

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

LAURA MELGAÇO FARIA

XENOENXERTO ÓSSEO TRABECULAR BOVINO DESMINERALIZADO ASSOCIADO  
AO PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM FALHAS ÓSSEAS NO RÁDIO DE COELHOS

UBERLÂNDIA

2016

LAURA MELGAÇO FARIA

XENOENXERTO ÓSSEO TRABECULAR BOVINO DESMINERALIZADO ASSOCIADO  
AO PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM FALHAS ÓSSEAS NO RÁDIO DE COELHOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Cirurgia e Anestesiologia

Orientador: Professor Dr. Francisco Cláudio Dantas Mota

UBERLÂNDIA  
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- 
- F224x  
2016      Faria, Laura Melgaço, 1986  
            Xenoenxerto ósseo trabecular bovino desmineralizado associado ao  
            plasma rico em plaquetas, em falhas ósseas no rádio de coelhos / Laura  
            Melgaço Faria. - 2016.  
            63 p.
- Orientador: Francisco Cláudio Dantas Mota.  
            Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
            Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.  
            Inclui bibliografia.
1. Veterinária - Teses. 2. Ossos - Enxerto - Teses. 3. Cirurgia  
            veterinária - Teses. 4. Ossos - Crescimento - Teses. I. Mota, Francisco  
            Cláudio Dantas, 1975-. II. Universidade Federal de Uberlândia.  
            Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

XENOENXERTO ÓSSEO TRABECULAR BOVINO DESMINERALIZADO ASSOCIADO  
AO PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM FALHAS ÓSSEAS NO RÁDIO DE COELHOS

Dissertação aprovada para a obtenção do título de  
Mestre em Ciência Animal no Programa de Pós-  
Graduação em Medicina Veterinária da  
Universidade Federal de Uberlândia pela banca  
examinadora formada por:

Uberlândia, 28 de novembro de 2016.

---

Prof. Dr. Francisco Cláudio Dantas Mota

---

Prof. Dr. Geison Morel Nogueira

---

Prof. Dr. Luiz Augusto de Souza



Aos meus pais, irmãos e ao meu noivo.  
Obrigada por todo sorriso, por todo amor, por toda compreensão.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus** por conceder a graça de me acordar todas as manhãs com saúde e alegria.

Aos meus pais **Raul e Marilda**, pelo incentivo aos estudos e amor incondicional.

Aos irmãos **Douglas e Rúbia**, pelo exemplo de dedicação, responsabilidade, fraternidade e pelo auxílio no decorrer da dissertação.

Ao meu noivo **Leandro**, pelo carisma, incentivo, amor, e pelo auxílio nos infindáveis sábados que lavávamos as baías e alimentávamos os coelhos.

Ao meu orientador **Dr. Francisco Cláudio Dantas Mota** (famoso Chico), amigo e eterno exemplo de professor, que se dedica, se envolve e estimula seus alunos. Serei eternamente grata a você.

Aos professores membros da minha banca: **Prof. Dr. Geison Morel e Prof. Dr. Luiz Augusto**, que se disponibilizaram com tanta atenção.

Ao querido professor **Dr. Emílio Beletti**, que de maneira humilde e extraordinária me “acolheu” na histologia, sempre disposto a me auxiliar.

Ao amigo professor **Msc. Danilo Guedes**, com o auxílio nos incontáveis cálculos nas tabelas.

À equipe de iniciação científica, orientada pelo prof. Francisco: **Laryssa “Coelho”, Marcella Dall’ Agnol, Rafael Simões**. Sem vocês, queridos, jamais conseguiria.

Aos grandes amigos **Prof. Msc Lucas Perroni, Msc. João Paulo Bueno, Antônio Bertolino e Msc. Marina Greco**, obrigada pelas ajudas nos experimentos, nos documentos, nas burocracias.

A **toda equipe** do Laboratório de Ensino em Histologia, Biologia Celular e Embriologia pelo auxílio na confecção das lâminas, em especial a **Ester Cristina!**

À prof<sup>a</sup>. **Ricarda Santos e Célia Regina**, do Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias.

Aos amigos do Centro Clínico Veterinário – UNIPAM, que entenderam minha ausência por um período (**Larissa do Vale, Maxsuel Assunção, Larisse Naves, Nayara Bontempo, Izamara Ramos, Prof. Msc. Nádia**).

A **UNITRI** e em especial ao **Coordenador Prof. Msc. Gabriel Labeca**, uma homem de fé, sabedoria e guiado por Deus. Agradeço a compreensão de algumas ausências.

Aos meus alunos pela torcida e amor a mim confiado.

Por fim, à minha avó **HONORINA**, por jamais cessar as orações.

## RESUMO

Na clínica de pequenos animais é comum o aparecimento de pacientes apresentando fraturas com perdas ósseas significantes ou casos patológicos como união retardada e não união óssea. Muitos são os relatos científicos a respeito das técnicas de preparação de enxertos, mas há necessidade de avaliação de novas técnicas que sejam mais facilmente empregadas, de fácil obtenção e que possibilitem uma consolidação óssea mais rápida e efetiva. Desta maneira, justificou-se a realização de um modelo animal experimental que testou a associação do xenoenxerto com plasma rico em plaquetas (PRP), além da possibilidade de formação de mais uma opção de banco de ossos para enxertia. Os fragmentos foram coletados da epífise distal de fêmures de bovinos, e, em seguida, fragmentados, desmineralizados e processados quimicamente. Foi criada uma falha óssea de um cm no terço médio no rádio de coelhos, os quais foram divididos em três grupos. O grupo um foi o grupo controle (GI), o segundo grupo tratado com xenoenxerto desmineralizado processado quimicamente (GII), e o terceiro preenchido com o mesmo enxerto e acrescido de plasma rico em plaquetas (GIII). O local do enxerto foi avaliado radiograficamente e histologicamente com 30 e 60 dias de pós-operatório. A área ostectomizada preenchida com o xenoenxerto foi substituída com grande quantidade de tecido ósseo, de forma organizada e precoce quando comparada ao grupo controle, com nenhuma rejeição. Já a associação de xenoenxerto com PRP não resultou em um processo de consolidação satisfatória.

**Palavras-chave:** Ácido Clorídrico. Consolidação óssea. Enxerto ósseo. Fatores de crescimento.

## ABSTRACT

In the clinics of small animals is common the appearance of patients with fractures with significant bone loss or pathological cases as delayed union and non-union bone. There are many scientific papers about preparation techniques grafts, but still a need to evaluate new techniques that are more easily used, easy to obtain and which enable a faster and more effective bone consolidation. Thus it has been justified conducting an experimental animal model that tested the association of xenograft with platelet-rich plasma (PRP), as well a possibility of forming another option of a bone bank for grafting. The fragments were collected from the distal femur epiphysis of bovines, then they were fragmented, demineralized and processed chemically. A bone failure of one cm was created in the middle third in rabbit radio, which were divided into three groups. The first was the control group (GI), the second one was treated with chemically processed demineralized xenograft (GII), and the third was filled with the same graft and added with platelet-rich plasma (GIII). The graft site was evaluated radiographically and histologically at 30 and 60 postoperative days. The ostectomy area filled with the xenograft was replaced with large amount of bone tissue, in an organized and precocious way when compared to the control group, with no rejection. However the association of xenograft with PRP did not result in a satisfactory consolidation process.

**Keywords:** Hydrochloric acid. Bone consolidation. Bone graft. Growth factors.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Imagens fotográficas do preparo do xenoenxerto trabecular bovino	21
Figura 2	Imagem fotográfica do aspecto final dos blocos de osso esponjoso bovino após descalcificação e processamento químico	22
Figura 3	Tubo de hemossedimentação a vácuo de 3,5 mL, com agulha de coleta específica, utilizado para coleta de sangue por punção intracardiaca	23
Figura 4	Tubo de hemossedimentação contendo 3,0 mL de sangue de coelhos da raça Nova Zelândia, antes e após centrifugação a 2.000 rpm por 20 min	23
Figura 5	Tubos de hemossedimentação a vácuo contendo sangue de coelho da Raça Nova Zelândia, após processo de centrifugação e confecção de PRP	24
Figura 6	Associação do PRP, Cloreto de Cálcio a 10% e xenoenxerto trabecular granulado, desmineralizado e processado quimicamente	25
Figura 7	Imagens fotográficas das principais etapas do procedimento cirúrgico experimental de criação de falha óssea de 01 cm no rádio de coelhos	26
Figura 8	Imagens fotográficas da criação de molde para ostectomia de rádio e remoção de fragmento de 01 cm do rádio de coelho	26
Figura 9	Imagem fotográfica do processo de preparação do xenoenxerto para enxertia	27
Figura 10	Implantação de xenoenxerto trabecular bovino desmineralizado associado a gel de PRP, e sutura da musculatura e pele do antebraço de coelho	28
Quadro 1	Parâmetros e legendas da análise histológica	30
Figura 11	Imagens radiográficas do antebraço esquerdo de coelhos, na projeção mediolateral, após 30 dias da ostectomia do rádio, dos grupos I, II e II respectivamente	34
Figura 12	Imagem radiográfica na projeção mediolateral, representando o antebraço esquerdo dos dois coelhos do grupo II, após 30 dias da ostectomia do rádio	35
Figura 13	Imagens radiográficas do antebraço esquerdo de coelhos, na projeção mediolateral, após 60 dias da ostectomia do rádio, dos grupos I, II e II respectivamente	36
Figura 14	Fotomocriografias do processo de reparação óssea de rádio de coelhos	37

Figura 15	Fotomocrigrafias do processo de reparação óssea de rádio de coelhos com associação de xenoenxerto	38
Figura 16	Fotomicrografias do processo de reparação óssea de rádio de coelhos com associação de xenoenxerto	38
Figura 17	Fotomocrigrafias do processo de reparação óssea de rádio de coelhos com associação de xenoenxerto e PRP	39
Figura 18	Comparação da porcentagem de neoformação óssea das falhas nos rádios de coelhos	40
Figura 19	Comparação de infiltrado mononuclear nas falhas nos rádios de coelhos	41

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>Tecido ósseo.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2</b>	<b>Consolidação óssea .....</b>	<b>13</b>
<b>2.3</b>	<b>Complicações ortopédicas.....</b>	<b>14</b>
<b>2.4</b>	<b>Enxertos ósseos .....</b>	<b>14</b>
<b>2.5</b>	<b>Processamento químico.....</b>	<b>16</b>
<b>2.6</b>	<b>Plasma rico em plaquetas .....</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>Grupos experimentais .....</b>	<b>20</b>
<b>3.2</b>	<b>Coleta do xenoenxerto trabecular.....</b>	<b>20</b>
<b>3.3</b>	<b>Processamento químico do xenoenxerto trabecular.....</b>	<b>21</b>
<b>3.4</b>	<b>Pré-operatório.....</b>	<b>22</b>
<b>3.5</b>	<b>Coleta e preparo do concentrado de plaquetas.....</b>	<b>22</b>
<b>3.6</b>	<b>Procedimento cirúrgico.....</b>	<b>25</b>
<b>3.7</b>	<b>Pós-operatório.....</b>	<b>28</b>
<b>3.8</b>	<b>Avaliação radiográfica .....</b>	<b>28</b>
<b>3.9</b>	<b>Eutanásia.....</b>	<b>29</b>
<b>3.10</b>	<b>Análise histológica .....</b>	<b>29</b>
<b>3.11</b>	<b>Análise estatística .....</b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
<b>4.1</b>	<b>Observações trans e pós-operatórias .....</b>	<b>31</b>
<b>4.2</b>	<b>Número de plaquetas, leucócitos e hemácias no pré-cirúrgico e após a preparação do plasma rico em plaquetas.....</b>	<b>31</b>
<b>4.3</b>	<b>Avaliação radiográfica .....</b>	<b>34</b>
<b>4.4</b>	<b>Avaliação histológica.....</b>	<b>36</b>

4.5	Avaliação estatística .....	40
5	DISCUSSÃO .....	42
5.1	Modelo animal .....	42
5.2	Protocolo cirúrgico e anestésico .....	42
5.3	Processamento químico.....	43
5.4	Achados radiográficos.....	43
5.5	Achados histológicos.....	44
5.6	Obtenção do PRP.....	48
6	CONCLUSÃO .....	50
	REFERÊNCIAS .....	51
	ANEXO A – Certificado - Aprovação do CEUA.....	59
	APÊNDICE A - Protocolo I - Avaliação radiográfica.....	60
	APÊNDICE B - Protocolo II - Avaliação microscópica .....	61
	APÊNDICE C - Protocolo III - Tabela de avaliação microscópica .....	62



## 1 INTRODUÇÃO

A reparação óssea é um processo de cicatrização especializado que envolve a regeneração do osso (HAVERSTOCK; MANDRACCHIA, 1998), no entanto, podem ocorrer situações em que a estabilização dos fragmentos ósseos por dispositivos de fixação metálica não são suficientes para promoverem a cura de uma fratura (BIRNBAUM et al., 2002; FINKEMEIER, 2002; Den BOER et al., 2003), o que resulta em distúrbio de consolidação (MANDT; GERSHUNI, 1987).

A não consolidação de defeitos ósseos representa ainda um grande desafio aos profissionais da saúde de diversas áreas (NASCIMENTO et al., 2010), sendo esta a condição inicial para o desenvolvimento da pseudartrose, e por sua vez, ainda é responsável por alto número de complicações, pois nem sempre se observa a sua cura, mesmo após a aplicação de recentes técnicas cirúrgicas (NOLTE et al., 2001).

O tratamento das não uniões é variado, dependendo de cada caso, podendo ser feito através da simples imobilização com talas, fixação interna com implantes metálicos ou com o uso de adjuvantes tais como os enxertos ósseos (MARX et al., 1998; MILLIS; JACKSON, 2007).

Os enxertos auxiliam na reformulação do osso através de quatro mecanismos distintos: suporte mecânico, osteocondução, osteogênese e osteoindução (MARTINEZ; WALKER, 1999). São caracterizados pelo transplante de tecido ósseo, sendo bastante utilizado na Medicina Veterinária (JOHNSON, 2007). Sendo os enxertos autólogos considerados “padrão-ouro” para reconstrução do esqueleto e para regeneração óssea guiada, devido a suas propriedades osteocondutivas, osteogênicas e osteoindutivas, além da ausência de rejeição imunológica. No entanto, a utilização destes resulta em algumas desvantagens como quantidade e áreas doadoras limitadas, o potencial de morbidade da área doadora e a considerável reabsorção e tempo cirúrgico adicional (BUCHARDT, 1983).

Uma alternativa para estas situações é o uso de xenoenxertos, no entanto, a taxa de sucesso é baixa por apresentarem ação apenas osteocondutora (WORTH et al., 2005). Já a sua associação ao plasma rico em plaquetas (PRP) pode representar uma opção disponível para modular e acelerar o processo de reparo, pois desta forma é fornecido uma matriz osteocondutiva natural e promotores de crescimento, presentes no PRP (MARX et al., 1998), que podem auxiliar no processo de consolidação óssea, além do possível aumento da velocidade e densidade a formação de tecido ósseo.

Objetivou-se avaliar os resultados da aplicação do xenoenxerto trabecular bovino desmineralizado e granulado associado ou não ao plasma rico em plaquetas no processo de reparação de falhas ósseas criadas experimentalmente na diáfise de rádio de coelhos.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Tecido ósseo**

O osso é um tecido conjuntivo especializado que compõe juntamente com a cartilagem, o sistema esquelético. Tais tecidos possuem três funções primordiais: mecânica (sustenta a estrutura muscular), protetora (para órgãos vitais e medula óssea) e metabólica (reserva de íons para todo o organismo, principalmente cálcio e fosfato) (BARON et al., 1993).

No osso estão presentes células como os osteócitos, osteoblastos e osteoclastos. Os osteócitos se posicionam em lacunas no interior da matriz óssea, são células que não se diferenciam, cujo papel principal é a manutenção da regeneração óssea em constante funcionamento. Os osteoblastos são células que depositam o osso e que sintetizam a parte orgânica (colágeno e proteoglicanas) da matriz óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). A deposição ocorre em duas etapas. Primeiramente, os osteoblastos secretam a matriz. Esta matriz contém substância proteica que polimeriza para formar fibras colágenas bem resistentes, que passam a ser, portanto, os constituintes principais desta matriz recém-formada. Após a matriz proteica ter sido formada, ocorre a precipitação de sais de cálcio nos interstícios desta matriz, compondo, desta maneira, a estrutura dura que conhecemos. A deposição dos sais necessita da combinação do cálcio com o fosfato para assim formar o fosfato de cálcio, e a lenta conversão deste composto em hidroxiapatita, que pode ter a duração de semana ou meses. Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas relacionadas com a reabsorção do tecido ósseo e que participam dos processos de remodelação dos ossos (GUYTON, 1988).

### **2.2 Consolidação óssea**

A reparação óssea é um processo de cicatrização especializado que envolve a regeneração do osso (HAVERSTOCK; MANDRACCHIA, 1998). Ela ocorre inicialmente pelo crescimento de tecido de granulação entre os fragmentos ósseos, sofre diferenciação e transforma-se em tecido conectivo denso. Tecido cartilaginoso desenvolve-se dentro desse tecido originando o calo fibrocartilaginoso que causa diminuição da mobilidade interfragmentária, o que possibilita mineralização inicial do calo. Em fase mais avançada, as células osteoprogenitoras do periósteo e endósteo distante do sítio da fratura iniciam a

produção de tecido osteoide que substitui o calo fibrocartilaginoso pelo calo ósseo (JORGE; GOUVEIA, 1989). No entanto, para que ocorra o processo de reparação óssea, é necessário manter o alinhamento do eixo longitudinal do osso, impedindo que forças externas de rotação, de cisalhamento, de flexão, de distensão e de compressão atuem sobre o foco da fratura, retardando a cicatrização (LESSER, 1984).

### **2.3 Complicações ortopédicas**

A não consolidação óssea está presente em situações em que o processo de cicatrização óssea cessou antes que a fratura se repare completamente (BRASHLAR, 1965; BRIGHTON, 1984). É condição inicial que pode evoluir para a pseudoartrose (BRIGHTON et al., 1981; BRIGHTON et al. 1975), que é uma falsa articulação com presença definitiva de tecido fibroso ou fibrocartilaginoso entre os fragmentos ósseos.

A etiologia da não consolidação óssea e da pseudoartrose inclui vários fatores tais como: idade do paciente, estado nutricional, configuração e local da fratura, presença de doenças metabólicas concomitantes, infecção, administração de drogas e grau de acometimento de tecidos moles (ROBELLO; ARON, 1992), incluindo também fatores físicos como intervalos muito grandes entre as extremidades das fraturas e o uso de métodos de fixação inadequada que impedem a anastomose da vascularização intramedular, vascularização do calo mole e formação do calo ósseo. (KADERLY, 1993).

União retardada é definida como uma fratura que não apresentou completa reparação no tempo normalmente requerido pela fratura. Já no processo de não-união, a reparação parou, não apresentando progresso em sequência de radiografias. (SCHMAEDECKE, 2003). A fratura não irá consolidar sem intervenção cirúrgica, sendo o desenvolvimento da união retardada ou não união uma complicação muito séria, tornando-se muitas vezes necessária a amputação do membro (EGGER, 1998).

### **2.4 Enxertos ósseos**

Os enxertos ósseos são utilizados como auxiliares no tratamento de fraturas, perdas e defeitos ósseos (BRINKER; PIERMATTEI; FLO, 1986). Segundo Salbego (2010), apresentam algumas vantagens em sua utilização como as propriedades biológicas e

mecânicas, que em inúmeras circunstâncias tornam-se a única alternativa no reparo de lesões com grave perda óssea.

Os enxertos ósseos podem ser classificados de acordo com sua origem, como autólogos (autoenxertos, retirados do próprio animal), homólogos (alo enxertos, retirados de um animal da mesma espécie) e heterólogos (xenoenxertos, retirados de animais de outra espécie) (MILLIS; MARTINEZ, 2007; CALASANS-MAIA et al., 2009).

Os enxertos ainda são classificados através de sua composição estrutural, dessa forma se o enxerto é proveniente de osso compacto é denominado enxerto cortical, se é proveniente de um tecido trabecular de alta celularidade, é denominado enxerto esponjoso e do tipo corticoesponjoso, quando apresentam ambas as características (SALBEGO, 2010; SOARES et al., 2013).

Os enxertos são usados como coadjuvantes no tratamento dos processos patológicos de não união óssea, por apresentarem fatores osteoindutores, que auxiliam na sinalização da fratura para que células mesenquimais dos tecidos adjacentes (do hospedeiro ou do enxerto) migrem para o local, se tornem osteoblastos e sofram diferenciação em tecido cartilaginoso ou ósseo (JOHNSON, 2007; MILLIS; MARTINEZ, 2007) e fatores osteocondutores, que servem como base para crescimento tecidual bem como aparecimento de microcirculação (SALBEGO, 2010), sendo que o enxerto fornece a estrutura para que este crescimento ocorra (MILLIS; MARTINEZ, 2007).

Os enxertos autólogos esponjosos estimulam a formação óssea devido ao fornecimento de células vivas e fatores de crescimento, são histocompatíveis, porém não possuem estrutura mecânica e não podem ser estocados. (SANTOS; RAHAL, 2004).

A obtenção dos enxertos autólogos apresentam riscos para o paciente, uma vez que o mesmo tem que passar por mais de um procedimento cirúrgico, deste modo há aumento da morbidade pós-operatória, e normalmente a região doadora não apresenta quantidade necessária para o enxerto (CALASANS-MAIA et al., 2009; ALIEVI et al., 2007). A taxa de complicações pós operatória varia de 9% até 49%, podendo gerar diversos inconvenientes para o paciente tais como: infecções, hematomas, seromas, hérnias e dor persistente (MAKRIDIS et al., 2012).

Os aloenxertos são os mais utilizados, porém sua incorporação ao osso lesionado nem sempre é completa, apresentando em alguns casos considerável formação de tecido conjuntivo fibroso na interface implante-osso (BARCKMAN et al., 2013).

Os xenoenxertos obtidos a partir de ossos bovinos têm se mostrado uma boa alternativa aos auto enxertos, uma vez que fazendo uso destes, é possível evitar que o paciente

passar por mais de um procedimento (PINHEIRO; GERBI, 2006) ou que outro animal da mesma espécie tenha que ser submetido a um procedimento invasivo. Conforme Buser, Martin e Belser (2004), os xenoenxertos bovinos, apresentam propriedades físicas e biológicas semelhantes aos de outras espécies além de apresentarem, segundo Khojasteh et al., (2013), uma boa capacidade osteocondutora. As vantagens também incluem a quantidade de material disponível, que é em geral abundante, a facilidade de uso, e resultados biomecânicos positivos (LAURENCIN; EL-AMIN, 2008), com rigidez e resistência elevadas (MILLIS; MARTINEZ, 2007).

Apesar das vantagens, as desvantagens também devem ser consideradas, tais como a transmissão de doenças, respostas imunes, falhas na consolidação dos enxertos (LAURENCIN; EL-AMIN, 2008), dor durante a realização de atividades e durante a palpação do local (LEDFOORD et al., 2013). O armazenamento em banco de ossos é complicado, sendo na maioria das vezes estocado em frízers específicos, o que torna uma alternativa cara e trabalhosa (CASTIGLIA et al., 2009).

## **2.5 Processamento químico**

Os ossos podem passar por diversos tratamentos tanto físicos, tais como irradiação, congelamento e autoclavagem, quanto por processos químicos que envolvem o uso de substâncias para esterilização do enxerto. Dessa forma, este enxerto fica mais seguro, uma vez que a esterilização previne transmissão de doenças e diminui a reação imunológica do organismo a ser enxertado, bem como propicia métodos mais baratos de preservação para que os ossos possam ser utilizados como enxertos (CASTIGLIA et al., 2009).

O processamento do xenoenxerto pode resultar em dois tipos distintos de material: o inorgânico e o orgânico. O inorgânico não contém proteínas e células, sendo caracterizado pelo elevado conteúdo de hidroxapatita. A remoção das proteínas é obtida através de tratamento térmico com temperatura acima de 300 °C, entretanto, a elevação da temperatura diminui a bioabsorção do material. Já o xenoenxerto tratado com ácidos em concentração ideal leva à remoção de células, e proteínas não colágenas, deixando um arcabouço proteico constituído praticamente de colágeno tipo I e pequena quantidade de fatores de crescimento, como a proteína morfogenética óssea (SANADA et al., 2003).

No processamento químico, o método desenvolvido por Volpon e Costa (2000) é bastante utilizado em aloenxertos, pois tal método gera enxertos com capacidade osteocondutora boa e é de certa forma uma alternativa, mesmo que com menor desempenho,

ao enxerto de osso autólogo. O processamento se inicia com a utilização de álcool absoluto para desidratação, éter etílico para desengorduramento, água oxigenada para clareamento, seguido de esterilização em óxido de etileno. Os enxertos tratados desta forma apresentam baixo custo e não requerem equipamentos específicos, podendo ser realizados na prática laboratorial básica (CASTIGLIA et al., 2009).

Segundo Castiglia e colaboradores (2009), o processamento químico apesar de mostrar inúmeras vantagens, tais como a melhor preservação do conteúdo celular, e outras já citados acima, quando submetido a esterilização por óxido de etileno pode provocar amalgamação das microfibras, isto é, quando a superfície óssea fica menos preservada e os orifícios vasculares menos nítidos.

O processo de desmineralização, segundo Fernandez et al. (1989), é realizado com ácido clorídrico (HCl), após retirado todo o tecido mole e lavados em água corrente. Segundo Volpon, Xavier e Gonçalves (1982) este processo pode auxiliar na melhora da qualidade osteoindutora do enxerto, além de diminuir a estimulação antigênica (RILEY et al., 1996).

O processo de granulação permite a utilização de maior quantidade de enxerto na falha óssea, uma vez que quando granulado, é capaz de preencher a falha de forma mais homogênea, o que resulta em maior quantidade de osso neoformado (URIST et al., 1970). Volpon, Xavier e Gonçalves (1982), ao fazerem uso do aloenxerto granulado descalcificado, em defeitos ósseos no rádio de coelhos, observaram correção completa em nove semanas, enquanto outros estudos como o de Tuli e Singh (1978), que usaram cilindros ósseos descalcificados, demoraram 12 semanas para que houvesse preenchimento do mesmo modelo de falha óssea.

## **2.6 Plasma rico em plaquetas**

O plasma rico em plaquetas (PRP) é uma fonte autógena e barata de fatores de crescimento, preparado a partir de pequena quantidade de sangue total retirado do próprio paciente, no período pré-operatório (LIEBERMAN; DALUISKI; EINHORN, 2002). O PRP apresenta em sua constituição plasma, leucócitos e plaquetas. No plasma estão contidos diversos fatores de coagulação (GOLDBERG, 1997), os leucócitos conferem resistência natural aos agentes infecciosos e imunológicos, e as plaquetas que sofrem degranulação nos sítios de lesão liberando os fatores de crescimento (MARX; GARG, 1999).

Os fatores de crescimento influenciam a divisão celular, a síntese de matrizes e a diferenciação tecidual, auxiliando na formação de cartilagem e na reparação de tecidos musculares e esqueléticos (LIEBERMAN; DALUISKI; EINHORN, 2002).

Estudos têm demonstrado a importância dos fatores de crescimento na reparação óssea, por apresentarem ação osteoindutora, agindo nas células osteoprogenitoras diferenciando-as e auxiliando na osteogênese (LEMOS; ROSSI JÚNIOR; PÍSPICO, 2015).

Pelo menos três fatores são derivados dos grânulos plaquetários: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento e transformação beta (TGF- $\beta$ ) e fator de crescimento semelhante à insulina [IGF] (GIANNOBILE, 1996) e outras proteínas que modulam a inflamação e reparação de feridas (SILVA et al., 2013).

PDGF é uma glicoproteína cujas atividades são mitogênese, angiogênese, ativação de macrófagos e promoção de quimiotaxia (MARX; CARLSON, 1996). O aumento de sua quantidade inicial propicia maior atividade das células osteocompetentes do que ocorreria no enxerto ou coágulo apenas, determinando rapidez na formação óssea e melhor qualidade do trabeculado (BRANDÃO, 2005).

TGF- $\beta$  é uma superfamília que inclui TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e proteínas morfogenéticas ósseas (BMP). Presume-se que TGF- $\beta$ 1 e  $\beta$ 2 sejam lançados pelas plaquetas após a formação do coágulo na fratura, estando associados à proliferação de tecido periosteal no período inicial da consolidação. No entanto, sua ação mais intensa ocorre durante a proliferação celular cartilaginosa e a ossificação endocondral (MARX; GARG, 1999; LIEBERMAN; DALUISKI; EINHORN, 2002).

O IGF é mitogênico para as células da linhagem osteoblástica e estimulador da osteogênese a partir dos osteoblastos diferenciados. Quando combinado com outros fatores de crescimento, como PDGF ou TGF- $\beta$ , pode acelerar a osteogênese (GIANNOBILE, 1996).

A atuação desses fatores de crescimento locais e sistêmicos nas diferentes fases da regeneração (inflamação, reparo e modelação) é imprescindível para o recrutamento de células imediatamente após a injúria, assim como para potencializar a produção de tecido ósseo e a adesão de células tronco mesenquimais, responsáveis pelo processo de consolidação e reparação tecidual (ANDRADE et al., 2016). Sendo o uso na reconstrução de tecido ósseo um avanço, visto que plaquetas autólogas foram utilizadas inicialmente apenas com funções hemostáticas, prevenindo ou tratando hemorragias secundárias à trombocitopenia (DONATTI et al., 2013).

Embora existam trabalhos com o PRP líquido, estudos tem demonstrado que sua forma em gel facilita sua ação sobre as lesões, proporcionando uma ação mais local e homogênea.



O gel pode ser obtido através da adição de substâncias como trombina, gluconato e o cloreto de cálcio, que promovem também a ativação das plaquetas. (BARBOSA et al., 2008; SILVA, et al., 2013).

### 3 METODOLOGIA

Todos os procedimentos neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia, sob número de protocolo: 075/14, conforme Anexo A.

#### 3.1 Grupos experimentais

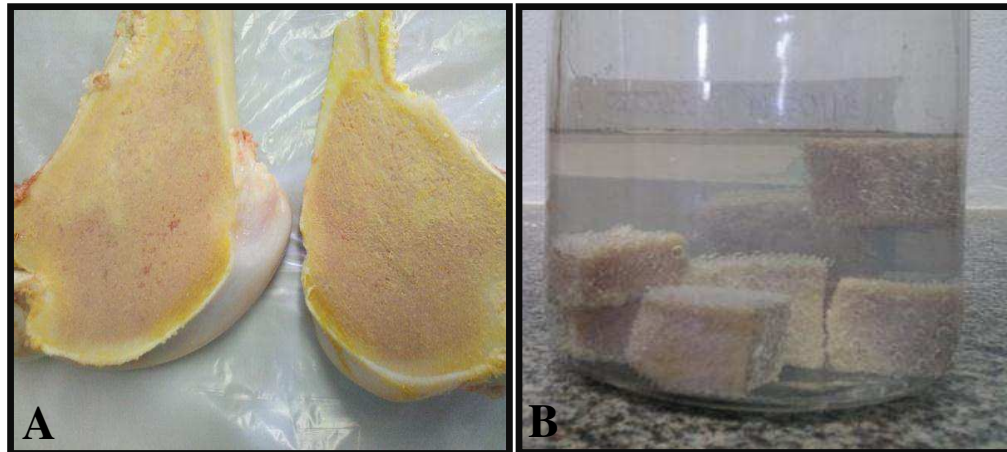
Para realização deste experimento foram utilizados 48 coelhos adultos, machos, da raça Nova Zelândia, com peso entre 3,0 kg a 4,5 kg, provenientes de um criadouro particular de Uberlândia, MG. Todos foram mantidos em gaiolas individuais, recebendo água e ração à vontade. Após um período de 15 dias de alojamento, utilizado para adaptação ao ambiente e socialização dos animais com os pesquisadores, os coelhos foram submetidos a avaliações clínicas, hematológicas (hemograma, leucograma e contagem plaquetária) e exames radiográficos do antebraço esquerdo nas posições látero-medial e dorso-palmar, para verificação de qualquer deformidade óssea. Os animais considerados aptos a participar do projeto foram os que não apresentaram nenhuma anormalidade nestas avaliações.

Os coelhos foram distribuídos aleatoriamente em três grupos com 16 indivíduos cada um, sendo o primeiro Grupo Controle (GI), o segundo tratado com xenoenxerto bovino desmineralizado (GII) e o último tratado com xenoenxerto desmineralizado associado a concentrado de plaquetas (GIII). Cada grupo foi subdividido em dois grupos de oito animais cada, sendo os coelhos avaliados com 30 dias de pós-operatório (PO) numerados de um a oito e os de 60 dias de PO identificados do nove ao 16.

#### 3.2 Coleta do xenoenxerto trabecular

O xenoenxerto trabecular foi obtido da epífise distal de oito fêmures de bovinos (**Figura 1A**), abatidos em frigoríficos sobre serviço de Inspeção Federal. As epífises foram levadas para o laboratório de cirurgia experimental do hospital veterinário da UFU, onde se removeram os resquícios de tecidos moles, superfície articular e toda a cortical do osso. A porção do osso esponjoso foi serrada em blocos, de 2 a 3 cm<sup>3</sup>. Foi realizada uma limpeza mecânica nos fragmentos com água corrente e escova para remoção de tecidos aderidos, em seguida acondicionados em álcool absoluto. (**Figura 1B**)

Figura 1 – Imagens fotográficas do preparo do xenoenxerto trabecular bovino



Fonte: A autora.

**A-** Imagem fotográfica do fêmur de bovino seccionada no eixo longitudinal, expondo o osso trabecular. **B-** Imagem fotográfica do osso esponjoso de bovinos em forma de cubos, imerso em álcool absoluto.

### 3.3 Processamento químico do xenoenxerto trabecular

O protocolo utilizado para o processamento químico dos ossos esponjosos foi baseado nos trabalhos descritos por Volpon e Xavier (1982), Volpon e Costa (2000) e Castiglia et al., (2009), obedecendo a seguinte sequência:

- 1 Lavagem em água corrente e filtrada por duas horas;
- 2 Fixação em álcool absoluto por 48 horas;
- 3 Manutenção em água oxigenada (40 volumes) até o clareamento.
- 4 Remoção da gordura em éter etílico (trocas sucessivas até o desaparecimento das gotículas sobrenadantes);
- 5 Descalcificação em ácido clorídrico 0,5 N, à temperatura ambiente, trocado diariamente, por cinco dias. A descalcificação foi controlada testando-se digitalmente a consistência do osso, até que ficassem macios ao tato.
- 6 Lavar em solução tampão de sulfato de sódio 5% por 20 minutos;
- 7 Lavar em solução de Ringer Lactato por 20 minutos;
- 8 Conservação em álcool etílico 70% (**Figura 2**).

Figura 2 – Imagem fotográfica do aspecto final dos blocos de osso esponjoso bovino após descalcificação e processamento químico



Fonte: A autora.

Observar o aspecto claro dos blocos de osso esponjoso submersos no álcool 70% e a ausência de gotículas de gordura.

### 3.4 Pré-operatório

Após jejum hídrico e sólido de duas e quatro horas, respectivamente, os animais foram anestesiados com solução de cloridrato de cetamina (35,0 mg/kg, IM), cloridrato de xilazina (10,0 mg/kg, IM) e morfina (2,5 mg/kg, IM), além de anti-inflamatório cetoprofeno (3,0 mg/Kg, IM) e antibioticoterapia profilática com cefazolina sódica (30,0 mg/Kg, IM), 30 minutos antes do procedimento cirúrgico. Realizou-se também bloqueio do plexo braquial do membro esquerdo, com lidocaína 2%. A região da pele entre a articulação escápulo-umeral e do metacarpo foi tricotomizada, e submetida à antissepsia com álcool 70% seguida da aplicação de iodopovidine tópico.

### 3.5 Coleta e preparo do concentrado de plaquetas

A coleta de sangue para a obtenção do plasma rico em plaquetas foi realizada apenas nos animais do grupo III, e durante o procedimento cirúrgico da criação da falha óssea. Foi considerado apto ao experimento, o animal em que o número de plaquetas estava dentro do padrão estabelecido de  $250-650 \times 10^3/\mu\text{L}$ , (QUESENBERRY, 1994), avaliado no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia.

Após anestesia, tricotomia e antissepsia com álcool 70% da região torácica esquerda, foi efetuada uma punção intracardíaca para colheita de 9,0 mL de sangue de cada animal, com

uma agulha 21G (0,8 x 25 mm) (Agulha S-Monovette, Sarstedt Brasil, Santana do Parnaíba, São Paulo, Brasil) e três tubos para hemossedimentação de polipropileno (130 x 8,0mm) (Tubo ESR S-Sedivette Sarstedt Brasil, Santana do Parnaíba, São Paulo, Brasil) contendo 0,7mL de citrato de sódio 0,106 molar (**Figura 3**).

Figura 3 - Tubo de hemossedimentação a vácuo de 3,5 mL, com agulha de coleta específica, utilizado para coleta de sangue por punção intracardíaca

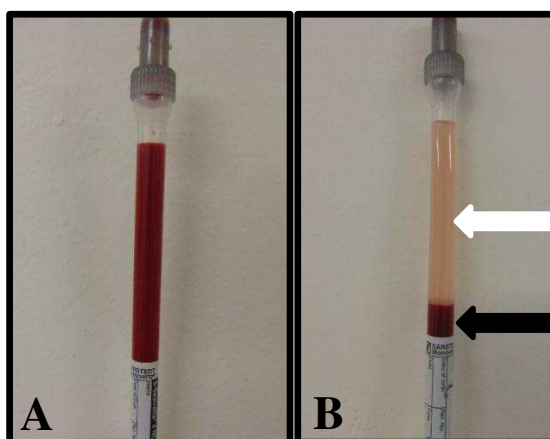


Fonte: A autora.

Tubo de hemossedimentação e agulha utilizados para punção intracardíaca de coelhos para realização de PRP.

Para preparo de 1,0 mL de PRP, foram utilizados três tubos da amostra (**Figura 4A**), submetidos à primeira centrifugação a 2.000 rotações por minuto (rpm), durante 20 minutos. Essa primeira centrifugação foi para separação dos componentes do sangue em: hemácias, que foram sedimentadas no fundo do tubo e zona intermediária bem diferenciada contendo leucócitos e plaquetas, além de sobrenadante contendo poucas plaquetas (**Figura 4B**).

Figura 4 - Tubo de hemossedimentação contendo 3,0 mL de sangue de coelhos da raça Nova Zelândia, antes e após centrifugação a 2.000 rpm por 20min

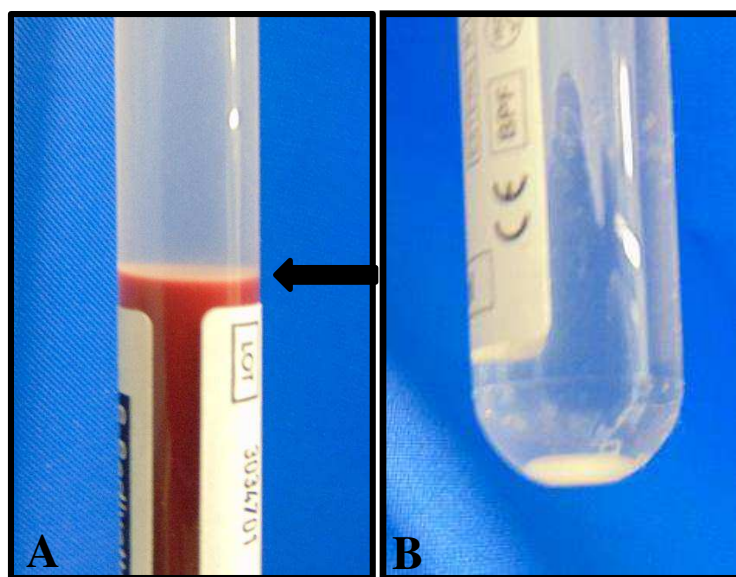


Fonte: A autora.

**A-** Observar o volume e homogeneização do plasma e soro sanguíneo, antes da primeira centrifugação. **B-** Tudo de hemossedimentação após primeira rotação a 2.000 rpm por de 20 min. Observar a separação de plama e soro sanguíneos. A seta branca mostra o sobrenadante pobre em plaquetas, e, a preta, a deposição das hemácias ao fundo do tubo.

Foi, então, desprezado de cada tubo 1,0 mL do sobrenadante e colhido de cada um dos tubos, com uma pipeta automática, o plasma sobrenadante restante, porém, sem que se coletasse a zona intermediária, rica em leucócitos (**Figura 5A**). Este material foi transferido para um único tubo, sem anticoagulante, com volume de 4,0 mL e dimensões de 12,7 mm x 75 mm e centrifugado pela segunda vez a 2000 rpm durante 10 minutos. O material restante (hemácias e faixa leucocitária) foi descartado. Após a segunda centrifugação desprezou-se 1,5 mL sobrenadante, restando então 1,0 mL de plasma com o botão plaquetário sedimentado ao fundo (**Figura 5B**). Este sobrenadante foi homogeneizado delicadamente para as plaquetas se distribuírem ao plasma.

Figura 5 - Tubos de hemossedimentação a vácuo contendo sangue de coelho da Raça Nova Zelândia, após processo de centrifugação e confecção de PRP



Fonte: A autora.

A- A seta preta identifica a zona intermediária com o cordão leucocitário (linha branca) e acima o plasma com as plaquetas, após processo de centrifugação a 2000 rpm, por 20 minutos. Em B, após a segunda centrifugação, a presença do botão plaquetário depositado no fundo do tubo.

Antes do encaminhamento das amostras para implantação no leito, foi realizada uma contagem automática de plaquetas em analisador hematológico veterinário pocH 100iVDiff, análise da morfologia ótica (DANTAS et al., 2010) através do método de Ress-Ecker. Finalmente, para promover a agregação plaquetária e transformar o estado líquido para gelatinoso, houve adição de 40  $\mu$ L cloreto de cálcio a 10% para cada 1,0 mL de PRP, e em seguida mantido por 30 segundos em banho-maria a 37,0 °C, conforme descrito por Nunes Filho et al. (2007).

Imediatamente após agregação, o gel de plaquetas foi misturado ao xenoenxerto já fragmentado e utilizado para preencher a falha óssea dos animais do grupo GIII (**Figura 6**).

Figura 6 – Associação do PRP, Cloreto de Cálcio a 10% e xenoenxerto trabecular granulado e desmineralizado



Fonte: A autora.

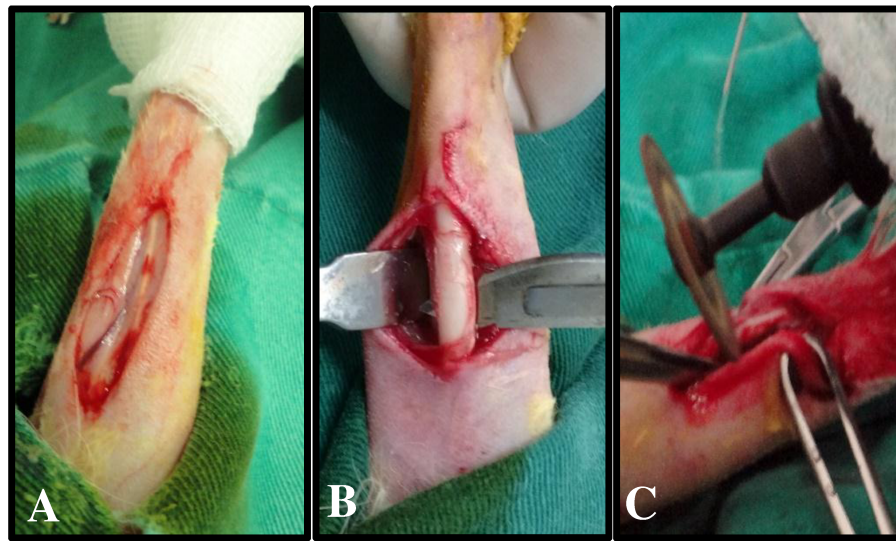
Xenoenxerto desmineralizado bovino associado a PRP, notar o formato em gel.

### 3.6 Procedimento cirúrgico

Todos os animais foram submetidos à criação da lesão óssea. Para realização do procedimento cirúrgico, os coelhos permaneceram em decúbito lateral esquerdo, e então foi realizada uma incisão de pele na região cranio medial, de aproximadamente 3,0 cm no terço médio do antebraço esquerdo (**Figura 7A**). O tecido subcutâneo e o músculo extensor radial do carpo foram identificados e afastados lateralmente, com afastador de Hohmann. Uma lâmina de bisturi nº 24 foi colocada entre o rádio e a ulna no ponto da secção, para evitar o contato do disco com a ulna (**Figura 7B**). Após exposição do terço médio da diáfise do rádio, removeu-se um segmento ósseo de 1,0 cm com auxílio de disco diamantado acoplado a perfuratriz elétrica, sobre constante irrigação com solução de Ringer Lactato (**Figura 7C**), que fora medido com um molde estéril de sonda uretral nº 06, elaborado com auxílio de uma régua metálica (**Figura 8**).



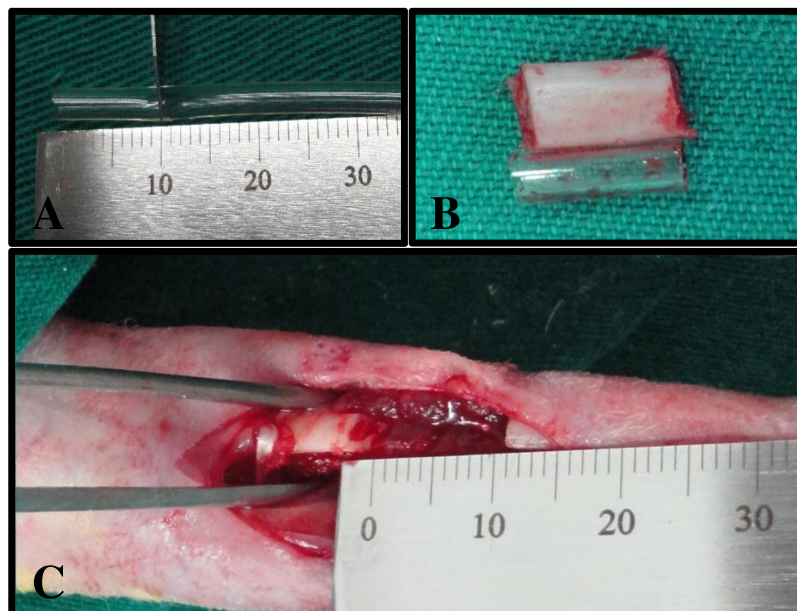
Figura 7 - Imagens fotográficas das principais etapas do procedimento cirúrgico experimental de criação de falha óssea de 01 cm no rádio de coelhos.



Fonte: A autora.

**A-** Incisão crânio medial do antebraço esquerdo de coelhos sobre a região diafisária do rádio. **B-** Afastamento do musculo extensor radial do carpo com afastador de Hohmann e isolamento da ulna do rádio com lâmina de bisturi nº 24. **C-** Osteotomia com auxílio de disco diamantado acoplado a perfuratriz elétrica.

Figura 8 - Imagens fotográficas da criação de molde para ostectomia parcial de rádio e remoção de fragmento de 01 cm do rádio de coelho



Fonte: A autora.

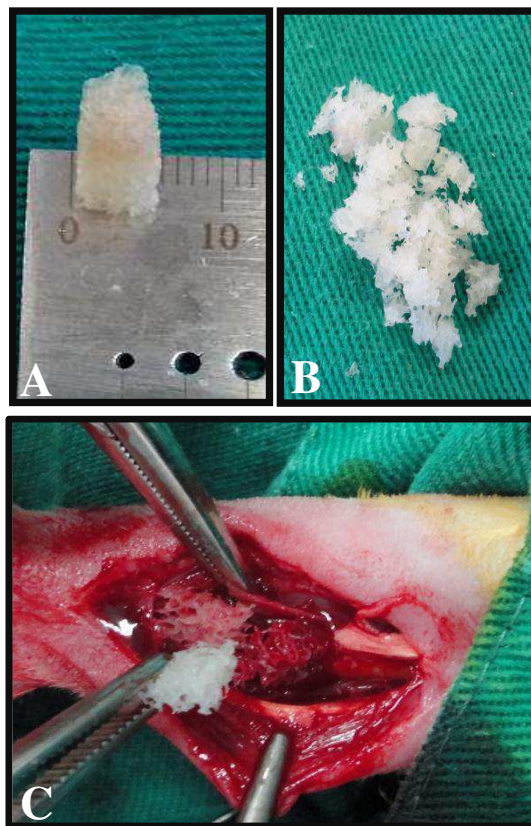
**A-** Corte de 01 cm de sonda uretral estéril nº 06 utilizada como molde para osteotomia. **B-** Fragmento de rádio ostectomizado. **C-** Falha óssea criada após remoção de um fragmento de 01 cm do rádio.



Nos animais do grupo controle (GI) houve apenas remoção do fragmento ósseo do rádio.

No GII, a lesão foi preenchida com xenoenxerto processado que fora retirado do álcool 70% e lavado na solução de Ringer Lactato por 30 trinta minutos. A quantidade de xenoenxerto foi a mesma pra todos os grupos, ou seja, três fragmentos de 0,5 x 0,8 mm; **(Figura 9 A e B)**, que foram fragmentados com o auxílio de uma goiva e colocado sobre a falha óssea **(Figura 9C)**.

Figura 9 - Imagem fotográfica do processo de preparação do xenoenxerto para enxertia



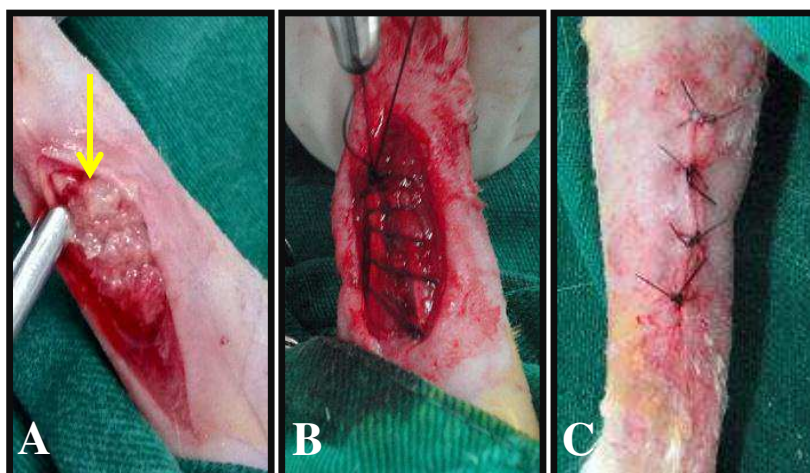
Fonte: A autora

**A-** Bloco de xenoenxerto bovino de aproximadamente 0,5 x 0,8 cm imediatamente antes de sua fragmentação. **B-** Aspecto do xenoenxerto bovino granulado, usado para preencher a falha óssea. **C-** Preenchimento da falha óssea com xenoenxerto trabecular bovino desmineralizado e processado quimicamente.

No GIII o xenoenxerto foi preparado de maneira semelhante ao grupo II, no entanto, associado ao gel de plasma rico em plaquetas autólogo **(Figura 10A)**.

Em todos os animais houve aproximação da musculatura com fio de poliglactina 910 nº 3-0 em ponto simples contínuo e a pele com náilon nº 3-0 em pontos simples separados **(Figura 10B e C)**.

Figura 10 – Implantação de xenoenxerto trabecular bovino desmineralizado associado a gel de PRP, e sutura da musculatura e pele do antebraço de coelho



Fonte: A autora.

**A-** Observar o gel de PRP associado ao xenoenxerto, depositado no leito receptor (seta amarela). **B-** Aproximação da musculatura com ponto simples contínuo com fio poliglactina 910, nº 3-0. **C-** Aspecto final do pós-operatório imediato, com sutura em náilon 3-0, pontos simples separados.

### 3.7 Pós-operatório

As feridas de pele foram higienizadas duas vezes ao dia com gazes embebidas em solução fisiológica a 0,9%, e posterior aplicação tópica de rifamicina por um período de sete dias. Para analgesia foi administrado morfina (2,5 mg/kg, SC), de oito em oito horas durante três dias, o cetoprofeno (3,0 mg/kg, SC), a cada 24 horas, por três dias e cefazolina sódica (30 mg/kg, IM), de 12 em 12 horas, durante sete dias.

### 3.8 Avaliação radiográfica

No período pós-operatório imediato, os animais dos três grupos tiveram seus antebraços esquerdos radiografados na incidência látero-medial, na voltagem de 48,0 kV, distância de 1,0 m e 0,16 segundos de exposição, sempre com o mesmo aparelho de raios X e filmes da marca Kodak MXG/Plus®. O exame radiográfico, com a mesma técnica, foi repetido com 30 e 60 dias de PO para todos os animais dos três grupos. Avaliou-se a neoformação óssea, presença de fissuras ou fraturas, a presença e nível de reabsorção do enxerto. As alterações macroscópicas foram detalhadas no Protocolo I (APÊNDICE A).

### **3.9 Eutanásia**

Após os períodos pré-estabelecidos de 30 e 60 dias de pós-operatório, os animais foram submetidos à eutanásia com aplicação de sobredose (50mg/Kg) de tiopental sódico a 2,5% de acordo com a resolução 1000 de 2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (2002).

### **3.10 Análise histológica**

Após a eutanásia, nos períodos pré-estabelecidos de PO, foram coletados o terço médio do rádio, correspondente a região da osteotomia, e armazenados em frascos individuais contendo formol a 10% por um período mínimo de 48 horas, à temperatura ambiente. Após esse acondicionamento os fragmentos foram lavados em água corrente e então a descalcificação foi realizada com ácido tricloroacético a 8% durante 30 dias, sendo efetuada a troca do fluido descalcificador a cada sete dias. A descalcificação foi completa quando os ossos obtiveram flexibilidade semelhante à borracha. Em seguida foram lavados com solução de sulfato de sódio 5%, durante 40 minutos, e finalmente, submetidos a água corrente por cinco minutos. O acondicionamento das amostras até a inclusão em parafina foi em álcool 70% por no mínimo 24 horas.

Foram confeccionada três lâminas para cada peça, com cortes longitudinais de cinco micrômetros de espessura, com 60 micrômetros entre si. Os cortes histológicos foram corados pela hematoxilina e eosina, e analisadas em microscópio Olympus BX 40<sup>®</sup> acoplado à câmera Olympus OLY-200<sup>®</sup>, ligada a um computador PC com placa digitalizadora Data Translation 3153<sup>®</sup>, onde as imagens foram analisadas para verificação das principais alterações histológicas.

Para avaliação histológica, foi seguido o protocolo II (APÊNDICE B), registrando-se as alterações observadas. Os achados foram analisados de forma semiquantitativa através de uma avaliação subjetiva, onde cada estrutura foi analisada sem que o examinador soubesse previamente qual material estava sendo analisado, utilizando-se os parâmetros reunidos no Quadro 1.

Quadro 1 – Parâmetros e legendas da análise histológica

Neoformação óssea	<b>Porcentagem - %</b>
Calcificação endocondral	<b>Presença</b>
Adipócito	Sim (S)
Xenoinxerto	Não (N)
Reabsorção do xenoinxerto	<b>Intensidade</b>
	Lenta (L)
	Avançada (A)
Tecido Conjuntivo	<b>Presença</b>
	Pouco (P)
	Muito (M)
Fibrina	<b>Quantidade</b>
Tecido de Granulação	Ausente (0)
Fibrose	Pouco (+)
Infiltrado mononuclear	Moderado (++)
Infiltrado polimorfonuclear	Elevado (+++)
Necrose	

Fonte: A autora.

### 3.11 Análise estatística

A base de dados, assim como a construção de tabelas, foi realizada através das planilhas eletrônicas do programa Microsoft Excel versão 2007. Na base de dados, cada amostra possuía as informações contidas no Apêndice C.

Os dados obtidos sobre neoformação óssea foram analisados em cada tempo por meio da análise de variância One Way. Já calcificação endocondral, adipócitos, reabsorção do xenoinxerto, tecido conjuntivo, fibrina, tecido de granulação, fibrose, infiltrado mononuclear, infiltrado polimorfonuclear e necrose sendo dados ordenativos foram analisados, em cada tempo (30 e 60 dias), por meio da análise de variância não paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância foi fixado em 5% ( $p < 0,05$ ) para rejeição de hipótese de nulidade. As médias foram comparadas pelo teste t Student. As análises e gráficos foram realizados com auxílio do programa BioStat 5.3 (AYRES et al., 2007).

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Observações trans e pós-operatórias**

O procedimento cirúrgico foi bem tolerado pelos animais, sendo o bloqueio dos nervos do plexo braquial com lidocaína efetivo, evitando administração adicional de quetamina e xilazina. Todos os animais apresentaram apoio do membro operado em todo o período pós-operatório, com ausência de fraturas.

### **4.2 Número de plaquetas, leucócitos e hemácias no pré-cirúrgico e após a preparação do plasma rico em plaquetas**

Foi possível obter no experimento, em 13 (81,25%) animais, o incremento plaquetário superior a 338%, como proposto por Marx et al. (1998) e obtido por Kim et al. (2002). Em 14 animais (87,5%), obteve-se número de plaquetas no PRP superior a  $500.000 \text{ mm}^{-3}$ , considerado por Obarrio et al. (2000) e Whitman, Berry e Green (1997) número ideal.

O número mínimo de incremento plaquetário foi 2,02, e o máximo 5,64, sendo considerado para Kim et al. (2012), um bom incremento plaquetário de apenas 1,5 vezes.

Em 13 (81,25%) animais, verificou-se ausência de leucócitos na contagem após processamento, e 16 (100%) animais apresentaram poucos leucócitos quando comparados à quantidade presente no sangue total (Tabelas 01 e 02).

Avaliando a presença de hemácias, 16 (100%) animais não tiveram presença de hemácias no PRP. A alta quantidade de plaquetas, associada à baixa presença de leucócitos e hemácias evidencia um processo de produção de PRP adequado.

Tabela 1 - Valores individuais do hemograma dos oito primeiros coelhos do grupo II, no período pré-operatório imediato e após a preparação do concentrado de plaquetas

	<b>WBC</b> <b>10<sup>3</sup>/μL</b>	<b>RBC</b> <b>10<sup>6</sup>/μL</b>	<b>HGB</b> <b>g/dl</b>	<b>PLT</b> <b>10<sup>3</sup>/μL</b>
<b>01 Pré op</b>	4,5	5,72	13,6	172
<b>01 PRP</b>	0,0	0,00	0,0	656
<b>02 Pré op</b>	7,4	4,44	10,3	255
<b>02 PRP</b>	0,6	0,00	0,0	781
<b>03 Pré op</b>	6,8	5,02	11,4	216
<b>03 PRP (*)</b>	0,0	0,00	0,0	556
<b>04 Pré op</b>	5,4	4,96	10,8	383
<b>04 PRP</b>	0,0	0,00	0,0	1149
<b>05 Pré op</b>	6,7	4,39	10,4	252
<b>05 PRP</b>	0,1	0,00	0,0	891
<b>06 Pré op</b>	6	5,52	13,2	308
<b>06 PRP (**)</b>	0,7	0,00	0,1	1417
<b>07 Pré op</b>	6,7	4,73	10,4	365
<b>07 PRP</b>	0,1	0,00	0,0	1631
<b>08 Pré op</b>	4,6	4,13	9,6	229
<b>08 PRP (*)</b>	0,4	0,00	0,0	464

Fonte: A autora.

Tabela com valores dos hemogramas, leucogramas e contagem de plaquetas dos coelhos do grupo com 30 dias, antes (**Pré op**) e depois (**PRP**) do preparo do PRP. Notar em destaque (\*) os processos em que se obteve incremento plaquetário abaixo de 338%. Em destaque (\*\*), o preparo que não obteve eliminação total de leucócitos.

Tabela 2 - Valores individuais do hemograma dos oito últimos coelhos do grupo II, no período pré-operatório imediato e após a preparação do concentrado de plaquetas

	<b>WBC</b> <b>10<sup>3</sup>/μL</b>	<b>RBC</b> <b>10<sup>6</sup>/μL</b>	<b>HGB</b> <b>g/dL</b>	<b>PLT</b> <b>10<sup>3</sup>/μL</b>
<b>09 Pré op</b>	4,3	5,3	12,5	289
<b>09 PRP</b>	0,3	0,00	0,0	1063
<b>10 Pré op</b>	6,7	4,42	9,9	125
<b>10 PRP</b>	0,9	0,00	0,0	527
<b>11 Pré op</b>	3,7	4,96	11,7	186
<b>11 PRP (*)</b>	0,0	0,00	0,0	522
<b>12 Pré op</b>	10,1	5,37	11,4	275
<b>12 PRP (**)</b>	1,5	0,01	0,0	891
<b>13 Pré op</b>	4,1	4,52	10,5	312
<b>13 PRP (**)</b>	2,0	0,00	0,0	1061
<b>14 Pré op</b>	4	5,68	13,1	254
<b>14 PRP</b>	0,2	0,00	0,0	1292
<b>15 Pré op</b>	6,5	5,77	13,7	181
<b>15 PRP</b>	0,4	0,00	0,0	1021
<b>16 Pré op</b>	5,8	5,26	12,7	365
<b>16 PRP</b>	0,1	0,00	0,0	1003

Fonte: A autora.

Tabela com valores dos hemogramas, leucogramas e contagem de plaquetas dos coelhos do grupo com 60 dias, antes (**Pré op**) e depois (**PRP**) do preparo do PRP. Notar em destaque (\*) o processo em que se obteve incremento plaquetário abaixo de 338%. %. Em destaque (\*\*), o preparo que não obteve eliminação total de leucócitos.

### 4.3 Avaliação radiográfica

As análises radiográficas realizadas na região da ostectomia foram diferentes, considerando os respectivos tempos pós-operatórios e grupos de tratamento.

No grupo controle, após 30 dias de procedimento, pôde-se verificar que as falhas ósseas apresentaram-se quase todas radioluscentes, com mínima presença de material radiopaco, originando-se das extremidades proximal e distal (**Figura 11A**).

Já 50% (quatro) dos coelhos do grupo com implantação do xenoenxerto, após 30 dias de procedimento, apresentaram a região ostectomizada com discretas áreas radiopacas oriundas das extremidades (**Figuras 11B**). Dois animais (25%) apresentaram a área ostectomizada totalmente preenchida por material radiopaco (**Figura 12**) e os outros 25% (dois) apresentaram preenchimento parcial com material radiopaco de forma homogênea e regular, oriundos do coto proximal e distal.

A avaliação da associação do xenoenxerto com PRP, após 30 dias de cirurgia, evidenciou, de maneira unânime, que as áreas ostectomizadas apresentaram quase todas radioluscentes, com nenhuma ou discreta presença de material radiopaco originando-se das extremidades proximal e distal (**Figura 11C**).

Figura 11 – Imagens radiográficas do membro anterior esquerdo de coelhos, na projeção mediolateral, após 30 dias da ostectomia do rádio, dos grupos I, II e III respectivamente



Fonte: A autora.

**A**– Grupo controle. Notar discreta presença de material radiopaco nas extremidades dos cotos. **B**- Grupo II (xenoenxerto) Notar presença de discretas áreas radiopacas oriundas das extremidades. **C**- Grupo III (associação de xenoenxerto e PRP na falha óssea). Notar a ausência de material radiopaco na falha óssea.



Figura 12 – Imagem radiográfica na projeção mediolateral, representando o antebraço esquerdo dos dois coelhos do grupo II, após 30 dias da ostectomia do rádio.



Fonte: A autora.

Notar presença de tecido radiopaco preenchendo toda a falha óssea.

As avaliações dos animais com 60 dias de pós-operatório também apresentaram diferenças nítidas, conforme descrição abaixo. No grupo controle, pôde-se verificar que as áreas ostectomizadas apresentaram-se parcialmente preenchidas por material radiopaco mais homogêneo e regular, originando-se das extremidades proximal e distal dos cotos (**Figura 13A**).

Já no grupo com implantação do xenoenxerto, 75% (seis) dos animais a área ostectomizada apresentou, em quase toda a sua extensão, aspecto radiopaco com discreta área radioluscente (**Figura 13B**).

A avaliação da associação do xenoenxerto com PRP evidenciou que a área ostectomizada apresentou, em quase toda sua extensão, áreas radioluscentes com discreta presença de material radiopaco homogêneo originando-se das extremidades proximal e distal (**Figura 13C**).

Figura 13 - Imagens radiográficas do antebraço esquerdo de coelhos, na projeção mediolateral, após 60 dias da ostectomia do rádio, dos grupos I, II e III respectivamente



Fonte: A autora.

**A-** Grupo controle. Notar presença de material radiopaco homogêneo, oriundo das extremidades dos cotos proximal e distal. **B-** Grupo II (xenoenxerto). Notar presença de tecido radiopaco preenchendo quase toda área ostectomizada. **C-** Grupo III. Notar discreta presença de material radiopaco no interior da falha óssea.

#### 4.4 Avaliação histológica

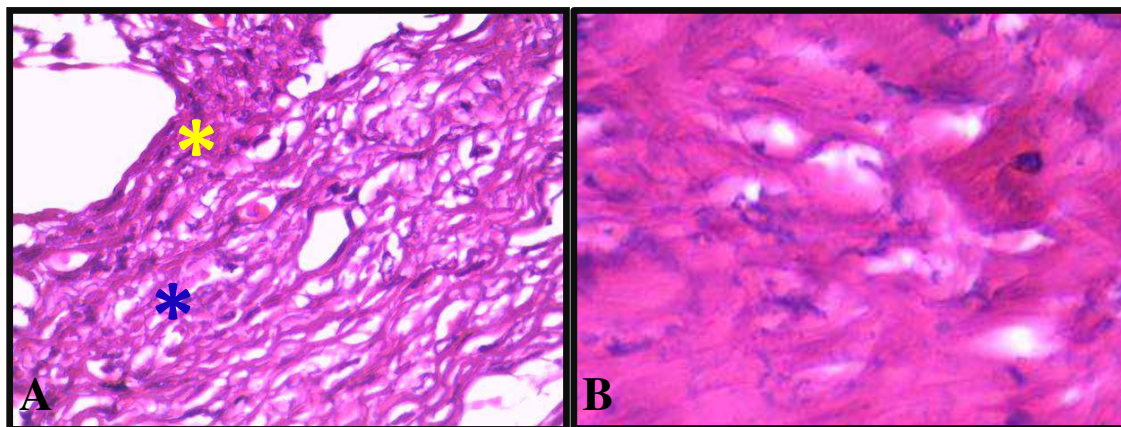
A análise microscópica do tecido foi determinada em função das alterações inflamatórias (presença de infiltrados mononucleares e polimorfonucleares) e dos processos reparatórios (presença de fibrose, tecido conjuntivo), porcentagem de neoformação óssea e nível de absorção do xenoenxerto.

No GI, aos 30 dias, observou-se uma média de 15% de neoformação óssea, proveniente dos cotos do rádio, e nenhum animal apresentou preenchimento completo da falha óssea. Três (37,5%) animais apresentaram calcificação endocondral e nenhum (100%) apresentou adipócitos, necrose tecidual e polimorfonucleares. Oito (100%) animais apresentaram pouco (+) infiltrado mononuclear e seis (75%) mostraram muita presença de tecido conjuntivo preenchendo a falha óssea. (**Figura 14A**).

No GI, aos 60 dias, observou-se uma média de 27,5% de neoformação óssea, proveniente dos cotos do rádio, e nenhum animal apresentou preenchimento completo da falha óssea. Um (12,5%) animal apresentou calcificação endocondral e três (37,5%) apresentaram adipócitos. Nenhum apresentou necrose tecidual e polimorfonucleares. Quatro (50%) animais apresentaram pouco (+) infiltrado mononuclear e seis (75%) apresentaram

muita presença de tecido conjuntivo preenchendo a falha óssea. Cinco (62,5%) apresentaram áreas de ossificação intramembranosa (**Figura 14B**).

Figura 14 - Fotomicrografias do processo de reparação óssea de rádio de coelhos



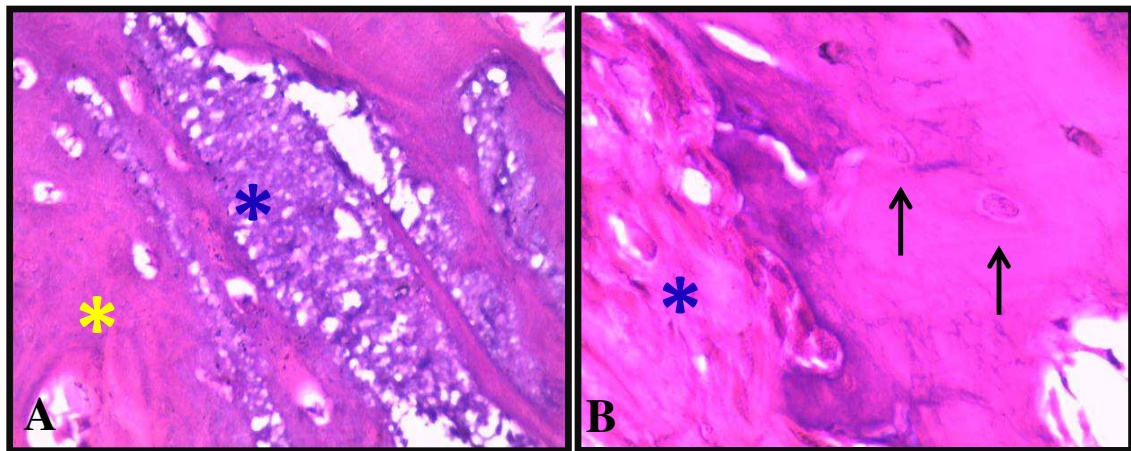
Fonte: A autora.

A (GI 30 dias) - Tecido conjuntivo no interior da falha óssea (**destaque azul**) e infiltrado mononuclear (**destaque amarelo**). B (GI 60 dias) - Processo de ossificação intramembranosa. Coloração HE.

No GII, aos 30 dias, observou-se uma média de 34,37% de neoformação óssea, proveniente dos cotos do rádio e no centro da lesão, e nenhum animal apresentou preenchimento completo da falha óssea. Um (12,5%) animal apresentou calcificação endocondral e nenhum (100%) apresentou necrose tecidual e polimorfonucleares. Em um (12,5%) animal foi verificado presença de adipócitos e quatro (50%) animais apresentaram muito infiltrado mononuclear e cinco (50%) apresentaram muita presença de tecido conjuntivo preenchendo a falha óssea, em volta dos fragmentos de xenoenxerto em processo inicial de reabsorção. Fibrose foi verificada em grande quantidade em seis (75%) animais (**Figura 15A**).

No GII, aos 60 dias, observou-se uma média de 35,62% de neoformação óssea, proveniente dos cotos do rádio e no centro da lesão, e nenhum animal apresentou preenchimento completo da falha óssea. Um (12,5%) animal apresentou calcificação endocondral e nenhum (100%) apresentou necrose tecidual e polimorfonucleares. Em um (12,5%) animal foi verificado presença de adipócitos e sete (87,5%) animais apresentaram pouco infiltrado mononuclear e muita presença de tecido conjuntivo preenchendo em torno do tecido ósseo neoformado. Fibrose foi verificada em grande quantidade em seis (75%) animais e em todos havia processo de reabsorção avançada dos xenoenxertos (**Figura 15B**).

Figura 15 - Fotomicrografias do processo de reparação óssea de rádio de coelhos com associação de xenoenxerto

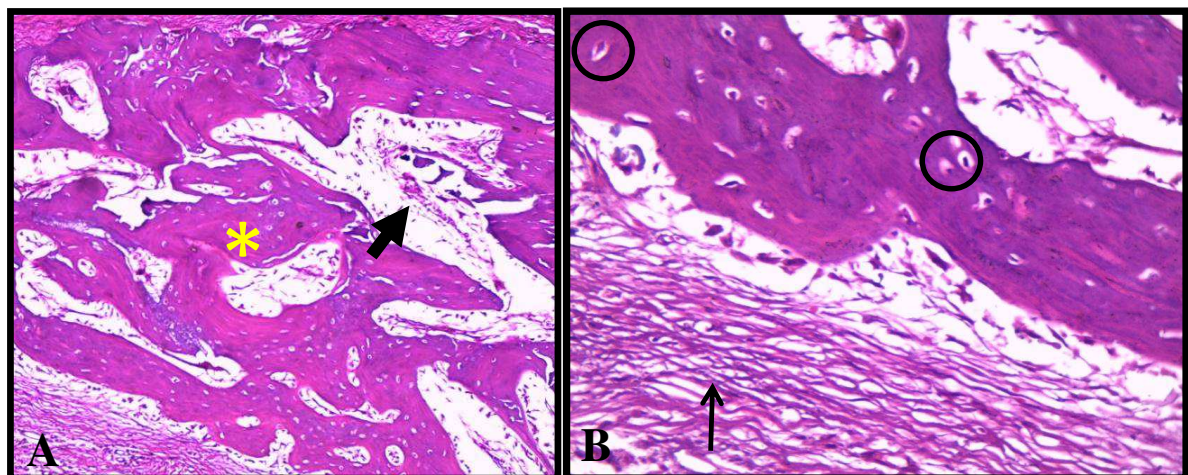


Fonte: A autora.

**A** (GII 30 dias) - Xenoenxerto em processo de reabsorção (**destaque azul**) e de tecido ósseo neoformado em sua volta (**destaque amarelo**). **B** (GII 60 dias) - Tecido ósseo neoformado, com presença de trabéculas ósseas (**seta preta**) e tecido conjuntivo preenchendo o restante da falha óssea (**destaque azul**).

Em especial no GII houve intensa neovascularização e aos 30 dias já se evidenciavam condrócitos e formação de perióstio (**Figura 16**).

Figura 16 - Fotomicrografias do processo de reparação óssea de rádio de coelhos com associação de xenoenxerto



Fonte: A autora.

**A** – (GII 30) Formação de tecido ósseo (**amarelo**) com presença de condrócitos, e neovascularização evidente (**seta preta**), objetiva 4x. **B** – (GII 30) Notar presença de condrócitos (círculos) e possível formação do perióstio, caracterizado camada de tecido conjuntivo denso modelado com muitas fibras colágenas (**seta**). Coloração HE.

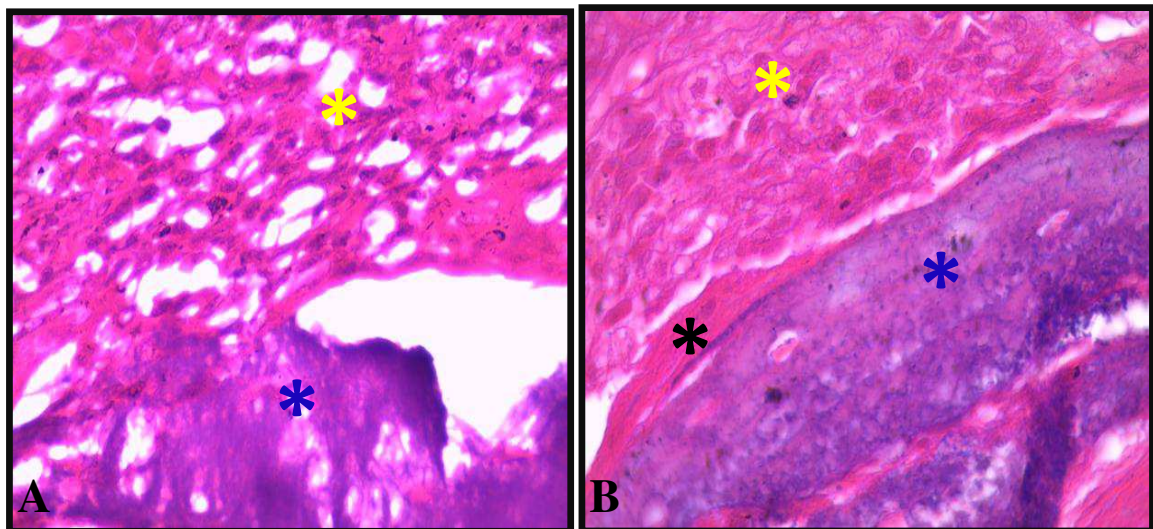
No GIII, aos 30 dias, observou-se uma média de 11,25% de neoformação óssea, proveniente dos cotos do rádio, e nenhum animal apresentou preenchimento completo da



falha óssea. Um (12,5%) animal apresentou calcificação endocondral e nenhum apresentou necrose tecidual, adipócitos e polimorfonucleares. Sete (87,5%) animais apresentaram muito infiltrado mononuclear e quatro (50%) apresentaram pouca presença de tecido conjuntivo preenchendo a falha óssea, em volta dos fragmentos de xenoenxerto em processo reabsorção. Fibrose foi verificada em grande quantidade em três (37,5%) animais (**Figura 17A**).

No GIII, aos 60 dias, observou-se uma média de 21,8% de neoformação óssea, proveniente dos cotos do rádio e em pequena parte em volta do xenoenxerto, e nenhum animal apresentou preenchimento completo da falha óssea. Um (12,5%) animal apresentou calcificação endocondral e nenhum (100%) apresentou necrose tecidual e polimorfonucleares. Em dois (25%) animais foi verificado presença de adipócitos e seis (75%) animais apresentaram muito infiltrado mononuclear e muita presença de tecido conjuntivo em volta de xenoenxerto (**Figura 17B**).

Figura 17 - Fotomicrografias do processo de reparação óssea de rádio de coelhos com associação de xenoenxerto e PRP



Fonte: A autora

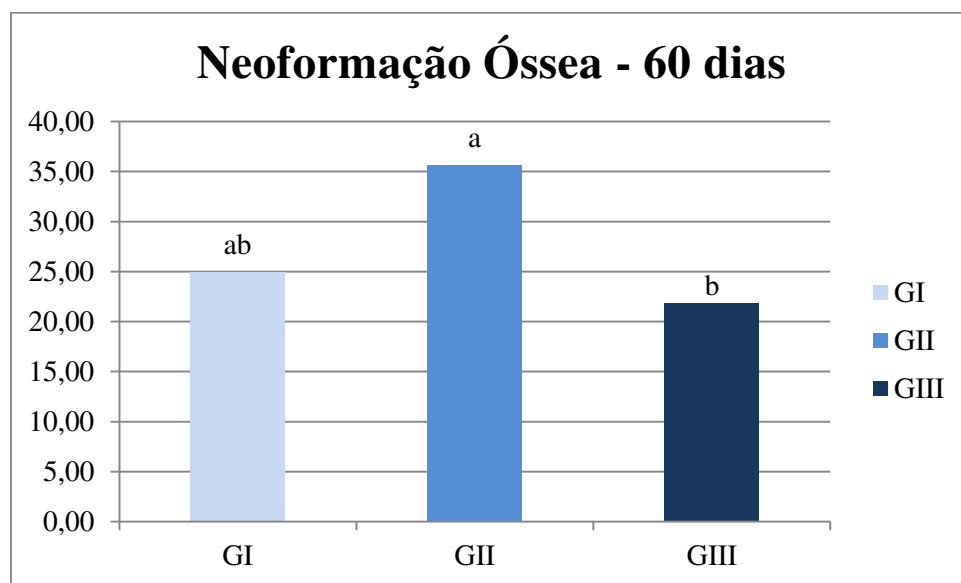
A (GIII 30 dias) - Presença de xenoenxerto em processo de reabsorção lenta (**destaque azul**), envolto por tecido conjuntivo com infiltrado mononuclear (**destaque amarelo**). B (GIII 60 dias) - Em **azul** presença de grande quantidade de xenoenxerto, presença de pequena trabécula óssea neoformada (**destaque preto**) e grande infiltrado mononuclear (**destaque amarelo**). Aumento na objetiva de 100x, com coloração HE.

#### 4.5 Avaliação estatística

##### Neoformação óssea:

A análise aos 30 dias de neoformação óssea não demonstrou diferença entre os grupos estudados ( $p=0,14$ ), enquanto para avaliação aos 60 dias houve diferença significativa entre os grupos GII e GIII ( $p=0,017$ ), onde GII se apresentou maior (**Figuras 18 e 19**).

Figura 18 – Comparação da porcentagem de neoformação óssea das falhas nos rádios de coelhos



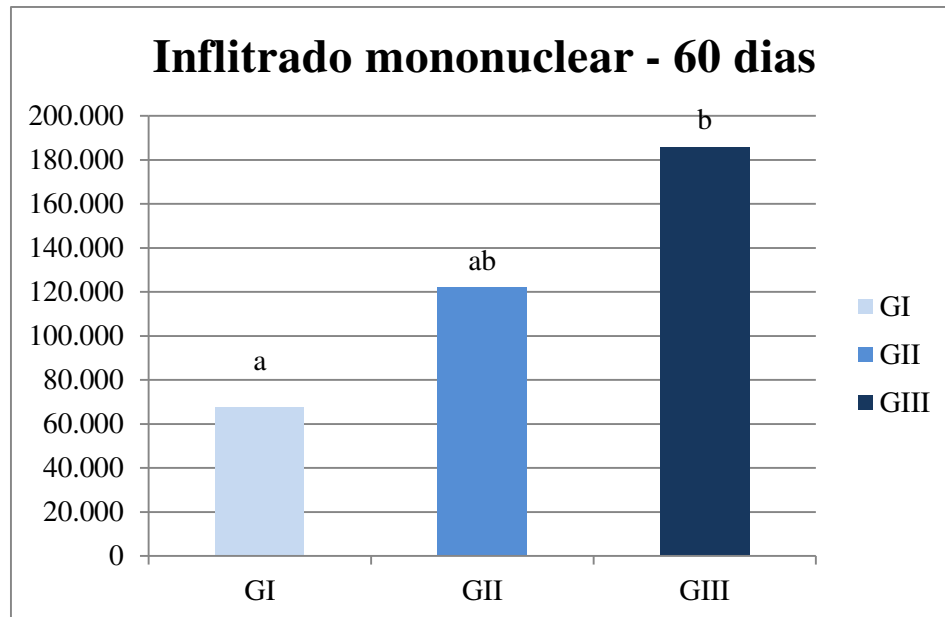
Fonte: A autora.

Valores médios da porcentagem de neoformação óssea para todos os grupos. Letras minúsculas diferentes representam valores significativamente diferentes ( $p<0,05$ ) entre os grupos.

##### Infiltrado mononuclear:

A análise aos 30 dias não demonstrou diferença entre os grupos estudados ( $p=0,0751$ ), enquanto para avaliação aos 60 dias houve diferença significativa entre os grupos GI e GIII ( $p=0,0008$ ), sendo o GIII com presença de maior infiltrado mononuclear, conforme apresentado na figura 20.

Figura 19 - Comparação de infiltrado mononuclear nas falhas nos rádios de coelhos



Fonte: A autora.

Valores médios de ranqueamento de infiltrado mononuclear para todos os grupos. Letras minúsculas diferentes representam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre os grupos.

Os demais parâmetros avaliados não apresentaram diferença estatística.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Modelo animal

O coelho (*Oryctolagus cuniculus*) foi o modelo animal escolhido para este experimento, por ser uma das espécies mais utilizadas em pesquisas que envolvem a fisiopatologia óssea frente a diversos tratamentos e pela facilidade de manejo, pequeno porte, baixo custo e principalmente pelo fato de que quando comparados a outras espécies, a sua fase de remodelação óssea é mais rápida (LACRETA JUNIOR, 2010).

A opção de trabalhar com coelhos machos foi para evitar interferências hormonais que, por ventura, pudessem ocorrer em fêmeas nas fases de estro e pro-estro.

A escolha do número de animais envolvidos baseou-se em princípios bioéticos, e de comparação com pesquisas semelhantes, utilizando o mínimo de coelhos para validação dos dados (LEOPIZZI et al., 1998).

### 5.2 Protocolo cirúrgico e anestésico

O protocolo anestésico utilizado foi de fácil administração, seguro e eficiente por manter os animais anestesiados e com respiração espontânea. A associação de cetamina e xilazina associado ao bloqueio do plexo braquial promoveu relaxamento muscular adequado para realização dos procedimentos cirúrgicos e analgesia no trans e pós-operatório imediato, além de evitar uma sobrecarga anestésica, evitando doses suplementares dos fármacos utilizados e o uso de anestesia geral inalatória, sugerido por Lacreta Junior et al. (2010) ao realizarem grandes falhas ósseas no rádio de coelhos.

Apenas um animal do grupo III veio a óbito no trans cirúrgico. Acredita-se que a coleta de sangue intracardiaca associado à aplicação de  $\alpha$ -2 agonista (xilazina) pode ter promovido uma falência cardíaca, visto que este grupo farmacológico promove ação depressora do miocárdio.

A técnica cirúrgica proporcionou fácil acesso ao osso rádio, bem como a realização da ostectomia. Foi necessário um cuidado para não realizar incisão em tendões e tecido mole adjacente que pudessem comprometer o apoio do animal no pós-operatório. O tempo cirúrgico a partir da incisão de pele e seu fechamento não excedeu 20 minutos.

De acordo com Hulse e Hyman (2007), é fundamental a preservação dos tecidos próximos ao foco de fratura ou defeito ósseo, uma vez que o suprimento inicial de nutrientes



provém deles. Sendo assim, a preservação da veia cefálica, bem como ausência de incisão na musculatura em volta da área ostectomizada foi fundamental para suprimento vascular inicial.

Pela docilidade dos animais, foi possível acompanhar e administrar os fármacos no pós-operatório e observar que a administração de anti-inflamatório não esteroidal Cetoprofeno e do opioide Morfina foi importante para a recuperação rápida dos animais, promovendo analgesia adequada.

### **5.3 Processamento químico**

O processamento de desengorduramento do xenoenxerto com ácido clorídrico e todo o processo químico promoveu a perda dos elementos celulares e enzimáticos do enxerto, deixando um arcabouço proteico com colágeno tipo I e de fatores de crescimento, como a proteína morfogenética óssea, por isso deve ter atuado apenas como elemento osteocondutor (VOLPON 2007). Possivelmente a medula óssea do rádio receptor, juntamente com a vascularização em volta, agiram favorecendo a osteogênese nos grupos GII (SANADA , 2003 e CALASANS-MAIA et al., 2009). Além do que a desmineralização expõe as proteínas indutoras (prot. morfogenéticas do osso) presentes na matriz orgânica do tecido ósseo (SASKA, 2008).

### **5.4 Achados radiográficos**

Conforme citado por Volpon e Costa (2000), o osso desmineralizado é praticamente radiotransparente, sendo pouco visível nas radiografias. Nosso resultado corrobora com a literatura, afirmando a eficiência do processo de descalcificação dos xenoenxertos, pois em todas as radiografias de pós-operatório dos grupos GII e GIII o local da falha óssea estava radioluscente.

Fernandez e colaboradores (1989), em seu trabalho com enxerto ósseo homólogo em falhas ósseas de 02 cm em rádio de coelhos, observaram que no grupo controle houve neoformação óssea apenas em um animal, quando avaliados com 56 dias, sendo a falha preenchida com tecido conjuntivo no restante dos animais. Em nosso experimento, apesar de trabalhar com defeito de 01 cm, também não houve fechamento da falha óssea aos 60 dias de pós-operatório nos animais do grupo controle. Possivelmente, pode ser explicado pelo expressivo tamanho da falha, apesar da rápida resposta de neoformação óssea dessa espécie, indicando que o tempo não é suficiente para total consolidação.

Outro fator importante é a estabilidade do local implantado, no caso de fraturas estáveis, há um aumento da sobrevivência de células dos enxertos (SANTOS; RAHAL, 2004). Neste trabalho, apesar de não se tratar de fratura, e sim defeito ósseo significativo, pode-se afirmar que houve estabilidade no membro avaliado, visto que as imagens radiográficas de pós-operatório imediato demonstram que as ulnas se mantiveram intactas, sem fraturas ou fissura, e são elas as responsáveis pela firmeza do membro anterior nessa espécie. Também podemos afirmar devido ao acompanhamento no pós-operatório, em que os animais apoiaram os membros sem resistência e não houve fratura espontânea até a eutanásia dos coelhos.

Os animais do grupo III, ao serem submetidos à análise histológica, apresentaram na região de osteoectomia presença do xenoenxerto em fase de reabsorção, ausência de tecido trabecular ósseo e intensa invasão de tecido conjuntivo, o que condiz com os achados radiográficos em todos os períodos analisados.

Avaliando a imagem radiográfica do GIII, a área ostectomizada apresenta-se quase toda radioluscente com discreta presença de material radiopaco, originando-se das extremidades proximal e distal, em todos os animais do experimento.

## **5.5 Achados histológicos**

Através da análise histológica foi possível verificar que o xenoenxerto administrado de forma isolada promoveu uma resposta satisfatória.

Buchardt (1983), em seu trabalho sobre a biologia da reparação do enxerto ósseo, afirma que enxertos esponjosos são revascularizados mais rápida e completamente do que enxertos corticais. Neste experimento observamos a intensa neovascularização nos animais submetidos à administração do xenoenxerto esponjoso, fato observado já no período de 30 dias. Saska et al. (2009), em seu trabalho com implantação de xenoenxerto bovino em osso parietal de coelhos, também verificou essa revascularização. Tal explicação pode ser devido à capacidade de osteocondução do enxerto, onde há suporte para crescimento tecidual e crescimento de microcirculação (SALBEGO, 2010).

Em todos os períodos avaliados, com a presença de xenoenxerto, a neoformação óssea originou-se da borda do osso basofílico desvitalizado e se estendeu sobre a superfície do biomaterial, juntamente com evidências de reabsorção, dados também verificados por Calasans-Maia et al. (2009). O xenoenxerto adquire uma coloração arroxeada, pois sofre

alterações químicas que o torna mais ácido, pelo processo de descalcificação com o ácido tricloracético. Ou seja, ele retém mais hematoxilina, característica denominada de basofilia.

De acordo com Saska et al. (2009), a reabsorção do xenoenxerto pode ser ocasionada pela instabilidade do mesmo em seu leito depositado, entretanto, o enxerto deve ser aplicado sem compressão dentro do local recipiente e mantido pela pressão dos tecidos moles circundantes (SANTOS; RAHAL, 2004). Portanto, é de fundamental importância a fixação do enxerto no seu local implantado. Neste experimento, por se tratar de xenoenxerto fragmentado, acredita-se que houve pequena mobilidade dos grânulos do xenoenxerto, porém, a sutura da musculatura fixou de maneira favorável partículas com o leito receptor. Também, de acordo com Millis e Martinez, (2007), outra causa de reabsorção é a presença de osteomileite no foco de implante, entretanto, é necessário que o ferimento esteja livre de infecção. A mínima incidência de infiltrado polimorfonuclear em todas as análises demonstra o efetivo cuidado antisséptico no pré e pós-operatórios.

Já para Buchardt (1983), a rejeição de um enxerto ósseo é histologicamente expressa pela ruptura dos vasos, um processo inflamatório, incluindo linfócitos, encapsulamento fibroso e reabsorção periférica do xenoenxerto, fraturas não consolidadas no pós-operatório, e fraturas de fadiga. A análise histológica evidenciou um processo de reabsorção não apenas periférica, e também não houve encapsulamento do xenoenxerto em nenhuma lâmina avaliada. Juntamente com a informação de ausência de fraturas de fadiga até aos 60 dias de avaliação pós-operatória, concluímos não haver rejeição do enxerto transplantado.

De acordo com Stevenson (1999), Bauer e Muschler (2000), a incorporação do aloxenoenxerto espolioso no local receptor, envolve vários estágios distintos, sendo que a formação de osteoide e reabsorção osteoclástica ocorrem simultaneamente sobre a superfície das trabéculas ósseas do xenoenxerto. Tanto no GII quanto GIII, verificamos tal acontecimento, visto que havia neoformação óssea e simultaneamente processo de reabsorção nos pequenos fragmentos de xenoenxerto. Possivelmente a granulação favoreceu essa ação, pois os fragmentos possuem grande número de poros interconectados que permitem a proliferação celular e vascular e formação de tecido de granulação em seu interior (CALASANS-MAIA et al., 2009).

Por fim, por ação de citocinas, nomeadamente a IL-1 e IL- 2, e de vários fatores de crescimento [ex. TGF- $\beta$ , BMPs, fatores de crescimento tipo insulina (IGF)- I e IGF-II, fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF)], ocorre a diferenciação das células mesenquimatosas multipotenciais (MSCs) na linha osteoblástica com formação de osteoide e matriz extracelular óssea, sendo que a maturação e remodelação óssea constituem as últimas

fases deste processo, de forma idêntica à biologia da formação do calo ósseo após fratura (ANDERSON, 2001). Em nenhum animal presenciamos a formação de tecido ósseo idêntico ao tecido biológico, verificando a transição do tecido ósseo do rádio remanescente. Como também não foi verificada no grupo controle, acredita-se que o defeito ósseo foi muito grande perante o tempo de avaliação, o mesmo avaliado por Fernandez et al. (1989) , avaliando 56 dias de pós operatório com falha de 02 cm no rádio de coelhos.

Além da fixação do enxerto no local implantando, de acordo com Santos e Rahal (2004), a quantidade de volume administrado é muito importante, pois com preenchimento excessivo de enxerto não há aumento osteogênico e um preenchimento parcial promove atraso. Desta forma, acreditamos que o volume de xenoenxerto administrado neste experimento, apenas o volume suficiente para preencher a falha óssea, foi necessário para obter o efeito osteogênico do osso transplantado.

Por outro lado, na análise histológica da associação do xenoenxerto ao PRP, houve um aumento expressivo de infiltrado mononuclear. Os macrófagos são células que participam da defesa imunológica contra infecções e tumores e na produção de citocinas, fatores de crescimento e angiogênese. Participam da imunidade inata, processam e apresentam antígenos, estimulando, desta forma, os linfócitos T. Já os linfócitos T e B, através de mediadores químicos e citocinas, migram para as regiões inflamadas exibindo uma relação de reciprocidade com os macrófagos na inflamação crônica (MOURÃO, 2013). Como no grupo de implantação de xenoenxerto isolado não houve aumento expressivo de mononucleares, acredita-se que sua presença na associação com PRP foi relacionada a um processo de inflamação, e não à rejeição do xenotransplante.

Outro aspecto importante foi a escolha do tamanho do enxerto, pois, de acordo com Weigel (1993), o tamanho da partícula óssea tem importância na vascularização e sobrevivência das células do enxerto. Existem evidências de que fragmentos menores que 0,7 mm não estimulam a osteogênese adequadamente e que podem induzir o granuloma por corpo estranho (FOX, 1984). Nesse experimento, os fragmentos foram granulados em superiores a 0,7mm e nenhum animal apresentou granuloma por corpo estranho, corroborando com a literatura. Mukai e Mukai (2016) também relatam efeito satisfatório da aplicação de xenoenxerto bovino granulado em seio maxilar humano. As partículas pequenas apresentam a capacidade de absorção mais fácil, dessa forma não competem com o tecido ósseo que está se formando (CAVENAGO, 2011).

Os animais do grupo III, ao serem submetidos a análise histológica, apresentaram na região de osteotomia presença do xenoenxerto em fase de reabsorção, ausência de tecido

trabecular ósseo e intensa invasão de tecido conjuntivo, o que condiz com os achados radiográficos em todos os períodos analisados. Estes achados se devem provavelmente a um desequilíbrio na liberação de metaloproteinases (MMP's) as quais foram responsáveis por reabsorção de tecido ósseo.

As MMPs, também chamadas de matrixinas, são uma família de enzimas que digerem proteínas da matriz extracelular e que apresentam funções importantes em diversos processos biológicos, como morfogênese, e em todos os estágios da cicatrização: reparação tecidual e remodelação em resposta à injúria, ou seja, são importantes na remodelação da ferida (ARAÚJO et al., 2011). Alguns organismos infecciosos também podem produzir proteinases, que são então classificadas como exógenas. Como exemplo, podemos citar as *Pseudomonas aeruginosas* que produzem duas MMPs: alcalino protease e elastase (OLLIVIER, 2004). Apresentam propriedades estruturais funcionais diferentes, porém todas exibem capacidade de degradar uma ou mais moléculas constituintes da matriz extracelular.

As MMPs são imprescindíveis em todos os estágios da cicatrização, e apresentam habilidade para sintetizar colágeno e outros membros da MEC. Agem em tecido cardíaco, sistema nervoso, pulmões e até mesmo no estroma corneal. Nas doenças, podem representar prejuízos no mecanismo regulatório primário da destruição tecidual, como artrite reumatoide ou deposição (ex. fibrose e cicatrização) (ARAÚJO et al., 2011). A sua expressão e atuação na córnea pode ser influenciada por fatores de crescimento de forma positiva ou negativa (GILGER et al., 2007), secretados pelas plaquetas (WANG; AVILA, 2007), e de acordo com Alio et al. (2007), elas se encontram em maior concentração no PRP. Nas doenças, podem representar prejuízos no mecanismo regulatório primário da destruição tecidual (ex. artrite reumatoide) ou deposição (ex. fibrose e cicatrização).

O uso de colírios de plasma rico e pobre em plaquetas influencia a expressão de metaloproteinases de matriz envolvidas no processo de reparação corneal, na maioria das vezes aumentando a sua expressão (KIM et al., 2012). Esse resultado corrobora com Quinderé et al. (2008), que cita que talvez a presença de substâncias como as metaloproteinases, liberadas pelo conteúdo inflamatório, possam interferir na deposição de colágeno tipo IV de acordo com a intensidade de conteúdo inflamatório no local. Hipótese que pode justificar a neoformação óssea insatisfatória, evidenciada pelo aumento de células mononucleares no grupo GIII, tanto com 30 e 60 dias de pós-operatório.

Na fase proliferativa da cicatrização, é essencial que ocorra um equilíbrio entre a ação e a inibição das MMPs, pois, como foi observado por Fujiwara et al. (2005), foi encontrado um aumento na produção de colágeno e MMPs em cultura de fibroblastos derivados de

queloides, quando comparada com a de fibroblastos de pele normal. Conjuntamente, as MMPs são capazes de degradar todas as proteínas da MEC, portanto, essas enzimas estão envolvidas em vários processos patológicos sistêmicos (FORTUNA et al., 2007), sendo possível a ação de degradação no xenoenxerto.

Oliveira (2005) avaliou comparativamente a neoformação óssea e o perfil de metaloproteinases durante o reparo de defeito crítico em crânio de ratos tratados com xenoenxerto desmineralizado. No grupo teste houve atraso no processo de reparo, ossificação incompleta e substituição das partículas do biomaterial por tecido conjuntivo fibroso, após 21 dias. Nos primeiros 14 dias após a cirurgia, o infiltrado inflamatório predominante era composto de células mononucleares e poucas células gigantes multinucleadas. A análise zimográfica demonstrou que a atividade MMP-2 e -9 foram significativamente maiores no grupo teste que no grupo controle. Embora não houve quantificação e isolamento das metaloproteinases neste experimento, acredita-se que seu aumento tenha sido expressivo.

Silva et al. (2007) também concluíram que a associação do PRP à hidroxiapatita não aumentou a velocidade de formação óssea e Sánchez et al. (2005) adicionaram PRP com xenoenxerto e não notaram diferença na densidade óssea em mandíbulas de cães.

Para serem ativadas, as MMPs requerem  $\text{Ca}^{2+}$  para sua ativação, sendo o tecido ósseo um local com bastante predominância deste íon, além da ativação do PRP com gluconato de cálcio, potencializando então sua expressão (OLLIVIER, 2004).

O protocolo de obtenção do PRP realizado conforme Andrade et al., (2016) obedeceu às técnicas assépticas, pois nenhum animal apresentou *caseum* e, através da microscopia, concluímos que também não apresentaram osteomielite, nem presença de infiltrado polimorfonuclear. É importante relatar a baixa de leucócitos presentes no PRP, pois eles podem interferir no processo de cicatrização tecidual (BOSWELL et al., 2012; WASTERLAIN et al., 2012). De acordo com Zandim et al. (2012), os neutrófilos também podem alterar o tecido onde o PRP foi implantado, pois expressam enzimas que liberam citocinas pró-inflamatórias que aumentam o catabolismo e diminuem a síntese de matriz celular. O mesmo se aplica aos heterófilos, presentes na constituição hematopoiéticas dos coelhos.

## 5.6 Obtenção do PRP

A técnica com a utilização dos tubos de hemossedimentação, descrita por Andrade et al. (2016), possibilitou, depois da primeira centrifugação, a formação de uma coluna alta de

sedimentação adequada à individualização das camadas de células formadas. Esta coluna alta permitiu a visualização e aspiração do plasma contendo plaquetas acima do anel leucocitário formado, bem como a exclusão dos leucócitos do processo de obtenção do PRP, obtendo uma concentração favorável de plaquetas e leucócitos.

A concentração de plaquetas foi ideal, de acordo com Whitman, Berry e Green (1997), pois 13 dos 16 animais apresentaram mais de 3x o número de plaquetas no concentrado, se comparado ao seu hemograma coletado no pré-operatório. Entretanto, Alio et al. (2012) referem boa resposta terapêutica com aumento na concentração de plaquetas de 1,6 a 2,5; assim como Kim et al. (2012), com incremento plaquetário de apenas 1,5 vezes. De acordo com Marx et al. (1998) e Whitman, Berry e Green (1997), para a realização ideal de PRP, o animal precisa ter de 500.000 a 1.000.000 plaquetas por microlitro; e após a confecção do agregado, a concentração plaquetária deve ser 338% superior ao número de plaquetas.

O decréscimo no número plaquetário foi relatado por GRAGEDA et al. (2005) no PRP de ovelhas e por WEIBRICH et al. (2002) em PRP humanos, obtidos em separadores específicos para PRP. Uma justificativa da redução no PRP poderia ser pela possibilidade de agregação plaquetária, já que as plaquetas agregadas podem não ser contadas (GRAGEDA et al., 2005).

Sugere-se um novo modelo experimental que avalie também os animais com 90 dias e que identifique e quantifique as metaloproteinases, se presentes.

## **6 CONCLUSÃO**

1. A descalcificação de osso esponjoso bovino com ácido clorídrico foi eficiente, não provocando reações de rejeição, mesmo se tratando de um xenotransplante.
2. A associação de PRP e xenoenxerto bovino, descalcificado, processado quimicamente e granulado impediu o crescimento de tecido ósseo em lesões ósseas em rádio de coelhos.
3. O xenoenxerto bovino administrado em lesões de rádio de coelhos promoveu uma neoformação óssea mais efetiva, se comparado ao grupo controle.



## REFERÊNCIAS

- ALIEVI, M. M; SCHOSSLER, J. E. W; GUIMARÃES, 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, n. 2, p. 450-457, 2007.
- ALIO, J. L.; ABAD, M.; ARTOLA, A.; RODRIGUEZ-PRATS, J. L.; PASTOR, S.; RUIZ-COLECHA, J. Use of autologous platelet-rich plasma in the treatment of dormant corneal ulcers. **Ophthalmology**, v. 114, n. 7, p. 1286-1293, 2007.
- ALIO, J.L.; ARNALICH-MONTIEL, F.; RODRIGUEZ, A.E. The role of “eye platelet rich plasma” (E-Prp) for wound healing in ophthalmology. **Curr. Pharm. Biotechnol.**, v. 13, p. 1257-1265, 2012.
- ANDERSON, J. M. Biological responses to materials. **Annu. Rev. Mater. Res.**, v. 31, p. 81-110, 2001.
- ANDRADE, M. G. M.; RODRIGUES, G. M.; LIMA, D. P.; FARIA, L. M.; SILVA, L. V. P.; SOUZA, R. R.; EURIDES, D. Utilização de plasma rico em plaquetas de coelhos com poucos leucócitos e hemácias para a consolidação de ossos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 68, n. 2, p. 276-282, 2016.
- ARAÚJO, R. V. S.; SILVA, F. O.; MELO JÚNIOR, M. R.; PORTO, A. L. F. Metaloproteínas: aspectos fisiopatológicos, sistêmicos e sua importância na cicatrização. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 10, n. 1, p. 82-88, 2011.
- AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. dos. **BioEstat 5.0**: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: MCT; IDSM; CNPq, 2007. 364 p.
- BARBOSA, A. L. T.; DEL CARLO, R. J.; GOMES, H. C.; OLIVEIRA, A. C. de; MONTEIRO, B. S.; DEL CARLO, B. N. Plasma rico em plaquetas para reparação de falhas ósseas em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 5, p. 1335-1340, agosto. 2008.
- BARCKMAN, J; BAAS, J; SØRENSEN, M; BECHTOLD, J. E; SØBALLE, K. Rinsing of allograft bone does not improve implant fixation: A study in 12 dogs. **ActaOrthopaedica**, v. 84, n. 3, p. 307-313, 2013.
- BARON, R.; CHAKRABORTY, M.; CHATTERJEE, D.; HORNE, W.; LOMRI, A.; RAVESLOOT, J. H. Biology of the osteoclast. In: MUNDY GR and MARTIN, T.J. **Physiology and Pharmacology of bone**. SpringerVerlag, New York, 1993.
- BAUER, T. W.; MUSCHLER, G. F. Bone graft materials. An overview of the basic science. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 371, p. 10-27, 2000.
- BIRNBAUM, K.; WIRTZ, D. C.; SIEBERT, C. H.; HELLER, K. D. Use of extracorporeal shock-wave therapy (ESWT) in the treatment of nonunions: a review of the literature. **Archives of Orthopaedics and Trauma Surgery**, v. 122, p. 324-330, 2002.

BOSWELL, S. G.; COLE, B. J.; SUNDMAN, E. A.; KARAS, V.; FORTIER, L. A. Current concepts with vídeo illustrations platelet-rich plasma: a milieu of bioactive factors. **Arthroscopy**, v.28, p.429-439, 2012.

BRANDÃO, G. H. F. **Estudo comparativo entre a eficácia clínica de enxertos ósseos (autógenos, alógenos, aloplásticos) com ou sem utilização de plasma rico em plaquetas**. 2005. Disponível em: <<http://www.medcenter.com>>. Acesso em: 28 jul 2015.

BRASHLAR, H.R. Diagnosis and prevention of nonunion. **The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume**, Boston, v.47, p.147-178, 1965.

BRIGHTON, C.T. The semi-invasive method of treating nonunion with direct current. **The Orthopedic Clinics of North America**, Philadelphia, v.15, n.1, p.33-45, 1984.

BRIGHTON, C.T., ADLER, S., BLACK, J., ITADA, N., FRIEDENBERG, Z.B. Cathodic oxygen consumption and electrically induced osteogenesis. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v.107, p.277-282, 1975.

BRIGHTON, C.T., BLACK, J., FRIEDENBERG, Z.B., ESTERHAI, J.L., DAY, L.J., CONNOLLY, J.F. A multicenter study of the treatment of nonunion with constant direct current. **The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume**. Boston, v.63, p.2-13, 1981

BRINKER, W. O; PIERMATTEI, D. L; FLO, G. L. Fraturas: classificação, diagnóstico e tratamento. In: BRINKER, W. O; PIERMATTEI, D. L; FLO, G. L. **Manual de ortopedia e tratamento das fraturas dos pequenos animais**. São Paulo: MANOLE, 1986. cap. 1, p. 2-40.

BURCHARDT, H. The biology of bone graft repair. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 174, p. 28-42, 1983.

BUSER, D.; MARTIN, W.; BELSER, U. C. Optimizing aesthetics for implant restorations in the anterior maxilla: anatomic and surgical considerations. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, v. 19, p. 43-61, 2004.

CALASANS-MAIA, M. D.; ASCOLI, F. O.; NOVELLINO, A. T. N. A.; ROSSI, A. M.; GRANJEIRO, J. M. Avaliação histológica comparativa de reparo ósseo em tíbia de coelho tratada com xenoenxertos. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 17, n. 6, p. 340-343, 2009.

CASTANIA, V. A.; VOLPON, J. B. Integração do enxerto ósseo corticoesponjoso homólogo, tratado quimicamente e esterilizado em óxido de etileno: estudo em cães. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 42, n. 6, p. 173-180, 2007.

CASTIGLIA, M. T, SILVA, J. V. F, THOMAZINI, J. A, VOLPON, J. B. Efeitos do processamento químico e da esterilização em óxido de etileno em osso cortical e esponjoso de ratas: estudo com microscopia de luz e eletrônica de varredura. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 44, n. 1, p. 32-39, 2009.

CAVENAGO, B.C. **Estudo do processo de reparo ósseo em função de quatro biomateriais. Avaliação microscópica em tíbias de coelhos.** 170f. Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas Aplicadas) Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2011.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. Resolução nº 714. **Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências.** Jun.2002. Disponível em: <[http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/resolucoes/resolucao\\_714.pdf](http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/resolucoes/resolucao_714.pdf)>. Acesso em 15 de março 2014.

DANTAS, T. A. C.; BARBOSA, I. R.; COSTA NETO, J. O. da; ARAÚJO, M. G. M.; MIRANDA, R. G. C. de; MEDEIROS, T. M. D. de. Estudo comparativo entre métodos de contagem de plaquetas. **NewsLab**, São Paulo, v.98 n.1, p.88-95, 2010.

Den BOER, F. C.; WIPPERMANN, B. W.; BLOKHUIS, T. J.; PATKA, P.; BAKKER, F. C.; HAARMAN, H. J. Healing of segmental bone defect with granular porous hydroxyapatite augmented with recombinant human osteogenic protein – 1 or autologous bone marrow. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 21, p. 521-528, 2003.

DeVRIES, W.J.; RUNYON, C. L.; MARTINEZ, S. A.; IRELAND, W. P. Effect of volume variations on osteogenic capabilities of autogenous cancellous bone graft in dogs. **Am J Vet Res**, Schaumburg, v. 57, n. 10, p. 1501-1505, 1996.

DONATTI, C.; BRANDÃO, C. V. S.; RANZANI, J. J. T.; PERCHES, C. S.; PADOVANI, C. R.; PELLIZZON, C. H.; SERENO, M. G. Uso do plasma rico em plaquetas no reparo de úlceras de córnea profundas induzidas em coelhos. Avaliação clínica e histomorfométrica. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 65, n.3, p.809-818, jun. 2013.

EGGER, E.L. Fixação esquelética externa. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais.** São Paulo: Manole, 1998a. v. 2. cap. 123, p. 1940-1961.

FERNANDEZ, P; XAVIER, C. A. M; VULGMAN, I; VOLPON, J. B. Enxerto ósseo descalcificado retardado. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 24, n. 3, p. 79-82, 1989.

FINKEMEIER, C. G. Bone graft and bone graft substitutes. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 84A, p. 454-464, 2002.

FORTUNA, G. M.; FIGUEIREDO-LOPES, L.; DIAS-JUNIOR, C. A.; GERLACH, R. F.; TANUS-SANTOS, J. E. A role for matrix metalloproteinase-9 in the hemodynamic changes following acute pulmonary embolism. **Int. J. Cardiol.**, Amsterdam, v. 114, n. 1, p. 22-27, 2007.

FOX, S. M. Cancellous bone grafting in the dog: An overview. **J Am Anim Hosp Assoc**, Golden, v. 20, p. 840-848, 1984.

FUJIWARA, N. H.; KALLMES, D. F.; LI, S. T.; LIN, H. B.; HAGSPIEL, K. D. Type 1 Collagen as an Endovascular StentGraft Material for Small-diameter Vessels: A Biocompatibility Study. **J. Vasc. Interv. Radiol.**, Reston, v. 16, n. 9, p. 1229-1236, 2005.

GIANNOBILE, W.V. Periodontal regeneration: potencial role of bone morphogenic proteins. **Journal of Periodontal Research**, v. 29, p. 225-235, 1996.

GILGER, B.C.; BENTLEY, E.; OLLIVIER, F.J. Diseases and surgery of the canine cornea and sclera. In: GELATT, K.N. **Veterinary Ophthalmology**. 4.ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2007. Chap.15, p. 690-752.

GOLDBERG, S. Descomplicando a fisiologia. In: **Tratado de fisiologia médica**. 8. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. p.61-65.

GRAGEDA, E.; LOZADA, J. L.; BOYNE, P. J.; CAPLANIS, N.; MCMILLAN, P. J. Bone formation in the maxillary sinus by using platelet-rich plasma: an experimental study in sheep. **Journal of Oral Implantology**, v.31, n.1, p.2-17, 2005.

GUYTON, A.C. **Fisiologia humana**. Sexta edição, Editora Guanabara, 1988

HAVERSTOCK, B. D., MANDRACCHIA, V. J. Cigarette smoking and bone healing implications in foot and ankle surgery. **The Journal of Food e Ankle Surgery**, Philadelphia, v. 37, n. 1, p. 69-74, 1998.

HULSE, D.; HYMAN, B. Biomecânica e biologia das fraturas. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 3. ed. Manole: São Paulo, 2007. v. 2, cap. 122, p. 1785 – 1792.

JOHNSON, A. L. Fundamentals of orthopedic surgery and fracture management. In: FOSSUM, T. W. **Small Animal Surgery**. Missouri: Mosby, 2007. cap. 31, p. 930-1014.

JORGE, W.A., GOUVEIA, M.M. Correção de consolidação viciosa de fraturas de mandíbulas. **Revista da Instituição Ciência Saúde**, São Paulo, v. 7, n. 2, p. 19-23, 1989.

JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan. cap. 8, p. 136-153. 2004.

KADERLY, R.E. Delayed union, nonunion and malunion. In: SLATTER, D. (ed). **Textbook of small animal surgery**, 2. ed. Philadelphia: Saunders, 1993. p.1676-1684.

KHOJASTEH, A; GHahremani, M. H; OSTAD, S.N; ESLAMI, M; MOTAHHARY, P; MORAD, G; SHIDFAR, S. The effect of deproteinized bovine bone mineral on saos-2 cell proliferation. **Iranian Endodontic Journal**, v. 8, n. 3, p. 118-122, 2013.

KIM, K.M.; SHIN, Y.T.; KIM, H.K. Effect of autologous platelet rich plasma on persistent corneal epithelial defect after infectious keratitis. **Jpn. J. Ophthalmol.**, v. 56, p. 544-550, 2012.

LACRETA JUNIOR, A. C. C.; REGONATO, E.; COSSI, L. B.; CRUVINEL, C., A., T.; CANOLA, J. C. Modelo experimental de falha óssea por meio de osteotomia do rádio em coelhos. **Biotemas**, Florianópolis, v. 23, n. 3, p. 149-157, 2010.

LAURENCIN, C. T; EL-AMIN, S. F. Xenotransplantation in orthopaedic surgery. **Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 16, p. 4–8, 2008.

LEDFOORD, C. K.; NUNLEY, J. A.; VIENS, N.A; LARK, R.K. Bovine xenograft failures in pediatric foot reconstructive surgery. **Journal of Pediatric Orthopaedics**, v. 33, n. 4, p. 458-463, 2013.

LEMOES, J. J.; ROSSI JUNIOR, R.; PÍSPICO, R. **Utilização de plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos – Proposta de um protocolo de obtenção simplificado**. Disponível em: < <http://www.dentaria.com/artigos/ver/?art=58>>. Acesso em: 02 set 2015.

LEOPIZZI, N.; BOLLINGER NETO, R.; BARROS FILHO, T. E. P.; AZZE, R. J. Modelos experimentais em ortopedia e ISO 10993: Biological evaluation os medical devices-part 2: Animal welfare requirements. Interpretação e extensão da norma. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v. 6, p. 139-142, 1998.

LESSER, A. S. Complication from improper intramedullary pin placement in tibial fracture (cat and dog). **Medicine Veterinary Praticce**. v. 65, n. 12, p. 940-944, 1984.

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

MAKRIDIS, K. G; AHMAD, M. A; KANAKARIS, N. K; FRAGKAKIS, E. M; GIANNOUDIS, P. V. Reconstruction of iliac crest with bovine cancellous allograft after bone graft harvest for symphysis pubis arthrodesis. **International Orthopaedics**, v. 36, p. 1701–1707, 2012.

MANDT, P. R., GERSHUNI, D. H. Treatment of nonunion of fractures in the epiphyseal-metaphyseal region of long bones. **Journal of Orthopaedic Trauma**, New York, v. 1, p. 141-151, 1987.

MARTINEZ, S. A.; WALKER, T. Bone grafts. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 29, p. 1207-1220, 1999.

MARX, R. E.; CARLSON, E. R. The potential role of growth and differentiation factors in periodontal regeneration. Position paper. **J Periodontol**, v. 67, p. 545-553, 1996.

MARX, R. E.; CARLSON, E. R.; EICHSTAEDT, R.M.; SCHIMMELE, S.R.; STRAUSS, J. E.; GEORGEFF, K. R. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod**, v. 85, n. 6, p. 638-46, 1998.

MARX, R. E.; GARG, A. K. Bone graft physiology with use of platelet-rich plasma and hiperbaric oxygen. In.: \_\_\_\_\_. **The sinus bone graft**. Colorado: Quintessence, 1999. p.183-189.

MILLIS, D. L.; JACKSON, A. M. União tardia, não-uniões e más-uniões. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 3. ed. Manole: São Paulo, 2007. v. 2, cap. 128, p. 1849 – 1861.

MILLIS, D. L., MARTINEZ, S. A. Enxertos ósseos. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 3. ed. Manole: São Paulo, 2007. v. 2, cap. 133, p. 1875-1891.

MOURÃO, R. V. C. **Estudo da relação do infiltrado inflamatório mononuclear e expressão de ki-67, colágenotipo iv e laminina em cistos radiculares**. 2013. 54 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

MUKAI, E.; MUKAI, S. Remodelação óssea com utilização do material de enxerto xenógeno ORTHOGEN: relato de casos. Disponível em: <<http://www.baumer.com.br/baumer/site/download/index.php?acao=download&cod=1786&idioma=Ingles>>. Acesso em: 09 ago 2016.

NASCIMENTO, S. B; CARDOSO, C. A; RIBEIRO, T. P; ALMEIDA, J. D; ALBERTINI, R; MUNIN, E; ARISAWA, E. A. L. Effect of low-level laser therapy and calcitonin on bone repair in castrated rats: a densitometric study. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, n. 1, p. 45-49, 2010.

NOLTE, P. A.; VAN DER KRANS, A.; PATKA, P.; JANSSEN, I. M. C.; RYABY, J. P.; ALBERS, G. H. R. Low-intensity pulsed ultrasound in the treatment of nonunions. **The Journal of Trauma**, Baltimore, v. 51, n. 4, p. 693-702, 2001.

NUNES FILHO, D. P.; LUPPINO, F.; YAEDÚ, R. Y. F.; CARVALHO, P. S. P. de. Avaliação microscópica da ação do osso autógeno associado ou não ao PRP em cavidades ósseas de cães. **Implantnews**, São Paulo, v. 4, n. 3, p. 263-269, 2007.

OBARRIO, J.J.; ARAÚZ-DUTARI, J. I.; CHAMBERLAIN, T. M.; CROSTON, A. The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology – case reports. **International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 20, n. 5, p. 487-497, 2000.

OLIVEIRA, R. C. de. **Análise comparativa da remodelação da matriz, angiogênese e neoformação óssea durante o reparo de defeito crítico tratado com osso autógeno ou xenoenxerto desmineralizado**. 85f. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

OLLIVIER, F. J. **Matrix metalloproteinase 2, matrix metalloproteinase 9, and connective tissue growth factor in the equine tear fluid: possible implications in corneal wound healing**. 158f. Dissertação (Doutorado) – Universidade da Flórida, 2004. Disponível em: <[http://etd.fcla.edu/UF/UFE0003781/ollivier\\_f.pdf](http://etd.fcla.edu/UF/UFE0003781/ollivier_f.pdf)>. Acesso em: 10 ago 2016.

PINHEIRO, A. L. B; GERBI, M. E. M. M. Photoengineering of bone repair processes. **Photomedicine And Laser Surgery**, v. 24, n. 2, p. 169–178, 2006.

QUESENBERRY, K. E. Rabbits. In: **Saunders Manual of Small Animal Practice**. BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. W. B. Philadelphia: Saunders Company, 1994. p. 1346.

QUINDERÉ, L. B.; NONAKA, C. F. W.; SOUZA, L. B. de; PINTO, L. P. Expressão imuno-histoquímica de colágeno IV, tenascina-C e fibronectina em lesões centrais e periféricas de células gigantes. **Rev. Inst. Ciênc. Saúde**. v. 26, n. 2; p. 226-231, 2008.

RILEY, E. H.; LANE, J. M.; URIST, M. R.; LYONS, K. M.; LIEBERMAN, J. R.; Bone morphogenetic Protein-2: biology and applications. **Clinical Orthopaedics**, Philadelphia, v. 324, p. 39-46, 1996.

ROBELLO, G. T.; ARON, D. N. Delayed and nonunion fractures. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, v. 7, p. 98-104, 1992.

SALBEGO, F. Z. **Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado à inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea**. 211f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2010.

SANADA, J. T.; RODRIGUES, J. G. R.; CANOVA, G. C.; CESTARI, T. M.; TAGA, E. M.; TAGA, R.; BUZALAF, M. A. R.; GRANJEIRO, J. M. Análise histológica, radiográfica e do perfil de imunoglobulinas após implantação de enxerto de osso esponjoso bovino desmineralizado em bloco em músculo de ratos. **J. Appl. Oral Sci.**, Bauru, v. 11, n. 3, p. 209-215, 2003.

SÁNCHEZ, A.R.; ECKERT, S. E.; SHERIDAN, P. J.; WEAVER, A. L. Influence of platelet-rich plasma added to xenogenic bone grafts on bone mineral density associated with dental implants. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 20, n. 4, p. 526-532, 2005.

SANTOS, F.C.; RAHAL, S.C. Enxerto ósseo esponjoso autólogo em pequenos animais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 1969-1975, 2004.

SASKA, S.; ROSSI, E.T.; CONTE NETO N.; SOUZA, S. F.; GABRIELLI, M. A. C.; HOCHULI-VIEIRA, E. Adesivos de cianoacrilato para fixação de xenoenxertos. **Rev. Cir. Traumatol. BucoMaxilo-Fac.**, v. 9, n. 1, p. 93-102, 2009.

SCHMAEDECKE, A.; ACETO, M. L.; QUEIRÓZ G, F.; TATARUNAS, A. C.; ZERWES, M. B. C.; MASTROCINQUE, S.; FERRIGNO C. R. A. Tratamento cirúrgico de união retardada e não-união de fraturas em cães: revisão de literatura. **R.v. Educ. Contin. CRMV-SP**, São Paulo. v. 6. n. 1/3. p. 74-82. 2003.

SILVA, R, F.; SANTANA, G. C.; LEME, F. O. P.; CARMONA, J. U.; REZENDE, C. M. F. Release of transforming growth factor beta 1 and platelet derived growth factor type AB from canine platelet gels obtained by the tube method and activated with calcium salts. **Arch. Med. Vet**, v. 45, p. 159-165, 2013.

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

SOARES, L. G.; MAGALHÃES, E. B.; MAGALHÃES, C. A.; FERREIRA, C. F.; MARQUES, A.M.; PINHEIRO, A. L. New bone formation around implants inserted on autologous and xenografts irradiated or not with IR laser light: A histomorphometric study in rabbits. **Brazilian Dental Journal**, v. 24, n. 3, p. 218-223, 2013.

STEVENSON, S. Biology of bone grafts. **Orthop. Clin. North. Am.**, v. 30, p. 543-552, 1999.

TULI, S. M.; SINGH, A. D. The osteoinductive property of decalcified bone matrix - An experimental study. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 60-B, n. 1, p. 116-123, 1978.

VOLPON, J. B; COSTA, R. M. P. Ensaio mecânico e uso clínico do enxerto homogêneo processado. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 35, n. 6, p. 219-224, 2000.

VOLPON, J. B; XAVIER, C. A. M; GONÇALVES, R. P. Enxerto homólogo de osso cortical granulado e descalcificado na correção de falha óssea diafisária: Estudo experimental em coelhos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 17, n. 1, p. 11-19, 1982.

WANG, H.; AVILA, G. Platelet Rich Plasma: Myth or Reality? **Eur. J. Dentist.**, v. 1, p. 192-194, 2007.

WASTERLAIN, A. S.; BRAUN, H. J.; DRAGOO, J. L. Contents and formulations of platelet-rich plasma. **Oper. Techn. Orthop.**, v. 22, p. 33-42, 2012.

WEIBRICH, G; KLEIS, W. K. G.; HAFNER, G. Growth factor levels in the platelet-rich plasma produced by 2 different methods: Curasan-type PRP kit versus PCCS PRP system. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v.17, n.2, p.184-190, 2002.

WEIGEL, J.P. Bone grafting. In: BOJRAB, M.J.; SMEAK, D.D.; BLOOMBERG, M.S. **Disease mechanisms in small animal surgery**. 2.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. Cap.98, p. 678-684. 1993.

WHITMAN, D. H.; BERRY, R. L.; GREEN, D. M. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral ad maxillofacial surgery. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 55, n. 11, p.1294-1299, 1997

WORTH, A.; MUCALO, M.; HORNE, G.; BRUCE, W.; BURBIDGE, H. The evaluation of processed cancellous bovine bone as a graft substitute. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 6, n. 3, p. 379-386, 2005.

ZANDIM, B. M.; SOUZA, M. V.; MAGALHÃES, P. C. et. al. Platelet activation: ultrastructure and morphometry in platelet-rich plasma of horses. **Pesqui. Vet. Bras.**, v. 32, p. 83-92, 2012.



**ANEXO A – Certificado - Aprovação do CEUA**

Universidade Federal de Uberlândia  
– Comissão de Ética na Utilização de Animais –

**CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 118/14, sobre o projeto de pesquisa intitulado “Estudo comparativo do enxerto heterólogo granulado desmineralizado e processado quimicamente, associado ao plasma rico em plaquetas e a medula óssea autógena, no tratamento de falhas ósseas diafisárias de rádio de coelhos”, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Francisco Cláudio Dantas Mota** está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal conforme regulamentações do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) – UFU em reunião de **06 de fevereiro de 2015**.

(We certify that the protocol nº 118/14, about “Estudo comparativo do enxerto heterólogo granulado desmineralizado e processado quimicamente, associado ao plasma rico em plaquetas e a medula óssea autógena, no tratamento de falhas ósseas diafisárias de rádio de coelhos” agrees with the ETHICAL PRINCIPLES ON ANIMAL RESEARCH as regulations of National Advice of Control and Animal Experimentation (CONCEA) and approved by Ethics Commission on Use of Animals (CEUA) – Federal University of Uberlândia in 06/02/2015).

Uberlândia, 20 de fevereiro de 2015.

**Prof. Dr. César Augusto Garcia**  
Coordenador da CEUA/UFU

**APÊNDICE A - Protocolo I - Avaliação radiográfica**

**Controle** (    )      **Xenoenxerto** (    )      **Xenoenxerto +PRP** (    )

Pré-operatório: (    )      Pós-operatório: 30 dias (    )  
60 dias (    )

Coelho nº \_\_\_\_\_

**INTERPRETAÇÃO RADIOGRÁFICA**

- **Posição látero-medial**

---

---

---

- **Posição dorso-palmar**

---

---

---

- **Observações**

---

---

---

## APÊNDICE B - Protocolo II - Avaliação microscópica

**Controle** (    )      **Xenoenxerto** (    )      **Xenoenxerto +PRP** (    )

Pré-operatório: (    )      Pós-operatório: 30 dias (    )  
60 dias (    )

Coelho nº \_\_\_\_\_

### **Avaliação da viabilidade e contagem celular**

---



---



---

### **Avaliação da área do rádio submetido a ostectomia**

1. Fibrina: 0, +, ++, +++
2. Tecido de granulação: 0, +, ++, +++
3. Fibrose (tecido conjuntivo fibroso): 0, +, ++, +++
4. Necrose: 0, +, ++, +++
5. Infiltração mononuclear: 0, +, ++, +++
- 5.4. Polimorfonucleares: 0, +, ++, +++

### **Aspecto da transição entre extremidade óssea e a região do rádio submetida a ostectomia:**

---



---

### **Observações:**

---



---



