os cirurgiões a instituir um tratamento precoce e pouco invasivo nos casos em que se deseja otimizar a regeneração óssea (FINKEMEIER, 2002; HERNIGOU et al., 2005).

A aplicação de medula óssea isoladamente tem potenciais inconvenientes como a tendência do material injetado de escorrer para fora do foco da fratura. Por este motivo, muitos autores têm estudado a viabilidade de se aplicar a medula óssea associada a um carreador, um enxerto ósseo (FINKEMEIER, 2002). Assim, a associação de medula óssea a enxertos ósseos pode ter importante papel na regeneração óssea tendo em vista a incorporação de celularidade multipotente ao enxerto.

## **2.5 Plasma rico em plaquetas (PRP)**

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos anucleados, discóides, derivados dos megacariócitos. Esses fragmentos apresentam importante função no processo de coagulação do sangue e são essenciais no processo inflamatório, na

reparação tecidual através da interação célula-célula e liberação de mediadores químicos (MAIA; SOUZA, 2009).

As plaquetas apresentam em seu interior diversas substâncias como, glicogênio, lisossomos e dois tipos de grânulos: grânulos densos, que contêm adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), serotonina e cálcio; e grânulos alfa, que contêm fatores de coagulação, fatores de crescimento (FC) e outras proteínas (EVERTS et al., 2006).

Normalmente as plaquetas estão no estado inativo necessitando de um gatilho para ativação (MAIA; SOUZA, 2009). Após ativação, as plaquetas mudam sua forma emitindo pseudópodes e realizam degranulação. Com isso liberam para o meio extracelular diversas substâncias como serotonina, fibrinogênio, enzimas hidrolíticas, cálcio e, principalmente, os fatores de crescimento, sendo estes, TGF-  $\beta$  (fator de crescimento e transformação beta), PDGF (fator de crescimento derivado da plaqueta), EGF (fator de crescimento epidermal), TGF-  $\alpha$  (fator de crescimento de transformação alfa), VEGF (fator de crescimento vascular endotelial), CTGF (fator de crescimento de tecido conjuntivo), FGF (fator de crescimento fibroblástico) e IGF-I (fator semelhante a insulina) (EVERTS et al., 2006; MAIA; SOUZA, 2009).

Os FC são proteínas solúveis que interagem com as células por meio de receptores de membranas e vias intracelulares regulando seu metabolismo. São de fundamental importância no processo de reparação tecidual, tanto de tecidos moles quanto do tecido ósseo, estimulando quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular, neovascularização e deposição da matriz extracelular (EVERTS et al., 2006).

Atuam em combinação ou isoladamente proporcionando benefícios ao processo de consolidação óssea. O IGF-I, por exemplo, é mitogênico para as células da linhagem osteoblástica e estimulador da osteogênese a partir dos osteoblastos diferenciados. Quando combinado com outros FC, como PDGF ou TGF-  $\beta$ , pode acelerar ainda mais a osteogênese (GIANNOBILE, 1999).

A diferenciação e proliferação de células osteoprogenitoras em osteoblastos também são estimuladas. Notadamente o TGF-  $\beta$ 1, FGF e EGF criam uma condição ideal para este processo. De modo similar, a diferenciação de células osteoprogenitoras é aumentada pela ação mitogênica do PDGF em associação ao TGF-  $\beta$  e EGF (EVERTS et al., 2006).

Condrócitos e osteoblastos têm grande quantidade de receptores para TGF-  $\beta$  o qual está associado à proliferação de tecido periosteal no período inicial da consolidação óssea, sendo observada ação mais intensa deste fator durante a proliferação celular cartilaginosa e a ossificação (LIEBERMAN; DALUISKI; EINHORN, 2002; EVERTS et al., 2006).

Baseados nas numerosas propriedades relacionadas à reparação tecidual dos FC derivados das plaquetas, estes componentes são alvo de constantes estudos com intuito de verificar a possibilidade utilizá-los na modulação da reparação óssea (LIEBERMAN; DALUISKI; EINHORN, 2002; EVERTS et al., 2006).

Para tanto, atualmente é frequente uso do plasma rico em plaquetas (PRP). Trata-se de um pequeno volume de plasma contendo altas concentrações plaquetárias, acima da concentração basal do sangue (DINOPOULOS; DIMITRIOU; GIANNOUDIS, 2012). Anitua et al. (2004) ressaltaram que concentrações superiores a 300.000 plaquetas  $\mu\text{L}^{-1}$  são suficientes para o PRP. Já outros autores sugerem que o PRP deva ser preparado para se obter concentrações de plaquetas de três a oito vezes maiores que os níveis fisiológicos, variando para cada espécie (GONSHOR, 2002; KEVY; JACOBSON, 2004).

O PRP é obtido a partir de uma amostra de sangue total autógeno submetido a centrifugações e isolamento do plasma (EVERTS et al., 2006). A força gravitacional e tempo destas centrifugações são bem estabelecidos para humanos, contudo, para obtenção do PRP em outros animais existe ainda uma grande variação e falta de padronização nos métodos de preparo (GIMENO et al., 2006).

Antes de ser utilizado é necessário que se promova a ativação das plaquetas presentes no PRP. A ativação pode ser realizada por agentes fisiológicos (ex: trombina, tromboxano, colágeno, ADP, fator ativador de plaquetas, serotonina e epinefrina) e farmacológicos (ex: o ionóforo de cálcio, o cloreto de cálcio e os análogos de endoperóxido cíclico). A ativação das plaquetas deve ser realizada próximo ao momento da aplicação terapêutica, de forma a assegurar adequada concentração e viabilidade dos FC (MAIA; SOUZA, 2009).

O PRP é uma fonte de fácil aquisição e de baixo custo de fatores de crescimento oriundos das plaquetas (MAIA; SOUZA, 2009). Tem sido amplamente utilizado em diversos procedimentos oftálmicos, ortopédicos, odontológicos, cirurgias

plásticas reparadoras, resumidamente, procedimentos que envolvam reparação de tecidos de modo geral (MAN; PLOSKER; WINLAND-BROWN, 2001; OYAMA et al., 2004; EVERTS et al., 2006; GIMENO et al., 2006; BARBOSA et al., 2008; MAIA;SOUZA, 2009). Ainda assim, na literatura os efeitos do PRP reportados tem sido controversos. Embora haja um evidente potencial de seu uso como estimulador na osteogênese é necessário maior entendimento a respeito desta fonte de FC para que se possa utilizar com maior propriedade esta terapia que tem se tornado cada vez mais popular (EVERTS et al., 2006).

### 3. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi detalhar os achados clínico-cirúrgicos, radiográficos e histopatológicos da reparação óssea após enxertia com osso esponjoso canino liofilizado em falhas ósseas provocadas em rádio de coelhos. Os objetivos específicos foram:

- a) Averiguar a confiabilidade do processamento do osso esponjoso canino pela liofilização/ esterilização;
- b) Determinar as propriedades inerentes ao osso esponjoso canino liofilizado em relação ao processo de regeneração óssea;
- c) Determinar se a associação de plasma rico em plaquetas ou medula óssea autógena ao enxerto ósseo esponjoso foi benéfica ao processo de regeneração óssea.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 INSTALAÇÕES

Os procedimentos cirúrgicos deste estudo foram realizados na sala de Técnica Operatória do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária de Pequenos Animais do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – UNESP – *Campus* de Jaboticabal. Os exames radiográficos foram feitos no Setor de Diagnóstico por Imagem desta mesma instituição.

As lâminas histológicas foram confeccionadas junto ao Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV – UNESP – *Campus* de Jaboticabal.

### 4.2 ANIMAIS

Foram utilizados 42 animais, da espécie leporina (*Oryctolagus cuniculus*), raça Nova Zelândia Branco, machos, adultos jovens (160 a 170 dias de idade), com peso corpóreo variando entre 2,6 e 3,5kg. Os coelhos foram mantidos em gaiolas individuais e alimentados com ração específica e água *ad libitum*.

Utilizaram-se ainda, três cadáveres de cão para extração de osso destinado à enxertia.

Os protocolos de pesquisa foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – UNESP – *Campus* de Jaboticabal<sup>1</sup>.

### 4.3 OBTENÇÃO DO ENXERTO ÓSSEO ESPONJOSO DE CÃO

As amostras de osso esponjoso para enxertia foram coletadas da metáfise de tíbia, fêmur, e úmero de cães jovens de médio e grande porte, de raças variadas,

---

<sup>1</sup> Protocolo número: 018421/11

submetidos à eutanásia ou, aqueles que vieram a óbito por causas não infecciosas ou neoplásicas, no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da UNESP-Jaboticabal (Quadro 1).

Quadro 1: Características dos cães utilizados para coleta de osso esponjoso destinado à enxertia em coelhos.

<b>Raça</b>	<b>Peso</b>	<b>Motivo do óbito</b>
Labrador	30 Kg	Atropelamento/fratura e luxação grave de coluna
Sem raça definida	35 Kg	Atropelamento/ pneumotórax
Labrador	35 KG	Atropelamento/fratura e luxação grave de coluna

Após tricotomia da região, foi realizado o acesso cirúrgico para a retirada do úmero, fêmur e tíbia bilateralmente. Os ossos foram lavados em água corrente e, todo perióstio, tecido fibroso e muscular aderido foi removido com a utilização de bisturi. Ato contínuo, serrou-se<sup>2</sup> transversalmente os ossos, mantendo a distância de aproximadamente 1cm entre cada corte, desde a região metafisária em direção à diáfise óssea, até o ponto onde não houvesse mais osso esponjoso no canal medular.

Utilizando-se uma serra oscilatória e osteótomo, a cortical óssea dos segmentos obtidos foi removida, restando apenas osso esponjoso trabeculado, em “bloco”. Este bloco foi lavado em água corrente, com auxílio de uma lavadora de alta pressão<sup>3</sup>, a fim de eliminar toda medula óssea.

Em seguida procedeu-se o desengorduramento do tecido esponjoso por meio de banhos químicos em solução homogênea de etanol e clorofórmio (proporção 1:1), durante quatro horas cada banho, a temperatura de 4º C (Figura 1A). Após cada banho químico os blocos ósseos foram novamente lavados em água sob alta

<sup>2</sup> Serra oscilatória Dremel©Multimax mm20-02H

<sup>3</sup> Lavadora de Alta Pressão Doméstica Intech Machine HL1600 - 1450 Libras

pressão. Desta forma, foram obtidos segmentos ósseos esponjosos livres de qualquer outro tecido (Figura 1B).

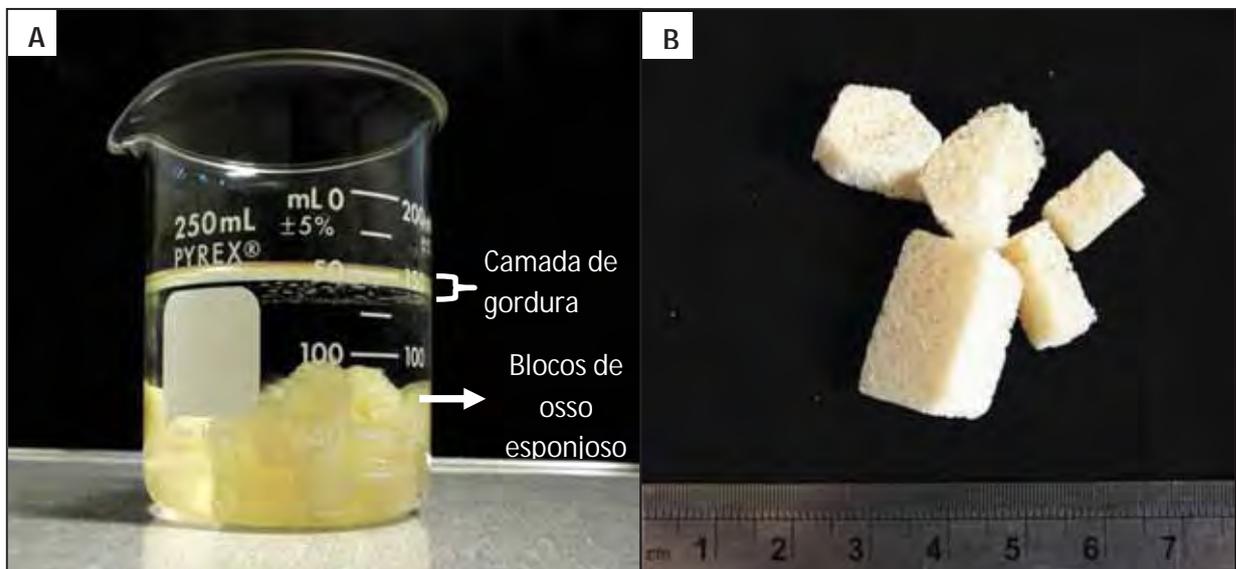


Figura 1. Imagem fotográfica do processamento de osso esponjoso de cão para enxertia. A) Enxertos ósseos imersos em solução de etanol e clorofórmio (1:1). B) Tecido ósseo esponjoso canino após processamento.

As amostras de tecido ósseo esponjoso canino foram liofilizadas, em um liofilizador industrial<sup>4</sup>, cedido pelo Departamento de Tecnologia de Produtos de Origem Animal da UNESP- Jaboticabal. As amostras foram inicialmente congeladas em freezer convencional (-18° Celcius). Em seguida, colocadas em bandejas dentro do liofilizador, que iniciou a redução da temperatura até -60° Celcius, estabilizando a pressão em torno de  $4 \times 10^{-1}$  atm. O material permaneceu sob estas condições de temperatura e pressão por 16 horas para que fosse completamente desidratado.

Após liofilização, as amostras permaneceram em um dessecador para que fosse evitado o contato com umidade do ar ambiente. Os blocos de osso esponjoso foram embalados individualmente em papel grau cirúrgico<sup>5</sup> e adicionalmente em embalagem plástica, a fim evitar que a umidade ambiente atingisse os enxertos.

<sup>4</sup> Liofilizador industrial. Marca Edwards. Modelo Pirani 501

<sup>5</sup> Steriflex - Papel grau cirúrgico com filme laminado de poliéster

Os enxertos foram esterilizados por meio de irradiação gama<sup>6</sup>, na dosagem de 25 kGy, e mantidos em temperatura ambiente até o momento de sua utilização (Figura 2).



Figura 2. Imagem fotográfica do osso esponjoso de cão liofilizado e esterilizado por irradiação gama.

#### 4.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os 42 coelhos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, de acordo com os tratamentos utilizados na falha óssea induzida experimentalmente no rádio destes animais:

---

<sup>6</sup> EMBRARAD – Empresa Brasileira de Radiações LTDA – Irradiador Industrial JS- 7500, número de série IR 106 - Cotia - SP

- ❖ GE - Grupo experimental enxerto esponjoso/ n=12 coelhos;
- ❖ GEM – Grupo experimental enxerto ósseo esponjoso associado à medula óssea/ n=12coelhos;
- ❖ GEPRP - Grupo experimental enxerto ósseo esponjoso associado ao plasma rico em plaquetas/ n=12coelhos;
- ❖ Grupo controle (C)/ n= 6 coelhos;

A identificação dos animais foi feita por meio de números, sendo os animais 1 ao 12 pertencentes ao GE, os animais 13 ao 24 pertencentes ao GEM, os animais 25 ao 36 pertencentes GEPRP e o restante, 37 ao 42, grupo C.

Os diferentes tratamentos foram avaliados clínica, radiográfica e histologicamente. Para avaliação histológica, metade dos animais de cada grupo foi submetida à eutanásia no 45º dia após o procedimento cirúrgico e a outra metade no 90º dia. Avaliações radiográficas foram realizadas no pós-operatório imediato, no 45º dia e no 90º.

## **4.5 IMPLANTAÇÃO DO ENXERTO**

### **4.5.1 Pré-Operatório**

Os coelhos foram submetidos a um período de adaptação às gaiolas e ao novo ambiente por um período de aproximadamente 10 dias.

Por não possuírem a capacidade de realizar êmese, não foi necessário jejum hídrico ou alimentar previamente ao procedimento cirúrgico (HARCOURT-BROWN, 2002).

### **4.5.2 Anestesia**

Os animais foram pré-medicados com acepromazina<sup>7</sup> (0,5 mg/kg) associada à metadona<sup>8</sup> (0,3 mg/Kg) por via intra muscular. Após tricotomia do membro torácico e canulação da veia auricular, procedeu-se a indução anestésica dos coelhos com

---

<sup>7</sup> Acepran 1%®/ VETNIL - Louveira - SP

<sup>8</sup> Mytedon 10 mg/mL®/ Cristália Produtos Farmacêuticos LTDA -Itapira - SP

propofol<sup>9</sup> (4 mg/kg) por via intravenosa, intubação orotraqueal e manutenção anestésica com isoflurano<sup>10</sup>.

#### **4.5.3 Procedimento Cirúrgico**

O animal foi posicionado em decúbito dorsal com o membro torácico direito estendido caudalmente. Procedeu-se antissepsia do campo cirúrgico utilizando clorexidine 2% e proteção da extremidade do membro com uma atadura coberta posteriormente com um dedo de luva estéril (Figura 3 A e B)

Procedeu-se uma incisão de aproximadamente 2,5 cm sobre a pele, na região dorsal do rádio, seguida da divulsão do tecido subcutâneo e musculatura, o que permitiu então a exposição da diáfise do rádio. Ato contínuo, foi feita uma osteotomia parcial de 1 cm de extensão na diáfise radial, distando 2 cm da articulação rádio-cárpica, utilizando-se uma serra oscilatória<sup>11</sup> para osteotomias e paquímetro para as mensurações. Para evitar a termonecrose óssea, foi feita irrigação do local de osteotomia com solução fisiológica 0,9% durante este procedimento. O segmento do rádio foi removido, juntamente com seu periósteo, obtendo-se desta forma uma falha óssea de 1 centímetro de extensão (Figura 3 C e D).

Para preenchimento da falha óssea, um dos blocos de osso esponjoso liofilizado foi previamente hidratado com solução salina 0,9 % durante 5 a 10 minutos. Em seguida foi esculpido com uso de lâmina de bisturi e pinça Goiva para assumir o formato exato da falha óssea confeccionada no rádio dos coelhos (Figura 4). Os enxertos, após serem esculpidos, adquiriram medidas semelhantes às da falha óssea em comprimento largura e altura.

No grupo controle (C), a falha óssea não foi preenchida com o enxerto, permanecendo vazia. Em todos os grupos tratados (GE, GEM e GEPRP), a falha óssea foi preenchida com o enxerto (Figura 3 E e F). Contudo houve diferentes tratamentos entre os grupos, detalhados a seguir.

---

<sup>9</sup> Propovan 10 mg/mL ®/ Cristália Produtos Farmacêuticos LTDA – Itapira-SP

<sup>10</sup> Medicamento genérico, Isoflurano 1ml/1ml/ Instituto Biochimico Ind. Farm. LTDA – Itatiaia - RJ

<sup>11</sup> Micro serra sagital/ Dentscler – Ribeirão Preto – SP.

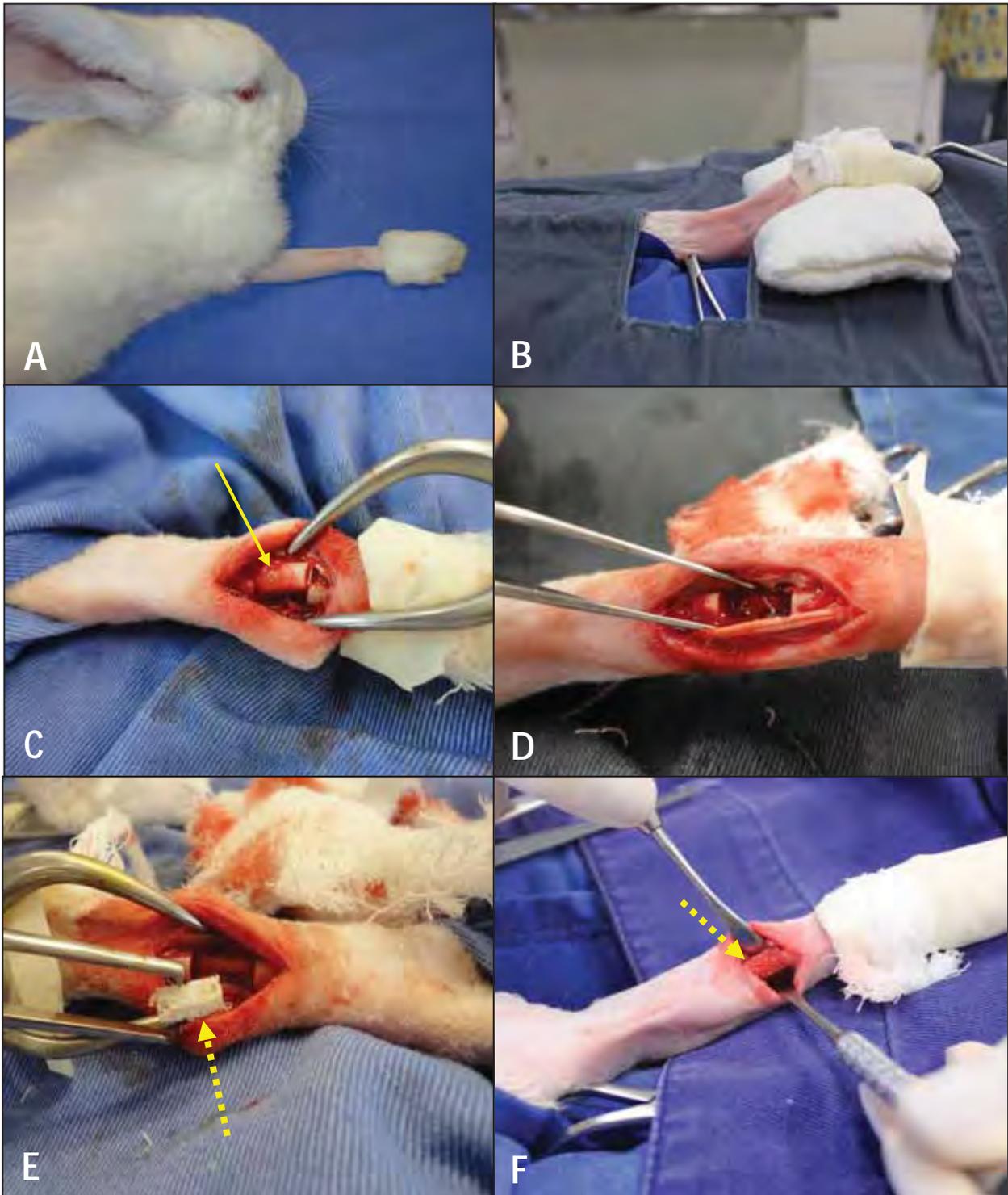


Figura 3: Imagens fotográficas da confecção de falha óssea em coelhos seguida de enxertia. A) Membro torácico direito tricitomizado. B) Posicionamento do animal para o procedimento cirúrgico: decúbito dorsal com membro tracionado caudalmente. C) Remoção segmento ósseo com o perióstio (seta contínua) após osteotomia. D) Aspecto da falha óssea do rádio após osteotomia. E/F) Falha óssea preenchida com enxerto ósseo esponjoso de cão (seta pontilhada).

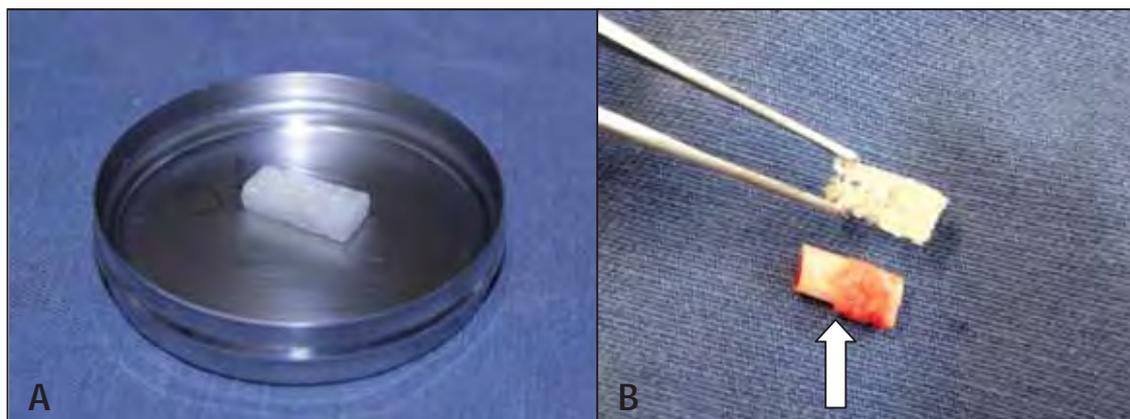


Figura 4: Imagem fotográfica da reidratação (A) e “moldagem” (B) do enxerto ósseo prévias ao momento da enxertia. Em B, notar a semelhança do enxerto com segmento ósseo removido do rádio (seta).

❖ ***Grupo Enxerto Ósseo Esponjoso (GE):***

No grupo GE, o osso esponjoso canino liofilizado puro, ou seja, sem associação a qualquer outro componente, foi utilizado para preenchimento da falha óssea no rádio dos coelhos.

❖ ***Grupo enxerto ósseo esponjoso associado à medula óssea (GEM):***

Nos animais do GEM, a falha óssea foi preenchida com enxerto esponjoso, como citado no item anterior, associado a 1mL de medula óssea autógena concentrada colhida da crista ilíaca.

*Coleta de medula óssea:*

Previamente ao ato cirúrgico o animal, já anestesiado, foi posicionado em decúbito esternal. Procedeu-se antissepsia com clorexine a 2 % e isolamento da crista ilíaca com panos de campo esterilizados. Uma agulha hipodérmica (40x12mm) foi inserida na crista ilíaca e rotacionada cuidadosamente até a cavidade medular. Uma amostra de 2mL de medula óssea foi aspirada com o auxílio de uma seringa de 20mL contendo heparina.

Com o intuito de preservar o seu potencial osteogênico, a amostra foi centrifugada (1500 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente) imediatamente após sua coleta. Posteriormente à remoção do sobrenadante, 1mL do sedimento foi homogeneizado e aplicado sobre o enxerto ósseo, o qual ficou embebido em medula óssea concentrada, e na falha óssea.

❖ ***Grupo enxerto ósseo esponjoso associado ao plasma rico em plaquetas – PRP (GEPRP):***

Nos animais do GEPRP, a falha óssea foi igualmente preenchida com o enxerto esponjoso com o diferencial de que após sua acomodação na falha, foi adicionado o PRP gel em toda extensão do enxerto e bordas dos fragmentos ósseos.

*Preparação do PRP:*

Após a sedação dos coelhos para intervenção cirúrgica, realizou-se tricotomia da região da traqueia e veias jugulares e antissepsia com solução de clorexidine alcoólico. Os animais foram posicionados em decúbito esternal com o pescoço em extensão dorsal máxima para permitir a visibilização adequada das veias jugulares (Figura 5 A). Procedeu-se a punção venosa e coleta de 9 mL de sangue utilizando uma seringa de 10 mL previamente preenchida com 0,2 mL de citrato de sódio. A amostra foi acondicionada em 3 tubos estéreis com tampa com capacidade para 4,5 mL. Dois tubos foram preenchidos com 4 mL de sangue, sendo estes destinados à preparação do PRP e, um terceiro tubo foi preenchido com com 1 mL da amostra a qual foi destinada à contagem de plaquetas.

Após averiguar contagem plaquetária dentro dos parâmetros fisiológicos para a espécie, iniciou-se a preparação do PRP. A os tubos foram centrifugados<sup>12</sup>, com a tampa fechada, a 1600 rpm durante 10 minutos, resultando na separação de hemácias e plasma contendo leucócitos e plaquetas (Figura 5 B).

---

<sup>12</sup> Modelo 206 Baby I centrifuge / Fanem® - SP.

Em uma capela de fluxo laminar, os tubos foram destampados para que o plasma fosse pipetado e transferido para outro tubo estéril (Figura 5 C). O plasma foi submetido à centrifugação com 2000 rpm por 10 minutos, resultando duas partes de plasma: a superior, consistindo o plasma pobre em plaquetas (PPP) e a parte inferior, um botão plaquetário. O PPP sobrenadante foi descartado de modo que permanecesse apenas uma pequena quantidade de aproximadamente 1 mL do PPP e o botão plaquetário (Figura 5 D). O botão de plaquetas foi resuspendido, resultando assim no PRP. Realizou-se contagem plaquetária do PRP a partir de uma alíquota de 80 µL da amostra. Todas ponteiras utilizadas foram previamente esterilizadas e os tubos foram abertos somente em capela de fluxo laminar.

O PRP foi ativado por meio de adição de gluconato de cálcio<sup>13</sup>, próximo ao momento de sua utilização terapêutica. Após ativação, o PRP tomou aspecto de gel e estava pronto para aplicação (Figura 5 E e F).

Em todos os grupos (GE,GEM,GEPRP e C), a sutura da musculatura e subcutâneo foi realizada com fio poliglecaprone 25<sup>14</sup> número 4-0, em padrão simples contínuo. Para a sutura de pele foi utilizado náilon cirúrgico<sup>15</sup> número 4-0 em padrão “u” contínuo.

#### **4.5.4 Pós-Operatório**

Durante o período de 7 dias os animais foram submetidos à antibioticoterapia com enrofloxacin 10%<sup>16</sup> na dose de 5 mg/Kg (diluído em 1mL de solução fisiológica), via subcutânea, a cada 12 horas. Ademais, para analgesia fez-se uso de cloridrato de tramadol<sup>17</sup> na dose de 4 mg/Kg via subcutânea, a cada oito horas nos primeiros três dias e , a cada 12 horas durante dois dias subsequentes.

Não foi necessária a utilização de nenhum tipo de bandagem , tampouco colar elizabetano.

---

<sup>13</sup> Gluconato de cálcio 100mg/mL/ Hipolabor- Sabará –MG

<sup>14</sup> Caprofil ETHICON® Johnson & Johnson LTDA.

<sup>15</sup> Nylon SHALON® Fios Cirúrgicos LTDA - São Luis de Belos Montes - GO

<sup>16</sup> Chemitril Injetável 10 %®/ Chemitecc agroveterinária LTDA – São Paulo –SP.

<sup>17</sup> Cloridrato de Tamadol 50 mg/mL® Hipolabor - Sabará –MG.

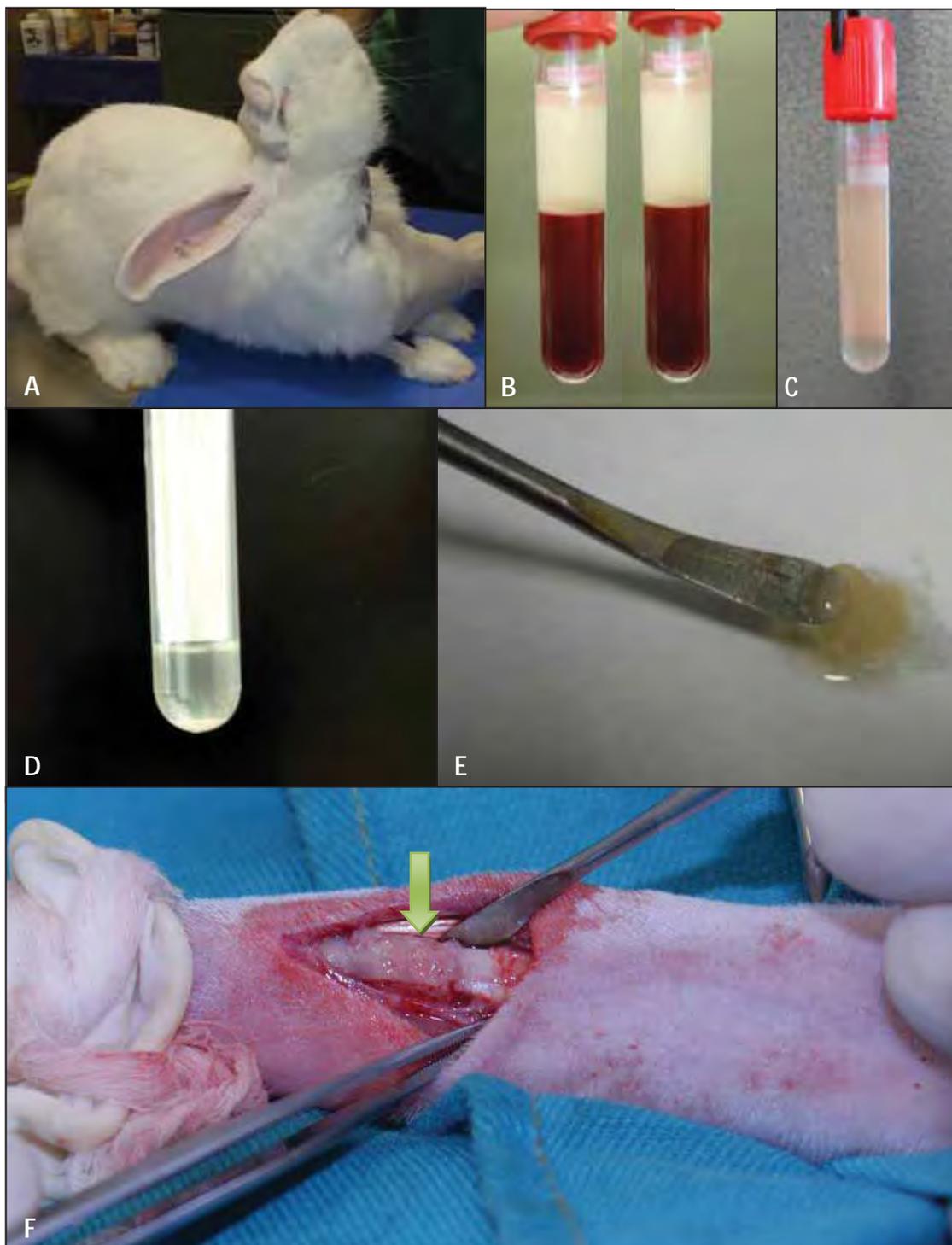


Figura 5: Obtenção de PRP em coelhos. (A) Posicionamento do animal para punção jugular. (B) Amostra sanguínea após primeira centrifugação. (C) Volume de plasma obtido, acondicionado em outro tubo. (D) Aspecto do plasma após a segunda centrifugação e descarte do sobrenadante. (E) Aspecto do PRP após ativação. (F) PRP envolvendo o enxerto ósseo esponjoso no trans-operatório (seta).

## 4.6 AVALIAÇÕES PÓS- IMPLANTAÇÃO

### 4.6.1 Avaliação Clínica

Os animais foram observados diariamente até o momento da eutanásia, a fim de verificar qualquer reação tecidual na cicatriz cirúrgica.

No 3º e no 7º dia pós-operatórios os animais foram submetidos à palpação no local da enxertia com intuito de verificar a presença ou ausência de reação que evidenciasse dor. Nestes mesmos dias, foi avaliada de forma minuciosa a presença de edema e secreções na ferida cirúrgica.

### 4.6.2 Avaliação Radiográfica

Todos os animais tiveram seus membros torácicos radiografados<sup>18</sup> no período pós-operatório imediato, aos 45 dias e, aos 90 dias.

Foram utilizadas as projeções médio-lateral e crânio- caudal. A técnica utilizada foi com mA= 100, KV= 40 e mAs = 3,2, havendo pequenas variações de acordo com o tamanho de cada animal.

A radiopacidade do enxerto, considerada como seu grau de preenchimento, foi determinada por meio mensuração da densidade óptica da radiografia na região da falha óssea - preenchida com o enxerto (GE, GEM e GEPRP) ou vazia (C).

A incorporação do enxerto nas interfaces, reabsorção e formação de ponte óssea foram avaliadas e graduadas em: não observado (0), observado com moderação (+) e intensamente observado (++) ( MORAES, 2006).

A incorporação foi considerada presente ( moderada ou intensa) quando se notava perda do delineamento das bordas do enxerto e dificuldade de distinção entre

---

<sup>18</sup> Aparelhos de radiografia marca Siemens, modelo tridoros 812E com capacidade para 800mA, equipado com grade antidifusora Polter-Bucky. Filme TGM/RA montado em chassi metálico com écrans Lanex Regular. Revelação dos filmes: processadora automática modelo Kodak X-OMAT 2000 Processor.

enxerto e borda da falha óssea. Naqueles animais em que estas características não foram observadas, a incorporação foi considerada ausente.

No que concerne à formação de ponte óssea, considerou-se somente aquelas que se formaram entre rádio e enxerto na porção onde o rádio não entra em contato com a ulna, ou seja, face cranial, craniolateral e craniomedial. Classificou-se a ponte óssea em “não observada”, “moderada” ou “intensa”.

#### ❖ Densitometria Óptica:

A densitometria óptica (DO) foi realizada por meio de um densitômetro digital<sup>19</sup>. Este aparelho emite um feixe de luz o qual foi posicionado na região da película radiográfica onde se desejava avaliar a densidade em relação à passagem de luz, avaliando conseqüentemente o grau de radiopacidade daquela região. Neste caso, realizou-se a DO em três pontos da falha óssea sendo calculada em seguida a média dos três valores numéricos obtidos.

A média da densidade óptica foi convertida em um valor numérico de 0 a 10, denominado Índice de Mineralização (IM). Este índice foi considerado então como o grau de radiopacidade da região da falha óssea. O IM foi determinado em função do valor obtido com a DO, sendo inversamente proporcional a este valor\*.

Para que fosse possível realizar a comparação entre o grau de radiopacidade do enxerto nas radiografias dos diferentes animais, foi necessário padronizar uma radiopacidade máxima (IM=10) e mínima (IM= 0) de cada radiografia. Assim, realizou-se a mensuração da DO na área mais radiolúcida, referente ao IM=0 (Figura 6, B) e, a mensuração da DO na área mais radiopaca, referente ao IM= 10 (Figura 6, A). Estes valores foram lançados no gráfico traçando assim uma reta. O IM foi determinado neste gráfico no qual o eixo X foi constituído por valores de mineralização de 10 a 0, enquanto que o eixo Y vertical apresentou os valores de densidade óptica. A média de densidade óptica obtida em cada radiografia na região

---

<sup>19</sup> Densitômetro Digital-CQ-01/ MRA Indústria de Equipamentos Eletrônicos LTDA – Ribeirão Preto-SP.

\*MACORIS, D. G. (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,UNESP, Júlio de Mesquita Filho – Câmpus de Jaboticabal). Comunicação Pessoal, 2012.

do enxerto foi inserida neste gráfico de forma que, no cruzamento deste valor com a reta foi obtido o valor de IM (Figura 6, C e D).

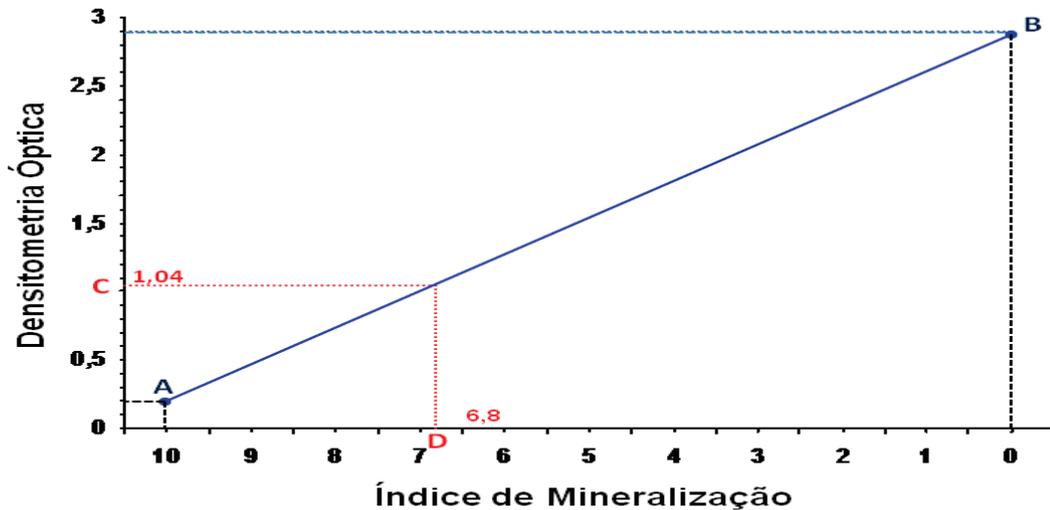


Figura 6: Exemplo de cálculo do Índice de Mineralização (IM). A: área mais radiopaca da radiografia (média). B: área mais radiolúcida da radiografia (média). C: Média da densitometria óptica obtida na falha óssea (1,04). D: Valor do IM obtido = 6,8.

#### 4.6.3 Avaliação Histológica

Seis animais de cada grupo tratado (n=12) e três do grupo C (n=6) foram submetidos à eutanásia aos 45 dias pós-operatórios. O restante dos animais, ou seja, seis nos grupos tratados e três no controle, foram eutanasiados aos 90 dias. Os animais foram sedados com xilazina 2%<sup>20</sup>, 5 mg/kg intra-muscular. A ato contínuo, foi induzida a parada cardio-respiratória com uso de propofol<sup>21</sup> dose-efeito, via intra-venosa e, por último, foi feita aplicação de 10 ml de cloreto de potássio.

Imediatamente após o sacrifício, foram coletados segmentos do membro torácico dos animais (rádio e ulna), sendo as osteotomias realizadas a aproximadamente 1,5 cm proximal e distal do local da falha óssea.

<sup>20</sup> Xilazin®/ Syntec do Brasil LTDA- Horlândia- SP

<sup>21</sup> Propovan®/ Cristália – Itapira-SP

As amostras foram fixadas em formalina 10% e processadas conforme descrito no anexo I. Foram feitos cortes histológicos paralelos ao eixo axial do rádio (contendo enxerto ou não) e ulna. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e Tricrômio de Masson (TM) para análise em microscopia de luz<sup>22</sup>.

As secções de cada espécime foram avaliadas com uma escala de graduação histológica de 14 pontos para determinar a qualidade da união enxerto/osso (0-4), aparência e qualidade formação de córtex e (ponte óssea) e remodelamento ósseo (0-4), e o grau de incorporação do enxerto (0-6), seguindo metodologia de Salkeld et al. (2001) modificada (Anexo II, Tabela 1).

#### **4.6.4 Análise estatística**

Os dados obtidos na análise radiográfica quantitativa foram avaliados estatisticamente. O delineamento utilizado foi o de parcelas subdivididas, testando o fator grupo (4 níveis) nas parcelas e o fator tempo (3 níveis) nas subparcelas, com 12 repetições nos grupos tratados (GE, GEM, GEPRP) e 6 repetições no grupo controle. Havendo diferença significativa entre as médias, estas foram comparadas entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5 %.

Para os dados radiográficos qualitativos (formação de ponte óssea e incorporação do enxerto nas interfaces) foi feita a comparação das frequências observadas dos escores em cada grupo por meio do Teste de Qi-quadrado ao nível de significância de 5%.

Os escores histológicos foram analisados pelo teste de kruska-wallis ao nível de significância de 5%.

---

<sup>22</sup> Microscópio modelo Axio Scope. A1 – Carl Zeiss

## 5. RESULTADOS

Os valores relacionados ao preparo do PRP encontram-se na Tabela 2, Anexo III.

### **5.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA**

Durante o período de acompanhamento clínico dos animais não foram observadas fístulas ou reações inflamatórias intensas. A cicatrização das feridas cirúrgicas ocorreu em média após sete dias, não sendo observadas secreções, purulentas ou não, em todo o período de avaliação.

À palpação do local de enxertia, seis animais demonstraram inquietude no momento do exame no 3º dia (dois animais do GE, três do GEPRP e 1 do C) e, 6 no exame do 7º dia (dois animais do GE, dois do GEPRP, 1 do GEM e 1 do C).

### **5.2 AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA**

A seguir serão descritos os achados radiográficos dos grupos tratados (GE, GEM, GEPRP) quanto à incorporação do enxerto, formação de ponte óssea e reabsorção do enxerto. Em seguida, os achados radiográficos do grupo controle serão explanados.

#### ***5.2.1 Avaliação da incorporação do enxerto***

A incorporação do osso canino liofilizado foi avaliada radiograficamente nas interfaces enxerto/osso proximal e distal nos animais dos grupos tratados totalizando 108 interfaces (72 aos 45 dias pós-operatórios e 36 aos 90 dias).

O enxerto apresentou excelente incorporação nas interfaces da falha óssea. Observou-se incorporação em 84,2% das interfaces avaliadas, independente do momento da avaliação radiográfica (45 e 90 dias), em 48,1% a incorporação foi considerada intensa e, em 36,1 % moderada.

Observou-se integração precoce do osso enxertado e evolução positiva da integração. Aos 45 dias pós-operatório houve incorporação do enxerto em 62 (86,1%) interfaces dentre um total de 72 interfaces avaliadas. Observou-se distribuição homogênea em relação a integração intensa e moderada aos 45 dias. Em 30 (41,6 %) a integração foi considerada intensa e em 32 (44,5 %) moderada. Já aos 90 dias a maior parte das interfaces apresentou integração intensa. Em um total de 36 interfaces, 22 (61,1%) foram classificadas como integração intensa e, 7 (19,4%) moderada (Tabela 3 e Figura 7).

Tabela 3: Frequência de observações dos escores em relação à integração do enxerto nas interfaces dos grupos GE, GEM e GEPRP e em cada momento pós-operatório.

<b>Grau de integração do enxerto</b>	<b>45 dias</b>	<b>90 dias</b>	<b>Total</b>
<b>Ausente</b>	10	7	17
<b>Moderada</b>	32	7	39
<b>Intensa</b>	30	22	52
<b>Total de interfaces avaliadas</b>	72 (36 coelhos)	36 (18 coelhos)	108

Houve índice relativamente baixo de falhas de enxertia. Dentre as 108 interfaces avaliadas somente em 17 houve ausência de incorporação radiograficamente perceptível. Nestes animais observou-se persistência de linha radiolucida entre enxerto/osso (Figura 8).

A comparação das frequências das observações em relação à integração do enxerto entre os grupos tratados não revelou diferença estatística ao nível de significância 5% (Tabela 4)

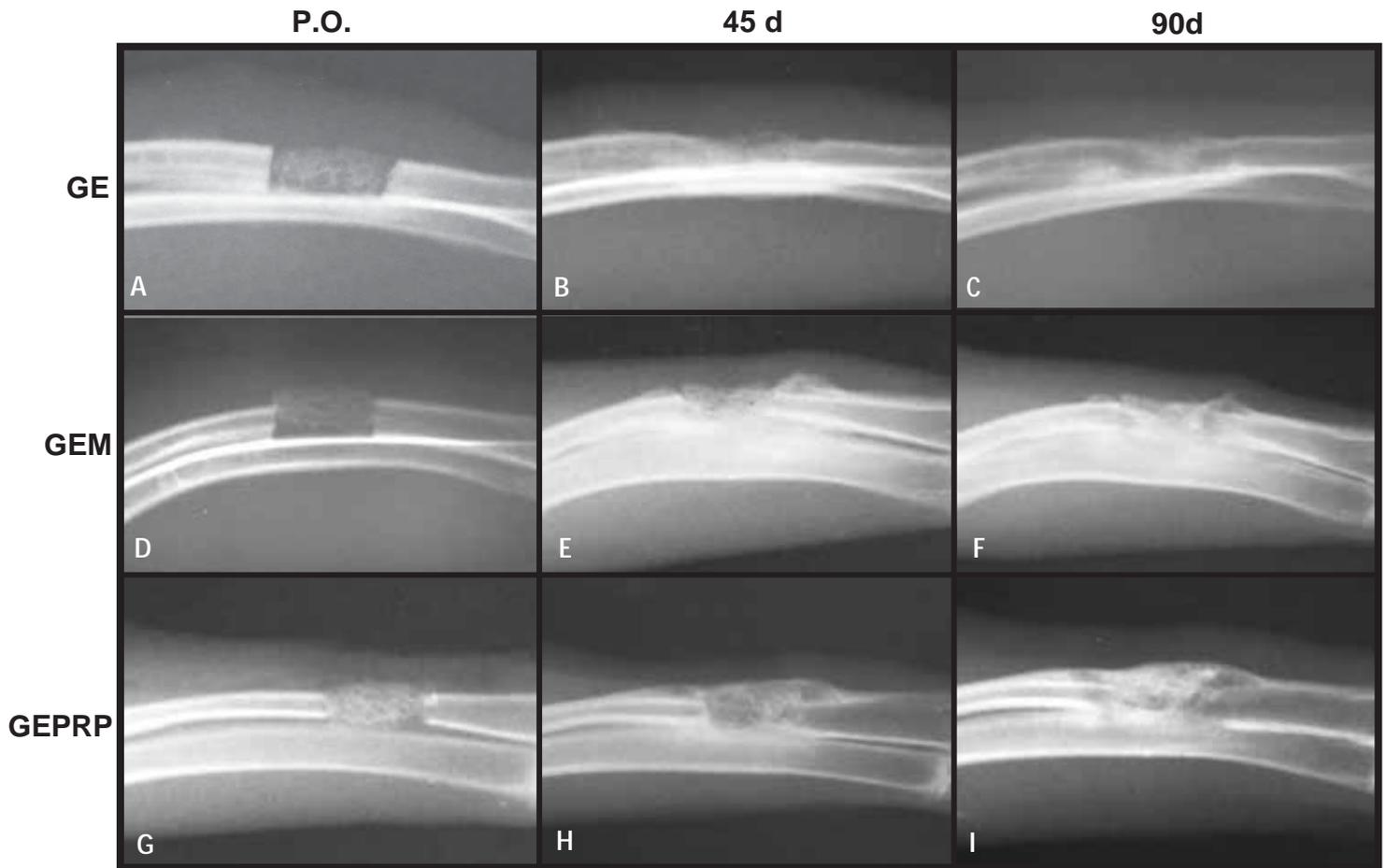


Figura 7: Imagens radiográficas mostrando o aspecto radiográfico da evolução da consolidação do defeito segmentar produzido no rádio dos animais dos grupos tratados e da integração do enxerto. Notar que no pós-operatório imediato (A, D e G) é possível delimitar o contorno dos enxertos ósseos e a transição enxerto/rádio. Aos 45 dias após a enxertia, enxerto incorporado em pelo menos uma das interfaces (E e H) ou em ambas (B) e aos 90 dias após a cirurgia, enxerto completamente integrado (C, F e I). P.O.: pós-operatório imediato. GE, GEM e GEPRP: grupos experimentais.

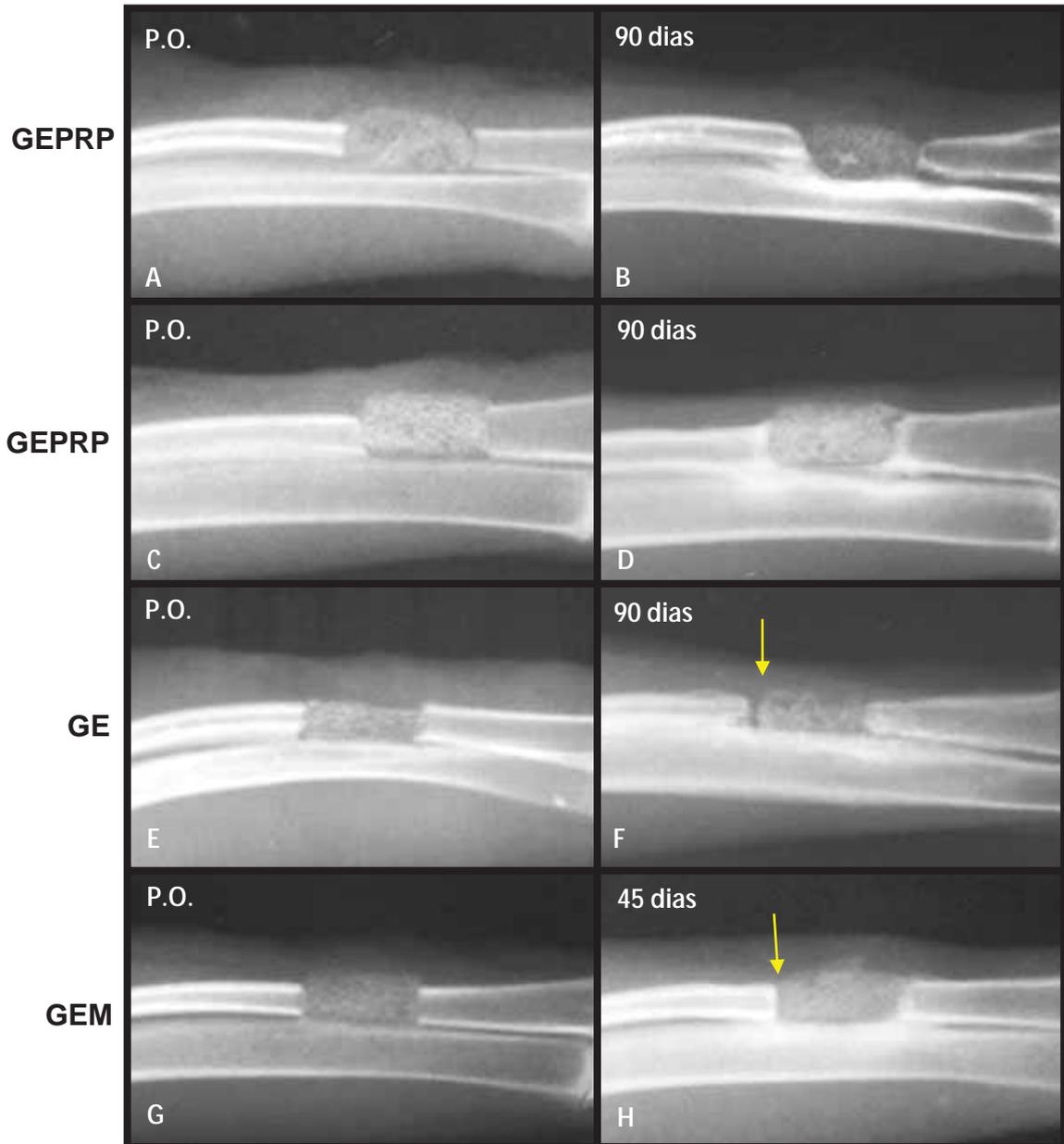


Figura 8: Aspecto radiográfico da falha óssea demonstrando ausência de incorporação do enxerto. As imagens mostram a primeira e a última avaliação radiográfica a qual os animais foram submetidos. Em A/B e C/D, observar a presença de linha radiolúcida em ambas as interfaces 90 dias após a enxertia. Em E/F, da mesma forma observa-se linha radiolúcida (seta) 90 dias pós-operatórios e discreta reabsorção do enxerto. Em G/H, notar linha radiolúcida (seta) em uma das interfaces aos 45 dias pós-operatórios e incorporação moderada na outra interface. P.O.: pós-operatório imediato. GE, GEM e GEPRP: grupos experimentais.

Tabela 4: Frequência dos escores observados em relação à integração do enxerto nas interfaces de cada grupo tratado e em cada grupo tratado nos diferentes tempos pós-operatórios.

	GE			GEM			GEPRP		
	45 dias (n= 24)	90 dias (n=12)	Total (n=36)	45 dias (n= 24)	90 dias (n=12)	Total (n=36)	45 dias (n= 24)	90 dias (n=12)	Total (n=36)
<b>Não observada</b>	2	3	5	4	1	5	4	3	7
<b>Moderada</b>	10	2	12	14	2	16	8	3	11
<b>Intensa</b>	12	7	19	16	9	15	12	6	18

**GE:** grupo enxerto ósseo canino liofilizado puro

**GEM:** grupo enxerto associado à medula óssea autógena

**GEPRP:** grupo enxerto associado ao PRP

### 5.2.2 Avaliação da formação de ponte óssea

A formação de ponte óssea foi avaliada em cada interface individualmente, totalizando 108 interfaces (72 aos 45 dias pós-operatórios e 36 aos 90 dias).

De um modo geral as interfaces dos grupos tratados apresentaram boa consolidação óssea visto que em 75% houve a formação de ponte óssea radiograficamente perceptível, sendo a maioria dentre estas (54,6%) classificada como intensa (Figura 9 e Tabela 5).

Nas radiografias obtidas 45 dias após a enxertia, grande parte das interfaces avaliadas apresentaram-se em bom estado de consolidação. Neste tempo de avaliação, observou-se formação de ponte óssea entre o enxerto e o rádio em 54 (74,9 %) das 72 interfaces, sendo em 41 (56,9 %) verificada intensa formação de ponte óssea e em 13 (18 %) moderada formação (Figuras 9, 10, 11 e 12).

Aos 90 dias pós-operatórios o índice de formação de ponte óssea se manteve semelhante. Em 27 (75 %) das 36 interfaces a formação de ponte foi visualizada, sendo em 18 (50 %) interfaces intensa e em 9 (25%) moderada (Figuras 9 e 13).

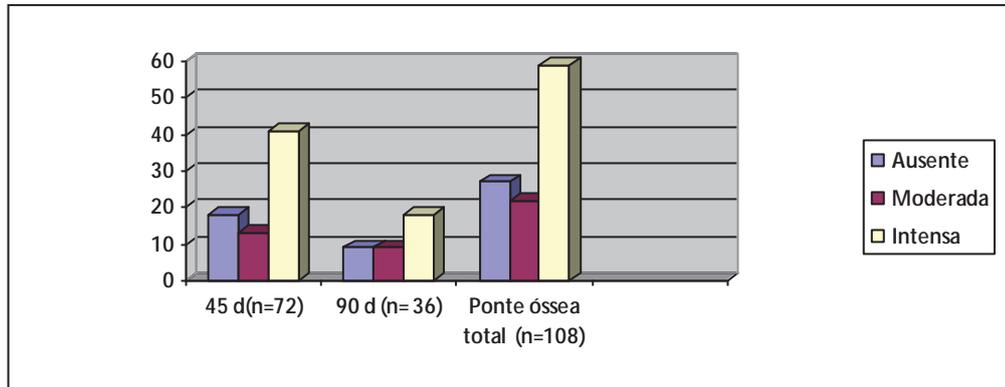


Figura 9: Frequência de observações dos escores em relação à formação de ponte óssea nas interfaces dos grupos tratados e em cada momento pós-operatório.

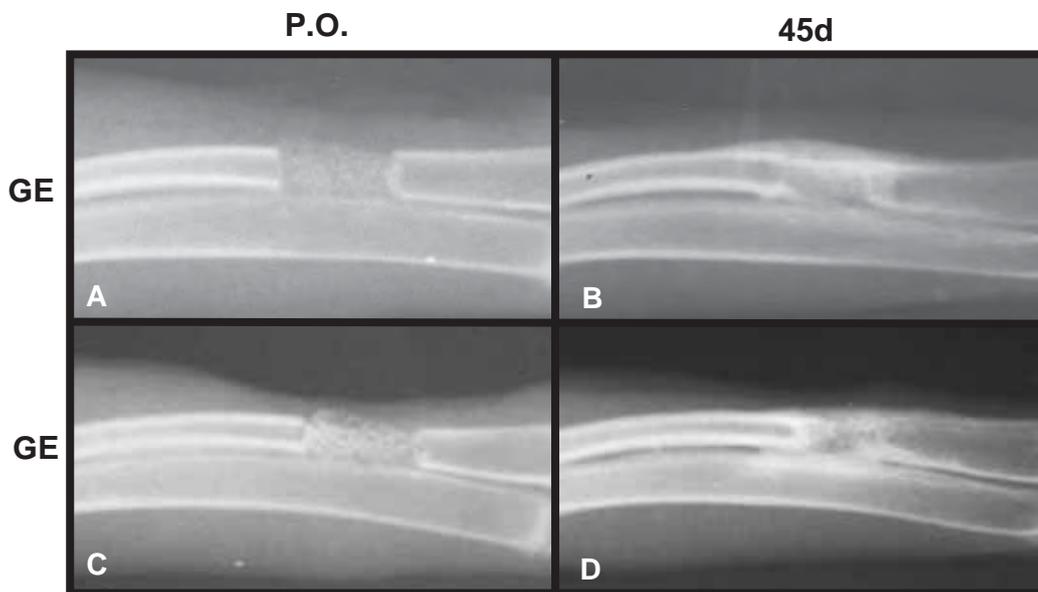


Figura 10: Aspecto radiográfico da formação de ponte óssea aos 45 dias pós-operatórios em animais do grupo GE. P.O.: pós-operatório imediato.



Figura 11: Aspecto radiográfico da formação de ponte óssea aos 45 dias pós-operatórios em animais do grupo GEM. P.O.: pós-operatório imediato.

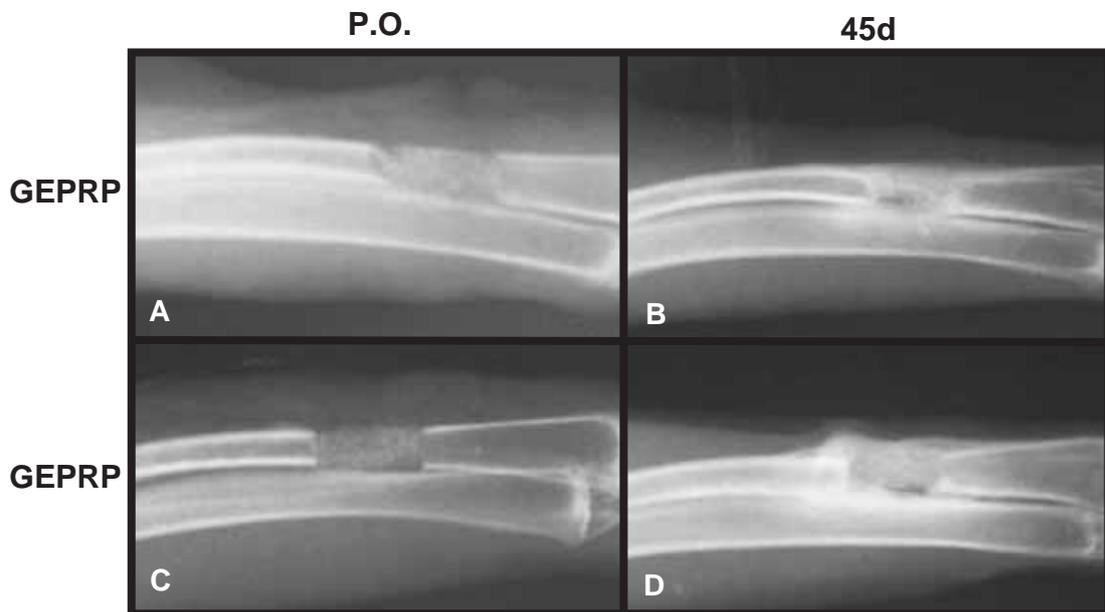


Figura 12: Aspecto radiográfico da formação de ponte óssea aos 45 dias pós-operatórios em animais do grupo GEPRP. P.O.: pós-operatório imediato.

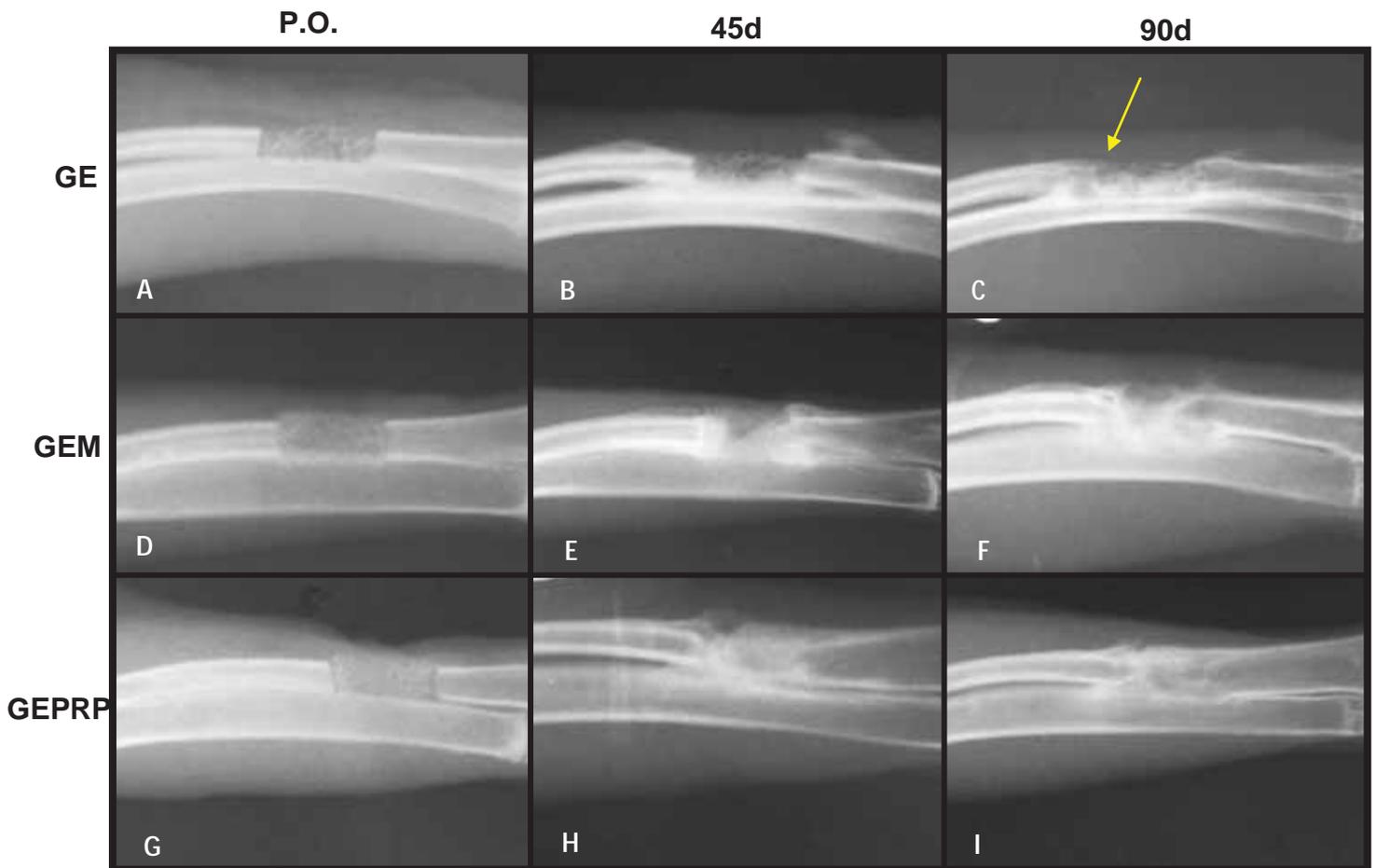


Figura 13: Aspecto radiográfico da formação de ponte óssea aos 45 dias e 90 dias pós-operatórios. Observar ponte óssea classificada em moderada (seta, C) em animal do GE aos 90 dias e, em “não observada” aos 45 dias (B), muito embora houvesse a presença de reação óssea no rádio sugestiva de início de formação de ponte. Nos animais dos grupos GEM e GEPRP é possível observar intensa formação de ponte óssea aos 45 dias que se remodela aos 90 dias.

Em 27 (25%) interfaces dos animais dos grupos tratados, independente do momento pós-operatório, a formação de ponte foi classificada em “não observada” pois não foi possível visibilizar nas porções cranial, crâniolateral e crâniomedial do rádio/enxerto a formação de córtex. Contudo, com exceção de dois animais (coelho 1 e 28), nestas interfaces observou-se a formação de ponte óssea entre rádio, ulna e enxerto na região do espaço interósseo e aparente condução da consolidação e preenchimento do enxerto ósseo esponjoso por esta via.

Este tipo de ponte óssea envolvendo a ulna, associado ou não à ponte entre rádio e enxerto somente, foi visibilizado radiograficamente em 22 dentre os 36 coelhos dos grupos tratados.

A comparação entre os grupos tratados aos 45 dias mostrou que a formação de ponte óssea intensa foi observada em um número maior de interfaces nos grupos GEPRP (16 interfaces) e GEM (14 interfaces) em comparação com o grupo GE (11 interfaces). Ainda neste mesmo momento, a presença de ponte óssea, seja intensa ou moderada, foi observada em 20 e 19 interfaces no GEPRP e GEM respectivamente e em 15 no grupo GE. Todavia, ao nível de significância de 5%, estas frequências, bem como aquelas observadas aos 90 dias pós-operatórios, não foram consideradas estatisticamente significantes.

A comparação geral entre os grupos tratados, independente do tempo, revelou maior quantidade de interfaces nas quais não se observou formação de ponte óssea no grupo GE (14 interfaces) em comparação aos demais grupos tratados, grupos GEPRP e GEM (8 e 5 interfaces respectivamente). Estas frequências não foram consideradas estatisticamente significantes ao nível de significância de 5%. A tabela 5 resume estes resultados.

Tabela 5: Frequência das observações em relação à formação de ponte óssea nas interfaces de cada grupo tratado nos diferentes tempos pós-operatórios.

	GE			GEM			GEPRP		
	<i>45 dias</i>	<i>90 dias</i>	<i>Total</i>	<i>45 dias</i>	<i>90 dias</i>	<i>Total</i>	<i>45 dias</i>	<i>90 dias</i>	<i>Total</i>
<b>Não observada</b>	9	5	14	5	0	5	4	4	8
<b>Moderada</b>	4	3	7	5	3	8	4	3	7
<b>Intensa</b>	11	4	15	14	9	23	16	5	21

### **5.2.3 Reabsorção do enxerto**

Discreta reabsorção do enxerto, radiograficamente perceptível, foi constatada em oito animais dos grupos tratados, sendo 4 do grupo GE, 2 do grupo GEM e 2 do grupo GEPRP. Estas alterações foram consideradas discretas, exceto no coelho 6 (GE) no qual foram observadas em maior intensidade.

### **5.2.4 Achados radiográficos qualitativos no grupo controle**

Os animais do grupo controle apresentaram as falhas ósseas totalmente radiolucidas no pós-operatório imediato, apenas com a radiopacidade do tecido muscular adjacente (Figura 14).

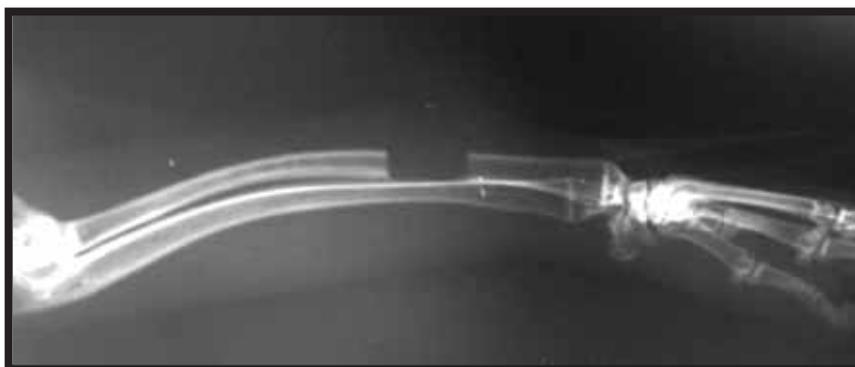


Figura 14: Aspecto radiográfico da falha óssea dos animais do grupo controle, em projeção médio-lateral, imediatamente após a cirurgia.

Nos seis animais deste grupo (n=6) foi possível visibilizar sinais radiográficos compatíveis com crescimento ósseo, em maior ou menor intensidade aos 45 dias e 90 dias após a cirurgia. Entretanto, em cinco dos seis animais deste grupo, foi possível verificar o preenchimento incompleto da falha óssea resultando em depressão óssea remanescente no local da ostectomia. Em dois animais observou-se formação intensa de ponte óssea aos 90 dias muito embora em um destes tenha sido identificado um halo radiopaco remanescente na região do espaço interósseo (Figuras 15 e 16).

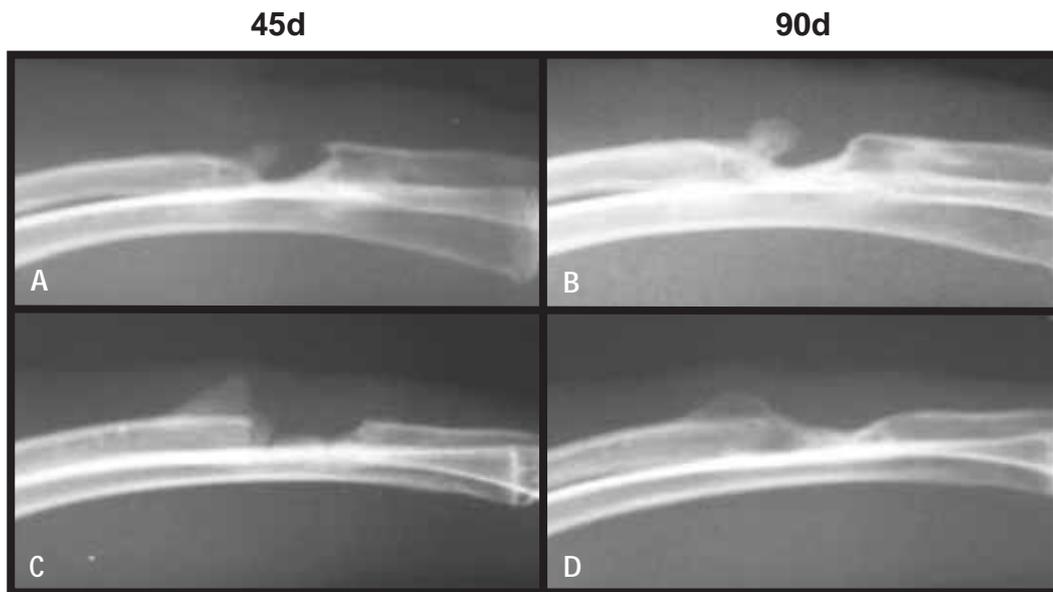


Figura 15: Aspecto radiográfico da consolidação óssea dos animais do grupo controle com acompanhamento até o 90º dia pós-operatório. Em A e B, imagens da falha óssea do coelho 37 aos 45 e 90 dias pós-operatórios, respectivamente. Em C e D, imagens da falha óssea do coelho 38 aos 45 e 90 dias pós-operatórios respectivamente.



Figura 16: Aspecto radiográfico da consolidação óssea dos animais do grupo controle com acompanhamento até o 45º dia pós-operatório. A, B e C mostram o grau de consolidação óssea dos coelhos 40, 41 e 42 respectivamente, aos 45 dias após a cirurgia. Notar falta de preenchimento completo da falha óssea em A e C. Em B formação intensa de ponte óssea com halo sem preenchimento remanescente na região interóssea.

### 5.2.5 Índice de mineralização das falhas ósseas (preenchimento)

A mensuração da densidade óptica foi realizada nas radiografias com projeção médio-lateral do membro dos coelhos, em três locais da falha óssea, abrangendo toda sua extensão (Figura 17).



Figura 17: Imagem radiográfica do membro torácico de coelho do grupo GE destacando a região da falha óssea submetida à densitometria óptica. "A" representa a falha óssea preenchida com enxerto ósseo esponjoso canino e os círculos demonstram os locais onde a densidade óptica foi mensurada.

A análise do IM médio nos momentos pós-cirúrgicos (incluindo todos os grupos) mostrou IM aos 45 dias (5,54) e aos 90 dias (5,32) pós-operatórios estatisticamente maiores que aqueles observados nas radiografias feitas imediatamente após o procedimento cirúrgico (3,79). Contudo, o IM médio obtido aos 45 dias não foi considerado significativamente diferente do IM médio obtido aos 90 dias, muito embora o primeiro tenha um valor maior que o segundo (Tabela 6).

Na avaliação da média do IM por grupo, o IM mínimo obtido foi de 1.02, em um animal do grupo C e, o máximo de 7.93 em um animal do GEM, aos 45 dias (Tabela 7).

Os grupos tratados obtiveram índices de mineralização estatisticamente maiores do que grupo controle ( $p > 0,05$ ). Embora não tenham sido consideradas significativas ( $p > 0,05$ ), a média do IM do grupo GEM (5,12) foi a maior dentre os

grupos tratados, seguida pela média do GEPRP (4,95) e GE (4,83). A Tabela 8 resume estes resultados.

Tabela 6: Médias gerais do índice de mineralização (IM) dos grupos GE, GEM, GEPRP e C em relação aos momentos de observação: pós-operatório imediato, 45 dias e 90 dias após a cirurgia, e valor mínimo e máximo do IM em cada momento.

Momentos	Média do IM	IM mínimo	IM máximo
<b>Pós-operatório</b>	3,79	1,02	5,6
<b>45 dias</b>	5,54	3,35	7,93
<b>90 dias</b>	5,32	3,4	7,57

IM: Índice de mineralização

Tabela 7: Médias gerais do IM em cada grupo experimental e, valor mínimo e máximo do IM de cada grupo.

Grupos	Média do IM	IM mínimo	IM máximo
<b>C</b>	3,80	1,02	6,28
<b>GE</b>	4,83	1,84	7,11
<b>GEM</b>	5,12	1,64	7,93
<b>GEPRP</b>	4,95	3,18	6,63

IM: Índice de mineralização

GE: grupo enxerto ósseo puro; GEM: grupo enxerto ósseo associado à medula óssea autógena; GEPRP: grupo enxerto ósseo associado ao PRP; C: grupo controle.

Tabela 8: Resumo da análise de variância do índice de mineralização observado entre momentos e grupos e da interação entre momento x grupo\*.

Momentos	Controle	GE	GEM	GEPRP	Média Geral de cada momento
<b>Pós-Operatório</b>	2,76 <sup>aA</sup>	4,05 <sup>aB</sup>	3,60 <sup>aAB</sup>	4,23 <sup>aB</sup>	3,79 <sup>a</sup>
<b>45 dias</b>	4,49 <sup>bA</sup>	5,52 <sup>bABC</sup>	6,34 <sup>bBC</sup>	5,30 <sup>bA</sup>	5,54 <sup>b</sup>
<b>90 dias</b>	4,47 <sup>bA</sup>	4,99 <sup>bA</sup>	5,71 <sup>bA</sup>	5,69 <sup>bA</sup>	5,32 <sup>b</sup>
<b>Médias Gerais de cada grupo</b>	3,79 <sup>A</sup>	4,83 <sup>B</sup>	5,12 <sup>B</sup>	4,95 <sup>B</sup>	

\* Médias seguidas das mesmas letras nas colunas (letras minúsculas somente) ou nas linhas (letras maiúsculas somente) não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5 %.

GE: grupo enxerto ósseo puro; GEM: grupo enxerto ósseo associado à medula óssea autógena; GEPRP: grupo enxerto ósseo associado ao PRP.

Dentro dos grupos tratados (GE, GEM e GEPRP), foi feita a análise da evolução do IM de cada grupo ao longo dos tempos observados radiograficamente, ou seja, pós-operatório imediato (PO), 45 e 90 dias. Esta análise mostrou que do PO aos 45 dias, o GEM apresentou evolução estatisticamente maior que os demais grupos ( $p < 0,05\%$ ).

Comparando-se o PO e 90 dias, da mesma forma o GEM apresentou diferença maior que os demais grupos, embora não tenha sido considerada estatisticamente diferente dos demais grupos.

A evolução observada de 45 dias para 90 dias foi maior no GEPRP (0,76), embora não tenha sido detectada diferença estatística frente aos demais grupos. Estes resultados encontram-se resumidos na Tabela 9.

Tabela 9: Resumo da diferença do índice de mineralização observado entre momentos de cada grupo\*.

	<b>Grupos</b>	<b>GEM</b>	<b>GE</b>	<b>GEPRP</b>
<b>Momentos</b>				
<b>PO - 45 dias</b>		2,74 <sup>A</sup>	1,47 <sup>B</sup>	1,06 <sup>B</sup>
<b>PO - 90 dias</b>		2,7 <sup>A</sup>	1,53 <sup>A</sup>	1,14 <sup>A</sup>
<b>45 dias – 90 dias</b>		-0,19 <sup>A</sup>	0,12 <sup>A</sup>	0,76 <sup>A</sup>

\* Médias seguidas das mesmas letras nas linhas não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%

GE: grupo enxerto ósseo puro; GEM: grupo enxerto ósseo associado à medula óssea autógena; GEPRP: grupo enxerto ósseo associado ao PRP; PO: pós-operatório imediato.

### **5.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA**

#### **5.3.1 Achados macroscópicos**

Após a eutanásia, o local da falha óssea no rádio dos coelhos foi observado macroscopicamente a fim de verificar o comportamento do enxerto ósseo esponjoso canino no osso hospedeiro.

Em todos os animais dos grupos tratados verificou-se continuidade do rádio com o enxerto. O local de enxertia apresentou difícil distinção visual em relação ao restante do rádio. Em muitos casos, apenas à palpação foi possível fazer a distinção devido à presença de certo grau de trabeculação no local da implantação (Figura 18).

Nos animais do grupo controle pôde-se perceber uma depressão no rádio, equivalente ao preenchimento ósseo incompleto da falha óssea, com exceção de dois animais (coelho 39 e 41) os quais tiveram boa formação de ponte óssea.

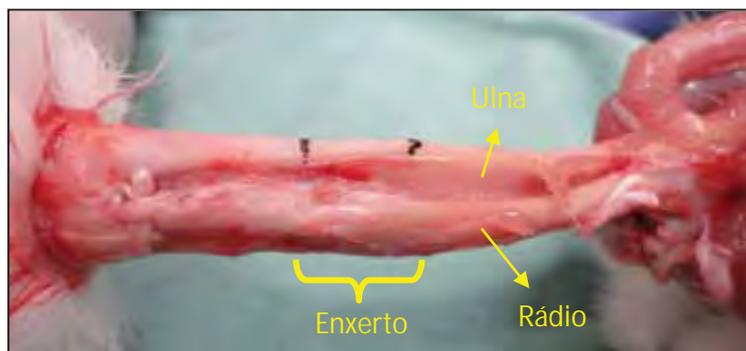


Figura 18: Aspecto macroscópico do enxerto ósseo esponjoso canino implantado em rádio de coelho, 90 dias após a cirurgia. A musculatura foi rebatida proximalmente (direita) para expor o local da enxertia. Notar a continuidade rádio-enxerto.

#### **5.3.2 Achados histológicos**

A graduação histológica (Anexo II) resultou em escores totais maiores nos grupos GE e GEPRP em relação ao GE. Contudo observou-se queda do escore total grupo GEPRP aos 90 dias (Tabela 10 e 11).

A análise estatística dos escores gerais (0-14) e dos escores parciais (qualidade da união, formação de córtex e incorporação do enxerto) pelo Kruskal-wallis ao nível de significância de 5% não encontrou diferenças significantes entre os grupos (GE, GEM, GEPRP e C) e os tempos 45 e 90 dias pós-operatórios.

As medianas dos escores de cada grupo tratado em cada tempo pós-operatório encontram-se na Tabela 10 e a mediana geral dos escores na Tabela 11. Os escores do grupo controle encontram-se na Tabela 12.

Tabela 10: Graduação histológica da consolidação óssea nos grupos tratados em cada período pós-cirúrgico

Grupos	Qualidade da união (0-4)	Formação de ponte óssea (0-4)	Incorporação do enxerto (0-6)	Escore total (0-14)
<b>45 dias</b>				
<b>GE</b>	2.5	1	3	7
<b>GEM</b>	2	2	3	8
<b>GEPRP</b>	2.5	2	4.5	9
<b>90 dias</b>				
<b>GE</b>	2	1	4.5	7.5
<b>GEM</b>	3	2	3.5	9
<b>GEPRP</b>	3	1	2.5	6

Os valores são medianas dos escores. A descrição dos escores se encontra no Anexo II.

GE: grupo enxerto ósseo puro; GEM: grupo enxerto ósseo associado à medula óssea autógena; GEPRP: grupo enxerto ósseo associado ao PRP.

Tabela 11: Escores gerais dos grupos tratados incluindo todos os períodos de avaliação histológica por grupo (45 dias e 90 dias)

Grupos Tratados	Qualidade da união (0-4)	Formação de ponte óssea (0-4)	Incorporação do enxerto (0-6)	Escore de consolidação (0-14)
<b>GE</b>	1	1	3.5	7
<b>GEM</b>	2	2	3	8
<b>GEPRP</b>	2	2	3.5	8

Os valores apresentados são medianas dos escores. A descrição dos escores se encontra no Anexo II.

GE: grupo enxerto ósseo puro; GEM: grupo enxerto ósseo associado à medula óssea autógena; GEPRP: grupo enxerto ósseo associado ao PRP

A seguir é feita uma descrição dos achados histológicos dos grupos tratados e exposição dos escores por meio de gráficos e em seguida do grupo controle.

### 5.3.2.1 Qualidade da união

A união entre enxerto e osso hospedeiro ocorreu em todas as lâminas analisadas dos grupos tratados, sendo que em 20 animais (n= 36) observou-se prevalência de união óssea e cartilagem já mineralizada (escores 3 e 4) e em 15 união com prevalência de tecido cartilaginoso e fibrocartilaginoso (escore 2). Observou-se uma evolução positiva de qualidade de união de 45 dias para 90 dias pós-operatórios, ou seja, de união com predominância fibrocartilaginosa para união com predominância óssea (Figura 19, 20 e 21).

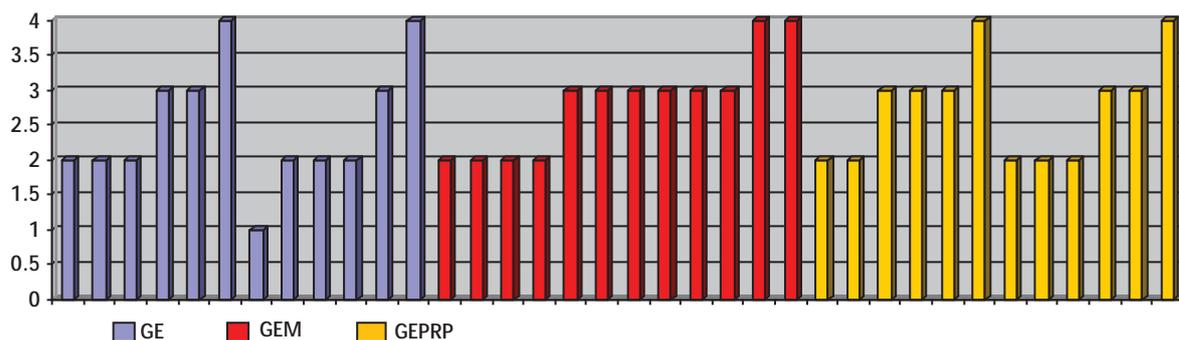


Figura 19: Escores atribuídos para “*qualidade da união*” (0-4 - eixo y) dentro dos grupos tratados GE, GEM e GEPRP (n=12). Dentro de cada grupo, as primeiras 6 colunas representam os escores dos animais eutanasiados aos 45 dias (n=6) e o restante daqueles eutanasiados aos 90 dias (n=6), ambos em ordem crescente.

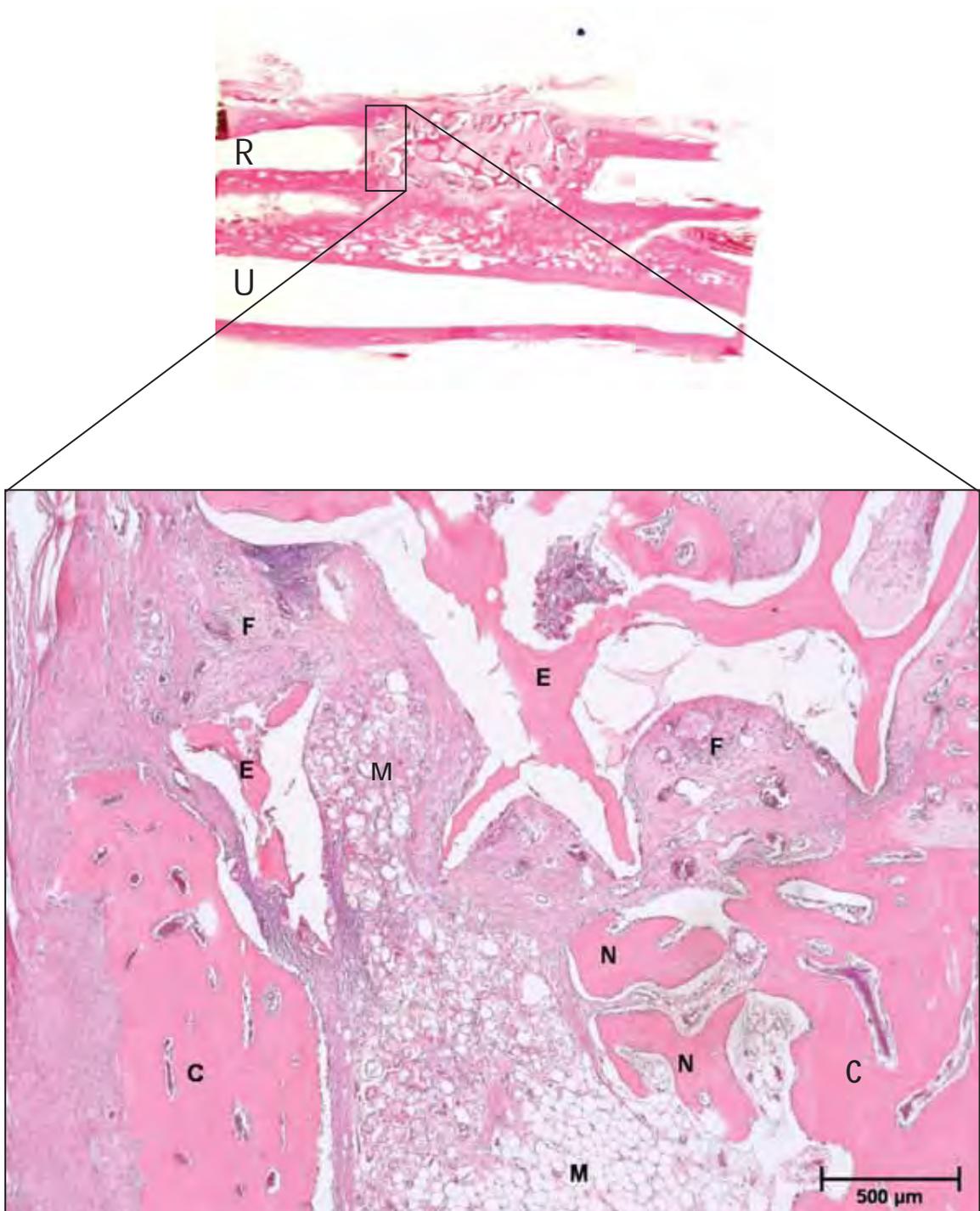


Figura 20: Aspecto histológico da união com prevalência de tecido fibrocartilagenoso. Fotomicrografia óptica da interface osso/enxerto. Observar união fibrocartilagenosa entre a região do enxerto e rádio de coelho (GEM aos 45 dias). Notar o avanço de medula óssea em direção às trabéculas do enxerto. Coloração HE. R: rádio; U: ulna; C: cortical do rádio de coelho; E: enxerto ósseo canino; F: tecido fibrocartilagenoso.

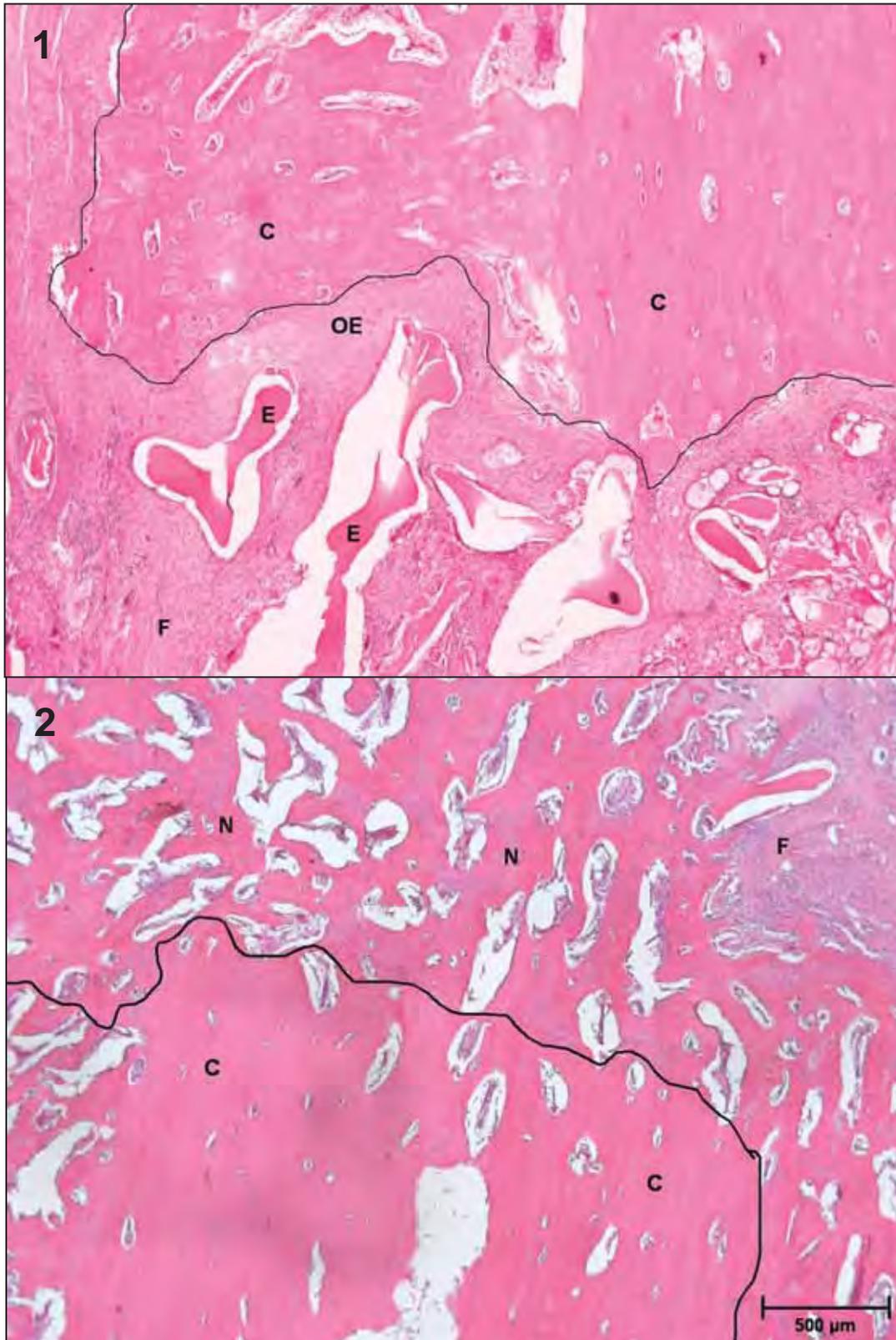


Figura 21: Aspecto histológico da união óssea. Fotomicrografia óptica da interface osso/enxerto, de animais dos grupos GEM (1) e GEPRP (2) 90 dias após a enxertia. Notar osso hospedeiro (C) contínuo com osso novo (N) formado por entre as trabéculas do enxerto (E). Na imagem 1 é possível visibilizar trabéculas remanescentes do enxerto e em 2, o enxerto já substituído por osso novo. A linha identifica a transição entre o osso do coelho e a falha óssea preenchida com enxerto. OE: ossificação endocondral. Coloração HE.

### 5.3.2.2 Formação de ponte óssea/córtex

Em nenhum dos animais foi observada a ausência de ponte óssea (escore 0). Na maioria dos animais (29 dentre 36), tanto aos 45 dias quanto aos 90 dias, foi possível visualizar processo de organização entre córtex e canal medular. Em 17 animais (escore 1) esta organização apresentava-se em grau inicial e em 12 mais avançado e evidente de organização (escore 2). A formação completa e bem distinta de córtex e canal medular foi observada em 7 animais (escore 3 e 4) sendo a ponte completa observada somente no grupo GEPRP aos 45 dias, em 2 animais (Figura 22 e 23). Entretanto nos animais do GEPRP eutanasiados aos 90 dias observou-se queda no escore de formação de ponte óssea em relação àqueles animais de 45 dias (Tabela 10 e Figura 22).

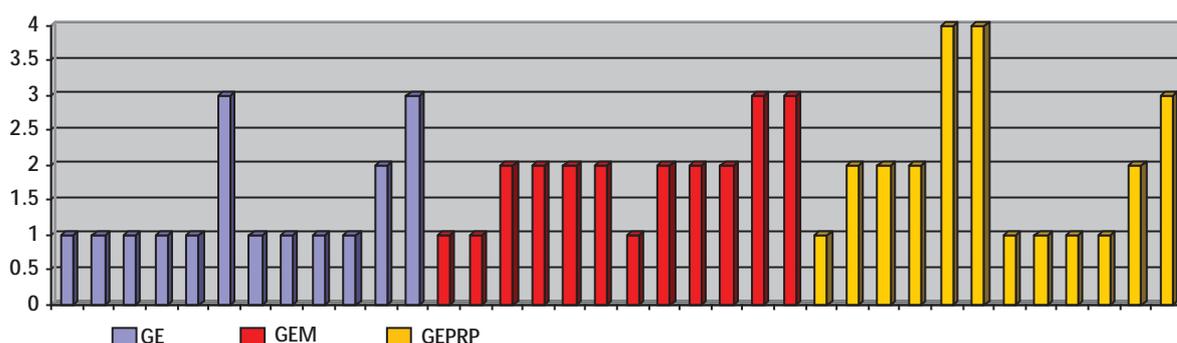


Figura 22: Escores atribuídos para “formação de ponte óssea” (0-4 - eixo y) dentro dos grupos tratados GE, GEM e GEPRP (n=12). Dentro de cada grupo, as primeiras 6 colunas representam os escores dos animais de 45 dias (n=6) e o restante de animais de 90 dias (n=6), ambos em ordem crescente.

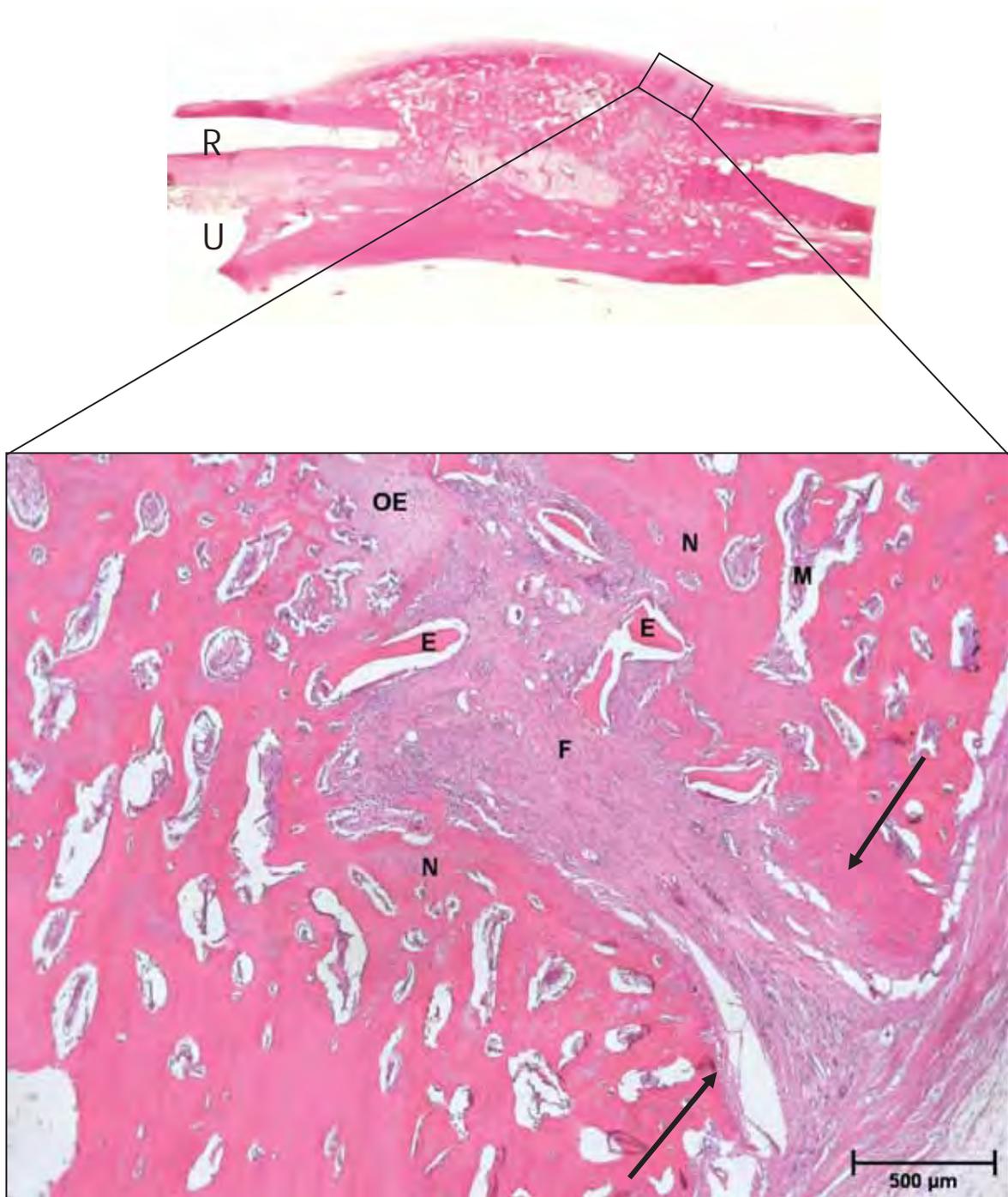


Figura 23: Aspecto histológico da formação de ponte óssea. Acima, fotografia da lâmina histológica permitindo visualização do rádio (R) contínuo com o enxerto ósseo esponjoso canino e a ulna (U) do coelho do grupo GEPRP, 45 dias após a enxertia. Abaixo, fotomicrografia óptica da interface osso/enxerto. Observar a formação da ponte óssea (sentido indicado pelas setas) composta por grande quantidade de osso novo. Nota-se o fechamento sub-total da ponte restando apenas discreta quantidade de tecido fibroso (F) interposto ao osso novo. Notar a grande quantidade de osso novo (N) e resquícios do enxerto (E). Coloração HE. OE: ossificação endocondral; M: medula óssea.

### 5.3.2.3 Incorporação do enxerto

A maior parte dos animais (28/ n=36), independente do grupo e tempo pós-operatório, apresentou nesta avaliação boa incorporação com formação de osso novo contínuo com o osso hospedeiro, decréscimo da quantidade de enxerto e aumento da quantidade de osso novo caracterizando processo de substituição do enxerto por osso novo (escores 3, 4 e 5). Notou-se ainda, presença de linhas de osteoblastos produzindo osso novo e intensa revascularização do enxerto, sendo possível a visualização de grande quantidade de vasos em meio às trabéculas ósseas e reorganização de medula óssea no tecido neoformado (Figura 25, 26, 27)

Em 8 animais (n= 36) observou-se presença de pouca ou moderada formação de osso novo (escore 1 e 2). Nenhum animal apresentou ausência de formação óssea e incorporação (escore 0).

Estes resultados estão expressos no Figura 24.

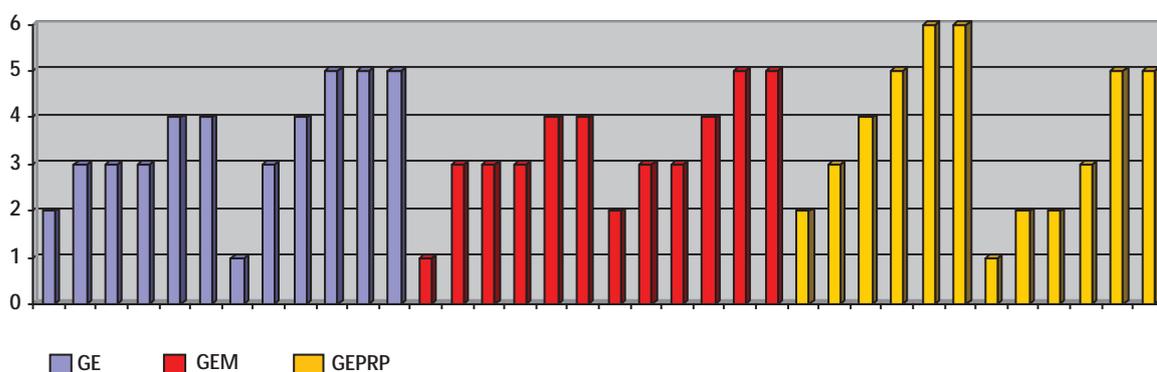


Figura 24: Escores atribuídos para “*incorporação do enxerto*” (0-6 - eixo y) dentro dos grupos tratados GE, GEM e GEPRP (n=12). Dentro de cada grupo, as primeiras 6 colunas representam os escores dos animais sacrificados aos 45 dias (n=6) e o restante daqueles sacrificados aos 90 dias (n=6), ambos em ordem crescente.

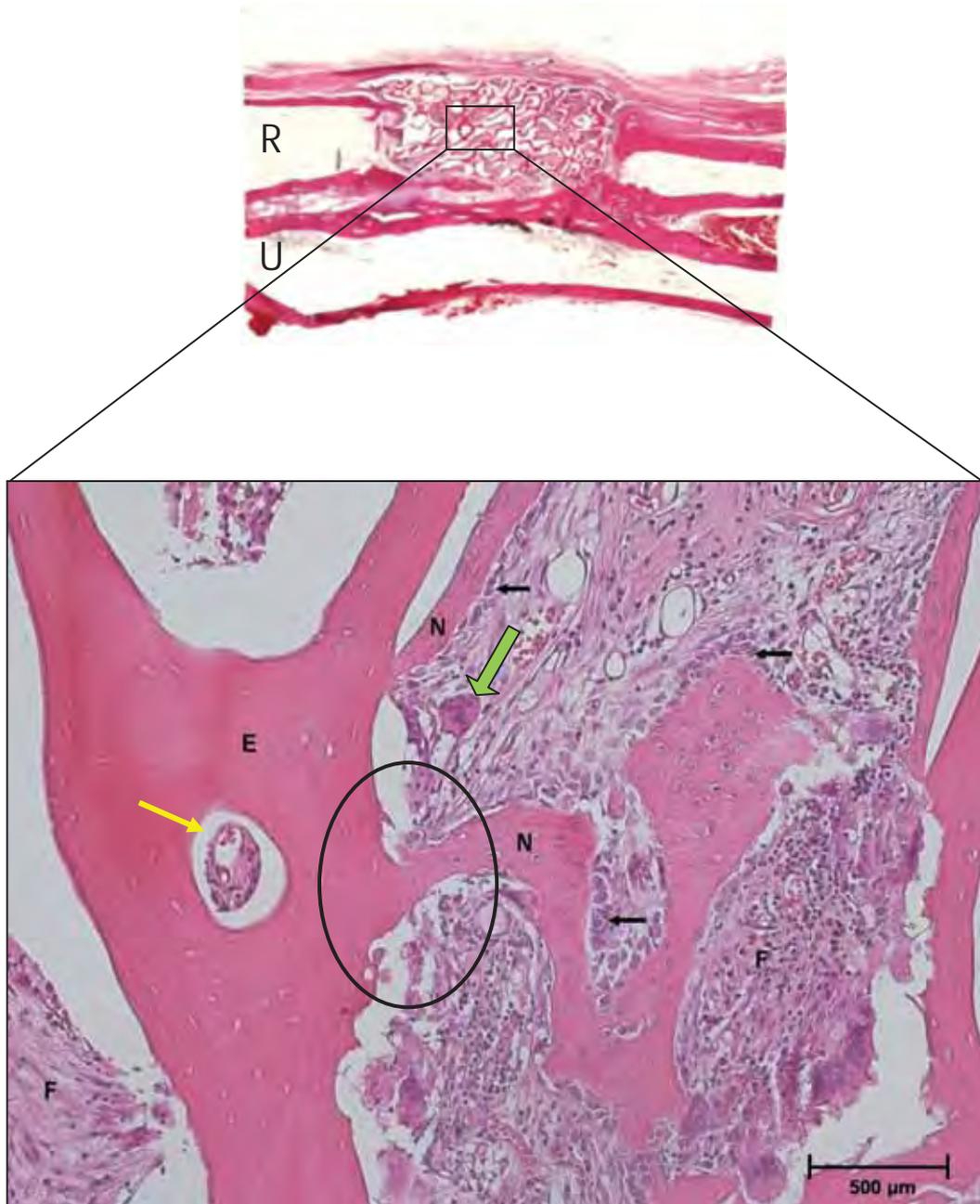


Figura 25: Aspecto histológico da incorporação do enxerto e formação de osso novo. Acima, fotografia da lâmina em coelho do grupo GEM 45 dias após a enxertia. Abaixo, fotomicrografia óptica da região central do enxerto. Notar presença de linhas de osteoblastos (setas pretas) e união entre o osso novo produzido e enxerto ósseo (círculo). Observar o crescimento de vasos dentro das trabéculas do enxerto (seta amarela). Notar ainda, osteoclasto realizando reabsorção óssea (seta verde). Coloração HE. F: tecido fibroso; N: osso novo; E: enxerto ósseo canino; R: rádio; U: ulna;

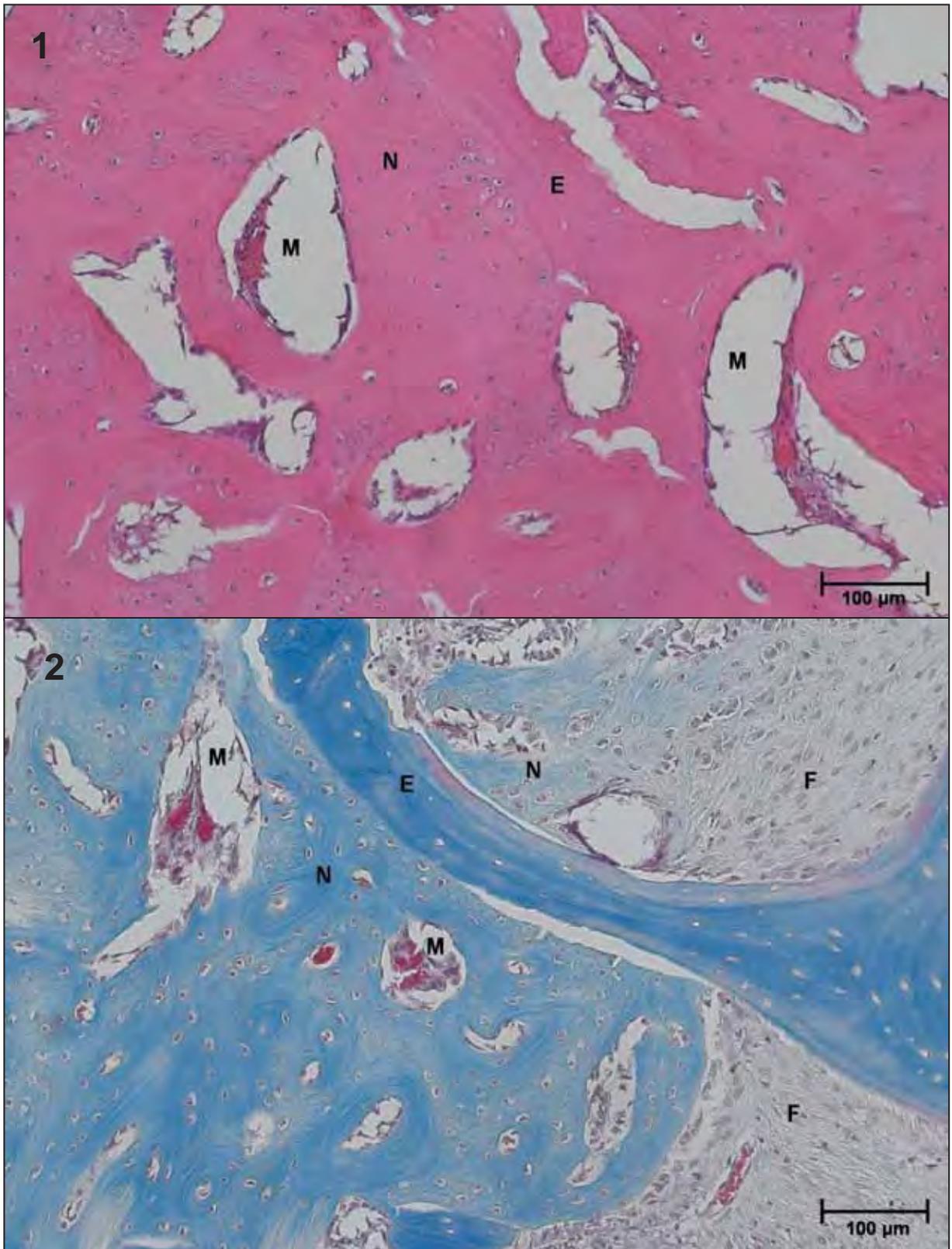


Figura 26: Aspecto histológico da incorporação do enxerto e formação de osso novo. Animal do grupo GEPRP, 45 dias após a enxertia. A imagem mostra área com excelente incorporação do enxerto (E) com o osso novo (N) formado ao longo de suas trabéculas e reorganização medular em meio ao tecido ósseo neoformado. Coloração HE (1) e TM (2). M: medula óssea.

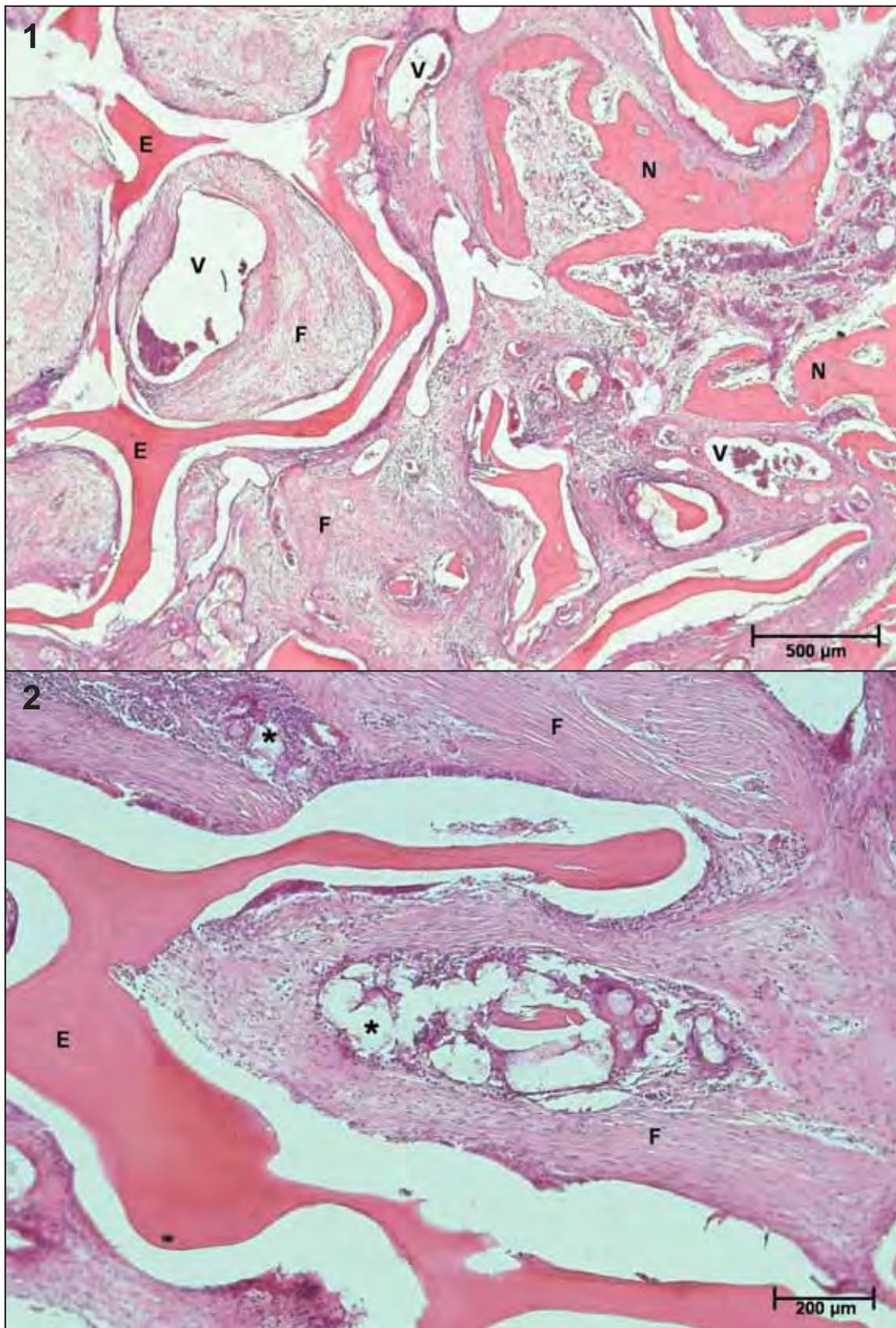


Figura 27: Fotomicrografias da região do enxerto de animal do grupo GE, 45 dias após a enxertia. Na imagem 1, notar a intensa vascularização formada em meio às trabéculas do enxerto. A imagem 2 mostra início de organização de medula óssea (\*) no tecido fibroso presente no interior das trabéculas. Coloração HE. F: tecido fibrosocartilaginoso; N: osso neoformado; V: vaso sanguíneo; E: enxerto ósseo canino.

#### 5.3.2.4 Achados histológicos do grupo controle

Nos animais do grupo controle (n=6), a formação óssea presente foi avaliada, da mesma forma que os demais grupos, dentro dos escores apresentados no Anexo II. A variável incorporação do enxerto não se aplica a este grupo, portanto, este grupo não apresenta escore geral de consolidação de 0-14.

As medianas dos escores para “qualidade da união” e “formação de ponte óssea” dos animais eutanasiados aos 45 dias (n=3) e 90 dias (n=3) encontram-se na Tabela 12. Observar aspecto histológico da união fibrosa em animal do grupo C na Figura 28.

Tabela 12: Medianas dos escores do grupo controle

<b>Grupo</b>	<b>Qualidade da união (0-4)</b>	<b>Formação de ponte óssea (0-4)</b>
<b>Controle (45 dias pós- operatório)</b>	3	2
<b>Controle (90 dias pós- operatório)</b>	3	3

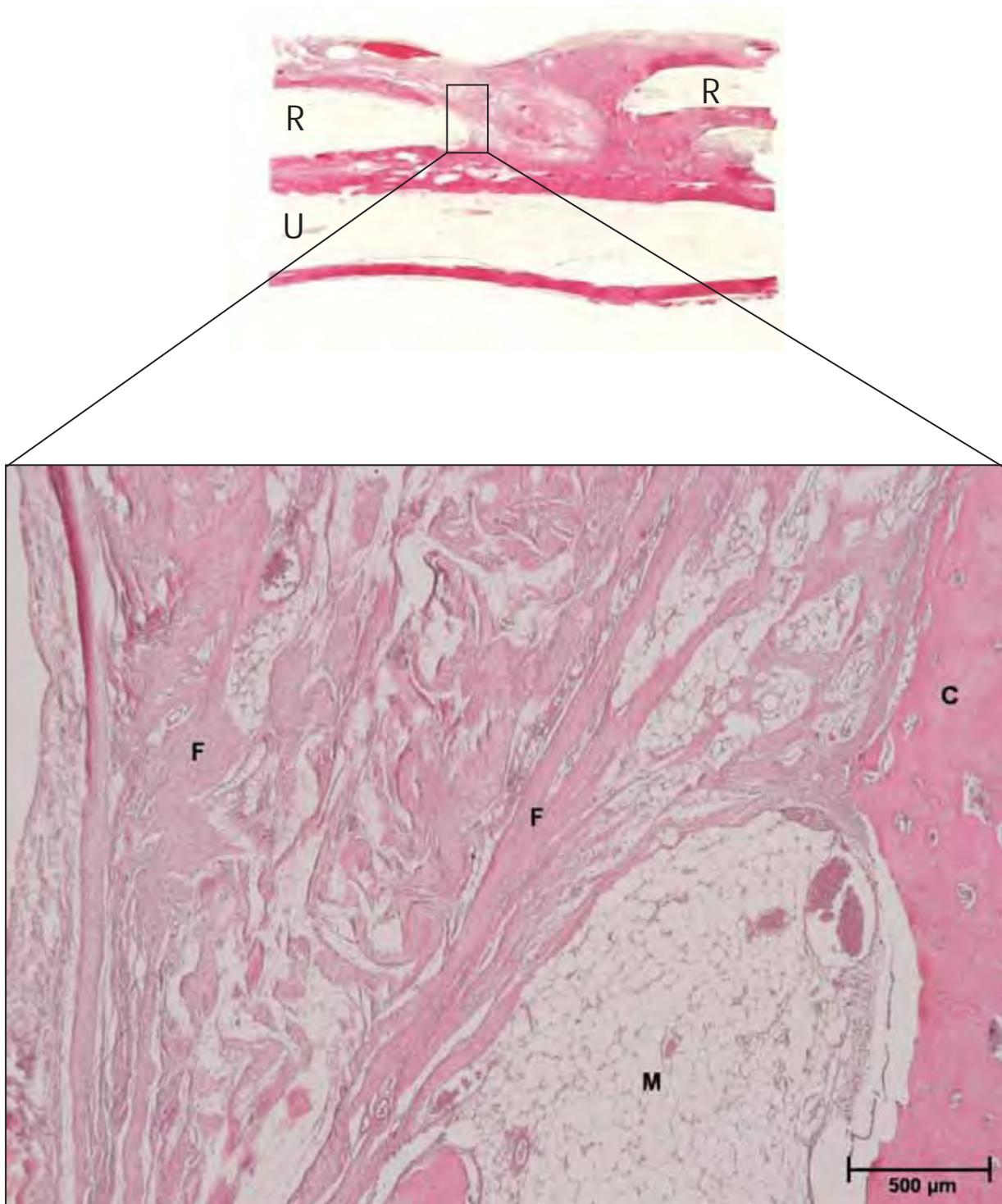


Figura 28: Aspecto histológico da falha óssea de animal do grupo controle, 45 dias após a cirurgia. Acima, fotografia da lâmina histológica mostrando rádio (R), tecido formado na falha óssea e ulna (U). Abaixo, fotomicrografia óptica da interface do osso do coelho (C) e com a falha óssea permitindo visualizar seu preenchimento com tecido fibroso (F). M: medula óssea/canal medular. Coloração HE.

## 6. DISCUSSÃO

A utilização de enxertos mantidos a temperatura ambiente mostrou-se prática conforme já mencionado por outros autores (ROECK; DRABU, 2001; ZHI; ZU-BING, 2005). A facilidade no armazenamento e transporte, acesso aos enxertos durante os procedimentos cirúrgicos e a possibilidade de armazenamento por longos períodos proporcionados pela liofilização (ROECK; DRABU, 2001) assume marcada relevância, notadamente quando se leva em consideração a otimização de procedimentos cirúrgicos ortopédicos.

Em relação ao preparo dos enxertos para utilização neste estudo, não se encontrou dificuldades na busca de cães que se adequassem aos critérios de inclusão para doação de ossos. A maioria dos doadores tratava-se de animais jovens com injúrias graves em decorrência de atropelamento tais como luxações e fraturas graves de coluna vertebral e alterações hemodinâmicas e respiratórias.

As amostras ósseas coletadas para enxertia mantiveram seu formato e estrutura trabecular após o processamento. Macedo et al. (1999) demonstraram que o processo de liofilização conjunto com a reidratação não alteram as propriedades biomecânicas de compressão do osso esponjoso bovino.

Por meio de avaliações subjetivas, palpação e observação das amostras do osso canino, foi possível perceber que a consistência dos enxertos tornou-se mais rígida, provavelmente devido ao ressecamento provocado pela desidratação, apresentando uma resistência maior à compressão digital, embora permitisse ainda o corte e adaptação ao leito receptor. O corte dos blocos de osso esponjoso pôde ser realizado com maior facilidade após a reidratação dos enxertos. Conrad et al. (1993) notaram que a reidratação dos enxertos esponjosos humanos pode reduzir sua rigidez e resistência à compressão. Características semelhantes foram percebidas com os enxertos caninos muito embora seja necessária a execução de testes biomecânicos para análise exata destes dados.

Vale ressaltar que o intuito da aplicação deste tipo de enxerto, segundo Finkemeier (2002), não é o de promover suporte mecânico e sim o de fornecer suporte estrutural para o intracrescimento ósseo e vascular e induzir a formação

óssea. O seu uso em condições que exijam suporte mecânico à compressão, embora realizado em algumas situações, deve ser feito com cautela (LASANIANOS; MOUZOPOULOS; GARNAVOS, 2008).

Ainda, no que concerne ao preparo dos ossos, seu desgorduramento previamente à liofilização, é indicado e utilizado durante o preparo de enxertos alógenos ou xenógenos com intuito de se remover os possíveis agentes imunogênicos, como células medulares e gordura. Além disso, a completa remoção celular elimina virtualmente o risco de transmissão de doenças tumorais (GALIA et al., 2005; ZHI; ZU-BING, 2005).

No presente estudo, após lavagem com água corrente sob alta pressão, os ossos esponjosos não aparentavam possuir gordura aderida em meio às trabéculas. Todavia, ao se fazer o desgorduramento por imersão em solução homogênea de álcool e clorofórmio, notou-se quantidade considerável de gordura remanescente formando sobrenadante espesso na solução. Galia et al. (2005) e Zhi e Zu-Bing, (2005) não mencionam a quantidade de banhos necessários para a completa retirada da gordura dos enxertos, recomendando banhos sucessivos provavelmente devido a variação na quantidade de gordura entre os fragmentos ósseos de cada doador. Esta variação também foi observada neste estudo, sendo as imersões para desgorduramento realizadas até que o sobrenadante deixasse de se formar, o que ocorreu em média com 2 a 3 banhos.

Durante o acompanhamento clínico a reação de incômodo observada quando da palpação da ferida cirúrgica constatada em 12 animais (n=42) foi interpretada como presença de dor. Contudo, nenhum dos animais apresentou tal reação fora do que se considera normal para o pós-cirúrgico de uma intervenção ortopédica.

Na avaliação tecidual microscópica observou-se infiltrado inflamatório em apenas duas lâminas. Radiograficamente, o osso do coelho adjacente ao enxerto mostrou-se com aspecto saudável, ou seja, sem sinais radiográficos de osteomielite. Ademais, no pós-operatório as medicações restringiram-se a analgesia e antibioticoterapia durante sete dias, não tendo sido estabelecida terapia com anti-inflamatórios. De acordo com o que Bubenik e Smith (2007) afirmam, tratamento de infecções ósseas exige a administração de antibióticos ou antifúngicos por um período prolongado (meses), o que não foi realizado nos animais desta pesquisa.

Tais observações clínicas, radiográficas e histológicas, nos permitem afirmar que o desengorduramento, a liofilização ocasionaram adequada redução da antigenicidade do osso esponjoso canino e, a irradiação gama subsequente, na dose de 25 kGy, gerou esterilização eficiente das amostras ósseas.

Pesquisas realizadas por diversos autores corroboram os achados deste estudo. Galia et al. (2005) implantaram enxertos de osso humano liofilizado no fêmur de ratos observando infiltrado inflamatório em apenas um dos 16 animais do grupo experimental. Da mesma forma, nos estudos de Salkeld et al. (2001) e Galia et al. (2008) não são reportados indícios de rejeição de enxertos ósseos liofilizados implantados de maneira alógena e xenógena, respectivamente.

Os achados radiográficos e histológicos da presente pesquisa mostraram que o osso canino processado de acordo com o protocolo sugerido apresentou excelente osteointegração. Radiograficamente notou-se integração de 84,2 % das interfaces avaliadas. Embora a avaliação tecidual microscópica seja de fundamental importância na confirmação da osteointegração, alguns autores como, por exemplo, Lasanianos, Mouzopoulos e Garnavos (2008) utilizaram somente graduação radiográfica por escores como método de avaliação da incorporação de enxertos esponjosos liofilizados alógenos aplicados como preenchedores ósseos nos casos de fraturas por impactação do platô tibial. Estes autores concluíram que os enxertos foram completamente incorporados pelos pacientes em um período de 8 a 12 semanas, resultados estes semelhantes aos constatados nos animais deste estudo.

A integração óssea de enxertos pode ser caracterizada histologicamente por presença de trabéculas ósseas em reabsorção ou necróticas, envolvidas por tecido ósseo neoformado, medula hematopoiética e células adiposas (GALIA et al., 2008). No presente estudo, histologicamente a osteointegração do enxerto foi constatada em 28 animais (n=36), sendo observado crescimento de osso novo envolvendo as trabéculas do osso esponjoso canino (escores 3, 4 e 5, Anexo III) e união do osso novo com o enxerto. Linhas de osteoblastos mostraram-se predominantes, posição que estas células assumem quando da produção de osso novo. Em alguns animais aos 90 dias observou-se que as trabéculas ósseas já haviam sido completamente substituídas por tecido ósseo neoformado, sendo possível identificar o processo de organização de medula óssea em estágio inicial ou mais avançado. Os achados

histológicos demonstraram claramente e, permitem afirmar, que o enxerto ósseo liofilizado canino é osteointegrável quando aplicado de maneira xenógena e, provavelmente o será quando da aplicação alógena.

De um modo geral, a união entre o enxerto e o osso do coelho ocorreu com prevalência de tecido ósseo e cartilagem mineralizada. Houve um índice relativamente baixo de interfaces que não apresentaram continuidade do enxerto com o osso hospedeiro (17 dentre 108), radiograficamente perceptível. Entretanto, radiograficamente pode ser difícil ou mesmo impossível discernir finas junções fibrosas ou cartilaginosas em início de mineralização, podendo somente a observação histológica mostrar a verdadeira composição tecidual prevalente (CROSS, 2012). Desta forma, o estudo histológico permitiu observar que nestas interfaces houve a maior prevalência de tecido fibrocartilagenoso (escore 2, anexo III) e não a ausência de preenchimento.

Suposições foram feitas a fim de explicar esta união retardada fibrocartilagenosa. Uma possibilidade seria a aposição de forma não justaposta do enxerto na falha óssea resultando em um pequeno espaço entre o enxerto e o rádio, o que dificultaria a mineralização. Outra possibilidade seria a de ter ocorrido lesões vasculares mais intensas durante as intervenções cirúrgicas destes animais. Tais lesões poderiam ter algum papel como causadoras do atraso da mineralização observado nestas interfaces visto que, condroblastos são formados sob tensões de oxigênio locais menores e, somente a medida que a tensão de oxigênio aumenta, juntamente com o crescimento vascular, é que a mineralização da fibrocartilagem é iniciada (CROSS, 2012).

Outra função desempenhada pelo osso esponjoso canino foi a de osteocondução. Sua estrutura macro e microscópica trabecular agiu como um guia no processo de consolidação por permitir a infiltração vascular e migração celular de elementos envolvidos na formação óssea. Formaram-se pontes ósseas conduzidas sobre o enxerto radiograficamente visibilizadas na maior parte das interfaces (75 %). Além disso, a presença do enxerto na falha óssea dos animais dos grupos tratados gerou preenchimento radiográfico estatisticamente maior em comparação aos animais do grupo controle ( $p < 0.05$ ).

A ampla vascularização do enxerto constatada por avaliação histológica, aliada a presença de neoformação óssea notadamente quando observadas por entre a estrutura trabecular tridimensional do osso esponjoso, segundo Kraus (2012) são achados que confirmam a propriedade osteocondutora de enxertos, neste caso, do enxerto esponjoso canino. Estes achados vão ao encontro de constatações feitas por Judas et al. (2005) os quais demonstraram a capacidade osteocondutiva de enxertos ósseos esponjosos liofilizados de coelhos aplicado de forma alógena.

Oliveira et al. (2007) também observaram a capacidade osteocondutora do osso liofilizado de ratos, afirmando adicionalmente a respeito de sua capacidade osteoindutora.

As propriedades osteoindutivas dos enxertos liofilizados desmineralizados estão bem documentadas (LOHMANN, et al., 2001; BAUER; MUSCHLER, 2003). Por outro lado, os enxertos liofilizados mineralizados seriam basicamente osteocondutivos, não sendo capazes de induzir neoformação óssea quando implantados heterotopicamente, na musculatura, por exemplo (PIATTELLI et al., 1996).

Segundo Lohmann et al. (2001), isto não negaria a possibilidade de em uma implantação ortotópica (em sítios ósseos) o osso liofilizado mineralizado apresentar capacidade de osteoindução. Suspeita-se que os fatores de crescimento, incluindo as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), que são sabidamente osteoindutivas, seriam liberados durante a reabsorção osteoclástica do enxerto. Ademais, seria improvável que a liofilização destruísse tais fatores bioativos e indutores do crescimento ósseo visto que a liofilização é comumente utilizada na preservação destes componentes quando estes são extraídos do osso.

Dinopoulos, Dimitriou e Giannoudis (2012) descrevem o potencial osteoindutor remanescente do osso esponjoso após liofilização e afirmam que a osteocondução é eficiente somente quando ambos, substâncias osteoindutoras e elementos osteogênicos estão presentes na mesma região.

Baseado nessas informações, os achados histológicos do presente estudo sugerem fortemente que o osso esponjoso liofilizado canino apresente capacidade de induzir a formação óssea. Todavia, os autores consideram importante a realização de estudos microscópicos de marcação celular para ratificar o potencial

osteoindutor destes enxertos não desmineralizados quando aplicados em sítios ósseos.

Os escores histológicos atribuídos à formação óssea identificada nos animais do grupo controle remetem a atividade óssea de boa qualidade. Estes resultados fazem jus ao metabolismo ósseo de animais hígidos. Na comparação dos animais pertencentes aos grupos tratados com aqueles do grupo controle, observou-se nas radiografias que embora tenha ocorrido crescimento ósseo em todas as falhas ósseas vazias, este crescimento foi muitas vezes desorganizado gerando preenchimento incompleto da falha, ou mesmo, crescimento além dos limites das corticais adjacentes. Macroscopicamente, quando da coleta das amostras ósseas para análise histológica, notou-se uma depressão onde havia sido retirado o segmento ósseo nos animais do grupo C. Em contrapartida, nos animais dos grupos tratados observou-se a continuidade do rádio como um todo, sendo difícil a identificação visual do local de enxertia.

O osso esponjoso canino atuou como bom preenchedor de falhas ósseas guiando o processo de regeneração óssea. Este é um aspecto importante clinicamente, quando se deseja restabelecer o formato anatômico exato da estrutura óssea danificada (DINOPOULOS; DIMITRIOU; GIANNOUDIS, 2012).

Em relação às comparações entre os grupos tratados, notaram-se resultados melhores nos grupos GEM e GEPRP em comparação ao grupo GE. A medula óssea e o PRP proporcionaram união com maior prevalência de tecido ósseo ou cartilagem já mineralizada (Figura 19) e maior formação de ponte óssea entre o rádio e o enxerto em comparação ao uso isolado do osso liofilizado ( $p > 0.05$ ).

Histologicamente notaram-se medianas maiores nos grupos nos quais o enxerto estava associado a algum outro componente no escore geral (GEM= 8, GEPRP=8 e GE=7, Tabela 11) e no escore aos 45 dias (GEPRP=9, GEM=8 e GE=7, Tabela 10).

Notadamente, no que diz respeito à formação de ponte óssea, foram observados valores maiores radiograficamente nos grupos GEM e GEPRP (31 e 28, respectivamente,  $n=36$ , Tabela 5) em comparação ao GE (22,  $n=36$ , Tabela 5). Observou-se na maior parte dos animais pertencentes ao GE, aumento da densidade óssea ao longo das bordas externas do enxerto, ou seja, ponte óssea em

estágio inicial. Em contrapartida, nos animais dos grupos GEPRP e GEM houve predominância de ponte óssea organizada de forma bem evidente, sendo observada ponte completa em animais do GEPRP somente (aos 45 dias).

Nos animais do GEPRP eutanasiados aos 45 dias, a associação do PRP ao enxerto gerou resultados histológicos melhores em relação ao enxerto utilizado puro ou associado à medula óssea. O PRP determinou maior quantidade de osso neoformado e maior substituição do enxerto pelo osso novo em relação aos grupos experimentais GE e GEM, sendo muitas vezes difícil a distinção entre enxerto e osso novo.

Estes achados tornaram possível perceber que a associação de medula óssea ou PRP ao osso liofilizado foram benéficas ao processo de consolidação. Provavelmente, houve a esperada estimulação da formação óssea proporcionada pela incorporação de células mesenquimais oriundas da medula óssea ao sítio de lesão e pelos fatores de crescimento liberados pelas plaquetas contidas no PRP (HERNIGOU et al., 2005; EVERTS et al., 2006).

Sabe-se que a medula óssea contém células-tronco osteoprogenitoras que são capazes de formar osso quando combinadas com elementos de uma matriz óssea (MILLIS; MARTINEZ, 2007). Segundo Bruder et al. (1998) as células osteoprogenitoras da medula óssea diferenciadas podem produzir osso novo sem estabelecer elementos de cartilagem inicial. Essa aposição direta do osso resultaria em consolidação rápida do defeito ósseo. Tal fenômeno poderia explicar o maior preenchimento radiográfico aos 45 dias ( $p < 0,05$ ) constatado no presente estudo naqueles animais nos quais o enxerto foi associado à medula óssea.

Vale ainda ressaltar que as células mesenquimais estão distribuídas de maneira esparsa na medula óssea (TIEDEMAN et al., 1991) e métodos que tornem possível concentrar a população de células osteoprogenitoras, como a centrifugação da medula realizada neste estudo, podem favorecer a osteogênese, uma vez que a formação óssea estaria diretamente relacionada ao número de células tronco mesenquimais (CONNOLLY et al., 1989).

Foi observado na literatura que defeitos ósseos segmentares podem consolidar de forma bem-sucedida após a adição de PRP ou medula óssea cultivada ou fresca diretamente ou em combinação com carreadores, tais como, esponjas de

gelatina, matriz óssea desmineralizada, proteína morfogênica óssea ou implantes cerâmicos (CONNOLLY et al., 1989; TIEDEMAN et al., 1991; BRUDER, et al., 1998; BARROS et al., 2001; HERIGOU et al., 2005). Entretanto, não foram encontradas pesquisas envolvendo o uso do osso mineralizado liofilizado de cão, podendo o presente estudo compor a escassa literatura neste tópico específico.

O osso esponjoso do cão atuou como um adequado carreador da medula óssea aplicada e do PRP, evitando que estes componentes se espalhassem para áreas distantes da falha, complicação comumente observada conforme Finkemeier (2002) descreve, sobretudo no caso da medula óssea.

No que concerne à coleta da medula óssea, a crista ilíaca é descrita por alguns autores como sendo o melhor lugar para sua coleta (BARROS et al., 2001). Concordantemente, neste estudo observou-se a possibilidade de coleta de no mínimo 2 mL de medula, a qual pôde ser facilmente aspirada mediante punção da crista ilíaca de coelhos. Fatores como a facilidade de coleta, baixas taxas de complicações relacionadas à coleta e custo praticamente ausente, podem encorajar os cirurgiões a procederem a injeção de medula óssea autógena em associação ao enxerto ósseo canino liofilizado.

Em relação ao plasma rico em plaquetas preparado para uso neste estudo, obteve-se a partir de 8 mL de amostra de sangue total dos coelhos, um volume médio de PRP de 0,7 mL, sendo a contagem média de plaquetas obtidas de 3.731.000 plaquetas/  $\mu$ L (Tabela 2, Anexo III). Na contagem plaquetária prévia ao preparo do PRP, todos os pacientes apresentaram níveis dentro dos padrões fisiológicos para a espécie, variando de 250.000 a 678.000 plaquetas/  $\mu$ L (CARPENTER, 2006). Este fator contribuiu para a adequada concentração de plaquetas visto que uma trombocitopenia pode ser considerada fator limitante para o preparo do PRP (MAIA; SOUZA, 2009).

As amostras de PRP coagularam, formando um gel, após ativação com gluconato de cálcio. Portanto, é possível inferir que a intensidade e tempo de centrifugação utilizados foram adequados, proporcionando um PRP com adequada concentração e viabilidade plaquetária (GIMENO et al., 2006).

Todavia três amostras de PRP preparadas para aplicação em animais que seriam eutanasiados aos 90 dias foram submetidas a maior tempo de espera após

ativação do PRP em decorrência da curva de aprendizado no preparo do componente. Estas amostras apresentaram contração do coágulo, diferente dos demais e não se entremearam adequadamente do enxerto ósseo esponjoso assumindo aspecto borrachoso. Além disso, segundo Maia e Souza (2009) a ativação do PRP deve ser feita imediatamente antes da sua utilização terapêutica para adequado aproveitamento dos FC. Acredita-se que isto possa ter prejudicado a eficiência do PRP nestes três animais e conseqüentemente provocado queda nos escores do GEPRP aos 90 dias no tocante à formação de ponte óssea, incorporação do enxerto e no escore total (Tabela 10).

Na literatura foram encontradas pesquisas mostrando a eficácia do PRP, pesquisas mostrando indícios de maior promoção à formação óssea, entretanto sem diferenças estatísticas e por último, relatos com falha na identificação de efeitos favoráveis do PRP (BARROS et al., 2001; SILVA et al., 2007; ISHIDA et al., 2007; KAJIKAWA et al., 2008; MAIA; SOUZA, 2009; ROCHA et al., 2011)

Desta forma, neste estudo optou-se por realizar uma análise adicional e mais exata das tendências observadas em relação tanto ao grupo experimental GEPRP quanto ao GEM. Supõe-se que a avaliação por escore possa não ter sido sensível suficiente a ponto de detectar alterações sutis na consolidação óssea geradas pela associação destes componentes ao enxerto. Estudos quantitativos de contagem celular, mensuração da área de formação de osso novo, área de vascularização estão sendo realizados na tentativa de se esclarecer melhor e com maior exatidão estas tendências positivas, tanto em relação ao PRP quanto em relação à medula óssea associadas ao enxerto ósseo canino liofilizado.

## 7. CONCLUSÕES

Por meio deste estudo foi possível concluir que:

- O processamento do osso esponjoso canino por meio da liofilização e esterilização forneceu enxertos com baixa antigenicidade e estéreis.
- O enxerto ósseo esponjoso canino liofilizado mostrou-se osteointegrável e com propriedades de osteocondução e osteoindução.
- O osso esponjoso canino atuou como bom preenchedor de falhas ósseas guiando o processo de regeneração, sendo o preenchimento da falha maior nos grupos tratados em comparação ao grupo controle, no qual as falhas ósseas permaneceram vazias.
- A associação de medula óssea ou PRP ao osso liofilizado foi benéfica ao processo de consolidação, gerando maior formação de ponte óssea aos 45 dias entre o enxerto e o osso hospedeiro em comparação com a implantação somente do enxerto liofilizado.
- A adição de medula óssea induziu maior preenchimento radiograficamente perceptível do enxerto no intervalo do pós-operatório imediato aos 45 dias em comparação ao uso do enxerto isoladamente ou em associação ao PRP.
- O PRP associado ao enxerto proporcionou maior formação de osso novo aos 45 dias e maior substituição do enxerto pelo osso novo em relação ao uso do enxerto isoladamente ou associado à medula óssea.

## 8. REFERENCIAS

ALIEVI, M. M. **Implante ósseo cortical alógeno conservado em mel na reconstrução de falha óssea diafisária em fêmur de cães**. 2006. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

ANITUA, E.; ANDIA, I.; ARDANZA, B.; NURDEN, P.; NURDEN, A.T. Autologous platelet source of proteins for healing and tissue regeneration. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v. 91, n. 1, p. 4-15, 2004.

BARBOSA, A. L. T.; DEL CARLO, R. J.; GOMES, H. C.; OLIVEIRA, A. C.; MONTEIRO, B. S.; DEL CARLO, B. N. Plasma rico em plaquetas para a reparação de falhas ósseas em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 5, p. 1335-1340, 2008.

BARROS, S. V. S. G.; DEL CARLO, R. J.; VARGAS, M. I.; GALVÃO, S. R.; MAIA FILHO, A. Auto-enxerto percutâneo de medula óssea em coelhos. I. coleta, preparo e aplicação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 6, p. 1013-18, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782001000600016>>.

BAUER, T. W.; MUSCHLER, G. F. Bone graft materials: an overview of the basic science. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v. 371, p. 10-27, 2003.

BOSS, E. A. **Modelagem e otimização do processo de liofilização**: aplicação para leite desnatado e café solúvel. 2004. 129 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

BRUDER, S. P.; KRAUS, K. H.; GOLDBERG, V. M.; KADIYALA, S. The effect of implants loades with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. **Journal of Bone and Joint Surgery**, Boston, v. 80, n. 7, p. 985- 986, 1998.

BUBENIK, L. J.; SMITH, M. Infecções ortopédicas. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 3. ed. Barueri: Manole, 2007. cap. 132, p. 1862-1874.

CARPENTER, J. W. **Formulário de animais exóticos**. 3. ed. Buenos Aires: Inter-médica, 2006. p. 416.

CAVASSANI, M. M.; MORAES, J. R. E.; PADILHA FILHO, J. G. Função osteoindutora de fragmentos ósseos conservados em glicerina a 98%: estudo experimental em ratos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 3, p. 445-448, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782001000300013>>.

CONNOLLY, J.; GUSE, R.; LIPPIELLO, L.; DEHNE, R. Development of an osteogenic bone-marrow preparation. **Journal of Bone and Joint Surgery**, Boston, v. 71A, n. 5, p. 684-691, 1989.

CONRAD, E. U.; ERICKSEN, D. P.; TENSER, A. F.; STRONG, D. M.; MACKENZIE, A. P. The effects of freeze-drying and rehydration on cancellous bone. **Clinical Orthopaedics**, Philadelphia, n. 290 p. 279-284, 1993.

CORNELL, C. N.; LANE, J. M. Current understanding of osteoconduction in bone regeneration. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, New York, n. 355, suppl., p. S267-S273, 1998.

CORNU, O.; BANSE, X.; DOCQUIER, P. L.; LUYCKX, S.; DELLOYE, Ch. Effect of freeze-drying and gamma irradiation on the mechanical properties of human cancellous bone. **Journal of Orthopaedic Research**, Hoboken, v. 18, n. 3, p. 426-431, 2000.

CRENSHAW, A. H. Bone grafting. In: CANALE, S. T.; DAUGHERTY, K.; JONES, L. J. **Campbell's operative orthopaedics**. Missouri: Mosby Year Book, 1991. p. 12-22.

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

DENNY, H. R.; BUTTERWORTH, S. J. Enxertos ósseos. In: \_\_\_\_\_. **Cirurgia ortopédica em cães e gatos**. 4. ed. São Paulo: Roca, 2006. cap. 40, p. 352- 382.

DIMITRIOU, R.; TSIRIDIS, E.; GIANNOUDIS, P. V. Current concepts of molecular aspects of bone healing. **Injury**, Bristol, v. 36, n. 12, p. 1392-1404, 2005.

DINOPOULOS, H.; DIMITRIOU, R.; GIANNOUDIS, P. V. Bone graft substitutes: what are the options?. **The Surgeon**, Edinburgh, p. 1-10, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.surge.2012.04.001>>.

EVERTS, P. A. M.; KNAPE, J. T. A.; WEIBRICH, G.; SCHÖNBERGER, J. P. A. M.; HOFFMANN, J.; PVERDEVEST, E. P.; BOX, H. A. M.; ZUNDERT, A. van. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. **The Journal of Extra-Corporeal Technology**, Portland, v. 38, n. 2, p. 174-187, 2006.

FARRINGTON, M.; MATTHEWS, I.; FOREMAN, J.; RICHARDSON, K. M.; CAFFREY, E. Microbiological monitoring of bone grafts: two years' experience at a tissue bank. **Journal of Hospital Infection**, Londres, v. 38, p. 261-271, 1998.

FEOFILOFF, E. D.; JESUS-GARCIA, R. Técnicas de obtenção, processamento, armazenamento e utilização de homoenxertos ósseos Protocolo do Banco de Ossos da Escola Paulista de Medicina. **Revista Brasileira de Ortopedia**, São Paulo, v. 31, n. 11, p. 895-903, 1996.

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

GALIA, C. R.; MACEDO, C. A. S.; ROSITO, R.; MOREIRA, L. F. Osteointegração de enxertos liofilizados impactados. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 24-8, 2008.

GALIA, C. R.; ROSITO, R.; MELLO, T. M.; MACEDO, C. Uso de enxerto ósseo homólogo e heterólogo em diáfise femoral de ratos: comparação entre enxerto ósseo congelado e liofilizado. **Revista Brasileira de Ortopedia**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 141-146, 2005.

GALIA, C. R.; MACEDO, C. A. S.; ROSITO, R.; MELLO, T. M.; DIESEL, C.; MOREIRA, L. F. Caracterização físico-química de ossos liofilizados de origem bovina e humana. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 2, p. 157-160, 2009.

GERSTENFELD, L. C.; CULLINANE, D. M.; BARNES, G. L.; GRAVES, D. T.; EINHON, T. A.; Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, v. 88, n. 5, p. 873-84, 2003.

GIANNOBILE, W. V. Periodontal tissue regeneration by polypeptide growth factors and gene transfer. In.: \_\_\_\_\_. **Tissue engineering**: applications in maxillofacial surgery and periodontics. Illinois: Quintessence, 1999. p. 231-243.

GIMENO, F. L.; GATTO, SILVIA, FERRO, J. CROXATTO, J. O.; GALLO, J. E. Preparation of platelet-rich plasma as a tissue adhesive for experimental transplantation in rabbits. **Thrombosis Journal**, London, v. 4, n. 18, p. 1-7, 2006.

GOLDBERG, V.; STEVENSON, S. Natural history of autografts and allografts. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, New York, n. 225, p. 7-16, 1987.

GONSHOR, A. Technique for producing platelet-rich plasma e platelet concentrate: background and process. **International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry**, Chicago, v. 22, n. 6, p. 547-557, 2002.

GOUJON, E. Recherches expérimentales sur les propriétés du tissu osseux. **Journal de l'Anatomie**, v. 6, p. 399-412, 1869.

HACHIYA, Y.; SAKAI, T.; NARITA, Y.; IWATA, H.; YOSHIZAWA, H.; HACHIYA, K.; MURITA, C. M. Status of bone banks in Japan. **Transplantation Proceedings**, Philadelphia, v. 31, n. 5, p. 2032-2035, 1999.

HARCOURT-BROWN, F. **Textbook of rabbit medicine**. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2002. p. 122.

HERNIGOU, P.; BEAUJEAN, F. Bone marrow in patients with pseudarthrosis: a study of progenitor cells by in vitro cloning. **Revue de Chirurgie Orthopédique et Réparatrice de l'Appareil Moteur**, Paris, v. 83, n. 1, p. 33-40, 1997.

HERNIGOU, P.; POIGNARD, A.; MANICOM, O.; MATHIEU. G.; ROUARD, H. The use of percutaneous autologous bone marrow transplantation in nonunion and avascular necrosis of bone. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, Needham, v. 87, p. 896-902, 2005.

ISHIDA, K.; ISHIDA, K.; KURODA, R.; MIWA, M.; TABATA, Y.; HOKUGO, A.; KAWAMOTO, T.; SASAKI, K.; DOITA, M.; KUROSAKA, M. The regenerative effects of platelet-rich plasma on meniscal cells *in vitro* and its *in vivo* application with biodegradable gelatin hydrogel. **Tissue Engineering**, New York, v. 13, n. 5, p. 1103-1112, 2007.

JUDAS, F.; FIGUEIREDO, M. H.; CABRITA, A. M. S.; PROENÇA, A. Incorporation of Impacted Morselized Bone Allografts in Rabbits. **Transplantation Proceedings**, Orlando, n. 37, p. 2802-2804, 2005.

KAJIKAWA, Y.; MORIHARA, T.; SAKAMOTO, H.; MATSUDA, K.; OSHIMA, Y.; YOSHIDA, A.; NAGAE. M.; ARAI, Y.; KAWATA, M.; KUBO, T. Platelet rich plasma initial mobilization circulation derived tendon healing. **Journal of Cellular Physiology**, Philadelphia, v. 215, n. 3, p. 837-845, 2008.

KEVY, S. V.; JACOBSON, M. S. Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. **The Journal of Extra Corporeal Technology**, Stuttgart, v. 36, n. 1, p. 28-35, 2004.

KON, T.; CHO, T. J.; AIZAWA, T.; YAMAZAKI, M.; NOOH, N.; GRAVES, D.; GERSTENFELD, L. C.; EINHORN, T. A. Expression of Osteoprotegerin, Receptor Activator of NF- B Ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. **Journal of Bone and Mineral Research** Washington, v. 16, n. 6, p. 1004-1014, 2001.

KRAUS, K. H. Bone grafts and substitutes. In: TOBIAS, K. M.; JOHNSTON, S. A. N. **Veterinary surgery small animal**. St. Louis: Elsevier, 2012. cap.49, p. 676-684.

KÜBLER, N.; REUTHER, J.; KIRCHNER, T.; PRIESSNITZ, B.; SEBALD, W. Osteoinductive, morphologic, and biomechanical properties of autolyzed, antigen-extract-ed, allogeneic human bone. **Journal Oral Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 51, n. 12, p. 1346-1357, 1993.

LASANIANOS, N.; MOUZOPOULOS, G.; GARNAVOS, C. The use of freeze-dried cancellous allograft in the management of impacted tibial plateau fractures. **Injury International Journal of the Care of Injured**, v. 39, n. 10, p. 1106-1112, 2008.

LIEBERMAN, J. R.; DALUISKI, A.; EINHORN, T. A. The role of growth factors in the repair of bone. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, Boston, v. 84, n. 6, p. 1032-1042, 2002.

LOHMANN, C. H.; ANDREACCHIO, D.; KÖSTER, G.; CARNES JR., D. L.; COCHRAN, D. L.; DEAN, D. D.; BOYAB, B. D.; SCHWARTZ, Z. Tissue response and osteoinduction of human bone grafts in vivo. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, New York, v. 121, p. 583-590, 2001.

MACEDO, C. A. S.; GALIA, C. R.; SILVA, A. L. B.; CÉSAR, P. C.; SANCHES, P. R. S.; DUARTE, L. S.; MÜLLER, L. M. Comparação da resistência à compressão do osso bovino congelado e liofilizado. **Revista Brasileira de Ortopedia**, São Paulo v. 34, n. 9/10, p. 529-534, 1999.

MAIA, L.; SOUZA, M. V. Componentes ricos em plaquetas na reparação de afecções tendo-ligamentosas e osteoarticulares em animais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 4, p. 1279-1286, 2009.

MAN, D.; PLOSKER, H. WINLAND-BROWN, J. E. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Baltimore, v. 107, n. 1, p. 229-237, 2001.

MARTINEZ, S. A.; WALKER, T. Bone grafts. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 29, n. 5, p. 1207-1219, 1999.

MILLIS, D. L.; MARTINEZ, S. A. Enxertos ósseos. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 3. ed. Barueri: Manole, 2007. cap. 133, p. 1875-1891.

MORAES, P. C. **O uso do ultrassom pulsado de baixa intensidade em falhas ósseas produzidas experimentalmente em rádio de coelhos, preenchidas ou não com cimento de fosfato de cálcio**. 2006. 44 f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2006.

MULLER, D. C. M.; PIPPI, N. L.; BASSO, P. C.; SANTOS JÚNIOR, E. B.; GUERRA, A. C. O. Técnicas e sítios de coleta de medula óssea em cães e gatos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 7, p. 2243-2251, 2009.

OLIVEIRA, A. C. P.; COLLARES, M. V. M.; GALIA, C. R.; EDELWEISS, M. I.; PINTO, R. A.; KNEIBEL, L. Comparação entre enxerto ósseo autólogo, homólogo congelado e homólogo liofilizado em modelo experimental de cranioplastia. **Revista da Sociedade Brasileira de Cirurgia Craniomaxilofacial**, São Paulo, v. 10, n. 4, p. 140-146, 2007.

OYAMA, T.; NISHIMOTO, S.; TSUGAWA, T.; SHIMIZU, F. Efficacy of platelet-rich plasma in alveolar bone grafting. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. Philadelphia, v. 62, n. 5, p. 555-558, 2004.

PADILHA FILHO, J. G.; PENHA, L. H. C.; SOUZA, S. F. Uso do enxerto ósseo cortical bovino conservado em glicerina a 98% na osteotomia femoral em gatos. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 9, n. 4, p. 1071-1078, 2008.

PAPAS, A. M. Current methods of bone storage by freenzing and freeze-drying. **Cryobiology**, Maryland Heights, v. 4, n. 6, p. 358- 375, 1968.

PIATTELLI, A.; SCARANO, A.; CORIGLIANO, M.; PIATTELLI, M. Comparison of bone regeneration with the use of mineralized and demineralized freeze-dried bone allografts: a histological and histochemical study in man. **Biomaterials**, Surrey, v. 17, n.11, p. 1127-1131, 1996.

POULTON, T. B.; MURPHY, W. D.; DUERK, J. L.; CHAPEK, C. C.; FEIGHLIN, D. H. Bone marrow reconversion in adults who are smokers: MR imaging findings. **American Journal of Roentgenology**, Springfield, v. 161, n. 3, p. 1217-1221, 1993.

ROCHA, F. S.; RAMOS, L. M. A.; BATISTA, J. D.; ZANETTA-BARBOSA, D.; DECHICHI, P. Enxerto bovino orgânico associado ao PRP em calvária de coelhos. **Arquivos Internacionais de Otorrinolaringologia**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 208-213, 2011.

ROECK, N.; DRABU, K. J. Impaction Bone Grafting Using Freeze-Dried Allograft in Revision Hip Arthroplasty. **The Journal of Arthroplasty**, v. 16, n. 2, p. 201-206, 2001.

ROOS, M. V.; CAMISA JÚNIOR, A.; MICHELIN, A. F. Procedimentos de um banco de ossos e a aplicabilidade dos enxertos por ele proporcionados. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v. 8, n. 3, p. 122-127, 2000.

SALKELD, S. L.; PATRON, L. P.; BARRACK, R. L.; COOK, S. D. The effect of osteogenic protein-1 on the healing of segmental bone defects treated with autograft or allograft bone. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, Needham, v. 83A, n. 6, p. 803-816, 2001.

SANTOS, F. C.; RAHAL, S. C. Enxerto ósseo esponjoso autólogo em pequenos animais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 6, p. 1969-1975, 2004.

SILVA, S. B.; FERRIGNO, C. R. A.; STERMAN, F. A.; BACCARIN, D. C. B.; YAZBEK, K. V. B.; MURAMOTO, C.; AMAKU, M. Plasma rico em plaquetas combinado a hidroxiapatita na formação do calo ósseo em fraturas induzidas experimentalmente no rádio de cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 4, p. 1045-1051, 2007.

STEVENSON, S. Enhancement of fracture healing with autogenous and allogeneic bone grafts. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, New York, v. 355, suppl., p. S239-S246, 1998.

TIEDEMAN, J. J.; CONNOLLY, J. F.; STRATES, B. S.; LIPPIELLO, L. Treatment of nonunion by percutaneous injection of bone marrow and demineralized bone matrix an experimental study in dogs. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, n. 268, p. 294-302, 1991.

TOMFORD, W. W.; DOPPELT, S. H.; MANDIN, H. J.; FRIEDLAENDER, G. E. 1983 bone bank procedures. **Clinical Orthopaedics Related Research**, Philadelphia, n. 174, p. 15-21, 1983.

TSIRIDIS, E.; UPADHYAY, N.; GIANNOUDIS, P. Molecular aspects of fracture healing: Which are the important molecules? **Injury**, Bristol, v. 38, n. 1, p. 11-25, 2007.

VULCANI, V. A. S.; MACORIS, D. G.; PLEPIS, A. M. G. Membranas biológicas homólogas preservadas em solução alcalina seguida de liofilização, glicerina a 98% e por liofilização para implantação em eqüinos. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 5, 2008.

WEIGEL, J. P. Enxerto ósseo. In: BORJAB, M. J. **Mecanismos da moléstia na cirurgia de pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1996. p. 791-798.

ZHI, L.; ZU-BING, L. Repair of mandible defect with tissue engineering bonein rabbits. **ANZ Journal of Surgery**, Richmond, v. 75, n. 11, p. 1017-1021, 2005.

ZILIOOTTO, L.; DALECK, C. R.; PADILHA FILHO, J. G.; SOUZA, A. P.; FANTINATTI, A. P.; DINIZ, P. P. V. P. Utilização de implante ósseo cortical alógeno conservado em glicerina para preservação de membro torácico: estudo experimental em cães. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 107-115, 2003.

## ANEXO I

### **PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DAS AMOSTRAS**

#### Fixação

A fixação das amostras coletadas foi realizada em formalina 10%. O tempo de imersão variou de um dia a uma semana.

#### Descalcificação

Após a fixação, as amostras ósseas foram descalcificadas para permitir o corte no micrótomo. Utilizou-se como descalcificador uma solução de ácido fórmico 30% e citrato de sódio 20 %. As amostras permaneceram imersas nesta solução e foram observadas a cada dois dias quanto à consistência. Após um período médio de oito dias as amostras apresentavam consistência tal que permitia o corte longitudinal com navalha. Este corte durante a descalcificação foi necessário para que o descalcificador penetrasse em toda a amostra, inclusive no enxerto canino, o qual apresentou descalcificação mais lenta que o osso de coelho.

Tão logo as amostras (osso de coelho contendo enxerto ósseo canino) adquiriram consistência borrachosa, estas foram lavadas e permaneceram imersas em água por um dia a fim de se retirar todo descalcificador remanescente.

O período médio total de descalcificação de 12 dias.

#### Desidratação

As amostras foram desidratadas em etanol por meio de imersões consecutivas de uma hora e 20 minutos, cada imersão. Utilizou-se nesta sequência: álcool 80%, álcool 90%, álcool 95%, álcool absoluto I, álcool absoluto II, álcool III e por último, solução de álcool absoluto e xilol, na qual as amostras permaneceram por 12 horas.

### Diafanização e inclusão

O agente diafanizador utilizado foi o xilol. Foram realizados três imersões de uma hora em xilol I, xilol II e por último xilol III. Em seguida as amostras foram incluídas em parafina e emblocadas para corte em micrótomo. Cada bloco de parafina continha um antímero da amostra, que já havia sido seccionada ao longo do eixo longitudinal do rádio e da ulna no momento da descalcificação. O antímero da amostra foi posicionado na parafina de modo que os cortes realizados no micrótomo resultassem em cortes histológicos do eixo longitudinal do rádio (contendo o enxerto) e ulna.

## ANEXOII

Tabela 1: Descrição da escala de graduação utilizada para avaliação histológica (somatório geral de 0 a 14). Fonte: Salkeld et al. (2001) modificada.

Descrição	Grau
Sem sinais de fibrose ou qualquer união	0
União com prevalência de tecido fibroso	1
União com prevalência de tecido fibrocartilaginoso ou cartilaginoso	2
Prevalência de cartilagem mineralizada e união óssea	3
União óssea	4
<b>Qualidade da união</b>	
Ausência de córtex ou ponte óssea	0
Aumento da densidade óssea ao longo da borda da falha óssea ou enxerto (início de ponte óssea)	1
Formação evidente de organização de córtex e canal medular	2
Formação do córtex, porém, ponte óssea incompleta	3
Completa formação do córtex e ponte óssea	4
<b>Formação de ponte óssea e remodelamento</b>	
<b>Incorporação do enxerto e formação de osso novo</b>	
Presença do enxerto, ausência de incorporação e de formação de osso novo	0
Ausência de formação de osso novo e presença do enxerto ou maior parte dele	1
Presença do enxerto, alguma incorporação com moderada formação de osso novo.	2
Diminuição do enxerto e aumento de osso novo	3
Presença do enxerto, alguma incorporação com formação de osso novo contínuo com osso hospedeiro e remodelação do osso novo	3
Diminuição da quantidade de enxerto (comparado com grau 3), boa incorporação do enxerto e grande quantidade de osso novo	4
Menor quantidade de enxerto visível (comparado com grau 4), boa incorporação do enxerto e osso novo com o hospedeiro e grande quantidade de osso novo	5
Não visualização do enxerto, extensa formação de osso novo.	6
Dificuldade de diferenciação entre o enxerto e o osso novo, excelente incorporação e avançado grau de remodelamento do osso novo com enxerto e hospedeiro.	6

**ANEXO III**

Tabela 2: Resultados da contagem plaquetária das amostras sanguíneas coletadas dos animais do GEPRP para preparo do PRP e quantidade plaquetas e volume obtido após seu processamento.

Coelho	Contagem de plaquetas da amostra sanguínea (x 10 <sup>3</sup> plqt/ $\mu$ L)	Contagem obtida no PRP (x 10 <sup>3</sup> plqt/ $\mu$ L)	Volume de PRP (mL)
25	456	6.007	0,4
26	484	2.860	0,4
27	489	8.324	0,4
28	678	6.949	0,4
29	509	3.605	0,8
30	392	2.312	0,8
31	428	2.764	0,8
32	250	1.316	0,7
33	340	1.595	0,8
34	451	3.165	0,9
35	390	2.219	0,8
36	229	3.654	0,8