

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO DA REVASCULARIZAÇÃO DE FRAGMENTOS
ÓSSEOS BOVINOS AUTOCLAVADOS E IMPLANTADOS
COM E SEM A PRESENÇA DO OMENTO EM SÍTIOS
INTRACORPÓREOS DE COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)
COMO MODELO DE BIORREATOR IN-VIVO**

Matheus Teixeira Seixas e Silva

Médico Veterinário

2018

**D
I
S
S.**

/

**S
I
L
V
A**

**M.
T.
S.**

**2
0
1
8**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO DA REVASCULARIZAÇÃO DE FRAGMENTOS
ÓSSEOS BOVINOS AUTOCLAVADOS E IMPLANTADOS
COM E SEM A PRESENÇA DO OMENTO EM SÍTIOS
INTRACORPÓREOS DE COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)
COMO MODELO DE BIOREATOR IN-VIVO.**

Matheus Teixeira Seixas e Silva

Orientador: Prof. Dr. Luis Gustavo Gosuen Gonçalves Dias

Dissertação apresentada à banca examinadora da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, para exame de qualificação como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária.

2018

Silva, Matheus Teixeira Seixas e
S586a Avaliação da revascularização de fragmentos ósseos bovinos autoclavados e implantados com e sem a presença do omento em sítios intracorpóreos de coelhos (*oryctolagus cuniculus*) como modelo de biorreator in-vivo / Matheus Teixeira Seixas e Silva. -- Jaboticabal, 2018
iii, 39 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018
Orientador: Luis Gustavo Gosuen Gonçalves Dias
Banca examinadora: Paola Castro Moraes, Sílvia Henrique de Freitas
Bibliografia

1. Enxerto. 2. Omento. 3. Xenógeno. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.71:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

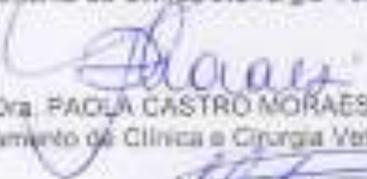
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DA REVASCULARIZAÇÃO DE FRAGMENTOS ÓSSEOS BOVINOS-AUTOCLAVADOS E IMPLANTADOS COM E SEM A PRESENÇA DO OMENTO EM SÍTIOS INTRACORPÓREOS DE COELHOS (*Drycolagus carniculus*) COMO MODELO DE BIORREATOR IN-VIVO

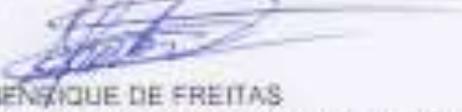
AUTOR: MATHEUS TEIXEIRA SEIXAS E SILVA

ORIENTADOR: LUIS GUSTAVO GOSUEN GONÇALVES DIAS

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


Prof. Dr. LUIS GUSTAVO GOSUEN GONÇALVES DIAS
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


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


Prof. Dr. SILVIO HENRIQUE DE FREITAS
Departamento de Medicina Veterinária / FZEA/USP - Pirassununga/SP

Jaboticabal, 09 de março de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Matheus Teixeira Seixas e Silva nasceu em Porto Ferreira - SP, aos 31 de dezembro de 1988. cursou graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Camilo Castelo Branco de março de 2008 a dezembro de 2012. Realizou Residência em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais de março de 2013 a março de 2015, sob orientação do Prof. Dr. Artur Gouveia Rocha. Atuou como professor *coaching* em técnica cirúrgica no Centro de Ensino em Anatomia e Cirurgia Veterinária de março de 2013 a novembro de 2015. Atualmente é mestrando do Programa de Cirurgia Veterinária pela FCAV UNESP de Jaboticabal – SP, sob orientação do Prof. Dr. Luis Gustavo Gosuen G. Dias. Possui experiência na área de Medicina Veterinária, com ênfase em Cirurgia Veterinária de Pequenos Animais.

EPÍGRAFRE

“Prefiro os que me criticam, pois me corrigem, aos que me elogiam, por que me corrompem.”

Santo Agostinho

DEDICATÓRIA

...A meus pais, família, amigos e todos que me apoiaram e me incentivaram para realização deste trabalho!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luis Gustavo Gosuen Gonçalves Dias pela amizade, confiança e por todo o conhecimento e experiências profissionais e pessoais compartilhados, pelas oportunidades que me proporcionaram crescer profissionalmente e pessoalmente e pela orientação e colaboração neste trabalho. Muito obrigado por tudo!

Ao meu Professor orientador de graduação e residência além de amigo, Artur Gouveia Rocha, a quem tenho eterna gratidão e admiração pessoal e profissional, por ter me ensinado tanto, ter sido um dos responsáveis pela minha formação e que tanto me incentivou a iniciar a pós-graduação nesta instituição.

Aos professores, residentes, pós-graduandos e funcionários do Hospital Veterinário da FCAV – UNESP Câmpus Jaboticabal, pela amizade e todo conhecimento compartilhado para completar esta etapa de minha vida.

Agradeço a minha família e aos meus amigos irmãos e minha namorada por todo apoio e confiança que também depositaram em mim, sem vocês eu não seria nada, muito obrigado.

Ao Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária da FCAV – UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Ao CNPq pela bolsa concedida durante o Mestrado.

Aos colaboradores deste trabalho, os professores. Dr. Alessandre Hataka, Profa. Paola Castro de Moraes, e pós-graduandos Thiago André Salvitti de Sá Rocha, Maria Eduarda Bastos Andrade Moutinho da Conceição, Gabriel Luiz Montanhim e todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, muito obrigado.

Especialmente a todos os animais que participaram de minha formação e pesquisa contribuindo para o avanço da ciência, possuem o meu eterno agradecimento e respeito.

Sumário	Página
Lista de Siglas e Abreviaturas	i
Lista de Tabelas	ii
Lista de Figuras	iii
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	2
3.OBJETIVO.....	9
3.1 Objetivo Geral.....	9
3.2 Objetivos Específicos.....	9
4.JUSTIFICATIVA	9
5.MATERIAL E MÉTODOS.....	10
5.1 Animais	10
5.2 Fragmentos Ósseos Esponjosos Bovinos (Xenógeno).....	10
5.3 Locais de Implantação – Sítios intracorpóreos	11
5.4 Procedimento.....	12
5.5 Descrição da técnica de implantação.	13
5.6 Avaliações	16
5.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA	17
5.7.1 Processamento histopatológico	17
5.7.2 Avaliação histopatológica.....	18
5.8 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	20
6 RESULTADOS	20
6.1 Análise histopatológica do Subgrupo S1 – Fragmento Ósseo Bovino no espaço subcutâneo.	21
6.2 Análise histopatológica do Subgrupo S2 – Fragmento Ósseo Bovino no espaço subcutâneo com omento.....	27

6.3 Análise histopatológica do Subgrupo S3 – Fragmento ósseo bovino intraósseo.	31
7.ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	35
8.DISSCUSSÃO	36
9.CONCLUSÃO.....	39
10.REFERÊNCIAS.....	39

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 REVASCULARIZAÇÃO DE FRAGMENTOS ÓSSEOS BOVINOS AUTOCLAVADOS E IMPLANTADOS COM E SEM A PRESENÇA DO OMENTO EM SÍTIOS INTRACORPÓREOS DE COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*) COMO MODELO DE BIORREATOR IN-VIVO

RESUMO - As falhas ósseas, principalmente as críticas, representam entidade à parte. Para que se possa gerar reconstituição de falhas ósseas críticas é necessário o auxílio de métodos de enxertia que promovam osteoindução e osteocondução. É frequente a busca de substitutos ósseos de forma a aprimorar técnicas já existentes que promovam osteogênese visando o rápido restabelecimento de suas funções. O enxerto autógeno isolado pode ser insuficiente nas falhas ósseas críticas apesar de ser a melhor opção, causa maior morbidade na recuperação do paciente. O omento tem sido frequentemente estudado na cirurgia devido suas diversas propriedades vasculares vantajosas em locais pouco vascularizados, melhorando a cicatrização e controle de infecção. Este estudo teve como objetivo avaliar a capacidade angiogênica e osteoindutora de fragmentos ósseos xenógenos autoclavados implantados, com ou sem a presença de omento no espaço subcutâneo (S1), espaço subcutâneo juntamente com o omento (S2) e região intraóssea (S3) em coelhos.

Utilizou-se 30 animais em um único grupo onde cada animal recebeu os fragmentos ósseos em três sítios corpóreos diferentes (S1, S2 e S3) e foram avaliados por métodos histológicos sua atividade angiogênica e osteogênica. Diante dos resultados obtidos foi possível observar que, o material implantado foi rejeitado devido à reação de corpo estranho ter sido intensa e persistente por todos os tempos (7, 15, 30, 45, 60 dias) de avaliação em todos os locais de implantação. Não houve osteogênese em nenhum dos locais de implantação. Foi possível comparar a angiogênese entre locais de implantação avaliando a infiltração vascular no interior dos fragmentos ósseos, onde S2 apresentou melhores resultados, com início de infiltração vascular aos 7 dias, enquanto que os demais grupos se iniciaram aos 30 dias. Conclui-se com este estudo que diante desta metodologia de preparo de implante ósseo xenógeno, provavelmente não houve remoção completa da antigenicidade, nem mesmo a preservação das BMPs, mas foi possível afirmar que o contato com o omento foi capaz de aumentar a angiogênese nos fragmentos implantados em comparação com os demais locais.

Palavras-chave: Enxerto, omento, xenógeno

EVALUATION OF REVASCULARIZATION OF AUTOCLAVED BOVINE BONE FRAGMENTS AND IMPLANTED WITH AND WITHOUT THE PRESENCE OF THE OMENTUM IN INTRACORPHORUS SITES OF RABBITS (*Oryctolagus cuniculus*) AS A BIORREATOR IN-VIVO MODEL

ABSTRACT - Bone failures, especially criticism, represent a separate entity. In order to generate reconstitution of critical bone defects it is necessary to use grafting methods that promote osteoinduction and osteoconduction. The search for bone substitutes is frequent in order to improve existing grafting techniques for the rapid restoration of their functions. The isolated autogenous graft may be insufficient in the critical bone faults although it is the best option, it causes greater morbidity in the recovery of the patient. The omentum has frequently been studied in the surgery due to its several advantageous vascular properties in places little vascularized, improving the cicatrization and control of infection. The purpose of this study was to evaluate the angiogenic and osteoinductive capacity of implanted autogenous xenogene bone fragments, with or without the presence of omentum in the subcutaneous space (S1), subcutaneous space together with the omentum (S2) and intraosseous region (S3).

Thirty animals were used in a single group where each animal received the bone fragments at three different body sites (S1, S2 and S3) and their angiogenic and osteogenic activity were assessed by histological methods. In view of the results obtained, it was possible to observe that the implanted material was rejected because the foreign body reaction was intense and persistent at all times (7, 15, 30, 45, 60 days) of evaluation at all implantation sites. There was no osteogenesis at any of the implantation sites. It was possible to compare the angiogenesis between implantation sites by evaluating the vascular infiltration within the bone fragments, where S2 presented better results, with vascular infiltration beginning at 7 days, while the other groups started at 30 days. It was concluded from this study that in view of this xenogen graft preparation methodology, there was probably no complete removal of the antigenicity, not even the preservation of the BMPs, but it was possible to affirm that the contact with the omentum was able to increase the angiogenesis in the fragments in comparison with the other sites.

Key words: Graft, omentum, xenogen

Lista de Siglas e Abreviaturas

BMP: Sigla do inglês “Bone Morphogenetic Protein” para proteína morfogenética óssea

cm: Centímetro

EDTA: Sigla para o ácido etilenodiamino tetra-acético.

IGF: Sigla do inglês “Insuline Growth Factor” para fator de crescimento semelhante à insulina

IL-1: Interleucina 1

IL-2: Interleucina 2

IM: Intramuscular

KCl: Cloreto de potássio

kg: Quilograma

mg: Miligramas

mL: mililitros

NaCl: Cloreto de sódio

PDGF: Sigla do inglês “platelet derived growth fator” para fator de crescimento derivado de plaqueta

SC: Subcutâneo

TGF- β : Sigla do inglês “transforming growth factor beta” para fator de transformação do crescimento beta

%: Porcentagem

°C: grau Celsius

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Escores quanto à resposta celular inflamatória.	18
Tabela 2 - Escores quanto à formação de novo tecido ósseo.	19
Tabela 3 - Escores quanto à presença de células gigantes inflamatórias (reação de corpo estranho).	19
Tabela 4 - Atividade no Interior do Fragmento S1.....	21
Tabela 5 - Atividade no Interior do Fragmento S2.....	27
Tabela 6 - Atividade no Interior do Fragmento S3.....	32
Tabela 7 - Tabela de relação entre tempo e vascularização interna do fragmento ósseo.....	36

Lista de Figuras

- Figura 1: Imagem fotográfica dos retângulos de osso corticoesponjoso bovino e os cubos confeccionados a partir deles. Fonte: Laboratório de Ortopedia da FCAV – UNESP, Jaboticabal, SP. 11
- Figura 2: Imagens fotográficas de coelho (*Oryctolagus cuniculus*), ilustrando as áreas submetidas à tricotomia e os posicionamentos na mesa cirúrgica, em decúbito dorsal em A e ventral em B, para os acessos cirúrgicos das regiões designadas para a implantação dos fragmentos ósseos bovinos. O traço vermelho representa o local onde foi alocado o fragmento do subgrupo 1 (S1), traço azul representa o subgrupo 2 (S2) e o traço preto o subgrupo 3 (S3). 13
- Figura 3: Imagens fotográficas do transoperatório (decúbito dorsal, cabeça localizada à direita das imagens) de coelho (*Oryctolagus cuniculus*) do subgrupo S1 (fragmentos ósseos bovino no subcutâneo) ilustrando: A) vista da incisão de pele e presença dos fragmentos ósseos (S1) (seta), alocado na região da artéria epigástrica superficial caudal direita. B) aspecto após a locação dos fragmentos ósseos (S1) (seta) antes da confecção das suturas para minimizar sua mobilização. 14
- Figura 4: Imagens fotográficas do transoperatório (decúbito dorsal, cabeça localizada à direita das imagens) de coelho (*Oryctolagus cuniculus*) do subgrupo S2 (fragmentos ósseos bovino no subcutâneo com omento) ilustrando: A) exposição do omento após celiotomia. B) imagem demonstrando a borda da linha mediana da celiotomia na seta pontilhada e na seta contínua é apontada a abertura lateral esquerda da musculatura do abdome onde o omento foi conduzido para o espaço subcutâneo para que os fragmentos fossem acomodados na “bolsa” confeccionada como observado em B e em C consecutivamente já fechada. 15
- Figura 5: Imagens fotográficas do transoperatório (decúbito ventral, cabeça localizada à esquerda das imagens) de coelho (*Oryctolagus cuniculus*) do subgrupo S3 (fragmentos ósseos bovino na região intraóssea do osso ilíaco direito) ilustrando:

A) osteotomia do osso íliaco direito, no sentido dorsal para ventral, com serra oscilatória elétrica cirúrgica (seta amarela) e, em B) os fragmentos ósseos bovino (seta azul) alocados entre as hemi porções ósseas (setas amarelas) do osso íliaco.

.....16

Figura 6: Fotomicrografia da periferia do fragmento ósseo implantado do subgrupo S1 aos sete dias de pós-operatório. Notar a célula gigante do tipo corpo estranho (seta longa) e a fragmentação da matriz óssea do fragmento ósseo (seta curta).

Coloração Hematoxilina Eosina na objetiva de 40x.22

Figura 7: Fotomicrografia da periferia do fragmento ósseo implantado do subgrupo S1 aos sete dias de pós-operatório. Notar os fibroblastos reacionais (seta longa) e a fragmentação da matriz óssea do fragmento (seta curta). Coloração Hematoxilina Eosina na objetiva de 20x.23

.....23

Figura 8: Fotomicrografia da região intrafragmentar do fragmento ósseo implantado do subgrupo S1 aos sete dias de pós-operatório. Notar a rede de fibrina e hemácias (seta longa) e a fragmentação da matriz óssea do fragmento (seta curta). Coloração Hematoxilina Eosina na objetiva de 20x.23

.....23

Figura 9: Fotomicrografia da periferia do fragmento ósseo implantado do subgrupo S1 aos 30 dias de pós-operatório. Notar a espessa cápsula conjuntiva (seta longa) e a região de neovascularização (seta curta). Coloração Hematoxilina Eosina na objetiva de 10x.24

.....24

Figura 10: Fotomicrografia da região intrafragmentar do fragmento ósseo implantado do subgrupo S1 aos 30 dias de pós-operatório. Notar a rede de fibrina, hemácias e células inflamatórias (seta longa). Coloração Hematoxilina Eosina na objetiva de 20x.25

.....25

Figura 11: Fotomicrografia da região intrafragmentar (fragmento ósseo implantado do subgrupo S1) aos 45 dias de pós-operatório. Notar a matriz óssea do fragmento degenerada (seta longa) e as células gigantes do tipo corpo estranho (setas curtas). Coloração Hematoxilina Eosina na objetiva de 40x.26

.....26

- Figura 12: Fotomicrografia da região intrafragmentar do fragmento ósseo implantado do subgrupo S1 aos 60 dias de pós-operatório. Notar a matriz óssea do fragmento envolvida pelo tecido conjuntivo (seta longa) e célula gigante do tipo corpo estranho (seta curta). Coloração Hematoxilina Eosina na objetiva de 10x.27
- Figura 13: Fotomicrografia da região intrafragmentar do fragmento ósseo implantado do subgrupo S2 aos 30 dias de pós-operatório. Notar o tecido conjuntivo vascularizado no interior do fragmento (seta). Coloração Hematoxilina Eosina na objetiva de 20x.29
- Figura 14: Fotomicrografia da região intrafragmentar do fragmento ósseo implantado do subgrupo S2 aos 30 dias de pós-operatório. Notar a célula gigante do tipo corpo estranho (seta longa) e a degeneração da matriz óssea do fragmento (seta curta). Coloração Hematoxilina Eosina na objetiva de 40x.30
- Figura 15: Fotomicrografia da periferia do fragmento ósseo implantado do subgrupo S2 aos 45 dias de pós-operatório. Notar o omento (seta longa) e o tecido conjuntivo no interior do fragmento ósseo (seta curta). Coloração Hematoxilina Eosina na objetiva de 10x.30
- Figura 16: Fotomicrografia da região intrafragmentar do fragmento ósseo implantado do subgrupo S2 aos 45 dias de pós-operatório. Notar o infiltrado inflamatório linfocitário (seta longa) e o tecido conjuntivo vascularizado. Coloração Tricrômico de Masson na objetiva de 10x.....31
- Figura 17: Fotomicrografia da região intrafragmentar do fragmento ósseo implantado do subgrupo S3 aos 07 dias de pós-operatório. Notar a grande quantidade de fibrina (seta). Coloração Hematoxilina Eosina na objetiva de 20x.33
- Figura 18: Fotomicrografia da periferia do fragmento ósseo implantado do subgrupo S3 aos 15 dias de pós-operatório. Notar a linha de crescimento endocondral do osso receptor (seta longa) e a matriz óssea degenerada do fragmento envolvida por tecido conjuntivo (seta curta). Coloração Hematoxilina Eosina na objetiva de 20x...33

Figura 19: Fotomicrografia da região intrafragmentar do fragmento ósseo implantado do subgrupo S3 aos 30 dias de pós-operatório. Notar o infiltrado inflamatório linfoplasmocitário (seta curta) e a matriz óssea do fragmento degeneradas (seta longa). Coloração Hematoxilina Eosina na objetiva de 20x.34

1. INTRODUÇÃO

A recuperação da função de um membro locomotor traumatizado representa desafio para o profissional, devido às particularidades de cada tipo de fratura, e o sucesso terapêutico será alcançado somente quando todas as dificuldades forem superadas. As falhas ósseas, principalmente as críticas, decorrentes de fratura cominutiva, não uniões, cisto ósseo e da remoção de segmento ósseo portador de neoplasia, representam entidade à parte, visto que as técnicas de tratamento cirúrgico convencionais para preservação do membro são trabalhosas, difíceis de serem realizadas e, por diversas vezes, insatisfatórias, culminando em amputação para melhoria da qualidade de vida do paciente.

Não obstante, alguns pacientes apresentam mais de um membro comprometido, dificultando sobremaneira o tratamento. Nestes casos, a amputação fica em tese descartada para ambos os apêndices locomotores. A exigência dos proprietários de animais de companhia também é relevante, pois buscam alternativas para preservação do membro nesses casos, e fazem-se necessárias alternativas que possibilitem a reconstrução tecidual, evitando a amputação. Ademais, tanto em casos isolados como de múltiplos membros comprometidos, é fundamental que haja celeridade no tratamento, eficiência na consolidação das fraturas e na resolução da osteomielite, que corriqueiramente está associada, e para tal, contar com quantidade considerável de tecido ósseo viável com capacidade osteoindutora é *conditio sine qua non*.

A engenharia de tecido ósseo é a utilização de material tridimensional que induz a formação de tecido ósseo ou age como carreador das células ósseas. Biomateriais modernos não devem somente preencher espaço e sim provocar resposta biológica específica.

A busca incessante por um material que possa ser utilizado como substituto ósseo é tema frequente em publicações científicas na área de reconstrução óssea. Relativamente à Ortopedia Veterinária, esta necessidade se torna ainda maior, pela dificuldade de se promover repouso adequado aos pacientes e, dessa forma, impedir sobrecarga precoce ao osso fraturado, mesmo após a osteossíntese. A associação entre implantes e enxertos é muito relatada na literatura, devido à

inexistência de material ideal para preenchimento de falhas ósseas críticas. Nesse contexto, a somatória dos efeitos é esperada para obter resultado satisfatório, ou seja, boa estabilização (osteossíntese) e quantidade ideal de tecido ósseo viável na falha, o que promoveria rápida deambulação e consolidação, minimizando as chances de quebra dos implantes.

O omento é uma reflexão peritoneal larga, ampla, que apesar das numerosas aplicações cirúrgicas, como retalhos, ainda continua sendo em grande parte desconhecido e certamente subestimado frente às diversas propriedades requeridas como, por exemplo, neovascularização, ativação de células tronco, carreamento de mediadores inflamatórios, dentre outros. Devido a este retalho ser amplamente vascularizado, ele é considerado bom leito receptor, sua obtenção é relativamente simples e rápida, apresentando pequeno índice de complicações.

A utilização do osso xenógeno bovino autoclavado se reforça pela facilidade de se obter banco de ossos de baixo custo e possibilidade de estoque. No entanto, será que o osso autoclavado e a associação com o omento aceleraria a neovascularização deste fragmento ósseo? Como será a resposta biológica com a presença do omento? Seria possível utilizar sítios intracorpóreos de coelhos como biorreatores *in vivo*? Caso essas respostas sejam afirmativas, há a possibilidade de se realizar estudo futuro com a utilização deste conjunto (osso bovino associado ou não ao enxerto de omento em diferentes sítios intracorpóreos), no intuito de formar tecido ósseo autógeno viável para posterior uso na reconstrução de falhas ósseas extensas do próprio paciente?

2. REVISÃO DE LITERATURA

Estudos estão sendo realizados em busca de substitutos ósseos biocompatíveis de origem biológica e/ou sintética, além de aprimorar as técnicas de enxertia já existentes e métodos que promovam a reparação de tecidos vivos lesionados, visando o rápido restabelecimento de suas funções mecânicas e fisiológicas (GUTIERRES et al., 2006; Turrer; FERREIRA, 2008; RAPOSO DO AMARAL et al., 2010; FREITAS et al., 2012). Segundo Salgado, 2002 e Gondim, 2007, o reparo de uma lesão está determinado a condições como, bom suprimento

sanguíneo, estabilidade mecânica, presença de um arcabouço tridimensional e KIM et al., 2006 enfatiza que regiões em que a morfologia e dimensão do defeito são extensas e críticas ao reparo, o mecanismo regenerativo torna-se limitado.

Avanço muito importante foi conquistado em 1965 quando Urist publicou seu trabalho sobre a teoria da indução óssea, e até hoje se busca por métodos no escopo de acelerar, de forma eficiente a indução da formação de novo tecido ósseo para utilização em falhas estruturais ósseas.

O osso é capaz de se regenerar e reconquistar sua estrutura original, sem que haja área com tecido cicatricial (REMEDIOS, 1999). Apesar desse potencial, a perda de tecido ósseo ainda é importante agravante para o tratamento das uniões retardadas, não uniões, fraturas múltiplas, cominutivas, nas ostectomias, artrodeses, no preenchimento de cavidades e defeitos ósseos segmentares extensos, neoplasias ósseas e osteomielites, consideradas as principais incidências de falhas ósseas na rotina da clínica cirúrgica, tanto na medicina veterinária quanto na humana. Para que se possa gerar reconstituição de falha óssea é necessário, em algumas ocasiões, auxílio de métodos de enxertia que promovam osteoindução e osteocondução, gerando muitas vezes, grande desafio para o cirurgião (COOK; RUEGER, 1996; REZENDE et al., 1998; ALIEVI et al., 2007).

Os materiais osteoindutores estimulam as células indiferenciadas do osso lesionado a converterem-se fenotipicamente em células osteoprogenitoras chamadas osteoblastos, responsáveis pela neoformação óssea. Os materiais osteocondutores não têm a capacidade para formar osso ou induzir sua formação, limitam-se, a fornecer base biocompatível inerte, que preenche a falha e orienta novas células originadas por proliferação da linhagem osteoprogenitora das bordas do defeito a promoverem a neoformação de tecido ósseo (COOK; RUEGER, 1996; KEATING; MCQUEEN, 2001).

A osteocondução é um processo tridimensional de crescimento de capilares, tecido perivascular e células mesenquimais do leito recipiente para dentro da estrutura do enxerto (MARTINEZ; WALKER, 1999; SLOTTE et al., 2003). Juntamente, faz-se necessário ambiente favorável e estímulo indutivo, como fragmento ósseo ou célula osteogênica para que a reparação óssea seja rápida e efetiva (ALEXANDER, 1987).

Os biomateriais podem atuar como um arcabouço e, assim, estimular a migração e proliferação celular (PIATTELLI et al., 2000). Dentre os métodos de “enxertia óssea”, já é sabido que o enxerto ósseo autógeno é considerado o “padrão ouro” e, apesar de biologicamente o próprio indivíduo ser a melhor fonte para a obtenção desse material, sua coleta muitas vezes pode ser limitada (GOLDBERG; STEVENSON, 1987; GUTIERRES et al., 2006; INTINI et al., 2008). A biocompatibilidade do enxerto autógeno (doador/receptor) para com o leito receptor gera aceleração na regeneração óssea por evitar rejeição, comparativamente aos demais tipos (alo e xenoenxertos), possuir matriz celular que estimula a osteogênese, osteocondução e a osteoindução, resultando no sucesso da formação e fusão ósseas (GUTIERRES et al., 2006; CAUBET et al., 2011).

Nos casos de falhas ósseas críticas e extensas, essa opção de enxerto isolado pode ser muitas vezes insuficiente. Apesar de ser biologicamente a melhor opção, a enxertia autóloga gera como inconveniente a necessidade de dois tempos cirúrgicos, lesão de tecido normal para obtenção do enxerto, maior tempo anestésico, maior dor e morbidade na recuperação do paciente e, não obstante, a maior chance de contaminações trans-cirúrgicas (RANZANI et al., 1996; MELO et al., 1998; REZENDE et al., 1998; MILLIS; MARTINEZ, 2003; ALIEVI et al., 2007; FREITAS et al., 2012).

Os implantes ósseos alógenos ou xenógenos são excelentes opções devido à similaridade com o osso autógeno em termos de estrutura e função (MAUNEY JR et al., 2004). Porém, para o uso de enxertos não autógenos é necessário preparo prévio como maceração ou liofilização, desproteínização e posteriormente esterilização, seja em autoclave, radiação gama ou oxido de etileno, com o objetivo de minimizar a imunogenicidade, o risco de transmissão de doenças do doador para o receptor, além de facilitar o armazenamento do material (BAUER; MUSCHLER, 2000; DUARTE; SCHAEFFER, 2000; OLIVEIRA et al., 2003).

Grande variedade de materiais utilizados na enxertia óssea está disponível para utilização de forma isolada ou combinada, segura e previsível, sendo os autoenxertos, aloenxertos, xenoenxertos e materiais aloplásticos como fosfatos de cálcio, partículas de vidro bioativo e hidroxiapatita os mais conhecidos e estudados (HANDSCHEL et al., 2009; SOHN et al., 2009).

Para o sucesso na aplicação de implantes, enxertos ou biomateriais, dois fatores são de suma importância, primeiro a sua biofuncionalidade, que está relacionada com a capacidade de desempenhar determinada função do organismo ou parte dela, e segundo, sua biocompatibilidade, que será baseada nas reações ocorridas no local onde será implantado (PROUBASTA; MUR; PLANELL, 1997; SILVA, 2006; CHEN, 2013).

Após a implantação do biomaterial num indivíduo, ocorrerá formação de hematoma na circunvizinhança, juntamente com a liberação de fluido rico em glicoproteínas, que revestirá e aderirá a essa estrutura. Pelo mecanismo de quimiotaxia, células como neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos são recrutadas para o local (reação de corpo estranho) que, além de atividade fagocítica, estimulam a ação dos linfócitos, fibroblastos, osteoclastos e células polimorfonucleares (DAVIES; HOSSEINI, 2000).

Em seguida, inicia-se o processo de angiogênese, com a migração e proliferação de células endoteliais que formarão rede de capilares que constituirá o suporte vascular no local (DAVIES; HOSSEINI, 2000), que levará a ação das citocinas (IL-1 e IL-2) e fatores de crescimento (TGF- β , PDGF, IGF, BMP's), proporcionando a diferenciação celular das mesenquimatosas pluripotenciais em matriz óssea e osso imaturo (GUTIERRES et al., 2006).

A maturação e remodelação que finalizam este processo se assemelham com a fisiologia da formação do calo ósseo decorrente a fratura (ANDERSON, 2001). Com a descoberta da importância da angiogênese e dos fatores de crescimento nos mecanismos de formação óssea, abre-se amplo campo de estudo de novas aplicações clínicas não só no tratamento de pseudoartroses e cirurgias reconstrutivas ósseas, mas também nos casos de osteopenia e osteoartrose (GUTIERRES et al., 2006).

Mimetizar as condições fisiológicas de um organismo para incentivar a proliferação e diferenciação das células são realizadas por biorreatores, devendo fornecer de maneira contínua, nutrientes, fatores bioquímicos, oxigênio e o estímulo físico adequado para as células, bem como facilitar a difusão de compostos químicos para o interior da matriz formada com o *scaffold* e remover ininterruptamente os subprodutos do metabolismo celular (KOROSSIS, 2005).

Os *scaffolds* são matrizes porosas de biomateriais de compostos naturais, sintéticos ou mistos, que fornecem suporte inicial para a adesão, crescimento, proliferação, diferenciação celular (AGRAWAL; RAY, 2001; SACHLOS; CZEMUSZKA, 2003^a; LIU et al., 2007) e angiogênese (KARP et al., 2003). *Scaffolds* de biomateriais naturais podem apresentar imunogenicidade, impurezas, com propriedades difíceis de serem controladas (LIU; MA, 2004) e sua confecção desafiadora, em formar estruturas homogêneas, reproduzíveis e com boas propriedades mecânicas (O'BRIEN, 2011).

Idealmente, devem possuir propriedades mecânicas semelhantes com às da região do corpo onde será implantado (O'BRIEN, 2011). *Scaffolds* de hidroxiapatita e de fosfato tricálcico, costumam ser utilizados no reparo de tecido ósseo devido a sua elevada semelhança com a fase mineral do osso (O'BRIEN, 2011). São várias as técnicas de reconstrução tecidual e vascular e, nesse contexto, o omento tem sido estudado por proporcionar vantagens cirúrgicas, maximizando as chances de êxito (HOSGOOD, 1990; CHUNG et al., 2009). Existem relatos do século XIX evidenciando a utilização do omento em cirurgias diversas, como as gastrointestinais, urinárias, vasculares, plásticas e reconstrutivas, tanto em humanos como em animais (HOSGOOD, 1990; PLATELL et al., 2000; GOES; MACEDO, 2013).

Apesar das numerosas aplicações cirúrgicas, o omento ainda continua sendo em grande parte desconhecido e certamente um órgão subestimado (HOSGOOD, 1990). Em estudo feito por Goldsmith em 1967, ficou evidente a ocorrência da patência vascular do pedículo do omento em 30 dias após sua transferência por meio de túnel para o subcutâneo de humanos.

Em 1973, o mesmo autor descreveu em outro estudo a capacidade angiogênica do retalho de omento na superfície cerebral em cães, além de comprovar que a passagem através de túnel subcutâneo é possível sem efeitos deletérios ao pedículo. Huyghe et al. (2015) desvendaram a estrutura microscópica do omento e relataram que, além de grande quantidade de células adiposas, possui células mesoteliais, fibras de colágeno, células de defesa como macrófagos, neutrófilos e linfócitos B, e observaram que sua estrutura é toda fenestrada,

concluindo que estas janelas possuem importante função de gerar aderência no tecido lesionado ou infectado, propiciando proteção ao local.

Hosgood (1990) descreveu a utilização do omento maior em cirurgia veterinária baseada nas aplicabilidades da medicina, como na reconstrução da parede torácica e abdominal, na proteção de vasos e nos procedimentos reconstrutivos. Ross e Pardo (1993), descreveram a primeira técnica de prolongamento de omento maior no cão baseados na anatomia da vascularização do omento e recentemente, Doom et al. (2016) aprimoraram a técnica, e além de demonstrarem as variedades anatômicas entre raças caninas, comprovaram a manutenção da viabilidade vascular do retalho em diferentes locais.

Devido a sua flexibilidade e ser facilmente moldável, além de possuir grande área de superfície, podendo fornecer pedículo vascular adequado, proporciona diversas vantagens para utilização em locais pouco vascularizados. O omento possui excelente vascularização intrínseca, capaz de aumentar o fluxo sanguíneo no local implantado, gerando maior aporte de oxigênio, carreando fatores humorais como citocinas, fatores de crescimento e angiogênicos, que são importantes no combate da infecção, além de acelerar a reparação de tecidos (ARNOLD et al., 1976; HOSGOOD, 1990; ROA et al., 1999; FERRIGNO et al., 2010).

O aumento do fluxo sanguíneo também leva ao acúmulo de neutrófilos, macrófagos, fibroblastos e células endoteliais, que são importantes na cicatrização de feridas e a resistência à infecção (ARNOLD et al., 1976; HOSGOOD, 1990; ROA et al., 1999; FERRIGNO et al., 2010). Em estudo realizado por Kawamura (2013) é relatado à associação do omento no aumento de sobrevivência de células tronco pluripotenciais transplantadas. O omento também é considerado uma excelente fonte de células tronco mesenquimais, apresentando melhor resultado proliferativo em estudo realizado por Pinto Filho et al., 2015. A habilidade em induzir a angiogênese aumenta a disponibilidade de sangue, oxigenando o local onde é implantado e aumenta o recrutamento dos antimicrobianos no sítio de infecção em casos de osteomielite, bem como favorece a reparação óssea (O'SHAUGHNESSY et al., 2007; FERRIGNO et al., 2010).

Roa et al. (1999), Ferrigno et al. (2010) e Stegen et al. (2015) exemplificaram os sucessos e insucessos na utilização do omento nos casos relatados e deixaram

explícito que ainda há muita coisa a aprimorar e estudar na aplicação deste órgão. Apesar de na medicina o uso do omento já ser muito utilizado e bem definido nas cirurgias relacionadas a tecidos moles, os estudos e a utilização na ortopedia ainda são escassos. Devido sua ampla funcionalidade, há muitas utilidades e viabilidades a serem estudadas e melhor compreendidas.

Diversas modalidades de enxertos e implantes biológicos e suas formas de conservação e aplicação estão descritas na literatura. Cavassani (2001), em estudo feito em ratos após implantar no tecido subcutâneo e intramuscular fragmentos ósseos autólogos de 3 mm² conservados em glicerina 98% durante 30 dias, observou, após 30 dias de cirurgia, grande atividade osteogênica devida à presença expressiva de osteoblastos e células indiferenciadas. Não obstante, a presença de tecido conjuntivo altamente vascularizado demonstra que mesmo em local distante de tecido ósseo é possível obter atividade osteogênica no implante ósseo. O autor discute que esse fato só seria possível ocorrer devido às proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) terem sido preservadas pelo método de conservação, permitindo a indução da atividade osteogênica.

Em estudos onde osso cortical bovino foi implantado de formas distintas no subcutâneo de ratos, a biocompatibilidade foi confirmada diante de resultados onde ocorreram em todos os casos, reações inflamatórias de corpo estranho de baixa intensidade, ausência de necrose ou abscesso no local da implantação, com presença de reação inflamatória inicial em média com 10 dias, além de formação neovascular (SICCA, 2000; CAVASSANI, 2001; OLIVEIRA, 2003; BENGTON, 2006), apresentando atividade osteogênica nos casos em que havia presença de BMP (CAVASSANI, 2001; BENGTON, 2006). Esses resultados mostram que o subcutâneo foi ambiente com potencial para vascularizar o material biológico (avascular) em questão, e induzir a diferenciação e multiplicação celular local a depender da metodologia aplicada (SICCA, 2000; CAVASSANI, 2001; OLIVEIRA, 2003; BENGTON, 2006).

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Com este estudo objetivou-se avaliar a capacidade angiogênica e osteoindutora de fragmentos ósseos xenógenos autoclavados e implantados, com ou sem a presença de omento, de forma ortotópica e heterotópica em coelhos.

3.2 Objetivos Específicos

Investigar se os sítios intracorpóreos (subcutâneo, subcutâneo junto com omento e intrailíaco) atuam como biorreatores *in vivo*, proporcionando a revascularização dos fragmentos ósseos, quiçá osteogênese ectópica;

Investigar por meio de avaliação macroscópica e histopatológica se os sítios intracorpóreos (subcutâneo, subcutâneo junto com omento e intrailíaco) atuam como biorreatores *in vivo*, proporcionando a revascularização e osteoindução dos fragmentos ósseos ou proporcionariam somente reação do tipo corpo estranho diante destes fragmentos ósseos xenógenos autoclavados.

4. JUSTIFICATIVA

A reconstrução de falhas ósseas extensas ainda é desafiadora na medicina veterinária, e pode ocorrer devido falha de implantes, instabilidade, não uniões, osteomielite, entre outros, culminando em amputação do membro acometido em algumas situações. Desta forma, faz-se necessário o emprego de alternativas que minimizem tais problemas acima citados e, nesse contexto, o uso de biomateriais ou implementação de métodos e técnicas terapêuticas que auxiliam a incrementar e acelerar a regeneração óssea e a recuperação total da função motora são fundamentais.

Se houver a comprovação que o uso de material ósseo xenógeno autoclavado, implantando no próprio paciente (que possui a falha óssea), utilizando-o como um biorreator (*in vivo*), foi capaz de se tornar vascularizado, tornando-o

fisiologicamente viável, capaz de promover osteoindução e/ou osteocondução equivalente ou próximo ao material ósseo autógeno, maximizará a probabilidade que seu posterior uso no local da falha óssea promova chances maiores de consolidação da fratura, de forma mais acessível.

5. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP - Câmpus de Jaboticabal - SP. Executado de acordo com as normas exigidas pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). Protocolo nº 7.903/16.

5.1 Animais

Para o experimento foram utilizados 30 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) jovens adultos, 15 fêmeas e 15 machos, da raça Nova Zelândia Branco com peso corpóreo aproximado de 3,3 kg. Os animais, previamente ao estudo, foram mantidos por período de 15 dias para que pudessem se adaptar ao novo ambiente. Durante todo o experimento foram mantidos individualmente em gaiolas metálicas dentro de biotério, em condições sanitárias adequadas, protegidos de estímulos auditivos intensos, com ventilação adequada, acesso à luz solar matinal e luminosidade natural. Tiveram livre acesso à alimentação com ração comercial adequada para a espécie, gramíneas (feno de *coast-cross*), planta forrageira *Boehmeria nivea* (*Rami*) e água potável, além de inspeção física e sanitária diárias.

5.2 Fragmentos Ósseos Esponjosos Bovinos (Xenógeno).

Os fragmentos foram obtidos da porção óssea corticoesponjosa do úmero, fêmur e da tíbia de bovinos, oriundos de frigorífico comercial. Os ossos, após dissecação manual minuciosa com bisturi, tesoura e pinças de dissecação com dente foram limpos com jato de água pressurizada, removendo todos os tecidos moles aderidos ao perióstio. Em seguida, foram delimitadas áreas de maior abundância de osso

corticoesponjoso (epífises). Ato contínuo, cortes transversos foram realizados, confeccionando porções ósseas de tamanhos irregulares, em seguida foram delimitadas as áreas mais homogêneas das trabéculas ósseas e mensuradas, confeccionando cortes retangulares de tamanho uniforme.

As porções retangulares foram novamente lavadas em água pressurizada, no intuito de remover partículas de tecidos moles e gordura. Após esta lavagem, confeccionaram-se por meio de serra óssea manual fragmentos em formato de cubos com dimensões aproximadas de 125 mm³. Todo o material confeccionado foi mantido congelado (-20°C) durante 60 dias como forma de preservação até o processo de esterilização (autoclavagem) (Figura 1). Para a esterilização, os fragmentos foram acondicionados em envelopes duplos de grau cirúrgico¹ e autoclavados² em baixo ciclo a 121°C durante 15 minutos.



Figura 1: Imagem fotográfica dos retângulos de osso corticoesponjoso bovino e os cubos confeccionados a partir deles. Fonte: Laboratório de Ortopedia da FCAV – UNESP, Jaboticabal, SP.

5.3 Locais de Implantação – Sítios intracorpóreos

Como padronização, todos os animais do estudo foram submetidos à implantação de fragmentos ósseos esponjosos de bovino (xenógeno) autoclavados. Utilizou-se um grupo de 30 animais, 15 machos e 15 fêmeas, que foram identificados aleatoriamente com numeração de um a 30, seguido de F para fêmeas

¹ EsterilCare® Embalagens para esterilização, Votorantim - SP

² Autoclave Phoenix Luferto - Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Ltda. Araraquara-SP

e M para machos nas gaiolas e na parte interna das orelhas com caneta dermatográfica³.

Tanto nos machos quanto nas fêmeas foram realizadas três intervenções cirúrgicas para a alocação de dois fragmentos ósseos xenógenos em cada uma delas, sendo um fragmento para análise histológica e um para análise em microscopia eletrônica a depender dos resultados histológicos, e denominou-se de Subgrupo cada um desses três locais.

Subgrupo1 (S1): espaço subcutâneo, em região próxima a artéria epigástrica superficial caudal direita.

Subgrupo 2 (S2): espaço subcutâneo juntamente com o omento que foi conduzido por abertura na musculatura lateral esquerda do abdome.

Subgrupo 3 (S3): Região intraóssea do osso íliaco direito.

5.4 Procedimento

Os animais não passaram por jejum prévio devido ao seu alto metabolismo e por ser espécie que não apresenta êmese (FLECKNELL, 1996).

No pré-operatório foi realizada terapia antimicrobiana com enrofloxacina a 2,5%⁴ na dose de 10 mg/kg, por via subcutânea. Os animais foram submetidos à anestesia seguindo o protocolo com uso de acepromazina 0,2%⁵ (0,1 mg/kg/IM) como medicação pré-anestésica, cetamina⁶ (40 mg/kg/IM), midazolam⁷ (0,5 mg/kg/IM) e morfina⁸ (1 mg/kg/IM) como anestesia e controle analgésico no transoperatório. Previamente ao ato operatório, o campo cirúrgico de cada Subgrupo foi amplamente e completamente depilado (tricotomia) (Figura 2) e realizado antissepsia com clorexidine a 2%⁹ intercalado (três vezes cada) com álcool 70%¹⁰.

³ SecurLine® 2 mm Caledonia,- Michigan, EUA

⁴ Chemitril 2,5%® Chemitec Agro-Veterinária, São Paulo – SP.

⁵ Aceproven 0,2%® Venco, Saude Animal, Londrina – PR.

⁶ Dopalen® Ceva, Saúde Animal Ltda, Paulínia – SP.

⁷ Dormonid® Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S. A, Rio de Janeiro – RJ.

⁸ Dimorfin® Cristália, Itapira – SP.

⁹ Riohex® Rioquímica, São José do Rio Preto – SP.

¹⁰ Rialcool 70® Rioquímica, São José do Rio Preto – SP.

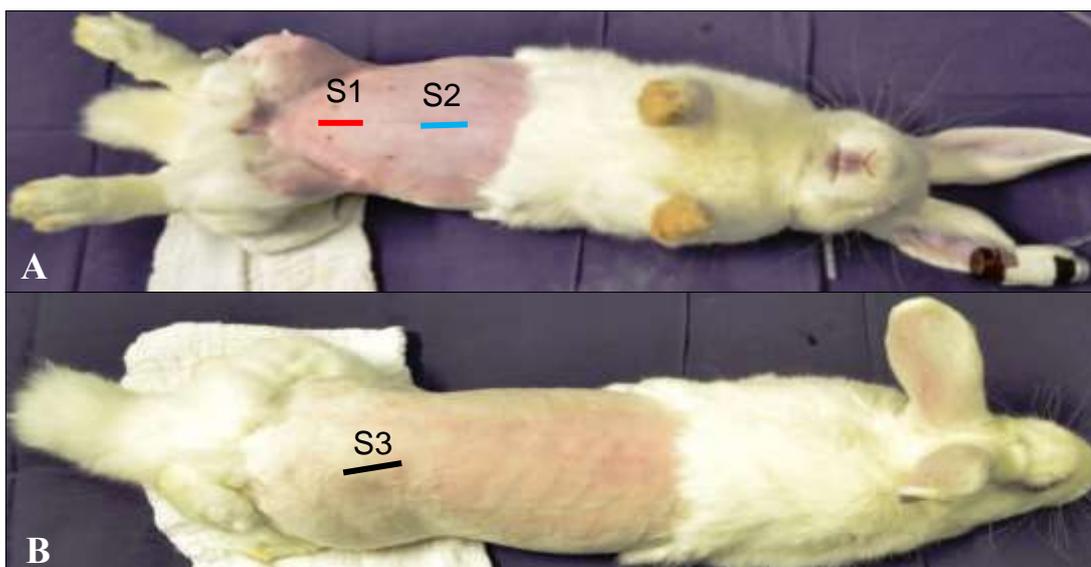


Figura 2: Imagens fotográficas de coelho (*Oryctolagus cuniculus*), ilustrando as áreas submetidas à tricotomia e os posicionamentos na mesa cirúrgica, em decúbito dorsal em A e ventral em B, para os acessos cirúrgicos das regiões designadas para a implantação dos fragmentos ósseos bovinos. O traço vermelho representa o local onde foi alocado o fragmento do subgrupo 1 (S1), traço azul representa o subgrupo 2 (S2) e o traço preto o subgrupo 3 (S3).

5.5 Descrição da técnica de implantação.

No subgrupo S1, foi realizada incisão de aproximadamente um centímetro na linha mediana abdominal ventral no sentido craniocaudal, próximo à artéria epigástrica superficial caudal, incluindo pele e tecido subcutâneo. Após divulsão, com parcimônia, para criar espaço lateral à esquerda da incisão, o fragmento ósseo (S1) foi implantado (Figura 3) e realizou-se, para auxiliar na minimização de sua mobilidade, suturas em padrão simples interrompido no tecido subcutâneo e musculatura ao redor do fragmento ósseo, utilizando fio nylon 4-0⁴, sem haver contato do fio de sutura com o fragmento ósseo. Utilizando o mesmo fio⁴, a aproximação do subcutâneo foi realizada com um único ponto em padrão Sultan e a cútis suturada com pontos simples interrompidos.



Figura 3: Imagens fotográficas do transoperatório (decúbito dorsal, cabeça localizada à direita das imagens) de coelho (*Oryctolagus cuniculus*) do subgrupo S1 (fragmentos ósseos bovino no subcutâneo) ilustrando: A) vista da incisão de pele e presença dos fragmentos ósseos (S1) (seta), alocado na região da artéria epigástrica superficial caudal direita. B) aspecto após a locação dos fragmentos ósseos (S1) (seta) antes da confecção das suturas para minimizar sua mobilização.

No subgrupo S2, o acesso à cavidade abdominal foi realizado por celiotomia mediana (padrão) em região pré-umbilical. Após localização do omento, confeccionou-se abertura no peritônio e na parede muscular esquerda do abdome, seguindo orientação na mesma linha de sua origem vascular (omento). O lado esquerdo e local da abertura muscular foi escolhido em detrimento à anatomia e raiz vascular do omento nessa espécie, também provinda da curvatura maior do estômago, evitando sua torção vascular.

Ato contínuo, o omento foi delicadamente tracionado para o subcutâneo com auxílio de pinça de dissecação atraumática. Utilizando o omento, os fragmentos ósseos foram englobados numa espécie de “bolsa” e, por meio de sutura em padrão bolsa de tabaco, com fio nylon 4-0⁴, se obliterou a referida “bolsa” de omento, mantendo os fragmentos ósseos em seu interior, ou seja, revestido e em contato íntimo 360° com o omento. Esta fixação teve por escopo primeiramente minimizar a chance dos fragmentos ósseos se desprender do omento e também, mantê-los com o maior contato físico possível. Em seguida, a “bolsa” foi fixada externamente ao

abdome, no músculo reto abdominal esquerdo com o mesmo fio⁴ e padrão de sutura simples interrompida (Figura 4).

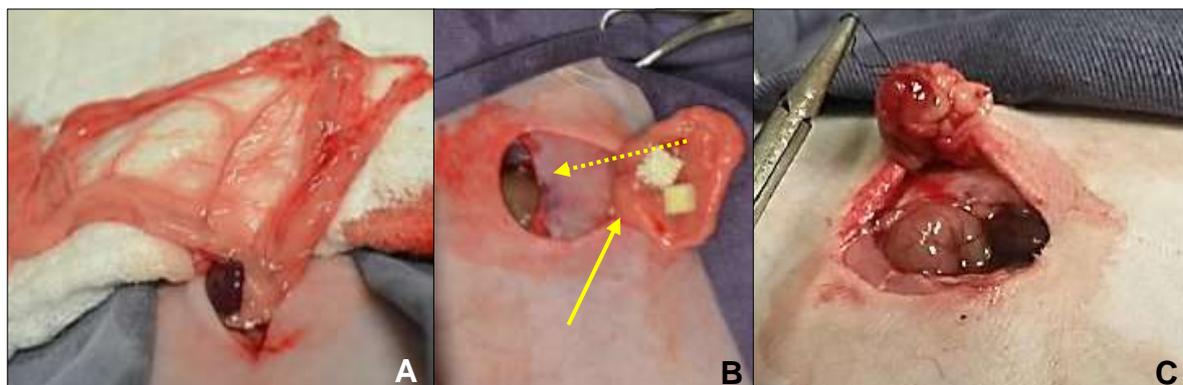


Figura 4: Imagens fotográficas do transoperatório (decúbito dorsal, cabeça localizada à direita das imagens) de coelho (*Oryctolagus cuniculus*) do subgrupo S2 (fragmentos ósseos bovino no subcutâneo com omento) ilustrando: A) exposição do omento após celiotomia. B) imagem demonstrando a borda da linha mediana da celiotomia na seta pontilhada e na seta contínua é apontada a abertura lateral esquerda da musculatura do abdome onde o omento foi conduzido para o espaço subcutâneo para que os fragmentos fossem acomodados na “bolsa” confeccionada como observado em B e em C consecutivamente já fechada.

No subgrupo S3, a crista ilíaca direita foi abordada por acesso corriqueiro (PIERMATTEI e JOHNSON, 2004). O osso ilíaco foi submetido à osteotomia parcial no sentido longitudinal (osteotomia no sentido dorsal para ventral) com auxílio de serra oscilatória elétrica cirúrgica¹¹. Por meio de alavanca, utilizando-se elevador periosteal de Freer, criaram-se duas hemi porções ilíacas (osso ilíaco osteotomizado), abertas dorsalmente, porém permaneceram unidas ventralmente, e os fragmentos ósseos (S3) foram cuidadosamente alocados, permanecendo em contato com o osso esponjoso das duas faces ósseas (hemi porções ilíacas) (Figura 5). Para evitar que os fragmentos se deslocassem do local implantado, durante a sutura de aproximação da musculatura em padrão Sultan, foi realizado ancoragem ao perióstio da margem dorsal das hemi porções ilíacas, como forma de barreira

¹¹ Serra Óssea Oscilatória, Cãomedica - Comercio de Materiais Cirúrgicos Veterinário Ltda. Campinas - SP

(física) muscular. Os tecidos subcutâneo e dérmico foram suturados seguindo a mesma padronização já citada nos subgrupos anteriores.

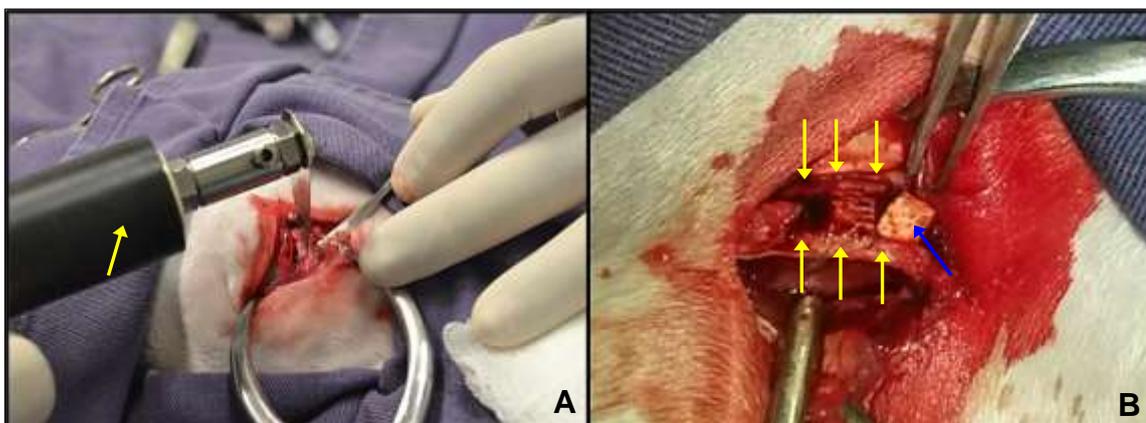


Figura 5: Imagens fotográficas do transoperatório (decúbito ventral, cabeça localizada à esquerda das imagens) de coelho (*Oryctolagus cuniculus*) do subgrupo S3 (fragmentos ósseos bovino na região intraóssea do osso ilíaco direito) ilustrando: A) osteotomia do osso ilíaco direito, no sentido dorsal para ventral, com serra oscilatória elétrica cirúrgica (seta amarela) e, em B) os fragmentos ósseos bovino (seta azul) alocados entre as hemi porções ósseas (setas amarelas) do osso ilíaco.

No pós-operatório os animais receberam terapia antimicrobiana a base de enrofloxacino a 2,5%⁵ (10 mg/kg/SC) a cada 24 horas durante 10 dias, e analgesia com cloridrato de tramadol 50 mg/mL¹² (4 mg/kg/SC) de 12 e 12 horas durante cinco dias. Todas estas medicações foram realizadas pela via subcutânea. O uso de anti-inflamatórios (AINE's) não foi adotado. O curativo das feridas cirúrgicas foram feitos diariamente com solução de NaCl a 0,9%¹³ e rifamicina spray¹⁴ até a remoção dos pontos de cúpis aos 10 dias de pós-operatório.

5.6 Avaliações

Foram avaliados seis animais por período, sendo três de cada grupo (machos e fêmeas) aos sete, 15, 30, 45 e 60 dias respectivamente, onde foram coletadas

¹² Medicação Genérica, laboratório União Química – Farmacêutica Nacional S/A, São Paulo - SP

¹³ JP Industria Farmacêutica S/A, Ribeirão Preto - SP

¹⁴ Rifotrat® - Natulab Laboratório S/A, São Paulo - SP

amostras dos três subgrupos para avaliação macroscópica e microscópica. Os animais foram submetidos à eutanásia com propofol¹⁵ pela via intravascular na dose 10 mg/kg seguido de KCl a 10%¹⁶ na dose de 1 mL por kg, em alguns casos foi necessário realizar sobredose dos fármacos descritos. Ato contínuo, as amostras (S1, S2 e S3) foram coletadas com ampla margem para avaliação histológica.

Para controle de avaliação comparativa foi utilizada amostra (fragmentos ósseos) denominadas de “amostra controle”, constituída de material ósseo xenógeno (ACX).

ACX: Foi utilizado o mesmo material implantado (fragmentos ósseos xenógenos autoclavados de bovino).

5.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA

5.7.1 Processamento histopatológico

Imediato à coleta, as amostras foram acondicionadas para fixação em formol 10% tamponado¹⁷ por período de 48 horas. Após a fixação, as peças foram descalcificadas em solução de ácido nítrico P.A.¹⁸ (Dinâmica®) a 10% durante sete dias. Após descalcificação as amostras foram lavadas em água corrente *overnight*. Posteriormente, foram desidratadas em álcool 70%¹¹, 80% e absolutos¹⁹ P.A. I, II e III, 60 minutos em cada.

A seguir, foram diafanizadas em xilol absoluto P.A.¹⁹ I, II e III, por 50 minutos cada. E finalmente impregnadas e incluídas em parafina histológica I e II, 60 minutos cada.

Ato contínuo foram emblocadas e cortes histológicos foram realizados em micrótomo semiautomático²⁰ com quatro micrômetros de espessura.

¹⁵ Provive® 1% - Laboratório Claris, Barueri - SP

¹⁶ Equiplex® Aparecida de Goiânia - GO

¹⁷ QuimiSul – Produtos Químicos e laboratório, Joinville - SC

¹⁸ Dinâmica® Produtos Químicos, Diadema, SP

¹⁹ Rioalcohol Absoluto 99,3%® Rioquímica, São José do Rio Preto – SP.

²⁰ LEICA® RM 2155. Leica Biosystems Inc. Buffalo Grove - IL, USA.

Os cortes foram colhidos em lâminas histológicas e corados pelas técnicas de hematoxilina e eosina e tricrômico de Masson, logo após os cortes foram cobertos com resina histológica e lamínula de vidro.

As colorações foram feitas de acordo como os protocolos estabelecidos no Laboratório de Pesquisa do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ – UNESP – Campus de Botucatu – SP.

5.7.2 Avaliação histopatológica

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

Tabela 1 - Escores quanto à resposta celular inflamatória.

Resposta Celular Inflamatória	Caracterização
Escore 0	Ausência de células inflamatórias no local de análise.
Escore 1	Inflamação discreta - menos de 25 células inflamatórias presentes na área de análise.
Escore 2	Inflamação moderada - entre 25-50 células inflamatórias presentes na área de análise.
Escore 3	Inflamação severa - entre 51-75 células inflamatórias presentes na área de análise.
Escore 4	Formação de abscesso - mais de 75 células inflamatórias presentes na área de análise.

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

Tabela 2 - Escores quanto à formação de novo tecido ósseo.

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

A reação a presença de corpo estranho (células gigantes inflamatórias próximas aos fragmentos ósseos) também foi caracterizada, seguindo, após adaptação, os critérios de Saghiri et al. (2016), (Tabela 3).

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

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

Os aspectos histopatológicos foram descritos de acordo com os respectivos tempos de colheita das amostras de cada subgrupo. Foram avaliados os seguintes aspectos baseado nas reações descritas nas Tabelas 1, 2 e 3 e relatado as atividades relacionadas à: Inflamação, tipo e intensidade do infiltrado inflamatório, presença e persistência de células gigantes do tipo corpo estranho; vascularização

do fragmento ósseo, intensidade e localização; ossificação, presença de osteoblastos e ou osteócito vivo (com núcleo) na região do fragmento ósseo.

5.8 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados referentes às avaliações histológicas foram submetidos à análise descritiva qualitativa dos efeitos biológicos baseado nas Tabelas de escores (Tabelas 1, 2 e 3) e o tempo de infiltração vascular foi tabulado em Tabela para discussão.

Os resultados foram comparados entre os subgrupos (ACX, S1, S2, S3) onde se avaliou a influência do omento e de cada região implantada frente aos achados microscópicos do fragmento ósseo bovino autoclavado, como a sua vascularização, incremento celular, absorção e/ou deposição óssea, a atividade celular e capacidade de revitalização óssea, buscando comparar a reação inflamatória local e a formação vascular intratrabecular.

Para que houvesse resultados comparativos fidedignos utilizou-se amostra controle (ACX) como comparativo, evidenciando o incremento ou déficit de características pré e pós-implantação nos sítios intracorpóreos, proporcionando assim, comparação dos tipos celulares, presença ou ausência de vascularização e arquitetura óssea das estruturas coletadas.

6 RESULTADOS

6.1 Análise Macroscópica

As amostras foram analisadas macroscopicamente desde o aspecto externo do local implantado, avaliando características como inflamação, edema, seroma, abscesso e deiscência de sutura.

Dos 30 animais avaliados somente dois apresentaram discreto seroma na região da crista íliaca operada. Os demais animais não apresentaram nenhuma alteração macroscópica em nenhum dos locais operados.

6.2 Análise histopatológica do Subgrupo S1 – Fragmento Ósseo Bovino no espaço subcutâneo.

Na Tabela 4 são ilustrados de forma sintetizada os resultados referentes ao tempo de análise e seus efeitos observados no interior do fragmento.

Tabela 4 - Atividade no Interior do Fragmento S1

Reação/Tempo	7 dias	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
Inflamação	Presente	Ausente	Presente	Presente	Presente
Reação de Corpo Estranho	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
Vascularização	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Presente
Atividade Óssea	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Degeneração	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente

Os aspectos histopatológicos foram idênticos tanto nos animais machos como nas fêmeas; e se repetiram entre os animais de cada subgrupo experimental, ou seja, as características histopatológicas foram semelhantes nas amostras analisadas dentro de cada tempo e subgrupo experimental. As alterações inerentes à cinética inflamatória e reacional encontram-se descritas abaixo.

Aos sete dias de pós-cirúrgico notou-se na periferia do fragmento ósseo reação inflamatória crônica ativa neutrofílica moderada (escore 2 da Tabela 1), com presença de células gigantes do tipo corpo estranho (Figura 6) (escore 1 da Tabela 3). No tecido reacional na interface entre o implante e o leito receptor, observou-se neovascularização moderada composta por capilares sanguíneos envolvidos por tecido conjuntivo frouxo, com deposição de fibras colágenas entre os fibroblastos reacionais (Figura 7).

No interior dos fragmentos ósseos, também aos sete dias de pós-cirúrgico, notou-se a presença de grande quantidade de hemácias e discreta rede de fibrina (Figura 8). Além disso, também foram observadas raras células inflamatórias

(neutrófilos e macrófagos). Não houve presença de neovascularização no interior do fragmento conseqüentemente nem formação de tecido ósseo (escore 0 da Tabela 2). Observou-se também nesse período evidente degeneração dos fragmentos ósseos (Figura 6).

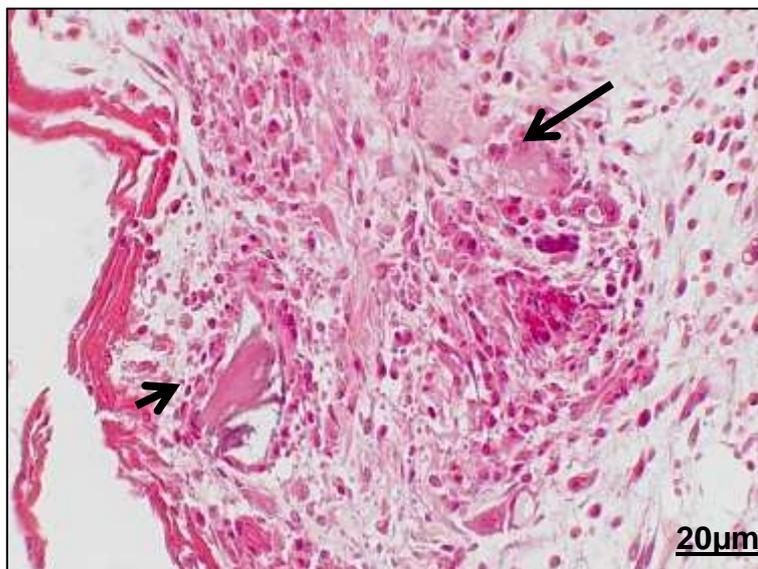


Figura 6: Fotomicrografia da periferia do fragmento ósseo implantado do subgrupo S1 aos sete dias de pós-operatório. Notar a célula gigante do tipo corpo estranho (seta longa) e a fragmentação da matriz óssea do fragmento ósseo (seta curta). Coloração Hematoxilina Eosina na objetiva de 40x.

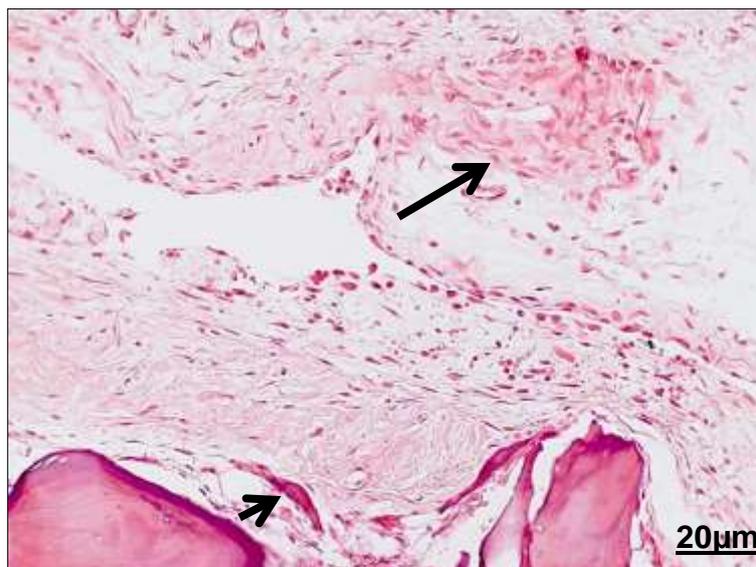


Figura 7: Fotomicrografia da periferia do fragmento ósseo implantado do subgrupo S1 aos sete dias de pós-operatório. Notar os fibroblastos reacionais (seta longa) e a fragmentação da matriz óssea do fragmento (seta curta). Coloração Hematoxilina Eosina na objetiva de 20x.



Figura 8: Fotomicrografia da região intrafragmentar do fragmento ósseo implantado do subgrupo S1 aos sete dias de pós-operatório. Notar a rede de fibrina e hemácias (seta longa) e a fragmentação da matriz óssea do fragmento (seta curta). Coloração Hematoxilina Eosina na objetiva de 20x.

A avaliação histopatológica dos Subgrupos aos 15 dias de pós-cirúrgico foi possível se observar no tecido reacional ao redor dos fragmentos ósseos a formação de delgada cápsula de tecido conjuntivo composta por cinco a 10 camadas de fibroblastos organizados ao redor dos fragmentos.

No interior dos fragmentos ósseos não havia células inflamatórias e/ou neovascularização. A ossificação também estava ausente (escore 0 da Tabela 2).

A degeneração do fragmento também estava presente neste período de avaliação (15 dias de pós-operatório).

Ao redor dos fragmentos notou-se discreto infiltrado inflamatório crônico ativo (neutrófilos, linfócitos, monócitos e macrófagos – escore 1 da Tabela 1). Células gigantes do tipo corpo estranho também foram observadas (escore 1 da Tabela 3).

No tecido ao redor dos fragmentos ósseos observou-se a permanência de neovascularização de forma moderada.

A avaliação aos trinta dias de pós-operatório evidenciou evolução do processo de encapsular o fragmento ósseo. A cápsula de tecido conjuntivo se encontrava mais espessa e evidente (Figura 9).

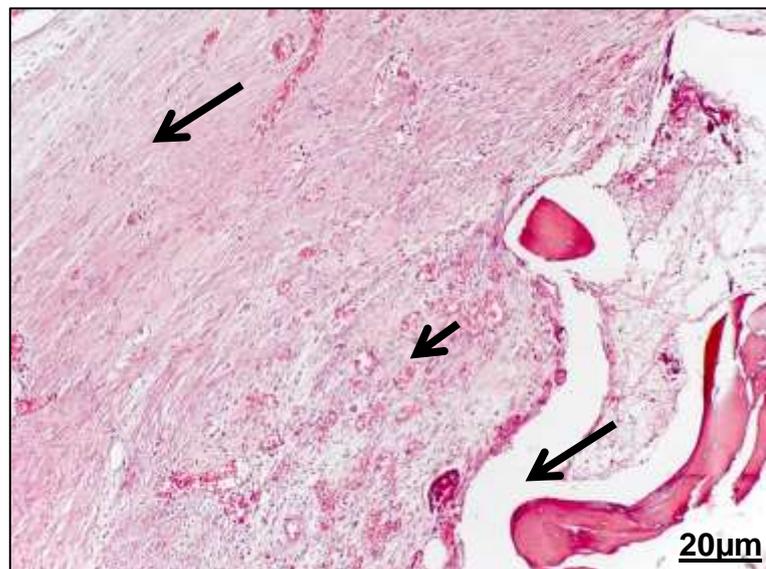


Figura 9: Fotomicrografia da periferia do fragmento ósseo implantado do subgrupo S1 aos 30 dias de pós-operatório. Notar a espessa cápsula conjuntiva (seta longa) e a região de neovascularização (seta curta). Coloração Hematoxilina Eosina na objetiva de 10x.

Não foi observado no interior dos fragmentos ósseos a presença de neovascularização nem ossificação (escore 0 da Tabela 2), porém neste período de avaliação (30 dias de pós-operatório) havia no interior da matriz óssea grande quantidade de células inflamatórias neutrofílicas (Figura 10) (escore 3 da Tabela 1), e células gigantes do tipo corpo estranho estavam presentes.

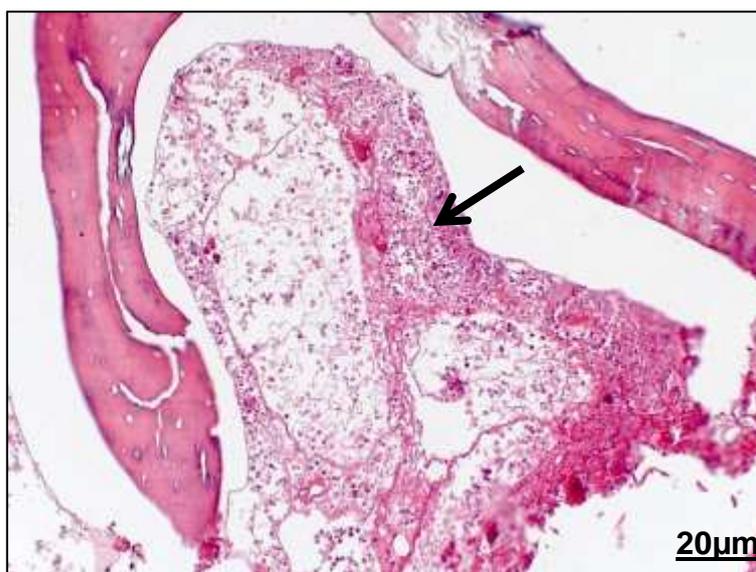


Figura 10: Fotomicrografia da região intrafragmentar do fragmento ósseo implantado do subgrupo S1 aos 30 dias de pós-operatório. Notar a rede de fibrina, hemácias e células inflamatórias (seta longa). Coloração Hematoxilina Eosina na objetiva de 20x.

Aos 45 dias de pós-operatório, observou-se no interior do fragmento ósseo presença de tecido conjuntivo vascularizado. O infiltrado inflamatório nesse tempo experimental foi do tipo crônico ativo (escore 1 da Tabela 1), localizado no interior do tecido conjuntivo reacional. Não houve presença de ossificação neoformada (escore 0 da Tabela 2).

Ao redor do fragmento a cápsula conjuntiva apresentava-se mais organizada, comparativamente aos períodos anteriores, com deposição de fibras colágenas no seu interior, porém ainda se observava células inflamatórias.

A matriz óssea dos fragmentos deste subgrupo continuava a se degenerar e células gigantes, do tipo corpo estranho, estavam presentes (Figura 11).

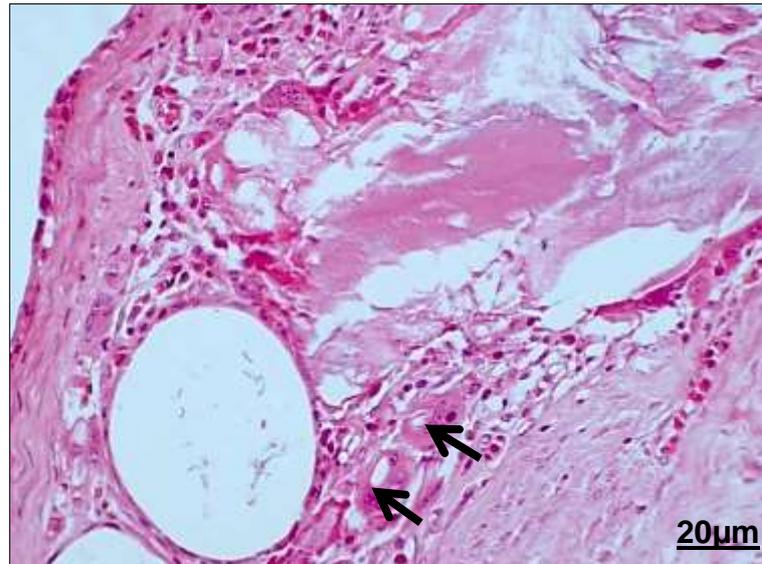


Figura 11: Fotomicrografia da região intrafragmentar (fragmento ósseo implantado do subgrupo S1) aos 45 dias de pós-operatório. Notar a matriz óssea do fragmento degenerada (seta longa) e as células gigantes do tipo corpo estranho (setas curtas). Coloração Hematoxilina Eosina na objetiva de 40x.

Aos 60 dias de pós-cirúrgico, para o Subgrupo S1 (fragmento ósseo no tecido subcutâneo), observou-se tanto no tecido reacional na interface entre o implante e o leito receptor, quanto no interior do fragmento a presença de tecido conjuntivo vascularizado maduro.

No interior do tecido conjuntivo notou-se infiltrado inflamatório crônico ativo composto por eosinófilos, neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e monócitos.

A matriz óssea dos fragmentos deste subgrupo encontrava-se neste tempo experimental (60 dias de pós-operatório) em avançado estágio de degeneração, havendo amostras nas quais não era possível a sua identificação.

Células gigantes ao redor da matriz degenerada e também fagocitando os debris celulares foram observadas de forma frequente (Figura 12) (escore 1 da Tabela 3).

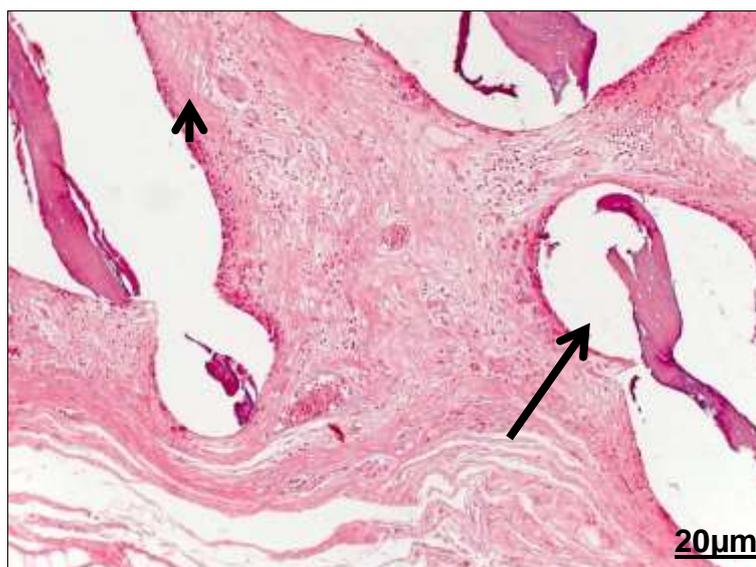


Figura 12: Fotomicrografia da região intrafragmentar do fragmento ósseo implantado do subgrupo S1 aos 60 dias de pós-operatório. Notar a matriz óssea do fragmento envolvida pelo tecido conjuntivo (seta longa) e célula gigante do tipo corpo estranho (seta curta). Coloração Hematoxilina Eosina na objetiva de 10x.

6.3 Análise histopatológica do Subgrupo S2 – Fragmento Ósseo Bovino no espaço subcutâneo com omento.

Na Tabela 5 são ilustrados de forma sintetizada os resultados referentes ao tempo de análise e seus efeitos observados no interior do fragmento.

Tabela 5 - Atividade no Interior do Fragmento S2

Reação/Tempo	7 dias	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
Inflamação	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
Reação de Corpo Estranho	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
Vascularização	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
Atividade Óssea	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Degeneração	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente

Os aspectos histopatológicos foram idênticos tanto nos animais machos como nas fêmeas; e se repetiram entre os animais de cada subgrupo experimental, ou seja, as características histopatológicas foram semelhantes nas amostras analisadas dentro de cada tempo/subgrupo experimental. As alterações inerentes à cinética inflamatória e reacional encontram-se descritas abaixo.

Aos sete dias de pós-cirúrgico observou-se ao redor do fragmento ósseo o omento, que se apresentava com discreta neovascularização na região próxima ao fragmento. Na periferia do fragmento ósseo foi possível se ver reação inflamatória eosinofílica moderada (escore 2 da Tabela 1), com presença de células gigantes do tipo corpo estranho (escore 1 da Tabela 3). No tecido reacional na interface entre o implante e o leito receptor observou-se neovascularização discreta composta por capilares sanguíneos envolvidos por tecido conjuntivo com discreta proliferação de fibroblastos.

No interior do fragmento ósseo, também aos sete dias de pós-cirúrgico, notou-se a presença de grande quantidade de hemácias e rede de fibrina em quantidade moderada. De forma multifocal havia aglomerados de eosinófilos, bem como fibroblastos reacionais e neovascularização de forma discreta que vinham da periferia do fragmento.

A matriz óssea encontrava-se em processo de degeneração com respectiva fragmentação. Não houve, neste período, formação de tecido ósseo (escore 0 da Tabela 2).

No período de 15 dias de pós-cirúrgico, ao redor dos fragmentos ósseos havia tecido conjuntivo reacional, apresentando cápsula que continha fibroblastos reacionais e infiltrado inflamatório crônico ativo discreto, composto por neutrófilos, linfócitos, plasmócitos, monócitos e macrófagos. Células gigantes, do tipo corpo estranho, também estavam presentes (escore 1 da Tabela 3).

No interior dos fragmentos ósseos havia grande quantidade de tecido conjuntivo vascularizado de forma difusa e exuberante composto por fibroblastos, neovasos e fibras colágenas, que se originavam na parte externa do omento, além disso, havia também de forma multifocal infiltrado inflamatório crônico ativo no interior do fragmento. Células gigantes, do tipo corpo estranho, estavam presentes. A matriz óssea dos fragmentos encontrava-se em processo de degeneração e

fragmentação. A ossificação também não ocorreu nesse tempo experimental (15 dias) (escore 0 da Tabela 2).

Trinta dias após a realização da cirurgia de implantação do fragmento ósseo, ao redor do fragmento havia tecido conjuntivo vascularizado (Figura 13) que se originou no omento. Nesta região havia moderado infiltrado inflamatório crônico ativo composto por neutrófilos, linfócitos, plasmócitos, monócitos e macrófagos.

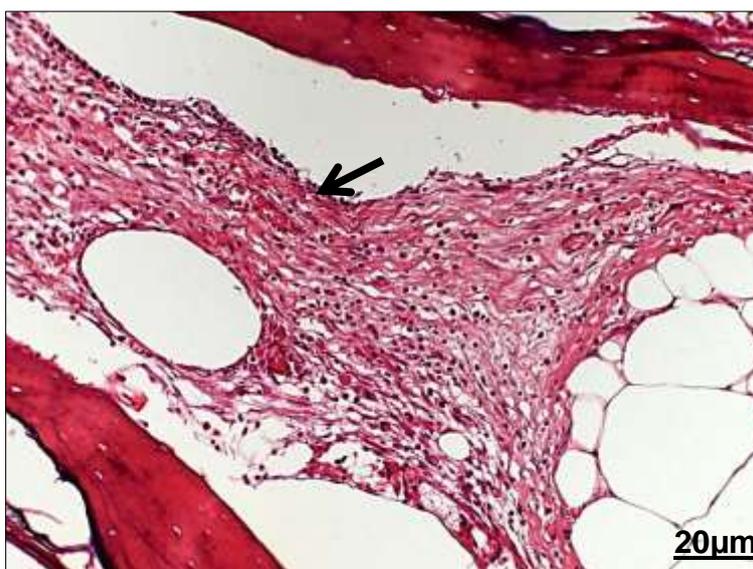


Figura 13: Fotomicrografia da região intrafragmentar do fragmento ósseo implantado do subgrupo S2 aos 30 dias de pós-operatório. Notar o tecido conjuntivo vascularizado no interior do fragmento (seta). Coloração Hematoxilina Eosina na objetiva de 20x.

Da mesma forma, e com as mesmas características histológicas, havia no interior do fragmento ósseo tecido conjuntivo vascularizado e infiltrado inflamatório. Células gigantes do tipo corpo estranho estavam presentes (Figura 14).

A matriz óssea do fragmento estava degenerada e fragmentada, e não foi observada presença de ossificação (escore 0 da Tabela 2).

Aos 45 dias de pós-operatório, observou-se tanto ao redor do fragmento ósseo, bem como no seu interior, a presença de tecido conjuntivo vascularizado (Figura 15). O infiltrado inflamatório era linfo-plasmocitário e se encontrava principalmente no interior do fragmento ósseo de forma moderada e multifocal. Na

periferia do fragmento a inflamação era praticamente ausente. No interior do fragmento o tecido conjuntivo vascularizado possuía presença de colágeno em sua organização. A matriz óssea estava degenerada e fragmentada, em geral ao redor dos fragmentos observavam-se células gigantes do tipo corpo estranho (escore 1 da Tabela 3). A osteogênese estava ausente (escore 0 da Tabela 2).

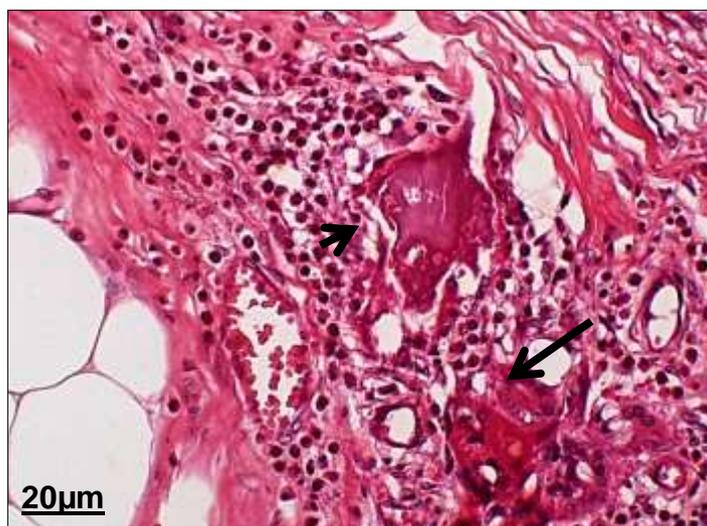


Figura 14: Fotomicrografia da região intrafragmentar do fragmento ósseo implantado do subgrupo S2 aos 30 dias de pós-operatório. Notar a célula gigante do tipo corpo estranho (seta longa) e a degeneração da matriz óssea do fragmento (seta curta). Coloração Hematoxilina Eosina na objetiva de 40x.

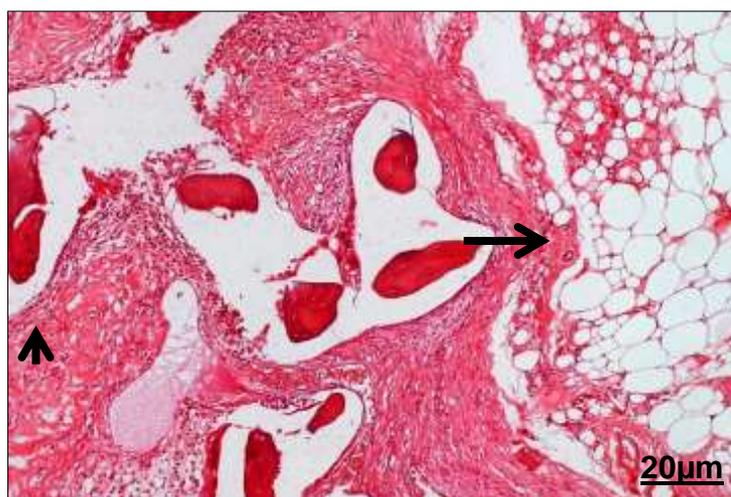


Figura 15: Fotomicrografia da periferia do fragmento ósseo implantado do subgrupo S2 aos 45 dias de pós-operatório. Notar o omento (seta longa) e o tecido conjuntivo no interior do fragmento ósseo (seta curta). Coloração Hematoxilina Eosina na objetiva de 10x.

Aos 60 dias de pós-cirúrgico, para o Subgrupo S2 (fragmento ósseo no tecido subcutâneo com omento), observou-se diminuição do infiltrado inflamatório, no entanto, havia grande quantidade de células gigantes do tipo corpo estranho, principalmente na interface entre o implante e o leito receptor.

O tecido conjuntivo vascularizado ainda estava presente no interior do fragmento (Figura 16) e a degeneração da matriz óssea, bem como a sua fragmentação continuavam a acontecer. A ossificação não foi observada.

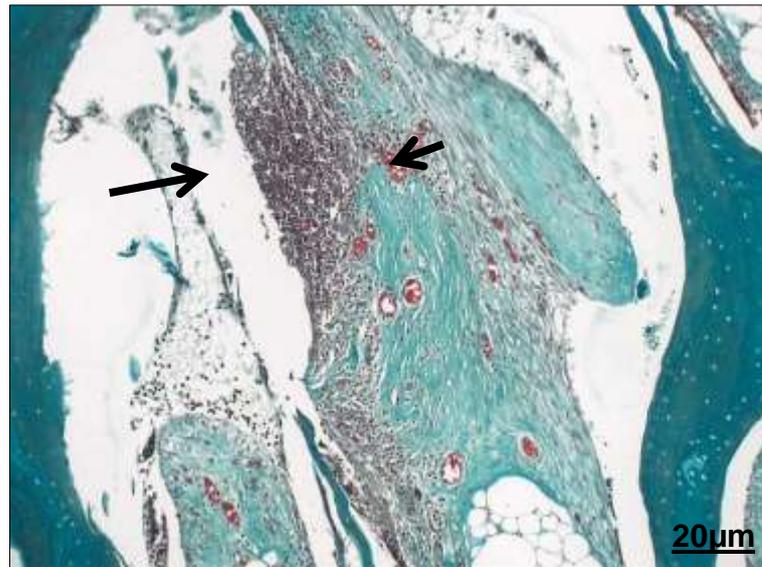


Figura 16: Fotomicrografia da região intrafragmentar do fragmento ósseo implantado do subgrupo S2 aos 45 dias de pós-operatório. Notar o infiltrado inflamatório linfocitário (seta longa) e o tecido conjuntivo vascularizado. Coloração Tricrômico de Masson na objetiva de 10x.

6.4 Análise histopatológica do Subgrupo S3 – Fragmento ósseo bovino intraósseo.

Na Tabela 6 são ilustrados de forma sintetizada os resultados referentes ao tempo de análise e seus efeitos observados no interior do fragmento.

Tabela 6 - Atividade no Interior do Fragmento S3

Atividade no Interior do Fragmento					
Reação/Tempo	7 dias	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
Inflamação	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
Reação de Corpo Estranho	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
Vascularização	Ausente	Ausente	Presente	Presente	Presente
Atividade Óssea	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Degeneração	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente

Os aspectos histopatológicos foram idênticos tanto nos animais machos como nas fêmeas; e se repetiram entre os animais de cada grupo experimental, ou seja, as características histopatológicas foram semelhantes nas amostras analisadas dentro de cada tempo/grupo experimental. As alterações inerentes à cinética inflamatória e reacional encontram-se descritas abaixo.

Aos sete dias de pós-cirúrgico observou-se ao redor do fragmento ósseo intensa reação fibrinosa e hemorragia (Figura 17). Na periferia do fragmento ósseo foi possível se ver reação inflamatória crônica ativa discreta, composta por neutrófilos, linfócitos, monócitos e macrófagos (escore 1 da Tabela 1), com presença células gigantes do tipo corpo estranho (escore 1 da Tabela 3). No tecido reacional na interface entre o implante e o leito receptor, sem presença de neovascularização.

No interior do fragmento ósseo, também aos sete dias de pós-cirúrgico, notou-se a presença de grande quantidade de hemácias e de fibrina.

Na região da fratura óssea (osteotomia do osso ilíaco) havia presença intensa de células sanguíneas, proliferação de fibroblastos e neovascularização. Nessa mesma região o infiltrado inflamatório era mínimo e do tipo crônico ativo, presença de células gigantes do tipo corpo estranho, que se encontravam próximas à matriz óssea degenerada do fragmento. Não se notou, neste período, formação de tecido ósseo (escore 0 da Tabela 2).

No período de 15 dias de pós-cirúrgico, notou-se ao redor dos fragmentos ósseos intensa reação fibroblástica e neovascular (Figura 18).

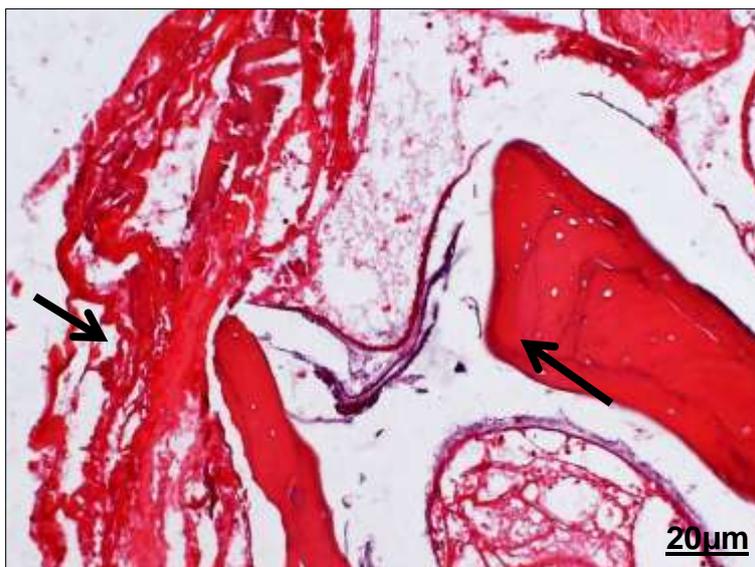


Figura 17: Fotomicrografia da região intrafragmentar do fragmento ósseo implantado do subgrupo S3 aos 07 dias de pós-operatório. Notar a grande quantidade de fibrina (seta). Coloração Hematoxilina Eosina na objetiva de 20x.

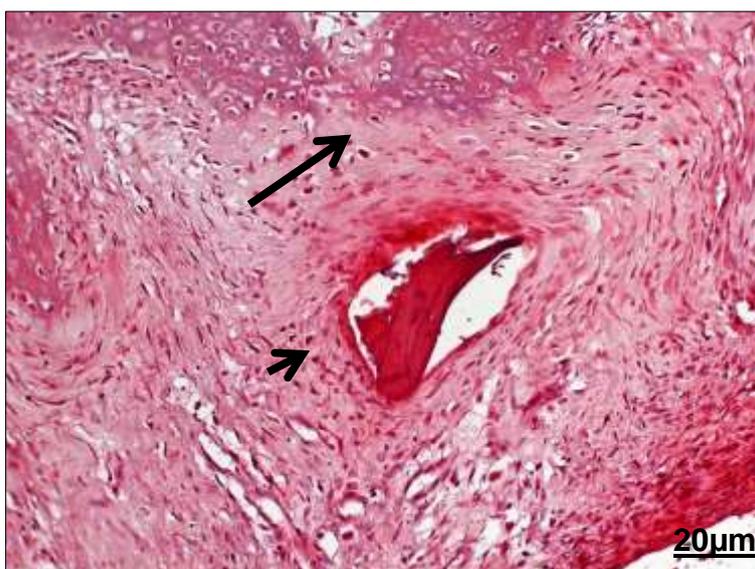


Figura 18: Fotomicrografia da periferia do fragmento ósseo implantado do subgrupo S3 aos 15 dias de pós-operatório. Notar a linha de crescimento endocondral do osso receptor (seta longa) e a matriz óssea degenerada do fragmento envolvida por tecido conjuntivo (seta curta). Coloração Hematoxilina Eosina na objetiva de 20x.

O infiltrado inflamatório era discreto, crônico ativo, composto por neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, plasmócitos, monócitos e macrófagos. Células gigantes do tipo corpo estranho também estavam presentes.

No interior dos fragmentos ósseos havia grande quantidade de fibrina e hemorragia, no entanto, nesse tempo experimental, não se observou tecido conjuntivo no interior da matriz. Não foi visibilizado neovascularização e nem ossificação nesse tempo experimental (15 dias).

Trinta dias após a realização da cirurgia observou-se, ao redor do fragmento, presença de tecido conjuntivo vascularizado bem organizado, com deposição de fibras colágenas e diminuição do número de fibroblastos, mimetizando uma “cápsula” ao redor do fragmento.

No interior do fragmento ósseo havia intenso infiltrado inflamatório linfoplasmocitário que acompanhava a intensa degeneração da matriz óssea (fragmento) (Figura 19). Notou-se tecido conjuntivo vascularizado no interior da matriz e células gigantes ao redor da matriz degenerada, porém sem identificar presença de ossificação (escore 0 da Tabela 2).

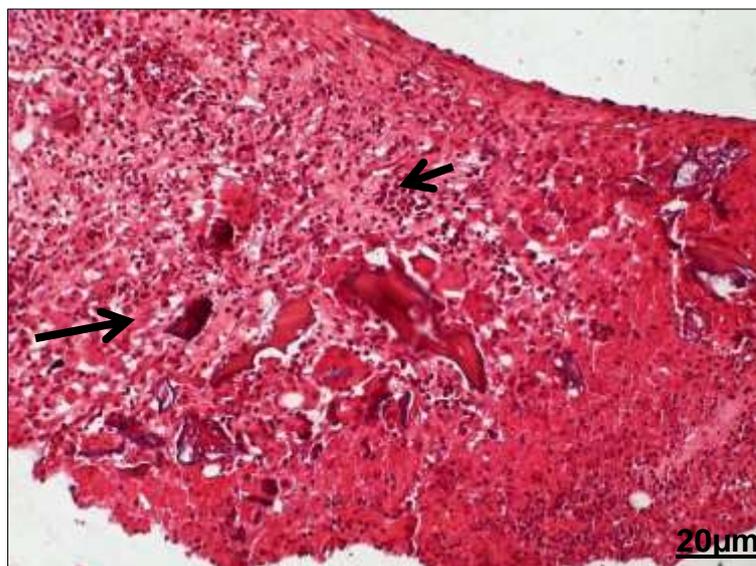


Figura 19: Fotomicrografia da região intrafragmentar do fragmento ósseo implantado do subgrupo S3 aos 30 dias de pós-operatório. Notar o infiltrado inflamatório linfoplasmocitário (seta curta) e a matriz óssea do fragmento degeneradas (seta longa). Coloração Hematoxilina Eosina na objetiva de 20x.

Aos 45 dias de pós-operatório, notou-se ao exame histopatológico significativa diminuição da inflamação tanto dentro, quanto ao redor do fragmento ósseo. O processo inflamatório era focal e do tipo linfocitário, e em geral se localizava em regiões próximas à matriz degenerada. Não havia ossificação e nem o povoamento do interior da matriz do fragmento por células hematopoiéticas, que continuava a apresentar processo de degeneração.

Aos 60 dias de pós-cirúrgico observou-se na interface entre o implante e o leito receptor maior organização da “cápsula” de tecido conjuntivo vascularizado com maximização da deposição de fibras colágenas e diminuição do processo inflamatório que era do tipo crônico e discreto. No interior do fragmento observou-se o mesmo padrão histopatológico. Não houve povoamento das lacunas ósseas por células hematopoiéticas e nem ossificação (escore 0 da Tabela 2). A matriz óssea do fragmento permanecia com processo degenerativo e ao seu redor observou-se células gigantes do tipo corpo estranho.

7. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Diante dos resultados obtidos neste estudo, é possível notar (Tabela 4) que diante do escopo do trabalho em avaliar a formação neovascular (angiogênese) e infiltração vascular do fragmento ósseo, o grupo S2 (subcutâneo junto com omento) apresentou melhores resultados. Porém, mesmo apresentando bons resultados de neovascularização, o fragmento ósseo foi encapsulado e a reação de corpo estranho foi progressiva em todos os animais, sugerindo que o fragmento ósseo foi rejeitado e reabsorvido na espécie estudada, diante da metodologia utilizada neste trabalho.

Tabela 7 - Tabela de relação entre tempo e vascularização interna do fragmento ósseo.

Tempo / Grupo	S1	S2	S3
7 Dias	AUSENTE	PRESENTE	AUSENTE
15 Dias	AUSENTE	PRESENTE	AUSENTE
30 Dias	AUSENTE	PRESENTE	PRESENTE
45 Dias	PRESENTE	PRESENTE	PRESENTE
60 Dias	PRESENTE	PRESENTE	PRESENTE

8. DISCUSSÃO

A utilização de biomateriais é crescente em todas as áreas da cirurgia. A compreensão de suas reações, diante das diversas formas de preparo e aplicação, é necessária para que tenhamos alternativas acessíveis para atender as diversas situações em que nos deparamos.

Neste modelo de estudo em coelhos, fragmentos de osso bovino foram confeccionados como um modelo de *scaffold* seguindo as características descritas por Agrawal; Ray (2001), Sachlos; Czernuszka, (2003^a) e Liu et al (2007). Como forma de conservação foram mantidos congelados durante 60 dias pois segundo Brown e Cruess (1982) o congelamento não interfere na osteoindução, Como forma de desproteinização antigênica e de esterilização seu preparo foi realizado em autoclave. A estrutura mecânica do fragmento foi mantida diante da metodologia realizada. Os resultados demonstram que os fragmentos implantados nos locais descritos no trabalho proporcionaram resposta tecidual semelhante entre eles no quesito resposta inflamatória, reações de corpo estranho e formação neovascular, podendo afirmar que o material apresentou biocompatibilidade semelhante aos enxertos comerciais seguindo os resultados de estudos realizados em ratos por Sicca et al. (2000), Cavassani et al. (2001) e Bengtson et al. (2006).

Diante da metodologia de preparo dos fragmentos utilizados neste estudo, pode se afirmar que não foi possível preservar as funções biológicas como a capacidade osteoindutora, devido à atividade osteogênica ser ausente em todos os

grupos. Tal fato estaria relacionado a exposição a alta temperatura ter degenerado todas as propriedades biológicas, mantendo somente a matriz mineralizada. Em estudo feito por Cavassani et al. (2001), que implantaram osso bovino conservado em glicerina a 98% no subcutâneo de ratos, os autores relatam que houve atividade osteoindutora e associou este fato de a glicerina além de remover a antigenicidade foi capaz de preservar as funções osteoindutoras, destacando-se principalmente a preservação das BMPs.

Apesar de que altas temperaturas possam afetar a propriedade osteoindutora, a desproteíntização pode ser influenciada. Oliveira et al. (2003) compararam a desproteíntização de osso bovino a altas temperaturas sendo 100°C e a 1000°C, posteriormente implantado no subcutâneo de ratos.

Neste estudo as amostras foram preparadas em autoclave a 121°C e implantadas além do subcutâneo com e sem a presença do omento, em sítio intraósseo. Os resultados histológicos foram semelhantes aos observados por Oliveira et al. (2003) que discutem que as reações de corpo estranho mais intensa estão ligadas à preservação de parte do componente orgânico no material tratado a 100°C, sendo responsável pela indução de tecido reacional composto, em sua maioria, por macrófagos e concluíram que em ambos o preparo o material foi considerado inerte por não ativar o sistema imune e gerando somente reação local, porém o osso cortical bovino desproteíntizado a 1.000°C proporcionou resultados mais favoráveis em relação ao desproteíntizado a 100°C, tanto na análise histológica como enzimática, possivelmente devido à desproteíntização mais eficiente.

O grupo em que havia a presença do omento (S2) se destacou devido à sua precocidade na neovascularização tanto externa como porção interna do fragmento, confirmando as observações relatadas por Goldsmith (1973) em que é possível obter uma patente vascular do omento fora da cavidade abdominal. O omento é excelente fonte de células tronco mesenquimais, apresentando bom resultado proliferativo em estudo realizado por Pinto Filho et al. (2015). Destacando-se os relatos na literatura, a evidência da alta capacidade do omento neste estudo em promover a angiogênese foi apresentada no grupo S2 onde, aos sete dias, foi possível observar início de neovascularização na porção interna do fragmento, o que só ocorreu nos demais grupos a partir dos 30 dias.

Essa precocidade em promover patente vascular através do omento corrobora a observação feita por Ferrigno et al. (2010) que utilizaram o omento em fratura complexa e obtiveram consolidação precoce pelo tempo estimado, e os autores relacionaram este fato à presença do omento no foco de fratura, aumentando a vascularização local, conseqüentemente acelerando o processo de cicatrização óssea.

Diante dos efeitos observados na histopatologia, é descrito que após a implantação do biomaterial num indivíduo, neste caso um tecido ósseo, inicia-se a reação inflamatória caracterizada pelo hematoma e liberação de fluido rico em glicoproteínas. Pelo mecanismo de quimiotaxia, células como neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos são recrutadas para o local gerando a reação de corpo estranho, que, além de atividade fagocítica, estimulam a ação dos linfócitos, fibroblastos, osteoclastos e células polimorfonucleares (DAVIES; HOSSEINI, 2000).

Ato contínuo, o processo de angiogênese inicia-se com migração e proliferação de células endoteliais formando rede de capilares que constituirá o suporte vascular no local (DAVIES; HOSSEINI, 2000), ativando a ação das citocinas (IL-1 e IL-2) e fatores de crescimento (TGF- β , PDGF, IGF) e juntamente à BMP, proporcionará a diferenciação celular das mesenquimatosas pluripotenciais em matriz óssea e osso imaturo (GUTIERRES et al., 2006). Nos resultados deste estudo todos esses efeitos foram observados exceto o início de osteogênese. Este fato é correlacionado a não preservação da BMP nos fragmentos ósseos implantados. A reação de corpo estranho, apesar de não intensa, foi constante, e os fragmentos foram encapsulados seguido da degeneração do fragmento com processo de reabsorção óssea progressiva. A reação de corpo estranho constante pode ser justificada pela desproteinização insuficiente através do uso de autoclave, ressaltando o que cita Liu; Ma, 2004 em que *Scaffolds* de biomateriais naturais podem apresentar imunogenicidade e impurezas, com propriedades difíceis de serem controladas.

Em relação ao grau de degeneração das amostras analisadas, não é possível descartar a hipótese de, pelo fato da origem desses ossos serem de frigorífico, não é possível saber quanto tempo ficou fora de refrigeração do abate até seu preparo, podendo ter grande influência nos resultados deste trabalho.

9. CONCLUSÃO

Conclui-se com este estudo que diante desta metodologia de preparo de implante ósseo xenógeno, provavelmente não houve remoção completa da antigenicidade, nem mesmo a preservação das BMPs, mas foi possível afirmar que o contato com o omento foi capaz de aumentar a angiogênese nos fragmentos implantados em comparação com os demais locais.

10.REFERÊNCIAS*

ARNOLD G. P; HARTRAMPF C. R; JURKIEWICZ M. J. One stage reconstruction of the breast using the transposed greater omentum. Case report. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.57, p.520, 1976.

ALEXANDER J. W. Bone grafting. **Veterinary Clinic of North America Small Animal Practice, Philadelphia**, v.17, n.4, p.811-819, 1987.

AGRAWAL C. M; RAY R. B; Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 55, p. 141-150, 2001.

ANDERSON J. M. Biological Response to Materials. **Annual Reviews**, v. 31 p.81-110, 2001.

ALIEVI M. M; SCHOSSLER J. E. W; GUIMARAES L. D; OLIVEIRA A. N. C; TRAESLEL C. K; FERREIRA P. A. Implante ósseo cortical alógeno conservado em mel na reconstrução de falha óssea diafisária em fêmur de cães: avaliação clínica e radiográfica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, p. 450-457, 2007.

* Formatação segundo as normas ABNT- NBR 6023/2002 / ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 23 p.

ABUNA R. P. F. Análise do potencial osteogênico e adipogênico de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea e de tecido adiposo. **Dissertação de Mestrado**, Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – USP, Ribeirão Preto, 2014.

ABUNA R. P. F; OLIVEIRA F. S; SANTOS T. S; GUERRA T. R; ROSA A. L; BELOTI M. M. Participation of TNF- α in inhibitory effects of adipocytes on osteoblast differentiation. **Journal of Cellular Physiology**. v. 231, p. 204–214, 2016.

BROWN K. L. B; CRUESS R. L. Bone and cartilage transplantation in orthopedic surgery. **The Journal of Bone and Joint Surgery AM**. Boston, v. 64 (2), p. 270-279, 1982.

BAUER T. W; MUSCHLER G. F. Bone graft materials: an overview of the basic science. **Clinical & Orthopedic Related and Reseach**, v. 371 p. 10-27, 2000.

BENGTSON A. L; BENGTSON E. M. G; BENGTSON C. R. G; BENGTSON N. G; SEMENTILLI A. Implante de proteína morfogenética do osso (rhbmp-2) em arcabouço de osso inorgânico no tecido subcutâneo de rato. **Revista da FZVA**. Uruguiana, v.13, n.2, p. 137-144. 2006.

COOK S. D; RUEGER D. C. Osteogenic protein-1. **Clinical & Orthopedic**, n.324, p.29-38, 1996.

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.

CHUNG K. C; SWANSON J. A.; SCHMITZ D; SWLIVAN D; ROHRICH R. J. Introducing evidence based medicine to plastic and reconstructive surgery. **Journal**

of **American Society of Plastic Surgery**, *Plastic Reconstruct Surgery*, v. 123 p. 1385-1389, 2009.

CAUBET J; PETZOLD C; SÁEZ-TORRES C; MOREY M; IRIARTE JI; SÁNCHEZ J; TORRES J. J; RAMIS J. M; MONJO M. Sinus Graft With Safescraper: 5-Year Results. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 69 n. 2, p. 482-90, 2011.

CHEN Q; LIANGA S; THOUAS G. Elastomeric biomaterials for tissue engineering. **Progress in Polymer Science**, Elsevier, v.38, p. 584–671, 2013.

DAVIES J. E.; HOSSEINI M. M. Histodynamics of Endosseous Wound Healing. In: **Special chapter reprint from: Bone Engineering**, Ed. JE Davies, Toronto, Canada, 2000.

DOOM M; CORNILLIE P; SIMOENS P; HUYGHE S; ROOSTER H. The Omental Pedicle Flap in Dogs Revised and Refined: A Cadaver Study. **Veterinary Surgery**, v 45, p. 746–753, 2016.

FLECKNELL P. A; LABER L. K; SWINDLE M. M. Anaesthesia and analgesia for rodents and rabbits. In: **Handbook of Rodent and Rabbit Medicine**, Pergammon Press, Butterworth Heineman, Newton, MA, pp. 219-37, 1996.

FERRIGNO C. R. A; ITO K. C; CAQUIAS D. F I; MARIANI T. C; DELLA NINA M. I; FERRAZ V. C. M; CUNHA O; ROMANO L. Retalho de omento maior para indução de vascularização e consolidação óssea em cão. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n. 9, p. 2033-2036, set, 2010.

FREITAS S. H; DÓRIA R. G. S; MENDONÇA F. S; SANTOS M. D; MOREIRA R; SIMÕES R. S; CAMARGO L. M; MARQUES A. T. C; SIMÕES M. J. Tomografia computadorizada da matriz óssea mineralizada heteróloga fragmentada e metilmetacrilato na reparação de falhas ósseas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 6, p. 1547-54, 2012.

GOLDSMITH H. S; SANTOS R; BEATTIE E. JR. Relief chronic lymphedema by omental transposition. **Annals of Surgery**, v.166, n.4, p.573-583, 1967.

GOLDSMITH H. S; CHEN W. F; DUCKETT S. W. Brain vascularization by intact omentum. **Archives of Surgery**, v.106, p.695-698, 1973.

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

GONDIM A. L. M. F. Efeito da laserterapia na biomodulação da osteogênese em defeitos críticos confeccionados em calota craniana de ratos. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade De Odontologia da Pontifícia Universidade Católica Do Rio Grande Do Sul – PUC, Porto Alegre - RS, 2007.

GOES J. C. S; MACEDO A. L. V. O omento na reconstrução da mama, In **Cirurgia Plástica - Mama**, v. 5, 3ed. p. 472-481, 2013.

GUTIERRES M.; LOPES M. A; HUSSAIN N. S; CABRAL A. T; ALMEIDA L; SANTOS J. D. Substitutos ósseos - Conceitos gerais e estado actual. **Arquivos de Medicina**, v. 19 n. 4, p. 153-162, 2006.

HOSGOOD G. The omentum – the forgotten organ: physiology and potential surgical applications in dogs and cats. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.12, n.1, p.45-50, 1990.

HARDIN C. K. Banked bone. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v. 27 n. 5 p. 911-925, 1994.

HANDSCHEL J; SIMONOWSKA M; NAUJOKS C; DEPPRICH R. A; OMMERBORN M. A; MEYER U; KUBLER N. R. A Histomorphometric Meta-Analysis Of Sinus Elevation With Various Grafting Materials. **Head & Face Medicine**, n11, S-12, 2009.

HUYGHE S; ROOSTER H; DOOM M; VAN DEN BROECK W. The Microscopic Structure of the Omentum in Healthy Dogs: The Mystery Unravelled. **Journal of Veterinary Medicine: Anatomia, Histologia, Embryologia**, June 2015.

INTINI G; ANDREANA S; BUHITE R. J; BOBEK L. A. A comparative analysis of bone formation induced by human demineralized freeze-dried bone and enamel matrix derivative in rat calvaria critical-size bone defects. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 7, p. 1217-1224, july, 2008.

KEATING J. F; MCQUEEN M. M. Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma. **The Journal of Bone & Joint Surgery Br**, v.83, p.3-8, 2001.

KARP J. M; DALTON P. D; SHOICHET M. S. Scaffolds for tissue engineering. **Materials Research Society Bulletin**, p. 301-306, 2003.

KOROSSIS S. A; BOLLAND F; KEARNEY J. N; FISHER J; INGHAM E. Bioreactors in tissue engineering. **Topics in Tissue Engineering**, v. 2, c. 8, 2005.

KIM S; PARK M. S; JEON O; CHOI C. Y; & KIM B. Poly (lactide-co-glycolide) / hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, p.1399–1409, 2006.

KAWAMURA M; MIYAGAWA S; FUKUSHIMA S; SAITO A; MIKI K; ITO E; SOUGAWA N; KAWAMURA T; DAIMON T; SHIMIZU T; OKANO T; TODA K; SAWA Y. Enhanced survival of transplanted human induced pluripotent stem-cell derived cardiomyocytes by the combination of cell sheets with the pedicled omental flap technique in a porcine heart. **Circulation Journal**, v. 128, p. 87–94, 2013.

LOHMANN C. H; ANDREACCHIO D; KÖSTER G; CARNES JR. D. L; COCHRAN D. L; DEAN D. D; BOYAN B. D; SCHWARTZ Z. Tissue response and osteoinduction of

human bone grafts in vivo. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 121 n. 10 p. 583-590, 2001.

LIU X; MA P. X. Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 32, p. 477-486, 2004.

LIU C; XIA Z; CZERNUSKA J. T. Design and Development of Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering. **Chemical Engineering Research and Design: Part A**, v. 85, p. 1051-1064, 2007.

MARINAK K. W; MELLONIG J. T; TOWLE H. J. The osteogenic potential of two human demineralized bone preparations using a xenogeneic model. **Journal of Periodontology**, v. 60 n.1, p. 12-18, 1989.

MELO E. G; REZENDE C. M. F; BORGES A. P. B; NOBREGA NETO P. I. Aloenxerto ósseo cortical: avaliação do seu emprego em tibia de cão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, p. 385-394, 1998.

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

MORETTON T. R; BROWN C. E; LEGAN J. J; KAFRAWY A. Tissue reactions after subcutaneous and intraosseous implantation of mineral trioxide aggregate and ethoxybenzoic acid cement. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 52, p. 528-33, 2000.

MILLIS D. L; MARTINEZ S. A. Bone grafts. In: SLATTER, D. **Textbook of Small Animal Surgery**, 3.ed. Philadelphia: Saunders, . V.2, cap.133, p.1875-1891. 2003.

MAUNEY J. R; BLUMBERG J; PIRUN M; VOLLOCH V; VUNJAK-NOVAKOVIC G; APLAN D. L. Osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on

partially demineralized bone scaffolds in vitro. **Tissue Engineering**, V10 (1-2), p. 81-92, 2004.

NOETZEL J; OZER K; REISSHAUER B. H; ANIL A; RÖSSLER R; NEUMANN K; KIELBASSA A. M. 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**, v.10, p. 77-83, 2006.

OLIVEIRA R. C; SICCA C. M; SILVA T. L; CESTARI T. M; KINA J. R; OLIVEIRA D. T; BUZALAF M. A. R; TAGA R.; TAGA E. M; GRANJEIRO J. M. Avaliação histológica e bioquímica da resposta celular ao enxerto de osso cortical bovino previamente submetido a altas temperaturas: efeito da temperatura no preparo do osso xenógeno. **Revista Brasileira de Ortopedia**, V 38(9): 551-60, 2003.

O'BRIEN F. J; HARLEY B. A; YANNAS I. V; GIBSON L. Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds. **Biomaterials**, v. 25, p. 1077-1086, 2004.

O'SHAUGHNESSY B. A; DUMANIAN G. A; LIU J. C; GANJU A; ONDRA S. L. Pedicled omental flaps as an adjunct in the closure of complex spinal wounds. **Spine**, v.32, n.26, p.3074-3080, 2007.

PROUBASTA J; MUR J. G; PLANELL J. A; Biocompatibilidad, materiales implantables, tipos de implante. In: **Fundamentos de Biomecânica y Biomateriales**, Ediciones. Madrid. P.271-350, 1997.

PIATTELLI A; SCARANO A; PIATTELLI M; CARAGGIO F; MATARASSO S. Bone regeneration using bioglass: An experimental study in rabbit tibia. **Journal of Oral Implantology**. v. 26, p. 257-261, 2000.

PINTO FILHO S. T. L; TREICHEL T. L. E; ARAMBURÚ JR J. S; ROSA M. B; BRUN M. V; LINHARES M. T; RODRIGUES B. E; KRAUSE A; VAZ M. A. B; DALMOLIN F; PIPPI N. L. Proliferação e viabilidade de células-tronco derivadas do omento maior, tecido adiposo perirrenal e bolsa adiposa interescapular em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). *Veterinária e Zootecnia*. v. 22(4), p. 607-618, 2005.

PLATELL C; COOPER D; PAPADIMITRIOU J. M; HALL J. C. The omentum. **World Journal of Gastroenterology**, v.6, n.2, p.169-176, 2000.

PIERMATTEI D. L; JOHNSON K. A. **An Atlas of Surgical Approaches to the Bones and Joints of the Dog and Cat** 4ed. Elsevier, 2004.

PANZARINI S. R; HOLLAND R; DE SOUZA V; POI W. R; SONODA C. K; PEDRINI D. Mineral trioxide aggregate as a root canal filling material in reimplanted teeth. Microscopic analysis in monkeys. **Dental Traumatology**, v. 23, p. 265-72, 2007.

ROSS W. E; PARDO A. D. Evaluation of an omental pedicle extension technique in the dog. **Veterinary Surgery**, v.22, n.1, p.37-43, 1993.

RANZANI J. J. T; SAMPAIO G. R; FRANCO M; CASTRO G. B. Aplicação de membrana biológica heteróloga conservada em glicerina, na reparação de lesão em coelhos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 8, p 35-45, 1996.

REZENDE C. M. F; BORGES A. P. B; BERNISW. O; MELO E. G; NOBREGA NETO P. I. Aspecto clínico-cirúrgico e radiográficos da hidroxiapatita sintética na diáfise proximal da tíbia de cães. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, n. 5, p. 537-545, 1998.

REMEDIOS A. Bone and bone healing. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v.29, p.1029-1044, 1999.

ROA D. M; BRIGHT R. M; DANIEL G. B; MCENTEE M. F; SACKMAN J. E; MOYERS T. D. Microvascular transplantation of a free omental graft to the distal extremity in dogs. **Veterinary Surgery**, v.28, p.456-465, 1999.

RAPOSO-DO-AMARAL C. A. A; RAPOSO-DO-AMARAL C. E; ROLAND F. G; ROLAND F. G; SILVA J. V. L; PASCHOAL G. H. L; SILVA A. M; CARONE D. R; MENON D. N; SILVA M. P. A; BENTO D. F; ALMEIDA F. L; BUZZO C. L. Implantes pré-fabricados customizados nas grandes perdas ósseas do esqueleto craniofacial. **Revista Brasileira de Cirurgia Craniomaxilofacial**, v. 3, p. 175-9, 2010.

STEVENSON, S. Bone Grafting. In: SLATTER, D. **Textbook of Small Animal Surgery**. 2 ed, Philadelphia: W.B. Saunders, v.2, p.1694-1703, 1993.

SICCA C. M; OLIVEIRA R. C. de; SILVA T. L; CESTARI T. M; OLIVEIRA D. T; BUZALAF M. A. R; TAGA R; TAGA E. M; GRANJEIRO J. M; KINA J. R. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos. Efeito tamanho da partícula. **Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru - FOB**, v. 8, n.1-2, p.1-10, 2000.

SALGADO J. F. M. Avaliação da Velocidade do Processo de Regeneração Óssea Primária, Conjugando a Técnica de Regeneração Óssea Guiada com Membrana de Colágeno Aniônico e Terapia Laser de Baixa Potência. **Dissertação de Mestrado** UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA – UNIVAP, São José dos Campos, SP, 2002.

SACHLOS E; CZEMUSZKA J. T. Making tissue engineering scaffolds work: review on the application of sff technology to the production of tissue engineering scaffolds. **European Cells and Materials**, v. 5, p. 29-40, 2003.SLOTTE C; LUNDGREN D; BURGOS P. M. Placement Of Autogeneic Bone Chips Or Bovine Bone Mineral In Guided Bone Augmentation: A Rabbit Skull Study. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 18(6), p. 795-806, 2003.

SILVA J. C DA. Estudo Comparativo de Superfícies de Titânio Utilizadas em Implantes. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-SP, 2006.

SOHN D. S; LEE J. K; AN K. M; SHIN H. I. Histomorphometric evaluation of mineralized cancellous allograft in the maxillary sinus augmentation: a 4 case report. **Implant Dentistry**, v. 18, l. 2, p. 172-181, April, 2009.

STEGEN L; VAN GOETHEM B; BEERDEN C; GRUSSENDORF C; ROOSTER H. Use of greater omentum in the surgical treatment of a synovial cyst in a cat. **Tierärztliche Praxis Kleintiere**, v.43 (K): p.115–119, 2015.

SAGHIRI M. A; ORANGI J; TANIDEH N; ASATOURIAN A; JANGHORBAN K; GARCIA-GODOY F; SHEIBANI N. Repair of bone defect by nano-modified white mineral trioxide aggregates in rabbit: A histopathological study. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 20, p. 525-31, 2015

TURRER C. L; FERREIRA F. P. M. Biomateriais em cirurgia craniomaxilofacial: princípios básicos e aplicações: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 23, p. 234-239, 2008.

URIST M. R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, v.150, p.893-899, 1965.