

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 25/02/2021.

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

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

Gabriel Luiz Montanhim

Médico Veterinário

2019

**D
I
S
S.

/

M
O
N
T
A
N
H
I
M

G.
L.

2
0
1
9**

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

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

Discente: Gabriel Luiz Montanhim

Orientadora: Profa. Dra. Paola Castro Moraes

Coorientador: Prof. Dr. Luis Gustavo Gosuen Gonçalves Dias

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

2019

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

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTOR: GABRIEL LUIZ MONTANHIM

ORIENTADORA: PAOLA CASTRO MORAES

COORDENADOR: LUIS GUSTAVO GOSUEN GONÇALVES DIAS

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

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

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

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

Jaboticabal, 25 de fevereiro de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

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

“Sonhar é acordar para dentro”

Mario Quintana

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SUMÁRIO

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

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

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

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

Jaboticabal, 02 de junho de 2016.


Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

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

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

Palavras-chaves: enxerto xenólogo, neovascularização e osteoindução.

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

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

Keywords: neovascularization, osteoinduction and xenografts.

LISTA DE FIGURAS

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

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

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

LISTA DE TABELAS

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

LISTA DE ABREVIATÖES

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

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

6. CONCLUSÃO

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

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

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

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

8. REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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