

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**INFLUÊNCIA DO ENXERTO OMENTAL LIVRE
AUTÓGENO NO TRATAMENTO DE LESÃO ÓSSEA
INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE NO OSSO RÁDIO DE
COELHO (*Oryctolagus cuniculus familiaris*)**

Leandro William Borges

Médico Veterinário

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS - BRASIL

Agosto /2018

LEANDRO WILLIAM BORGES

**INFLUÊNCIA DO ENXERTO OMENTAL LIVRE
AUTÓGENO NO TRATAMENTO DE LESÃO ÓSSEA
INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE NO OSSO RÁDIO DE
COELHO (*Oryctolagus cuniculus familiaris*)**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária (Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia-PPGCV - UFU), como parte das exigências para obtenção de título de mestre em ciências veterinárias

Área de concentração: saúde animal

Orientador: Prof. Dr. Francisco Claudio Dantas Mota

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Karen Renata Nakamura Hiraki

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL
Agosto - 2018

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

B732i
2018 Borges, Leandro William, 1983
 Influência do enxerto omental livre autógeno no tratamento de lesão óssea induzida experimentalmente no osso rádio de coelho (*Oryctolagus cuniculus familiaris*) [recurso eletrônico] / Leandro William Borges. - 2018.

Orientador: Francisco Claudio Dantas Mota.

Coorientadora: Karen Renata Nakamura Hiraki.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.1214>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Veterinária. 2. Coelhos. 3. Ossos - Enxerto. 4. Regeneração óssea. I. Mota, Francisco Claudio Dantas, 1975, (Orient.). II. Hiraki, Karen Renata Nakamura, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

CDU: 619

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



Ata da defesa de Dissertação de **MESTRADO ACADÊMICO** junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de: Dissertação de mestrado acadêmico nº **PPGCV/015/2018**

Data: 28/08/2018

Discente: *Leandro William Borges* – Matrícula – 11612MEV016

Título da Dissertação: **INFLUÊNCIA DO ENXERTO OMENTAL LIVRE AUTÓGENO NO TRATAMENTO DE LESÃO ÓSSEA INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE NO OSSO RÁDIO DE COELHO (*Oryctolagus cuniculus familiaris*)**

Área de concentração: SAÚDE ANIMAL

Linha de pesquisa: ANESTESIOLOGIA E CIRURGIA

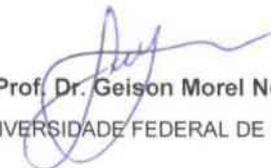
Projeto de Pesquisa de vinculação: MÉTODOS DE REPARAÇÃO DE FALHAS ÓSSEAS

No dia 28 de Agosto do ano de 2018 às 09:00 horas no Anfiteatro do Hospital Veterinário – Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Comissão Julgadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, composta pelos Professores(as)/Doutores(as): **Geison Morel Nogueira** – UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA; **Paulo Vinícius Tertuliano Marinho** – INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO SUL DE MINAS GERAIS, CAMPUS MUZAMBINHO e **Francisco Cláudio Dantas Mota** orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da comissão Dr./Dra. Francisco Cláudio Dantas Mota concedeu a palavra ao(a) candidato(a) para uma exposição do seu trabalho, contando com o tempo máximo de 50 minutos. A seguir o(a) senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o(a) candidato(a), durante o prazo máximo de (30) minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para resposta. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Comissão Julgadora, em sessão secreta, considerou o(a) candidato(a) *Aprovado*.

Esta defesa de dissertação de mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme Regulamento do Programa, Legislação e a Regulamentação Interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar o(a) Presidente encerrou os trabalhos às 12 horas e 00 minutos, lavrou esta ata que será assinada por todos os membros da Comissão Examinadora. Uberlândia, 28 de Agosto de 2018.


Prof. Dr. Geison Morel Nogueira
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA


Prof. Dr. Paulo Vinícius Tertuliano Marinho
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DO SUL DE MINAS – CAMPUS MUZAMBINHO


Prof. Dr. Francisco Cláudio Dantas Mota
ORIENTADOR

Leandro William Borges - nascido na Cidade de Contagem, estado de Minas Gerais aos vinte seis dias do mês de outubro de um mil novecentos e oitenta e três. Graduado em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU) no ano de 2014, foi bolsista de iniciação científica da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) de 2012 a 2013, e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) de 2013 a 2014. Pós-graduado em clínica cirúrgica de animais de companhia pelo Programa de Residência Uniprofissional em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) em 2016, no mesmo ano ingressou no mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia (PPGCV-UFU), foi bolsista (CAPES) de 2016 a 2018. Pesquisador na área de cirurgia experimental com foco em enxertia aplicada à ortopédica veterinária, trabalhou com enxerto omental livre autógeno em de defeitos ósseas no Rádio de coelhos, sendo este o tema da dissertação de mestrado. Atualmente é docente do curso de Medicina Veterinária no Centro Universitário do triângulo, (UNITRI) campus Uberlândia, ministrando as disciplinas de Anatomia dos animais domésticos, Anestesiologia e princípios de cirurgia e clínica cirúrgica de pequenos animais.

“Bem-aventurado aquele que teme ao SENHOR e anda nos seus caminhos. Pois comerás do trabalho das tuas mãos, feliz serás, e te irá bem. ”

Salmo 128:1,2)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida e por ter me abençoado até aqui.

Aos meus pais Ideltino Borges e Maria Borges, pelos ensinamentos e o apoio em todos os meus objetivos. Vocês são o meu exemplo de dignidade e fé.

A minha esposa Suelen Borges e minha filha Alice Borges, pela compreensão e parceria em todos os momentos. Vocês além de ser a minha família, são a razão da minha existência!

Ao meu orientador Professor Dr. Francisco Cláudio Dantas Mota, pelos ensinamentos, paciência e amizade ao longo destes anos. Você é para mim um exemplo de profissional!

A professora Dra. Karen Nakamura, minha co-orientadora, que disponibilizou recursos e se dispôs a me ajudar na execução deste trabalho.

Ao professor Dr. Marcelo Beletti, que em um momento de dificuldade me estendeu a mão e me ajudou a concluir as avaliações histológicas.

Aos professores Dr. Marcio Bandarra, Dr. Geison Nogueira, Aracelle Alves, Dr. Joao Paulo Sault, e Dra. Vanessa Faiad, pelo apoio e ajuda durante as atividades da Pós-graduação.

A toda a equipe do Hospital veterinário, principalmente aos amigos Antônio, Raquel, Cristiane, dona Maria e Joao de Assis da técnica cirúrgica, Solange e Raquel da recepção, Felipe, Wilson e Amanda do laboratório de análises clínicas, Bruno e Werlles do RX e Igor do laboratório de patologia veterinária.

Aos meus colegas de Pós-graduação, Bruna Souza, Felipe Sales, Marcelo corrijo e Rodrigo, pela parceria e ajuda.

As amigas Laís Basso e Fernanda Muraro, pela ajuda fundamental durante toda a fase experimental.

Ao meu Amigo Douglas Alves, que é como um irmão, mais velho é claro, pela ajuda de sempre!

A amiga Renata Miranda, pela ajuda com as análises clínicas.

Ao amigo Professor Dr. Ricardo Ramirez, pela ajuda com as análises estatísticas.

Aos técnicos do laboratório de histologia UFU, Ester e Fabrício pelos ensinamentos sobre a confecção de cortes histológicas.

Aos gestores Amado Junior e Professor Dr. Diego Delfiol, ex e atual diretores executivos do Hospital Veterinário –UfU respectivamente, pelo apoio e disponibilização de recursos junto ao hospital veterinário em prol da pesquisa e extensão.

A universidade Federal de Uberlândia (UFU), principalmente a faculdade de medicina veterinária (FAMEV), pela oportunidade de aprendizado e apoio, disponibilizando a estrutura e recursos que possibilitaram a execução deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela ajuda financeira por meio da bolsa de estudo ao longo de dois anos.

A todos a minha gratidão !!!!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. JUSTIFICATIVA	15
3. OBJETIVO	16
4. REFERENCIAL TEÓRICO	17
4.1 Tecido ósseo	17
4.2 Regeneração de lesões ósseas e suas complicações	18
4.3 Enxertos ósseos	20
4.4 Enxerto omental	21
4.5 Fosfatase alcalina óssea.....	23
5. METODOLOGIA	24
5.1 Animais	25
5.2 Pré-operatório.....	Erro! Indicador não definido.
5.3 Procedimento cirúrgico.....	26
5.4 Pós-operatório	29
5.5 Avaliação radiográfica	30
5.6 Dosagem fosfatase alcalina óssea (FAO)	31
5.7 Eutanásia	32
5.8 Avaliação macroscópica	32
5.9 Análise microscópica.....	32
5.10 Análise Estatística	33
6 RESULTADOS	34
6.1 Observações trans e pós-operatórias	34
6.2 Avaliação macroscópica	34
6.3 Dosagem da fosfatase alcalina óssea (FAO).....	34
6.4 Avaliação radiográfica	35
6.5 Avaliação histológica.....	37
7. DISCUSSÃO	41
8. CONCLUSÃO	46
9. REFERÊNCIAS	48
ANEXOS	57
ANEXO I - Autorização da Comissão de Ética na Utilização de Animais – CEUA. .	58

LISTA DE ABREVIATURAS

μL – microlitros;

μm – Micrômetros;

CEUA – Comitê de Ética na Utilização de Animais;

CFMV – Conselho Federal de Medicina Veterinária;

cm – centímetros;

CT – Coto ósseo;

D0 - Dia Zero;

D45 - Dia quarenta e cinco;

D90 - Dia noventa;

DP – Desvio Padrão;

EDTA - Ethylenediamine Tetraacetic Acid (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético);

FA – Fosfatase Alcalina;

FAO - Fosfatase Alcalina Óssea;

GI – Grupo Controle;

GII – grupo tratado com o enxerto omental;

gl – Grau de liberdade;

HE – Hematoxilina e Eosina;

IM – Intramuscular;

IQR – Intervalo Interquartil;

Kg – quilogramas;

kV- quilovolt;

mg – miligramas;

MG – Minas Gerais;

mL- mililitros;

mm² - Milímetros quadrados;

NaCl – Cloreto de sódio;

OC – Ossificação endocondral;

OD – Omento degenerado ou em absorção;

OE – Osso esponjoso;

OI – Ossificação Intramembranosa;

ON – Osso neoformado;

p – p valor;

pH - Potencial Hidrogeniônico;

PO – Pós-operatório;

PPGCV – Programa de Pós-graduação e Ciências Veterinárias;

SC – Subcutânea;

TC – Tecido conjuntivo;

U/L – Unidades internacionais por litro;

UFU – Universidade Federal de Uberlândia;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagens fotográficas das principais etapas do procedimento cirúrgico experimental de criação de falha óssea segmentar de 01 cm no rádio de coelhos.....	27
Figura 2 - Imagens fotográficas ilustrando o procedimento cirúrgico para obtenção do enxerto omental livre autógeno por meio da celiotomia em coelho Nova Zelândia.....	28
Figura 3 - Imagens fotográficas ilustrando o transplante do enxerto omental livre autógeno para o leito receptor, síntese de musculatura e pele.....	29
Figura 4 - Imagens “print screen” do programa AutoCAD® 2016, ilustrando as etapas executadas para a obtenção da área em mm ² da falha no osso rádio, de coelho Nova Zelândia.....	31
Figura 5 - Representação gráfica apontando a similaridade na concentração plasmática da fosfatase alcalina óssea em relação aos grupos (controle e tratamento) e ao tempo de acompanhamento (0, 45 e 90 dias).....	35
Figura 6 - Imagens radiográficas obtidas no D0, D45 e D90, do osso rádio, de coelho da raça Nova Zelândia, do GI.....	36
Figura 7 - Imagens radiográficas obtidas no D0, D45 e D90, do osso rádio, de coelho da raça Nova Zelândia, do GII.....	36
Figura 8 - Representação gráfica mostrando a redução da porcentagem das áreas radiolúcidas das lesões visualizadas nas imagens radiográficas aos 45 e 90 após suas induções e a similaridade em relação aos grupos (controle e tratamento).....	37
Figura 9 - Fotomicrografia do processo de regeneração da falha óssea de coelho Nova Zelândia do GI, 45 dias após procedimento cirúrgico.....	38
Figura 10 - Fotomicrografia mostrando a ossificação endocondral no osso rádio, de coelho Nova Zelândia do GI, 90 dias após procedimento cirúrgico.....	39
Figura 11 - Fotomicrografia evidenciando infiltrado mononuclear em meio ao enxerto omental na falha óssea, de coelho Nova Zelândia do GII, 45 dias após procedimento cirúrgico.....	39
Figura 12 - Fotomicrografia de falha óssea em processo de regeneração no osso rádio, de coelho Nova Zelândia do GII, 90 dias após procedimento cirúrgico.....	40

INFLUÊNCIA DO ENXERTO OMENTAL LIVRE AUTÓGENO NO TRATAMENTO DE LESÃO ÓSSEA INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE NO OSSO RÁDIO DE COELHO (*Oryctolagus cuniculus familiaris*)

Resumo - O tecido ósseo é fundamental na locomoção, proteção dos órgãos internos e na produção de células do sistema hematopoiético e imunológico dos animais. As lesões neste tecido, principalmente nos animais de companhia, normalmente ocorrem devido a traumas. As fraturas têm sido bastante discutidas na ortopedia veterinária, principalmente quanto aos métodos de tratamento, tempo de recuperação e complicações. Uma opção no tratamento das lesões ósseas são os enxertos. Com o objetivo de se estudar a influência do enxerto omental livre autógeno na reparação de falha óssea utilizou-se 32 coelhos adultos, machos, não castrados da raça Nova Zelândia, com idade entre 6 e 7 meses, divididos em dois grupos (G1 controle e GII tratados com enxerto omental) com 16 animais cada. Falhas ósseas segmentares de 1cm foram criadas cirurgicamente no terço médio da diáfise radio direito. No mesmo momento cirúrgico realizou-se também a celiotomia para obtenção do enxerto a partir do omento, inclusive nos animais do G1. Os animais do GII tiveram as falhas ósseas cobertas com o enxerto omental livre autógeno. Imediatamente após as cirurgias, aos 45 e 90 dias, os animais tiveram os respectivos antebraços radiografados para posterior avaliação do processo de regeneração óssea. Também foi realizada coleta de sangue para a dosagem da fosfatase alcalina óssea nos dias 0 (antes das cirurgias), 45 e 90 (após as cirurgias). Metade dos animais de cada grupo foram eutanasiados aos 45 dias e aos 90 dias respectivamente para realização da coleta de amostra da área anteriormente lesionada visando a confecção de laminas histológicas. Não houve diferença nos níveis séricos da FAO entre G1 e GII aos 45 e nem aos 90 dias ($p=0,42$), nem na avaliação radiográfica comparando os grupos ($p=0,99$). Histologicamente também não foi notada diferença no processo de regeneração óssea entre G1 e GII, exceto pela presença de resíduos do enxerto omental em absorção, sugerindo uma reação tipo corpo estranho. O enxerto omental autógeno livre, no tratamento de falhas ósseas com 1cm de extensão no osso Rádio de coelhos Nova Zelândia, não influenciou o processo de regeneração óssea.

Palavras-chave: Enxerto omental, Células Gigantes, Ostectomia, Regeneração óssea.

INFLUENCE OF SELF-FREE OMENTAL GRAFT IN THE TREATMENT OF BONE INJURY EXPERIMENTALLY INDUCED IN THE RADIO OF RABBIT (*Oryctolagus cuniculus familiaris*)

Abstract - Bone tissue is essential in locomotion, internal organs protection and in the hematopoietic and immunological systems cells production of animals. Lesions in this tissue, especially in pet animals, usually occur due to trauma. Fractures have been widely discussed in veterinary orthopedics, mainly regarding treatment methods, recovery time and complications. An option in the treatment of bone lesions are the grafts. with aim to study the influence of the autogenous free omental graft on the repair of bone defect, 32 male, uncastrated New Zealand rabbits aged between 6 and 7 months were divided into two groups (GI control and GII treated with free omental graft) with 16 animals each. 1 cm Segmental bone defects were surgically criated in the middle third of the right Radio. At the same surgical procedure, the celiotomy was also performed to obtain the graft from the omentum, including the GI animals. The GII animals had bony defects covered with autogenous free omental graft. Immediately after the surgeries and at 45 and 90 days, the animals had their respective forearms radiographed for later images evaluation. Blood samples were also collected for the measurement of bone alkaline phosphatase on days 0 (before surgery), 45 and 90 (after surgery). Half of the animals in each group were euthanized at 45 days and 90 days, respectively, to collect samples from the previously injured area, aiming the preparation of histological laminae. There was no difference in bone alkaline phosphatase serum levels between GI and GII at 45 and 90 days ($p = 0.42$), nor at the radiographic evaluation comparing the groups ($p = 0.99$). Histologically, no difference was also observed in the regeneration process of bone defects between GI and GII, except for the presence of residues from the omental graft under absorption, suggesting a foreign body reaction. The autogenous free omental graft, on treatment of 1 cm extension bone defects in New Zealand rabbit Radio, did not influence the bone regeneration process.

Key words: Bone regeneration, Giant cells, Ostectomy, Omental graft.

1. INTRODUÇÃO

O tecido ósseo além de proporcionar apoio ao músculo esquelético, é fundamental na locomoção, proteção das estruturas internas do corpo e na produção de células do sistema hematopoiético e imunológico dos animais. Os ossos também funcionam como depósito de minerais armazenando-os e liberando-os, mantendo equilibrados seus níveis nos fluidos corporais (ETTINGER; FELDMAN, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; DENNY; BUTTERWORTH, 2006).

As lesões ósseas nos animais de companhia, em sua maioria são decorrentes de traumas e vem sendo bastante discutidas na ortopedia veterinária, principalmente no que diz respeito aos métodos de tratamento, tempo de recuperação e possíveis complicações.

O processo de regeneração óssea começa logo após a fratura, e envolve uma série de eventos subsequentes. Estes induzem à liberação de fatores de crescimento, mediadores e células inflamatórias, que juntos estimulam a mitose, a diferenciação celular e a angiogênese no local da lesão (REDDI, 1998; FERREIRA et al., 2018). Tais eventos levam à formação de um calo fibrocartilaginoso que une provisoriamente as extremidades dos ossos fraturados (BRINKER; PIERMATTEI; FLO, 1986)

A regeneração óssea pode ocorrer de duas formas, através da consolidação óssea primária ou direta (sem formação de calo ósseo) e secundária ou indireta (com formação de calo ósseo) (SCHENK, 2003). Posteriormente, as trações e as pressões exercidas sobre a fratura estimulam a remodelação do calo ósseo e sua completa substituição por tecido ósseo, sem formação cicatricial (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Quando a cicatrização no local fraturado não ocorre, dá-se o nome de não união óssea que pode ser classificada como viável ou não viável, e um dos fatores predisponentes é a união tardia, que é quando a consolidação não ocorre no tempo estimado (DENNY; BUTTERWORTH, 2006; MILLIS; JACKSON, 2007).

Vários são os fatores que podem contribuir com o processo de não união óssea, como erros na execução da técnica cirúrgica, má qualidade do material utilizado, distúrbios no paciente e complicações pós-operatórias (NIKURA *et al.*, 2013).

O tratamento da não união óssea é variado, dependendo de cada caso, podendo ser feito através da simples imobilização com talas, fixação interna e o emprego de adjuvantes como os enxertos. Desta forma compete aos ortopedistas intervirem no momento ideal e com a técnica cirúrgica adequada (MARSH, 1998; MILLIS; JACKSON, 2007; JOHNSON, 2007).

Uma alternativa no auxílio do tratamento das fraturas e suas complicações são os enxertos (BRINKER; PIERMATTEI; FLO, 1986). Segundo Salbego (2010) utiliza-los pode resultar em benefícios ao receptor, considerando suas propriedades biológicas e mecânicas.

Os enxertos são utilizados como coadjuvantes no tratamento dos processos patológicos de não união óssea, e podem apresentar fatores osteogênicos, osteoindutores e osteocondutores, o que os tornam fundamentais na composição de estruturas para que o processo de regeneração ocorra (JOHNSON, 2007; MILLIS; MARTINEZ, 2007; SALBEGO, 2010).

Eles são classificados em aloenxertos, xenoenxertos e autoenxertos, sendo este último considerado padrão ouro devido ao seu potencial em reunir fatores fundamentais para o processo de regeneração óssea, além da ausência de reação imunológica por ser histologicamente compatível com o leito receptor (PINHEIRO; GERBI, 2006; TANAKA *et al*, 2008; BARCKMAN *et al.*, 2013).

Como alternativa ao uso dos enxertos ósseos no tratamento de fraturas, união retardada e não união óssea, o omento autólogo tem sido experimentado, e desde então alguns resultados se mostraram promissores quanto à sua aplicabilidade e benefícios aos pacientes. Entre os benefícios está o fato de ser rico em células mesenquimais, a capacidade de promover angiogênese e acelerar o processo de regeneração óssea, reduzindo a morbidade e complicações pós-operatórias (MORAN *et al*, 1987; OLOUMI *et al*, 2006; SAIFZADEH *et al*, 2009; SMOLEC *et al*, 2010; BALTZER *et al*, 2015; REE *et al*, 2016).

2. JUSTIFICATIVA

Distúrbios na cicatrização óssea são comumente vivenciados na prática ortopédica veterinária, sendo a condição inicial para o desenvolvimento de complicações, que são responsáveis por alta morbidade, considerando que nem sempre sua reparação é possível. O uso dos enxertos tem auxiliado os cirurgiões na tentativa de reestabelecer a fisiologia óssea normal dos pacientes. Porém, em alguns casos não são efetivos, devido à pouca quantidade obtida, grande morbidade ao doador, e possíveis reações imunológicas que podem levar ao retardo e insucesso da técnica. Assim, há uma necessidade de se estudar métodos alternativos, que sejam eficazes, práticos e com a menor morbidade possível.

Acredita-se que o enxerto omental autógeno livre, possa acelerar o processo de reparação em grandes falhas ósseas. Se comprovada sua eficácia, esta técnica se tornará um método efetivo no tratamento dessas afecções, até mesmo aquelas com perdas ósseas.

3. OBJETIVO

Objetiva-se com este estudo avaliar os resultados da utilização do enxerto omental autógeno livre no processo de reparação de falhas ósseas segmentares de 1cm criadas experimentalmente na diáfise do rádio de coelhos da raça Nova Zelândia.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Tecido ósseo

É um sistema vivo, que proporciona apoio aos músculos esqueléticos e juntos constituem um sistema de alavancas, que amplia as forças geradas na contração muscular. Tem como função proteger as vísceras, abrigar a medula óssea, essencial para produção de células do sistema hematopoiético e imunológico. Os ossos também funcionam como depósito de minerais, tais como cálcio, fosfato e outros íons, assim, eles têm a capacidade de armazenar ou liberar tais minerais para manter constante e equilibrada sua concentração nos fluidos corporais (ETTINGER; FELDMAN, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; DENNY; BUTTERWORTH, 2006).

O tecido ósseo é formado por um tecido conjuntivo especializado, composto por células e material extracelular calcificado, denominado matriz óssea (parte inorgânica). As células que compõem os ossos são os osteoblastos, osteoclastos e osteócitos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; DENNY; BUTTERWORTH, 2006).

Os osteoblastos são de origem mesenquimal, sintetizam colágeno tipo I, proteoglicanas e glicoproteínas que são a parte orgânica da matriz óssea. Além disso participam da calcificação, reabsorção óssea na fase inicial e na comunicação com os osteócitos, eles ficam dispostos lado a lado na superfície óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; DENNY; BUTTERWORTH, 2006).

Os osteóides ou matriz óssea, são formados através da polimerização do colágeno produzido pelos osteoblastos. Este é um tecido muito parecido com a cartilagem, diferindo apenas pela alta capacidade em fixar sais de cálcio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Durante a formação do osteóide muitos osteoblastos ficam presos e recebem o nome de osteócitos (GUYTON; HALL, 2006), estes ficam dispostos em lacunas, mantendo contato com as células vizinhas por canalículos, são essenciais para a manutenção da matriz óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013) e também estão relacionados a homeostasia do cálcio (DENNY; BUTTERWORTH, 2006). Depois de alguns dias da formação do osteóide, inicia-se a deposição de sais de cálcio sobre as fibras colágenas (GUYTON; HALL, 2006), este cálcio chega através da corrente sanguínea (KIERSZENBAUM; TRES, 2012). Após semanas ou meses esses sais

depositados passam por processos de substituição e adição de átomos que os convertem em cristais de hidroxiapatita (GUYTON; HALL, 2006).

Os osteoclastos são células gigantes e móveis, multinucleadas que ajudam no remodelamento e na reabsorção óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013), ficam em equilíbrio com a deposição, exceto nos ossos em crescimento, onde a taxa de deposição é maior que a de reabsorção (GUYTON; HALL, 2006).

Os ossos são formados por partes sem cavidades visíveis, denominado osso compacto, e partes com muitas cavidades, o chamado osso esponjoso, ambos têm a mesma composição histológica básica, mas recebem esta divisão macroscópica (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A histogênese óssea ocorre por um processo denominado ossificação intramembranosa, que origina no interior de uma membrana conjuntiva, ou pela ossificação endocondral, quando se inicia sobre um molde de cartilagem hialina, que posteriormente é substituído por tecido ósseo formado por células do tecido conjuntivo adjacente. Em ambos os casos o primeiro tecido ósseo formado é do tipo primário que é gradualmente substituído por tecido ósseo secundário ou lamelar (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

4.2 Regeneração de lesões ósseas e suas complicações

As fraturas são compreendidas como soluções de continuidade causadas, geralmente, por traumas, doenças metabólicas, endócrinas, tumorais ou infecciosas (FERREIRA et al., 2018). Acompanhando as fraturas vem as lesões em variados graus nos tecidos adjacentes. Estas injúrias desencadeiam a liberação e influxo de muitos mediadores e células inflamatórias para o local da lesão, que estimulam a mitose, a diferenciação celular e a angiogênese no local da fratura. Após certo tempo ocorre a formação de um calo fibrocartilaginoso que une provisoriamente as extremidades dos ossos fraturados substituindo o coágulo inicial (BRINKER; PIERMATTEI; FLO, 1986). Este processo é o evento padrão que se segue (SCHENK, 2003; DENNY; BUTTERWORTH, 2006), ocorre geralmente de forma ordenada (MILLIS; JACKSON, 2007), composta pela ativação, proliferação celular e de diferenciação tecidual, que contribui para o crescimento e desenvolvimento do osso fraturado, levando a restauração (SCHENK, 2003).

O processo de regeneração óssea começa logo após a fratura com a formação do coágulo sanguíneo e pela degranulação subsequente das plaquetas liberando os fatores de crescimento (REDDI, 1998), associado a atuação dos macrófagos que retiram os debris celulares auxiliando na reparação tecidual (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A consolidação de uma fratura pode se dar de duas formas, pela consolidação óssea primária ou direta, onde há pouca formação de calo e a fixação da fratura é estável, sendo esta a forma esperada de reparação (MILLIS; JACKSON, 2007). Também pode ocorrer a consolidação óssea secundária ou indireta, e neste tipo há primeiramente a formação de um calo intermediário (fibrocartilaginoso), que posteriormente sofre calcificação, porém é um processo que ocorre de forma lenta e gradual (SCHENK, 2003), com formação de um calo ósseo exuberante, devido por exemplo, à uma estabilidade relativa no foco da fratura (MILLIS; JACKSON, 2007). Por fim, as trações e as pressões exercidas sobre a fratura, geram estímulos para a remodelação do calo ósseo e sua completa substituição por tecido ósseo, sem formação cicatricial (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

De acordo com Marsh (1998) o tempo necessário para a reparação de uma fratura depende de inúmeros fatores, tais como a idade do paciente, a abordagem clínica e ou cirúrgica, ossos envolvidos, tipos de fraturas e doenças sistêmicas concomitantes. Dessa forma para cada caso há um tempo de consolidação óssea aceitável. Sendo assim, o termo união retardada é empregado quando a consolidação óssea ocorre, porém de forma mais lenta do que o considerado normal (DENNY; BUTTERWORTH, 2006; MILLIS; JACKSON, 2007), isso de acordo com a comparação de um mesmo tipo de fratura, numa mesma espécie animal, com a utilização de sistemas de estabilização semelhantes (MILLIS; JACKSON, 2007).

Não união óssea, é o termo requerido quando a união não ocorre a consolidação da fratura cessa. Sendo a união tardia, fator predisponente para essa condição (DENNY; BUTTERWORTH, 2006).

As não uniões ósseas podem ser classificadas como viáveis, que são aquelas que apresentam ainda certa formação de calo e reação óssea. Ou podem ser classificadas como não viáveis, estas são mais raras e são caracterizadas pela interrupção do fluxo sanguíneo no local da fratura (MILLIS; JACKSON, 2007).

A não união é fator predisponente para a formação da pseudoartrose, que é quando ocorre a formação de um tecido fibroso entre as superfícies ósseas fraturadas (MILLIS; JACKSON, 2007; FERREIRA et al., 2018).

Vários são os fatores que podem contribuir com o processo de não união óssea, como estabilização mecânica deficiente, redução inadequada, tratamento cirúrgico inapropriado, fixação insuficiente, erros técnicos cirúrgicos, fragmentação e perda óssea, fratura exposta, exposição cirúrgica excessiva, infecção, radioterapia prévia, doenças genéticas e metabólicas (NIKURA et al., 2013).

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

4.3 Enxertos ósseos

Os enxertos são utilizados como auxiliares no tratamento de fraturas, perdas e defeitos ósseos (BRINKER; PIERMATTEI; FLO, 1986). Segundo Salbego (2010) utiliza-los pode resultar em benefícios ao receptor, considerando suas propriedades biológicas e mecânicas, que em alguns casos são a única alternativa no reparo de lesões com extensa perda óssea.

São utilizados 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). Os fatores osteocondutores funcionam como base para o crescimento tecidual bem como o aparecimento de microcirculação (SALBEGO, 2010), sendo o enxerto, fundamental na composição da estrutura para que este crescimento ocorra (MILLIS; MARTINEZ, 2007).

Eles podem ser classificados de acordo com sua origem, como autólogos (auto enxertos, retirados do próprio animal), homólogos (aloenxertos, retirados de um animal da mesma espécie) e heterólogos (xenoenxertos, retirados de animais de outra espécie) (CALASANS – MAIA, 2009; MILLIS; MARTINEZ, 2007).

Os autoenxertos são considerados os melhores, devido ao seu potencial em reunir fatores fundamentais para o processo de regeneração óssea, como por

exemplo: a osteocondução, osteoindução e osteogênese, além da ausência de reação imunológica por ser histologicamente compatível (TANAKA *et al*, 2008). A sua obtenção e transplante para o leito receptor implica em alguns riscos para o paciente, uma vez que o mesmo deve passar por dois procedimentos diferentes no mesmo ato cirúrgico, o que conseqüentemente pode resultar em aumento da morbidade (CALASANS – MAIA, 2009; ALIEVI *et al.*,2007).

Os aloenxertos podem apresentar uma incorporação incompleta ao osso lesionado, resultando em alguns casos, em considerável formação de tecido conjuntivo fibroso na interface implante-osso (BARCKMAN *et al.*, 2013).

Os xenoenxertos tem se mostrado uma boa alternativa considerando que o seu emprego evita que um mesmo paciente passe por mais de um procedimento cirúrgico reduzindo-se a morbidade (PINHEIRO; GERBI, 2006). Entretanto, algumas desvantagens devem ser consideradas quanto à sua utilização, como a transmissão de doenças, respostas imunes e falhas na consolidação (LAURCERIN; SAADIQ, 2008). Outro ponto é a dificuldade em processar e armazenar esses enxertos, pois ambos dependem de insumos e equipamentos específicos, que tornam a sua obtenção onerosa (CASTIGLIA *et al.*, 2009).

4.4 Enxerto omental

O omento é uma expansão do peritônio, se estende da curvatura maior do estômago ao colon transverso, formando uma estrutura semelhante a um avental sobre a maior parte do intestino delgado. Suas funções incluem armazenamento de gordura, acolchoamento dos órgãos viscerais, suporte de linfonodos e proteção contra traumas e disseminação de infecções (VAN DE GRAAFF, 2003).

Começou a ser utilizado em cirurgias no século XIX, inicialmente para o reparo de lesões de órgãos intra-abdominais (SENN, 1988). A primeira vez que foi utilizado em uma cirurgia extra cavitária, bem-sucedida, foi descrita por Morison (1903). Posteriormente O'Shaughnessy (1937) relatou o seu emprego, pediculado, para o tratamento de angina e identificou o seu potencial angiogênico, a partir da observação de neovascularização em estruturas adjacentes ao retalho transposto.

A partir de 1960, o estudo da aplicabilidade do omento extraperitoneal expandiu-se para as diversas especialidades cirúrgicas (KIRICUTA, 1963). Em

ortopedia, começou a ser utilizado no reparo de defeitos ósseos, tratamento de osteomilite, cobertura de próteses e prevenção de aderência após tenólise (AZUMA et al., 1976; HULTMAN, 2002)

Moran et al. (1987) relataram o emprego de retalho livre do omento maior no tratamento de osteoradionecrose mandibular em humano, no qual concluíram que o enxerto omental se mostrou como uma boa alternativa no tratamento da osteoradionecrose, promovendo suporte vascular e linfático, resolvendo a infecção e restaurando a função mandibular com mínima morbidade, reduzindo inclusive a hospitalização do paciente.

Na medicina veterinária, técnicas cirúrgicas reconstrutivas e vasculares utilizando enxertos omentais começaram a ser desenvolvidas em 1990 (HOSGOOD, 1990), e desde então a aplicabilidade cirúrgica do omento como enxerto no tratamento de diversas afecções nos animais vem sendo estudada.

O potencial angiogênico do enxerto omental foi relatado por Oloumi et al. (2006) em estudo no qual utilizaram o enxerto omental livre sobre orifícios de 2mm no córtex medial do platô tibial em coelhos, e após análise histológica constataram a formação de osso preenchendo o defeito ósseo com intensa neovascularização da matriz nos animais do grupo tratado.

O enxerto omental livre também foi utilizado por Saifzadeh et al. (2009) em um modelo experimental de não união óssea em cães, onde foram criadas falhas transversais completas de 2mm na diáfise do rádio. Os animais do grupo tratado tiveram uma melhor recuperação com formação óssea preenchendo as falhas, enquanto que, no grupo controle houve o desenvolvimento de não união hipertrófica mostrando uma diferença clara entre os animais tratados e não tratados. Baseando-se neste resultado, estes autores concluíram que o enxerto omental livre tem aplicação clínica no tratamento de fraturas em pacientes com risco de desenvolvimento de união retardada ou não união óssea.

Em um trabalho utilizando o coelho como modelo experimental foram criados defeitos críticos na diáfise do rádio os quais foram preenchidos com enxerto omental autógeno. A avaliação das radiografias por densitometria ao longo do tratamento apontou uma diferença significativa entre o grupo tratado e o controle, permitindo concluir que o enxerto omental autógeno promoveu uma melhor regeneração das falhas ósseas deste grupo (SMOLEC et al, 2010).

Baltzer et al. (2015) utilizaram o enxerto omental livre autógeno associado a placas ósseas no tratamento de fraturas diafisárias em cães com menos de 6kg e obtiveram bons resultados, os animais que receberam o enxerto omental livre autógeno apresentaram menos complicações pós-operatórias que os animais que receberam somente o implante. Estes autores sugeriram ainda que novas investigações sobre o uso de enxerto omental para estimular a cicatrização óssea, deveriam ser realizadas empregando diferentes preparações de omento como o isolamento e cultura de células, além de diferentes tamanhos de falhas ósseas e avaliação histopatológica do local da enxertia para avaliar as reações teciduais.

O enxerto omental livre autógeno também foi utilizado em associação com enxerto de osso esponjoso, como coadjuvante em artrodeses tarsais e carpais com implante de placas ósseas em cães, e após 9-12 semanas os animais tratados com esta associação apresentaram melhores escores que os animais que receberam somente o enxerto de osso esponjoso. Os autores concluíram que o enxerto omental livre pode ser utilizado em associação com o enxerto de osso esponjoso para aumentar a artrodese carpal e tarsal em cães, reduzindo o risco de maiores complicações, como a necessidade de reintervenção para a retirada dos implantes e tratamento de infecções (REE et al, 2016).

No Brasil, o primeiro relato da utilização de enxerto omental em ortopedia veterinária foi no tratamento de lesão óssea na tíbia de uma cadela, na qual um retalho de omento maior foi levado ao foco da fratura via túnel subcutâneo. A paciente com 10 anos de idade apresentava um quadro de união retardada, exposição óssea associada à perda extensa de massa muscular, óssea e de pele da tíbia direita após duas intervenções cirúrgicas prévias sem sucesso. Oitenta dias após a colocação do enxerto omental pediculado, houve consolidação óssea da tíbia e retorno do apoio do membro (FERRIGNO et al., 2010)

4.5 Fosfatase alcalina óssea

A fosfatase alcalina (FA) é uma glicoproteína de membrana com atividade enzimática encontrada em diversos tecidos, com concentrações maiores no fígado e ossos (GARNERO; DELMAS, 1993; AKESSON, 1995; USTÁRIZ, 1998). Ela atua em reações bioquímicas como a hidrólise dos ésteres fosfóricos de álcoois, fenóis e

mononucleotídeos. No fígado está nas células que formam a parede dos ductos biliares, onde participa da digestão de lipídios. Nos ossos, é produzida pelos osteoblastos, células fundamentais no processo de regeneração da fisiologia estrutural óssea (USTÁRIZ et al., 1998).

O aumento sérico de FA pode estar relacionado à colestase, utilização de drogas ou hormônios, aumento de atividade osteoblástica, animais em crescimento, filhotes que ingeriram e absorveram colostro e fêmeas gestantes (DIAL, 1995).

Em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) a FA apresenta concentrações plasmáticas variáveis entre 70 -145 UI/L (QUESENBERRY, 1994) e 4-16 UI/L (QUESENBERRY; CARPENTER, 2003), o que dificulta uma padronização quanto aos valores de referência.

As isoformas da Fosfatase Alcalina estão presentes em diversos tecidos, porém com maior atividade no fígado, ossos, intestino, rins e placenta. Elas podem ser diferenciadas pelas suas características eletroforéticas, mediante a inibição por levamisole e teste de inativação pelo calor (DIAL, 1995; DUNCAN et al., 1994; STEVEN; SCOTT, 2002).

A Isoforma óssea está presente na membrana plasmática de osteoblastos, acredita-se que esteja envolvida com a formação e a mineralização da matriz óssea. Sua atividade sérica é proporcional à formação de colágeno e geralmente correlaciona-se bem com o crescimento ósseo (GARNERO; DELMAS, 1993; FARLEY; BAYLINK, 1995; VIEIRA, 1999). A fosfatase alcalina óssea (FAO) predomina durante a infância e a adolescência, enquanto a hepática é maior em adultos e idosos (CHRISTENSON, 1997).

Para a diferenciação das isoformas óssea e hepática foram desenvolvidas técnicas como inativação pelo calor, inibição por L-fenilalanina e uréia, precipitação por germe de lecitina e eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida (GARNERO; DELMAS, 1993; FARLEY; BAYLINK, 1995; CHRISTENSON, 1997; VIEIRA, 1999).

5. METODOLOGIA

Todos os procedimentos realizados neste estudo foram previamente aprovados pelo Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia sob o número de registro CEUA/UFU 076/16.

5.1 Animais

Foram utilizados 32 coelhos adultos, com idade entre 6 e 7 meses, machos não castrados da raça Nova Zelândia, com massa corporal entre 3,0 e 4,0 kg, provenientes de um criador particular de Uberaba, MG. Eles foram mantidos em gaiolas individuais, no alojamento experimental do hospital Veterinário da UFU, recebendo ração uma vez ao dia e água à vontade. Após um período de 30 dias de alojamento, utilizado para adaptação ao ambiente e socialização com os pesquisadores, os animais foram submetidos a avaliações clínicas, hematológicas e exames radiográficos do antebraço direito nas posições látero-medial e dorso-palmar, para descartar qualquer anormalidade que pudesse interferir nos resultados do experimento.

Os coelhos foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos de 16 animais, grupo I controle (GI) e grupo II (GII) tratado com enxerto omental livre autógeno. Cada grupo foi subdividido em 2 subgrupos com oito animais cada e avaliados aos 45 e 90 dias de pós-operatório (PO) respectivamente.

Os animais do grupo controle foram identificados de GI1 a GI16, sendo de GI1 a GI8 avaliados até 45 dias de PO e os GI9 a GI16 até 90 dias de PO. Os animais do GII seguiram o mesmo padrão.

5.2 Pré-operatório

Para a indução das falhas, os animais foram anestesiados com a associação de cloridrato de cetamina ($90,0 \text{ mg.kg}^{-1}$, IM) e cloridrato de xilazina ($10,0 \text{ mg.kg}^{-1}$, IM) e anestesia locorregional por meio do bloqueio do plexo braquial do respectivo membro com cloridrato de lidocaína (7 mg.kg^{-1}). Para analgesia pré-operatória foi administrado cloridrato de tramadol ($2,0 \text{ mg.kg}^{-1}$, IM) e o anti-inflamatório flunixinina meglumina ($1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$, IM).

A região da pele entre a articulação escapulo umeral e metacarpo direito e a região ventral do abdome foram tricotomizadas, e submetida à anti-sepsia com clorexidine alcoólico 0,5%.

5.3 Procedimento cirúrgico

Todos os animais de ambos os grupos foram submetidos à criação da lesão óssea, seguido da celiotomia para obtenção do omento, ambas no mesmo momento cirúrgico. Para realização do procedimento cirúrgico, os coelhos permaneceram em decúbito lateral direito, foi realizada uma incisão de pele na região crânio medial, de aproximadamente 3,0 cm no terço médio do antebraço direito. O tecido subcutâneo e o músculo extensor radial do carpo foram identificados e afastados lateralmente. Com o auxílio de duas pinças Backaus o terço médio diafisario do rádio foi exposto e isolado das demais estruturas (Figura 1A). Foi utilizado uma régua metálica para demarcar a área do rádio a ser ostectomizada. Em seguida, sobre constante irrigação com solução de Ringer Lactato (Figura 1B) removeu-se um segmento ósseo com auxílio de disco diamantado acoplado a uma mini retifica elétrica, (Figura 1C), criando uma falha segmentar de 1 cm no rádio (Figura 1D).

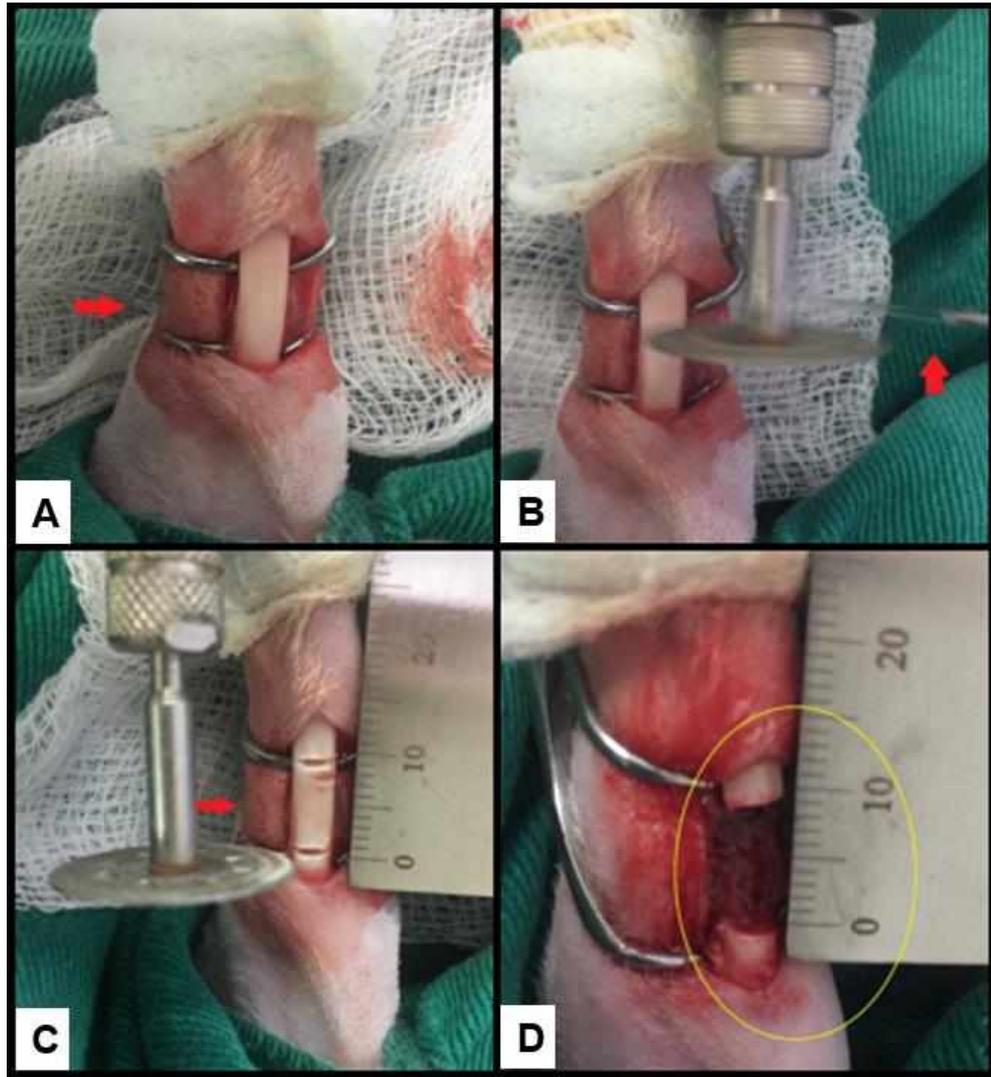


Figura 1 - Imagens fotográficas das principais etapas do procedimento cirúrgico experimental de criação de falha óssea segmentar de 01 cm no rádio de coelhos. **A**- Presença das pinças Bakaus expondo e isolando o terço médio do rádio (seta vermelha). **B**- Osteotomia com auxílio de disco diamantado acoplado a mini retífica elétrica sobre irrigação (seta vermelha). **C**- Demarcação de uma área de 1 cm do rádio a ser osteotomizada (seta vermelha). **D**- Falha óssea criada após remoção de um segmento de 01 cm do rádio (elipse amarela).

Para obtenção do enxerto omental foi realizada uma incisão retro umbilical de 2 cm na linha média abdominal ventral (figura 2A), incidindo pele, subcutâneo e linha alba (figura 2B). Após a abertura da cavidade foi exteriorizado um seguimento do omento maior (figura 3C), obtido um fragmento de aproximadamente 3 cm² (Figura 2D).

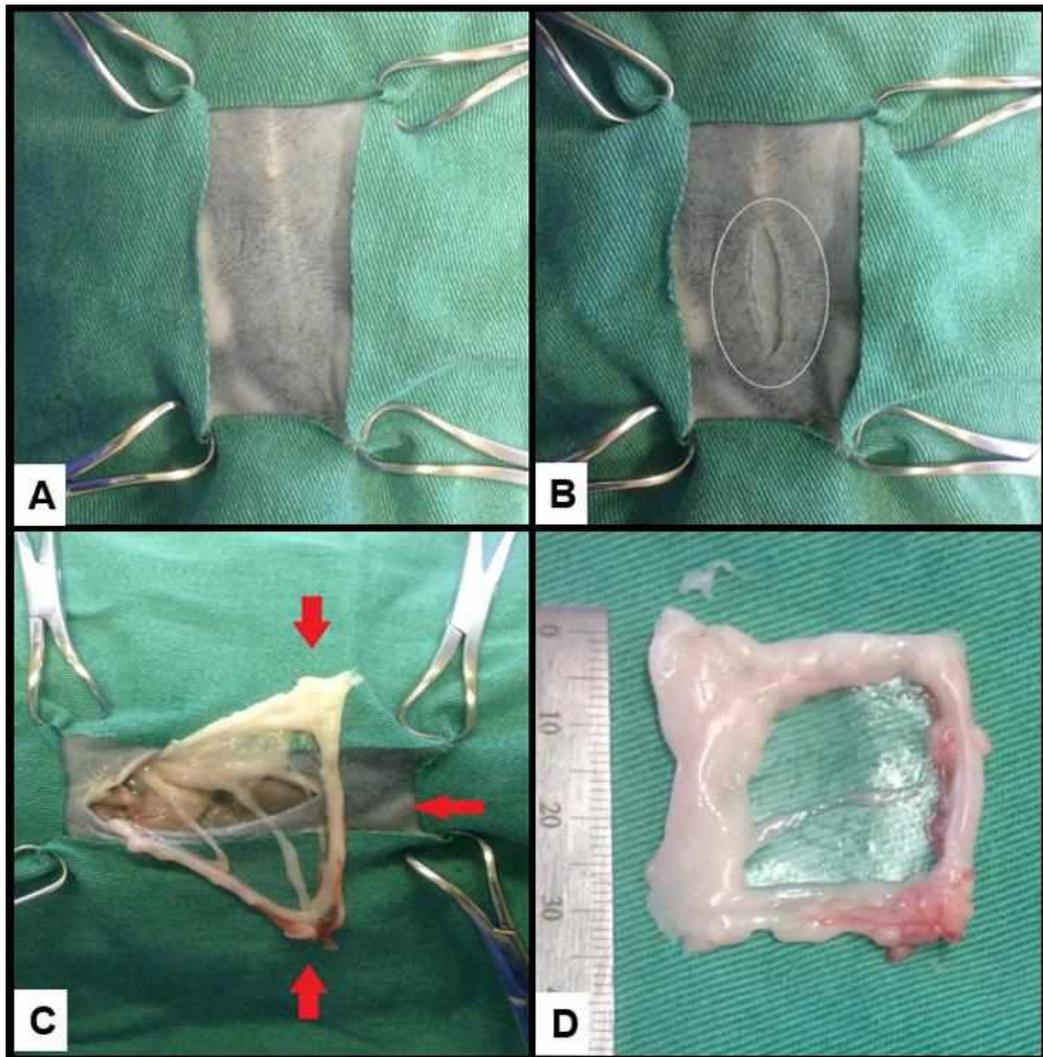


Figura 2- Imagem fotográfica ilustrando o procedimento cirúrgico para obtenção do enxerto omental livre autógeno por meio da celiotomia em coelho Nova Zelândia. **A-** região abdominal preparada para incisão. **B-** incisão retro umbilical medindo 2cm (elipse branca), **C-** exteriorização do omento maior (setas vermelhas), **D-** fragmento de omento medindo aproximadamente 3cm².

Os animais do grupo tratado (GII) tiveram as falhas ósseas cobertas com enxerto omental livre autógeno (figura 3 A e B). O mesmo foi coletado e transplantado imediatamente para o leito receptor. Em seguida os tecidos adjacentes à lesão óssea do Rádio foram aproximados com fio de poliglactina 910 nº 3-0 (figura 3C) em pontos padrão X, a síntese da pele foi realizada com pontos padrão Wolf com náilon nº 3-0 (figura 3D). Na região da celiotomia, a musculatura abdominal foi suturada com pontos em padrão X, o tecido subcutâneo reaproximado com pontos em padrão zig-zag, ambos utilizando o fio poligalactina 910 nº 3-0 e a pele suturada com nylon nº 3-0 em pontos tipo Wolf.

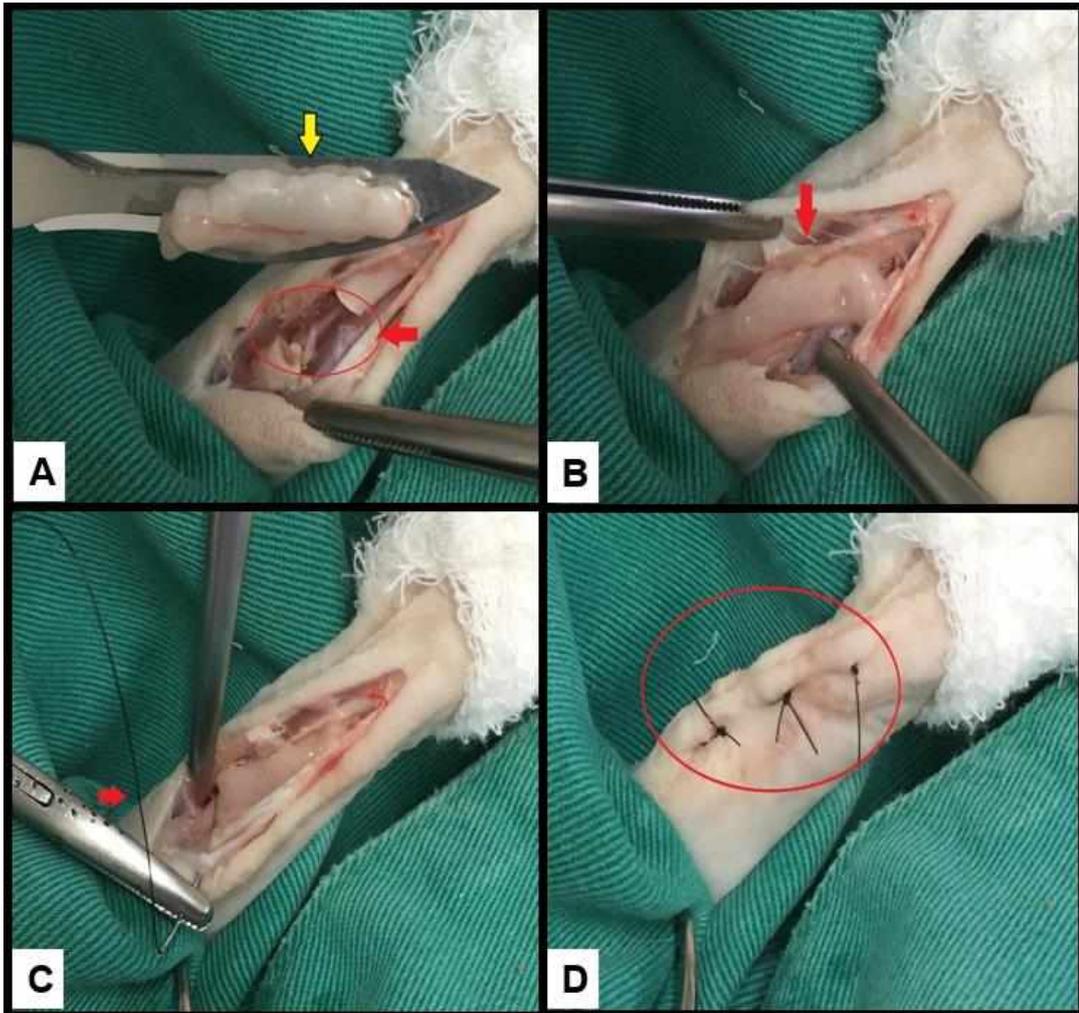


Figura 3- Imagem fotográfica ilustrando a transplantação do enxerto omental livre autógeno para o leito receptor, síntese de musculatura e pele. **A-** fragmento de omento preparado para a enxertia sobre a lâmina de bisturi (seta amarela) e a falha óssea segmentar do Rádio (seta vermelha). **B-** Fragmento de omento cobrindo a lesão óssea (seta vermelha). **C-** Reaproximação da musculatura sobre o enxerto e falha óssea (seta vermelha). **D-** Síntese de pele com pontos em padrão wolf (elipse vermelha).

5.4 Pós-operatório

As feridas cirúrgicas foram higienizadas uma vez ao dia com gaze umedecida em solução fisiológica a 0,9% com posterior aplicação tópica de Rifamicina por sete dias. Para controle da dor foi administrado o cloridrato de tramadol ($2,0 \text{ mg.kg}^{-1}$, SC), a cada 12 horas, o flunixin meglumina ($1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$, SC), a cada 24 horas, ambos por três dias e enrofloxacino (10 mg.kg^{-1} , SC), a cada 12 horas, durante 5 dias.

5.5 Avaliação radiográfica

No pós-operatório imediato todos os animais de ambos os grupos tiveram seus antebraços direitos radiografados na incidência látero-medial, na voltagem de 48,0 kV, distância de 1,0 metro foco filme e 0,16 segundos de exposição, sempre com o mesmo aparelho de raio X e filmes da marca Kodak MXG/Plus®.

O exame radiográfico foi repetido com 45 e 90 dias de PO em todos os animais de acordo com os períodos de acompanhamento pré-estabelecidos, sempre utilizando a mesma técnica.

Os filmes radiográficos foram visualizados em negatoscópio e as imagens capturadas utilizando câmera digital modelo Cyber-shot, SONY, 6 megapixels, zoom óptico de 3x, mantida em tripé há uma distância constante de 10 cm foco/filme. As imagens foram transferidas para uma planilha do software AutoCAD® 2016 (figura 4.A), onde a área de lesão do rádio de cada indivíduo foi obtida em mm² e avaliadas de acordo com os períodos de observação pré-estabelecidos (45 e 90 dias). Para tal utilizou-se a ferramenta “Polyline”, que consiste em delimitar manualmente todo o perímetro da falha óssea visualizada na imagem (figura 5.B). Posteriormente a área delimitada foi selecionada e executado o comando “LIST” na própria planilha, o qual efetuou o cálculo da área (figura 5.C e D). Para minimizar o erro, a planilha utilizada foi configurada especificamente para este fim empregando-se a ferramenta “SCALE” para padronizar o tamanho reduzir a discrepância entre as imagens radiográficas.

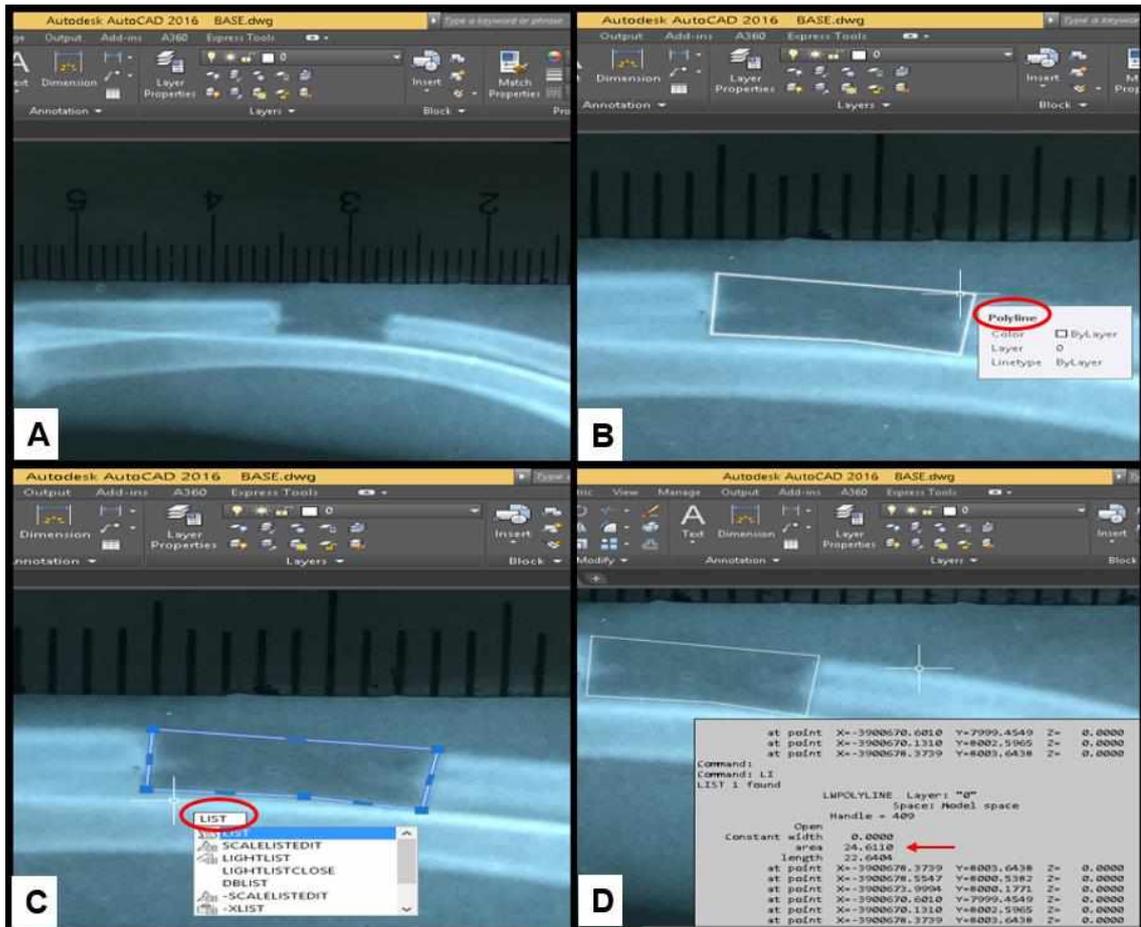


Figura 4 - Imagens “print screen” do programa AutoCAD® 2016, ilustrando as etapas executadas para a obtenção da área em mm² da falha no osso radio, de coelho Nova Zelândia. **A**- Transferência da imagem radiográfica para a planilha do AutoCAD 2016; **B**- Delimitação da falha óssea com a ferramenta *Polyline*, (elipse em vermelho); **C**- Seleção da área delimita e comando *LIST* (elipse em vermelho) para o cálculo da área; **D**- Resultado do cálculo da área em mm² (quadro cinza seta vermelha).

5.6 Dosagem fosfatase alcalina óssea (FAO)

Para a dosagem da fosfatase alcalina e suas frações, foram coletados 2 ml de sangue por meio de punção da veia marginal da orelha em tubos específicos para exame bioquímico, antes das cirurgias (dia 0), aos 45 e 90 dias após. A partir do sangue foi obtido o soro por centrifugação e determinada a fosfatase alcalina total (FA). A fração óssea foi obtida utilizando kit da GtLab[®] pelo método cinético com leitura semiautomática no aparelho BioPlus 2000 e desnaturação pelo calor respectivamente, de acordo com protocolo do fabricante. 10 µL do soro foram aquecidos a 56°C durante 15 minutos em banho Maria, visando promover o fim da atividade da isoenzima de origem óssea em quase 100 %. Ao fim deste processo o

oro foi novamente analisado no aparelho BioPlus 2000 utilizando kit GtLab[®] onde se obteve o valor da leitura, ao subtrair este da primeira leitura determinou-se a concentração da fosfatase alcalina óssea (FAO).

5.7 Eutanásia

Todos os animais de ambos os grupos, foram submetidos a eutanásia de acordo com seus períodos de observação (45 e 90 dias). Para tal, foram previamente anestesiados com associação de cloridrato de cetamina (90 mg.kg⁻¹ IM) e cloridrato de xilazina (10 mg.kg⁻¹ IM), e posteriormente aplicação de tiopental sódico a 2,5% na dose de 50 mg.kg⁻¹ por via endovenosa. Após constatação da parada respiratória foi administrado cloreto de potássio dose efeito por via endovenosa até a confirmação da parada cardíaca e morte. A eutanásia procedeu seguindo as normas recomendadas no Guia Brasileiro de Boas Práticas para a Eutanásia em animais (CFMV, 2012).

5.8 Avaliação macroscópica

Após a eutanásia, durante a coleta do material para avaliação histológica o antebraço direito e região abdominal, especificamente as regiões das feridas cirúrgicas foram avaliadas quanto á cicatrização, reações e coloração teciduais.

5.9 Análise microscópica

Foram coletados os seguimentos do terço médio do rádio, correspondentes as regiões das falhas, estes fragmentos foram fixados em formol a 10% tamponado, por um período mínimo de 48 horas, a temperatura ambiente. A descalcificação foi realizada em EDTA com pH 7,4, sendo este trocado a cada 2 dias durante 45 dias. Após a descalcificação as amostras foram enxaguadas em água destilada, desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina, segundo técnicas de rotina praticadas no laboratório de Histologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Foram confeccionadas 5 lâminas para cada peça, com cortes seriados longitudinais de cinco micrômetros de espessura, com 60 micrômetros entre si. Os cortes histológicos foram corados pela hematoxilina e eosina (HE) e analisadas em microscópio Olympus BX 40[®] acoplado à câmera Olympus OLY-200[®], ligada a um

computador PC com placa digitalizadora Data Translation 3153[®], onde as imagens foram analisadas e capturadas.

5.10 Análise Estatística

Foram realizadas as análises estatísticas dos valores obtidos da fosfatase alcalina óssea e da área de lesão no rádio obtida pelas imagens radiográficas nos respectivos dias de observação (0, 45 e 90 dias). Para análise dos dados referentes às áreas das falhas obtidas no software AutoCAD[®] 2016, os valores em mm² foram convertidos em porcentagem, sendo a medida da área obtida no dia zero (D0), considerada 100% e assim sucessivamente. As análises foram realizadas com auxílio do software R (RTM Foundation for Statistical Computing, Áustria). Inicialmente testou-se a normalidade dos resíduos (teste de Shapiro) e homocedasticidade das variâncias (teste de variância) de todos os parâmetros estudados. As concentrações de FA óssea foram comparadas entre os grupos de tratamento (gl=1), os dias após a lesão (gl=2) e a interação destes fatores (gl=5) pelo teste de ANOVA com medidas repetidas no tempo e pós-teste de Tukey, apresentando seus resultados como média \pm DP. A porcentagem da área de lesão obtida pelas análises das imagens radiográficas foi comparada entre os grupos de tratamento (gl=1), os dias após a lesão (gl=2) e a interação destes fatores (gl=5) pelo teste de Friedman, pós-teste de Dunns e seus resultados apresentam-se como mediana \pm intervalo interquartil (IQR). A significância foi fixada para todos os testes em 5% ($p < 0,05$).

6 RESULTADOS

6.1 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.

6.2 Avaliação macroscópica

Na avaliação macroscópica foi observado nos animais tratados a presença de um tecido semelhante ao adiposo e muscular aderidos no local das lesões, enquanto que nos controles apenas a aderência do tecido muscular adjacente era observada na área da lesão.

6.3 Dosagem da fosfatase alcalina óssea (FAO)

Os resultados da concentração da FAO obtida a partir da fosfatase alcalina total (FA), por meio da desnaturação pelo calor, não apresentaram diferença estatística entre os períodos analisados (0, 45 e 90 dias) ($p=0,41$) e nem entre os grupos (GI e GII) ($p=0,42$) (Figura 5)

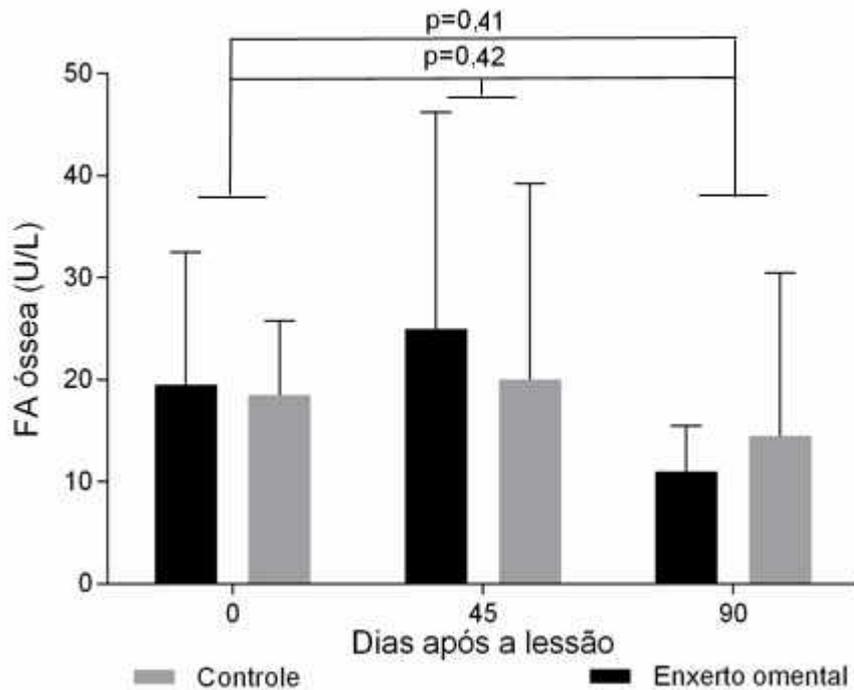


Figura 5- Representação gráfica apontando a similaridade na concentração plasmática da fosfatase alcalina óssea em relação aos grupos (controle e tratamento) e ao tempo de acompanhamento (0, 45 e 90 dias).

6.4 Avaliação radiográfica

As radiografias das lesões nos animais GI e GII, foram submetidas às avaliações descritiva e em planimetria digital, o que possibilitou a comparação das falhas ósseas tanto dia 0, 45 e 90 dias, respectivamente. As imagens obtidas no pós-operatório imediato (D0) mostraram falhas segmentares no osso Rádio, com 1cm de extensão, sem a presença de esquírolas ou quaisquer outras estruturas radiopacas em seus interiores (figura 6 e 7 A).

Aos 45 dias após as cirurgias (D45), as alterações foram similares nos animais dos GI e GII. Observou-se na maioria dos indivíduos de ambos os grupos, aumento de radiopacidade na região periosteal da ulna adjacente a falha, bem como nas regiões dos cotos, com preenchimento parcial da falha (figura 6 e 7 B).

Com 90 dias de pós-operatório (D90), a maioria dos indivíduos, tanto do GI quanto do GII, apresentavam preenchimento das falhas por material radiopaco, compatível com tecido ósseo, proveniente das extremidades. As alterações radiográficas foram semelhantes independente do tratamento (figuras 6 e 7 C).

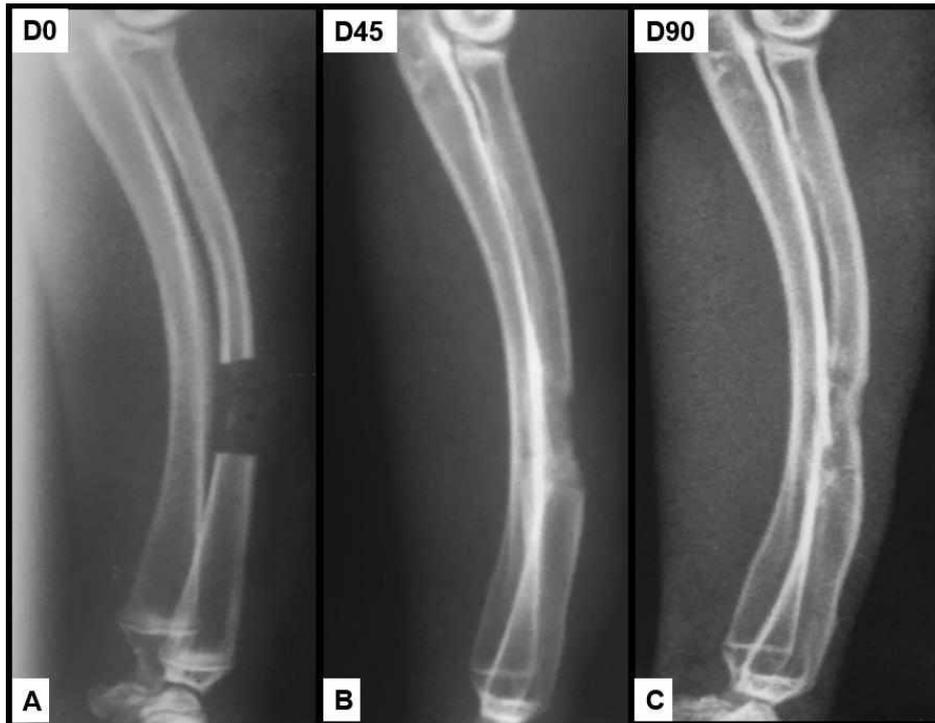


Figura 6. Imagens radiográficas obtidas no D0, D45 e D90, do osso rádio, de coelho da raça Nova Zelândia, do GI. **A-** falha segmentar do osso rádio medindo 1cm; **B-** aumento da radiopacidade na região dos cotos preenchendo parcialmente a falha e reação periosteal na ulna adjacente; **C-** preenchimento da falha por material radiograficamente compatível com osso neoformado.



Figura 7. Imagens radiográficas obtidas no D0, D45 e D90, do osso rádio, de coelho da raça Nova Zelândia, do GII. **A-** falha segmentar do osso rádio medindo 1cm; **B-** aumento da radiopacidade na região dos cotos preenchendo parcialmente a falha e reação periosteal na ulna adjacente; **C-** preenchimento da falha por material radiograficamente compatível com osso neoformado.

Na avaliação por planimetria digital no programa AutoCAD[®]16, os valores referentes as áreas radiolucidas das imagens radiográficas das falhas ósseas, convertidos em porcentagem, foram analisadas estatisticamente. Os resultados demonstraram que as áreas das falhas ósseas diminuíram significativamente ($p < 0,01$) aos 45 e 90 dias, sendo a redução percentual de, $57 \pm 46\%$ e de $73 \pm 21\%$ respectivamente, entretanto não houve diferença entre esses períodos de acompanhamento ($p = 0,13$) e nem em relação aos GI e GII ($p = 0,99$) (Figura 8).

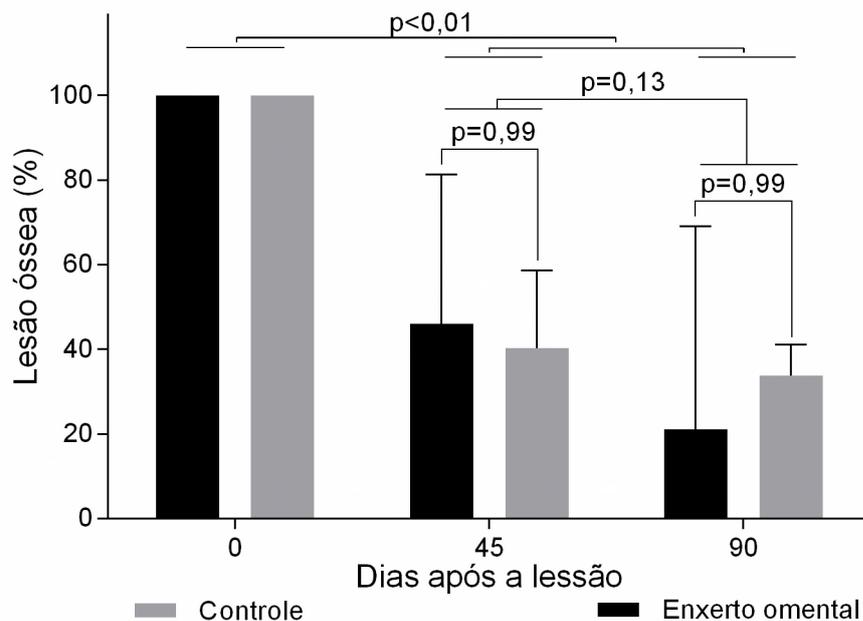


Figura 8- Representação gráfica mostrando a redução da porcentagem das áreas radiolucidas das lesões visualizadas nas imagens radiográficas aos 45 e 90 após suas induções e a similaridade em relação aos grupos (controle e tratamento).

6.5 Avaliação histológica

Na avaliação dos cortes histológicos da região da falha óssea induzida no rádio, corados com HE, notou-se em ambos os grupos GI e GII, uma evolução semelhante quanto ao processo de regeneração óssea, tanto aos 45, quanto aos 90 dias respectivamente.

Nas lâminas do GI, analisadas aos 45 dias de pós-operatório, observou-se ossificação intramembranosa (OI) próxima aos cotos e endocondral (OC) espalhada pela falha óssea, ambas originando osso esponjoso (OE) (figura 9A).

Freqüentemente foi possível observar neoformação óssea a partir do coto, com uma área de transição entre o osso compacto e o osso neoformado que apresentava osteoblastos, caracterizando ossificação intramembranosa (figura 9B).

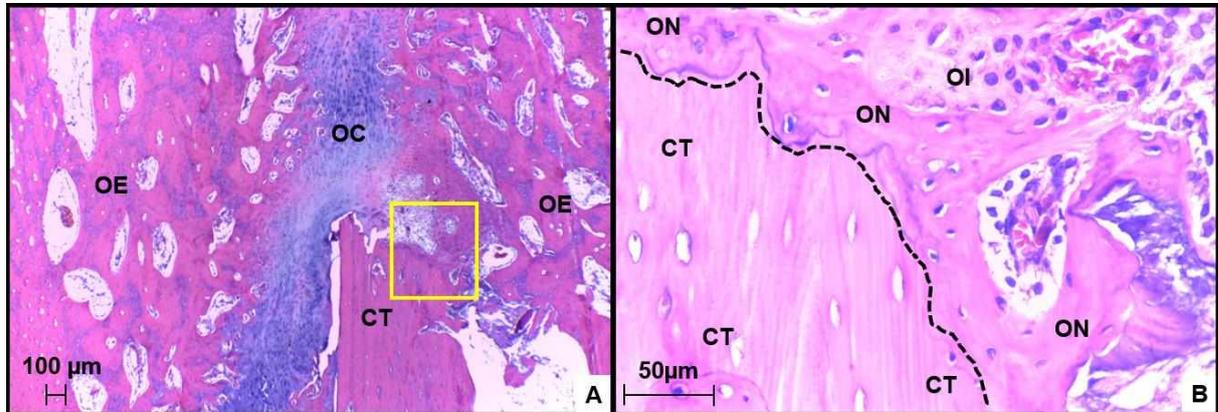


Figura 9. Fotomicrografia do processo de regeneração da falha óssea de coelho Nova Zelândia do GI, 45 dias após procedimento cirúrgico. **A-** observar ossificação endocondral (**OC**) próxima ao coto (**CT**) formado por osso cortical e entremeado no osso esponjoso neoformado (**OE**); **B-** mostra seleção do quadro amarelo em A, onde se pode notar osso neoformado (**ON**), ossificação intramembranosa (**OI**), a transição (**linha tracejada em preto**) entre o osso compacto do coto (**CT**) e osso neoformado (**ON**). Coloração com HE.

Aos 90 dias, 60% das laminas do GI apresentavam regiões de ossificação endocondral (OC) com hipertrofia de condrócitos e pontos de calcificação da matriz cartilaginosa e osso esponjoso preenchendo todo o interior das falhas (figura 10). No entanto ainda era possível observar pequenas áreas com tecido conjuntivo (TC) e atividade osteoblástica moderada. Nos 40% restante, a falha estava parcialmente preenchida com osso esponjoso com origem nas extremidades e o centro das lesões era coberto por uma faixa de tecido conjuntivo, porém menor que o observado aos 45 dias.

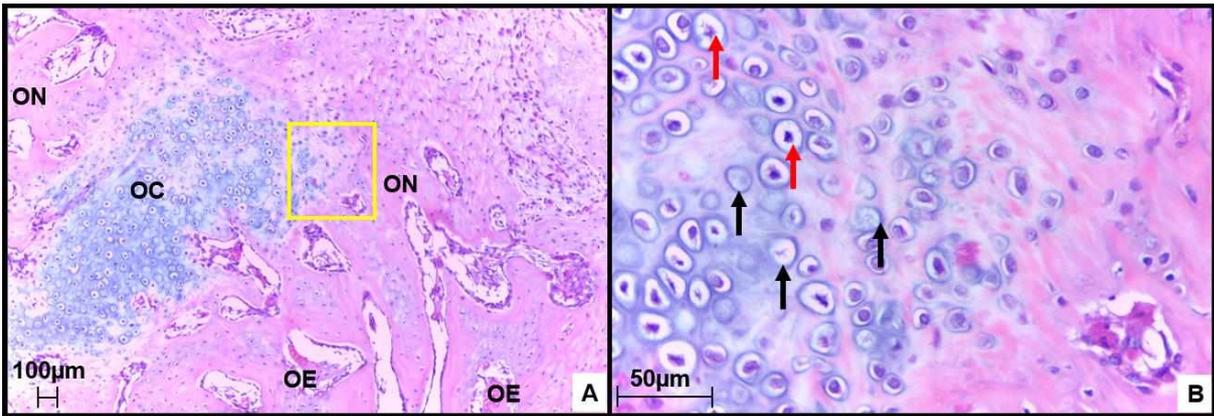


Figura 10. Fotomicrografia mostrando a ossificação endocondral no osso rádio, de coelho Nova Zelândia do GI, 90 dias após procedimento cirúrgico. Em **A** é possível observar processo de ossificação endocondral (**OC**), neoformação óssea (**ON**) e osso esponjoso (**OE**); **B** mostra seleção do quadro amarelo em **A**, onde é possível notar condrócitos hipertrofiados (setas vermelhas) e calcificação da matriz cartilaginosa (setas pretas). Coloração com HE.

Nas lâminas dos indivíduos pertencentes ao GII analisados aos 45 dias, notou-se tecido conjuntivo interposto entre as extremidades osseas da falha, com áreas de ossificação endocondral e intramembranosa, osso esponjoso e osteoblastos ativos proximo aos cotos. No centro da falha, interposto ao tecido conjuntivo era possível notar um infiltrado mononuclear e células gigantes entremeados ao enxerto omental caracterizando processo de absorção, semelhante ao que ocorre na presença de corpo estranho, ou seja, o omento atuou como barreira para o processo de ossificação (figura 11).

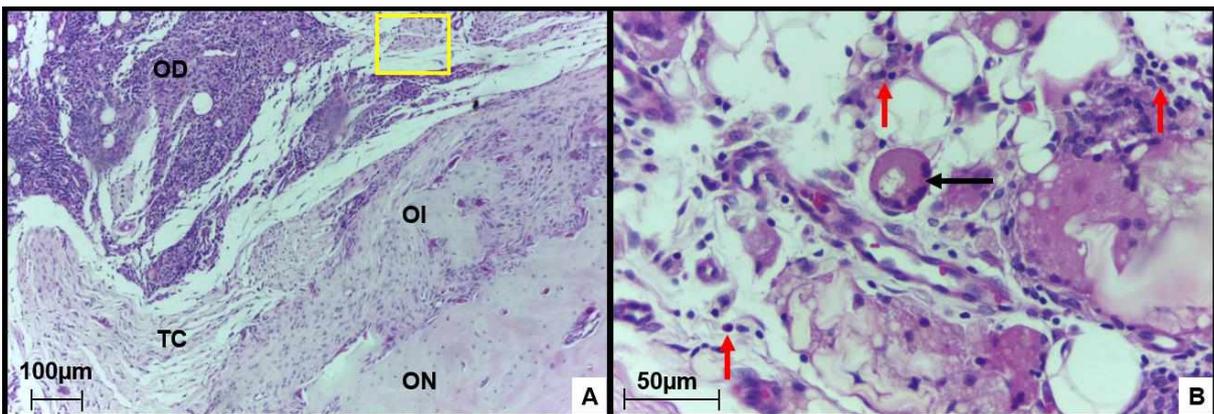


Figura 11. Fotomicrografia evidenciando infiltrado mononuclear em meio ao enxerto omental na falha óssea, de coelho Nova Zelândia do GII, 45 dias após procedimento cirúrgico. Em **A** é possível observar omento sendo absorvido com presença de infiltrado mononuclear (**OD**), tecido conjuntivo (**TC**), osso neoformado (**ON**), ossificação intramembranosa (**OI**); Em **B** observa-se ampliação da região demarcada pelo quadro amarelo em **A**, onde é possível notar presença de mononucleares (seta vermelha) e célula gigantes (seta preta). Coloração com HE.

Nos indivíduos do GII analisados aos 90 dias de pós operatorio, não foi observada evolução satisfatória quando comparado aos analisados aos 45 dias do mesmo grupo, nos quais notou-se a presença de tecido conjuntivo em processo de ossificação no interior da falha óssea junto ao enxerto omental que se apresentava em avançado processo de absorção permeado por infiltrado mononuclear e células gigantes, ainda impedindo o avanço da ossificação proveniente das extremidades da falha óssea (figura 12). Somente em 37% dos indivíduos deste grupo notou-se a falha óssea quase totalmente preenchida por neoformação óssea.

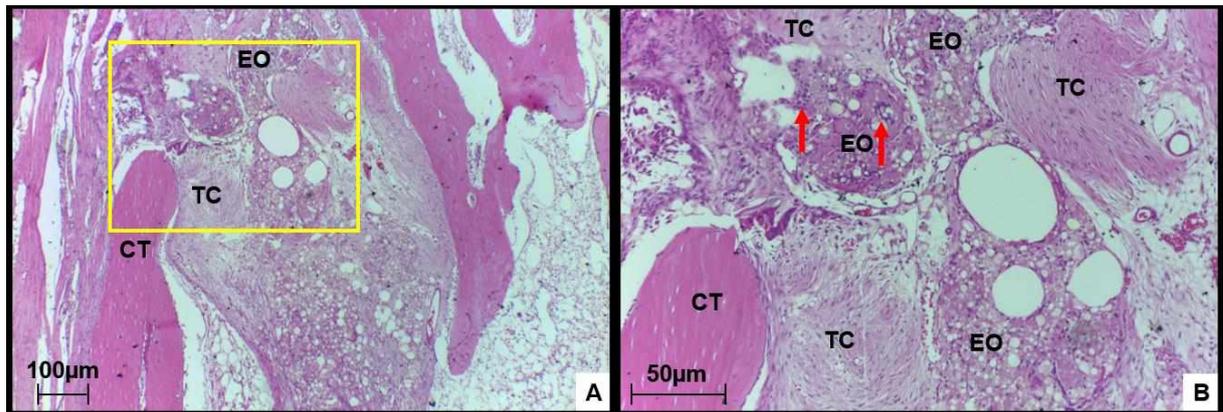


Figura 12. Fotomicrografia de falha óssea em processo de regeneração no osso rádio, de coelho Nova Zelândia do GII, 90 dias após procedimento cirúrgico. Em **A** é possível notar região de falha óssea em processo de regeneração, omento em processo avançado de absorção (**EO**), tecido conjuntivo em processo de ossificação (**TC**) e contorno de tecido ósseo cortical (**CT**); Em **B** observa-se ampliação da região demarcada pelo quadro amarelo em **A**, onde é possível notar coto da falha óssea (**CT**), tecido conjuntivo em processo de ossificação (**TC**), resíduo de enxerto omental no interior da falha óssea (**EO**), com infiltrado mononuclear (**seta vermelha**). Coloração com HE.

7. DISCUSSÃO

O coelho (*Oryctolagus cuniculus*) foi um dos primeiros animais utilizados em experimentação animal. Existem relatos de sua utilização por Pasteur em 1884, quando demonstrou que cães podiam ser imunizados contra o vírus da raiva, por meio da inoculação de conteúdo medular dissecado de coelhos infectados experimentalmente com este patógeno (COUTO, 2002).

A raça Nova Zelândia foi escolhida por ser reconhecidamente dócil, de fácil manejo e sua uniformidade nos resultados das provas experimentais. Além disso é uma das espécies mais utilizadas em pesquisas que envolvem a fisiopatologia óssea, pois se comparados a outros animais de laboratório, apresentam uma regeneração mais rápida deste tecido (COUTO, 2002; LACRETA JUNIOR, 2010).

Por serem machos, os animais foram mantidos em gaiola individuais visando-se evitar brigas e mutilações. A opção de se trabalhar com animais machos foi no intuito de evitar a influência de fatores hormonais e reprodutivos, já que fêmeas podem apresentar, além de pseudogestação, quando mantidas próximas umas das outras, alterações hormonais a depender da fase do ciclo estral (COUTO, 2002).

Vários pesquisadores utilizaram o coelho como modelo experimental para a execução de técnicas que envolveram lesões ósseas. Os objetivos foram em geral, avaliar a eficiência e aplicabilidade de enxertos, técnicas cirúrgicas ortopédicas, uso de fatores de crescimento e utilização de materiais biológicos e sintéticos como indutores de crescimento ósseo. Para tal a ostectomia do osso rádio foi uma das técnicas mais praticadas (MIRANDA et al., 2005; CIANI et al., 2006; DEGHANI et al., 2008; KASTEN et al., 2008). A ostectomia do rádio é amplamente utilizada devido à estabilidade proporcionada pela sinostose com a ulna, que mesmo após a retirada de um segmento se mantém estável sem a necessidade de imobilização do membro (DEL CARLO et al., 2001; MORAES et al., 2004).

O protocolo anestésico proposto neste estudo foi semelhante ao praticado por Oloumi e colaboradores (2006) no qual utilizaram, com sucesso, 90 mg.kg⁻¹ de cetamina em associação com 10 mg.kg⁻¹ de xilazina por via intramuscular.

Para complementar a anestesia, no presente estudo optou-se ainda pelo bloqueio dos nervos do plexo braquial com lidocaina, o que proporcionou analgesia satisfatória, reduzindo significativamente o desconforto dos animais à manipulação

cirúrgica e no pós-operatório imediato durante o exame radiográfico. O bloqueio do plexo braquial nesta espécie se mostrou viável e eficiente, dada a facilidade de administração, custo do anestésico e o efeito obtido.

A opção por utilizar uma dose maior de cetamina e xilazina que a praticada em outros experimentos (MORAES et al., 2004; LACRETA JUNIOR et al., 2010) ocorreu porque segundo Lacreata Junior et al. (2010) em estudo no qual também realizaram ostectomia no Rádio de coelhos, 30 mg.kg⁻¹ de cetamina associada a 2 mg.kg⁻¹ de xilazina foram insuficientes na tranquilização e analgesia dos animais, sendo necessário, para complementar, o emprego de anestesia volátil com isoflurano por meio de máscara. No presente estudo o protocolo anestésico foi efetivo e seguro sem necessidade de administração de doses complementares minimizando os riscos de complicações anestésicas, o que foi posteriormente confirmado, já que não houveram perdas decorrentes das anestésias.

As cirurgias realizadas neste experimento para a indução das falhas segmentares de 1 cm nos rádios dos coelhos foram bem-sucedidas, com duração média de 15 minutos demonstrando a reprodutibilidade da técnica anteriormente praticado por outros pesquisadores (DEL CARLO et al., 2001; JUNQUEIRA et al., 2003; CIANI et al., 2006; LACRETA JUNIOR, 2010).

As celiotomias para a obtenção dos enxertos a partir do omento maior duraram em média 5 minutos, sem quaisquer intercorrências, o que contribuiu na rápida recuperação com ausência de morbidade adicional. Este mesmo achado foi descrito por Saifzadeh et al. (2009), em trabalho no qual também realizaram celiotomia para coleta de enxerto a partir do omento maior.

Durante as observações pós cirúrgicos, não foram observadas complicações, o protocolo estabelecido com antibiótico, anti-inflamatório, analgésico e curativo tópico se mostrou eficaz.

Na avaliação macroscópica, realizada durante a coleta do segmento do rádio para avaliação histológica, ao fim dos períodos preestabelecidos, notou-se a cicatrização completa das feridas cirúrgicas nos antebraços e na região abdominal, com restabelecimento inclusive da cobertura pilosa. Vilardo (2007), em estudo realizado com coelhos, não recomendou sutura da pele com fio de náilon nesta espécie, devido ao risco de reação inflamatória tecidual, com formação de edema e

exsudato, entretanto no presente estudo o fio de nylon utilizado nas suturas da pele do antebraço e região abdominal não acarretou distúrbios na cicatrização.

A dosagem dos biomarcadores do metabolismo ósseo é uma importante ferramenta clínica no acompanhamento dos processos de formação e absorção óssea. É um procedimento relativamente rápido e menos invasivo, se comparado a densitometria e a biópsia respectivamente (CHRISTENSON, 1997).

A FAO é um dos biomarcadores da formação óssea (SARAIVA; LAZARETTI-CASTRO, 2002). E segundo Dial (1995), o seu aumento nos níveis plasmáticos, está relacionado ao aumento da atividade osteoblástica.

Acreditava-se que, caso o enxerto omental livre autógeno apresentasse um efeito benéfico no processo de regeneração óssea, e conseqüentemente haveria um aumento significativo nos níveis plasmáticos da FAO nos animais do GII, fato que não ocorreu.

O discreto aumento da concentração da FAO aos 45 dias de pós-operatório em ambos os grupos, pode ser explicado pela presença de osteoblastos ativos na superfície da matriz óssea neoformada, notada no interior das falhas neste período através do exame microscópico. Segundo Ustáriz et al. (1998) a FAO está presente na membrana plasmática de osteoblastos e relacionada à capacidade de mineralização. Atua controlando os inibidores da mineralização, aumentando a concentração local de íons fosfatos, removendo-os de outras proteínas, atuando como transportador iônico.

O exame radiográfico possibilitou a avaliação das alterações ocorridas nas falhas ósseas durante o período de acompanhamento. Vários autores utilizaram esta ferramenta para o mesmo fim em seus estudos, nos quais as avaliações foram realizadas por meio de visualização e interpretação das alterações radiográficas encontradas, como por exemplo, reações periosteais e presença de material radiopaco no interior das falhas (BARROS et al., 2001; DEL CARLO et al., 2001; CIANI et al., 2006; DEHGhani et al., 2008; KASTEN et al., 2008). No entanto neste estudo, além da avaliação descritiva, optou-se pela mensuração da área radiolúcida das falhas e a comparação das medidas encontradas nos dias 0, 45 e 90, por meio de planimetria digital e teste estatístico respectivamente. Acredita-se que com esse método, a avaliação tenha sido mais precisa.

A análise estatística apontou redução da radiolucência nas lesões somente em relação ao tempo ($p < 0,01$), fato semelhante ao encontrado no experimento de Lacreta Junior et al. (2010), ao estudar o comportamento de falhas ósseas segmentares de 1 cm induzidas experimentalmente nos ossos Rádio de coelhos, onde observaram que esse tipo de falha se encontrava parcialmente preenchido por material radiopaco 30 dias após suas induções.

Em relação a utilização do enxerto omental livre autógeno, não houve diferença radiográfica ($p = 0,99$) em nosso trabalho, contrariando os resultados apresentados por outros autores, nos quais este mesmo tipo de enxerto foi associado a uma melhor regeneração óssea.

Smolec et al. (2010) em trabalho no qual preencheram falhas ósseas críticas induzidas no rádio de coelhos, com enxerto omental livre autógeno, constataram na avaliação radiográfica por densitometria, 6 semanas após as cirurgias, melhor regeneração das falhas quando comparado ao controle. Entretanto, as falhas foram visivelmente menores do que as induzidas no presente estudo, o que pode ter favorecido o processo de regeneração. Vale ainda ressaltar que não foi realizada avaliação histológica do local da enxertia, para avaliar a interação entre o enxerto e o leito receptor, como o realizado neste trabalho onde foi possível notar a presença do enxerto omental em processo de absorção no interior da falha.

Saifzadeh et al. (2009) em um modelo experimental de não união óssea em cães, no qual também utilizaram o enxerto omental livre autógeno, constataram por meio do exame radiográfico a consolidação das lesões aos 4 meses no grupo tratado enquanto que no grupo controle persistiu a não união. Neste caso, as lesões induzidas foram de 2mm transversais no Rádio e o enxerto omental foi colocado sobre o defeito. Em outro estudo realizado por Baltzer et al. (2015) o enxerto omental livre autógeno também foi colocado sobre fraturas diafisárias no Rádio de cães, fixadas com placas, apresentando resultado semelhante. Já no presente trabalho o enxerto omental foi colocado dentro da falha, o que provavelmente impediu um processo de consolidação satisfatório, pois o mesmo atuou como corpo estranho, conforme constatado no exame histológico.

Segundo Bigham-Sadedegh et al. (2012) o enxerto omental livre autógeno teve um efeito benéfico sobre falhas ósseas segmentares de 1cm experimentalmente induzidas e estabilizadas com placas, no rádio de cães com

peso aproximado de 25 kg. Ainda de acordo com esses autores, o omento favoreceu a angiogênese, proporcionando um microambiente favorável à produção de células osteo-progenitoras (osteoblastos) a partir de células mesenquimais no leito receptor. O que não ocorreu em nosso estudo, provavelmente pela maior dimensão do defeito ósseo proporcionalmente ao nosso modelo experimental, onde o enxerto omental ainda estava presente aos 90 dias permeado por infiltrado mononuclear e células gigantes, impedindo o avanço da ossificação proveniente das extremidades da falha óssea.

Os achados histológicos quanto ao processo de regeneração óssea foram semelhantes no GI e GII, tanto aos 45, quanto aos 90 dias de pós-operatório. O predomínio da ossificação intramembranosa próximo aos cotos e a ossificação endocondral espalhada mais ao centro das falhas, próximo ao enxerto, foram semelhantes as ocorridas em trabalho realizado por Junqueira et al. (2003), no qual utilizaram matriz óssea desmineralizada na enxertia de falhas ósseas semelhantes às do presente estudo na mesma espécie animal. Segundo Nidoli et al. (1999), a predominância de ossificação intramembranosa na periferia do enxerto pode ser explicada pela maior tensão de oxigênio neste local, devido a presença de vasos dos tecidos adjacentes. Já a ossificação endocondral neste caso predomina nas áreas com menor capilaridade e conseqüentemente, menor tensão de oxigênio.

Um achado comum no GII, em ambos os períodos, foi a presença do enxerto omental em processo de absorção, entremeado por infiltrado mononuclear e células gigantes, atuando como uma barreira ao processo de ossificação no interior das falhas, caracterizando uma reação do tipo corpo estranho. Acredita-se que esta alteração possa ter prejudicado a regeneração óssea, como o relatado por Silva et al. (2009) em trabalho cujo a tromboplastina originária do cérebro de coelhos, utilizada na confecção de gel com plaquetas, enxertado em falhas ósseas parietais em coelhos, também causou reação tipo corpo estranho com características semelhantes as encontradas no presente estudo.

O processo de absorção do enxerto, observado no GII pode ser devido à ausência de uma origem vascular, fato que pode ter contribuído com o processo de degeneração do mesmo no leito receptor.

Na maioria dos trabalhos consultados o enxerto omental livre foi utilizado com sucesso, no entanto vale resaltar que as falhas induzidas nestes experimentos foram

menores ou monocorticais. Oloumi et al. (2006), por exemplo trabalharam com falhas monocorticais de 2mm na tíbia de coelhos. Sotoudeh et al. (2013) utilizaram o enxerto omental livre isoladamente, e em associação com nanofibras de poli L-ácido láctico sobre orifício cortical de 3mm induzido na tíbia de coelho. Saifzadeh et al. (2009), também utilizaram este mesmo padrão de enxerto sobre falhas transversais completas de 2mm na diáfise do rádio de cães. Ree et al., (2016) relataram sobre o sucesso da omentalização em artrodeses e Baltzer et al., (2015) em fraturas fixadas com placas em cães. Em ambas as situações, os resultados foram favoráveis. A diferença nestes casos em relação ao presente experimento, e que além das falhas ósseas terem sido menores, os enxertos permaneçam externos a elas.

Acreditamos que falhas menores como as observadas na literatura consultada, provavelmente dificultaram a penetração dos enxertos omentais em seus interiores, permanecendo estes externos a lesão, servindo como plataforma para o crescimento periosteal,

Já no presente estudo a extensão da falha induzida favoreceu a presença física do enxerto omental dentro da lesão, atuando como barreira, promovendo uma maior diferenciação de células mesenquimais em células com características fibroblásticas, ao invés de células osteogênicas.

8. CONCLUSÃO

O enxerto omental autógeno livre, no tratamento de falhas ósseas de 1cm de extensão na diáfise do osso Rádio de coelhos Nova Zelândia não influenciou o processo de regeneração. Na avaliação histológica constatou-se que este enxerto, atuou como um corpo estranho dentro da falha óssea, contudo não interferiu nos resultados entre os grupos, que foram semelhantes.

9. REFERÊNCIAS

AKESSON, K. Biochemical markers of bone turnover: a review. **Acta Orthop. Scand.**,Kobenhavn, v. 66, n. 4, p. 376-386, Aug. 1995. <https://doi.org/10.3109/17453679508995567>

AZUMA, H.; KONDO, T.; MLKAMI, M.; HARH, K. Treatment of chronic osteomyelitis by transplantation of autogenous omentum with microvascular anastomosis. A preliminary report. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 47, n. 3, p. 271–275, 1976. <https://doi.org/10.3109/17453677608991990>

BALTZER, W. I.; COOLEY, S.; WARNOCK, J. J.; NEMANIC, S.; STIEGER-VANEGAS, S. M. Augmentation of diaphyseal fractures of the radius and ulna in toy breed dogs using a free autogenous omental graft and bone plating. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, 28(02), 131-139, 2015. <http://doi:10.3415/vcot-14-02-0020>

BARCKMAN, J.; BAAS, J.; SØRENSEN, M.; BECHTOLD, J. E.; SOBALLE, K. Rinsing of allograft bone does not improve implant fixation: A study in 12 dogs. **Acta Orthopaedica**, v. 84, n. 3, p. 307-313, 2013. <https://doi.org/10.3109/17453674.2013.797314>

BARROS, S. V.G.; DEL CARLO, R.G.; VILORIA, M.I.; GALVÃO, S. R.; MAIA FILHO, A.; OLIVEIRA, D.R. Auto-enxerto percutâneo de medula óssea. ii. reparação de falhas segmentares produzidas no rádio de coelhos1. **Ciência Rural**, v. 31, n. 4, 2001.

BIGHAM-SADEGH, A.; MIRSHOKRAEI, P.; KARIMI, I.; ORYAN, A.; APARVIZ, A.; SHAFIEISARVESTANI, Z. Effects of adipose tissue stem cell concurrent with greater omentum on experimental long-bone healing in dog. **Connective Tissue Research**, 53(4), 334-42, 2012. <http://doi.org/10.3109/03008207.2012.660585>

BRINKER, W. O.; PIERMATTEI, D. L.; FLO, G. L. Transplante ósseo. 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. 3, p. 45-49.

CASTIGLIA, M. T.; DA 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. <https://doi.org/10.1590/S0102-36162009000100005>

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. <https://doi.org/10.1590/S1413-78522009000600004>

COUTO, Sebastião Enes Reis. Criação e manejo de coelhos. Em: ANDRADE, A.; PINTO, SC.; OLIVEIRA, RS. orgs. **Animais de Laboratório: criação e experimentação [online]**. Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ, 2002, p.93-103.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA- CFMV. **Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais - Conceitos e Procedimentos Recomendados** - Brasília, 2012

CHRISTENSON, R. H. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. **Clinical Biochemistry**. Toronto, v. 30, n. 8, p. 573-593, Dec. 1997. [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(97\)00113-6](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(97)00113-6)

CIANI, R. B.; RAHAL, S. C.; VOLPI, R. S.; TAGA, R.; GRANJEIRO, J. M.; CESTARI, T. M.; MAMPRIM, M. J. Mistura de proteínas morfogenéticas ósseas, hidroxiapatita, osso inorgânico e colágeno envolta por membrana de pericárdio no preenchimento de defeito ósseo segmentar em coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, p. 59-67, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352006000100010>

DEHGHANI, S. N.; BIGHAM, A. S.; NEZHAD, S. T.; SHAFIEI, Z. Effect of bovine fetal growth plate as a new xenograft in experimental bone defect healing: radiological, histopathological and biomechanical evaluation. **Cell and tissue banking**, v. 9, n. 2, p. 91-99, 2008. <https://doi.org/10.1007/s10561-008-9062-7>

DEL CARLO, R. J.; VILORIA, M. I.; GALVÃO, S. R.; MAIA FILHO, A.; OLIVEIRA, D. R. Auto-enxerto percutâneo de medula óssea: II. Reparação de falhas segmentares produzidas no rádio de coelhos. **Ciência Rural**, v. 31, n. 4, p. 627-632, 2001. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782001000400011>

DENNY, H. R.; BUTTERWORTH, S. J. Fracture healing. In: DENNY, H. R.; BUTTERWORTH, S. J. **A Guide to Canine and Feline Orthopaedic Surgery**. 4. ed. Oxford: Blackwell Science, 2000. cap. 1, p 3-17.

DENNY, H. R.; BUTTERWORTH, S. J. Bone grafts. In: DENNY, H. R.; BUTTERWORTH, S. J. **A Guide to Canine and Feline Orthopaedic Surgery**. 4. ed. Oxford: Blackwell Science, 2000. Cap. 2, p. 18-24.

DIAL, S.M. Clinicopathologic evaluation of the liver. **The Veterinary Clinics of North America**, v. 25, p. 257-273, 1995. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(95\)50026-9](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(95)50026-9)

DUNCAN, J.R.; PRASSE, K.W.; MAHAFFEY, E.A. Liver. **Veterinary laboratory medicine: clinical pathology**. 3. ed. IOWA: State University, 1994. p.130-151.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. Distúrbios das articulações e do esqueleto. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária: Moléstias do cão e do gato**. 4. ed. São Paulo: MANOLE, 2003. v. 2, cap. 150, p. 2867-2904.

FARLEY, J.; BAYLINK, D. J. Skeletal alkaline phosphatase activity in serum. **Clinical chemistry**, New York, v. 41, n. 11, p. 1551-1553, Nov. 1995.

FERREIRA, M. L.; SILVA, P. C.; PEREIRA, L. D. P. M.; FRANCO, R. S.; MELLO, N. B.; AMARAL, A. C.; SCHANAIDER, A. Modelo experimental em ratos para o desenvolvimento de pseudoartrose. **Revista Do Colégio Brasileiro De Cirurgiões**, v.36, n.6, p. 514-518, 2018. <https://doi.org/10.1590/S0100-69912009000600010>

FERRIGNO, C. R. A.; ITO, K. C.; CAQUIAS, D. F. I.; MARIANI, T. C.; NINA, M. I. D.; FERRAZ, V. C. D. M.; ROMANO, L. Retalho de omento maior para indução de vascularização e consolidação óssea em cão. **Ciência Rural**, v. 40, p. 2033–2036, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782010000900029>

GARNERO, P.; DELMAS P. D. Assessment of the serum levels of bone alkaline phosphatase with a new imunoradiometric assay in patients with metabolic bone disease. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.**, Philadelphia, v. 77, n. 4, p. 1046-1053, Oct. 1993. <https://doi.org/10.1210/jcem.77.4.8104954>

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Paratormônio, calcitonina, metabolismo do cálcio e fosfato, vitamina D, ossos e dentes. In: GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 11. ed. São Paulo: Elsevier, 2006. Cap. 79, p. 978-995.

HOSGOOD, G. The omentum - The forgotten organ: physiology and potencial surgical applications in dogs and cats. **Compendium on continuing education for the practicing veterinarian**, v. 12, n. 1, p. 45 – 50, 1990.

HULTMAN, C. S.; CARLSON, G. W.; LOSKEN, A., JONES, G.; CULBERTSON, J.; MACKAY, G.; JURKIEWICZ, M. J. Utility of the omentum in the reconstruction of complex extraperitoneal wounds and defects: donor-site complications in 135 patients from 1975 to 2000. **Annals of Surgery**. 2002;235:782–95.
[http:// DOI: 10.1097/00000658-200206000-00005](http://DOI:10.1097/00000658-200206000-00005)

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.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan. cap. 8, p. 136-153. 2013

JUNQUEIRA, A. M. D. S. R.; CARLO, D.; SAYEGH, M. I. V. V. A.; FILGUEIRAS, S. R. R. Matriz óssea homóloga desmineralizada na preparação de falhas ósseas segmentares produzidas no rádio de coelhos. **Ciência Rural**, v. 33, n. 3, 2003.

KASTEN, P.; VOGEL, J.; GEIGER, F.; NIEMEYER, P.; LUGINBÜHL, R.; SZALAY, K. The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects. **Biomaterials**, v. 29, n. 29, p. 3983-3992, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.06.014>

KIERSZENBAUM. A. L; TRES, L. L. Osteogênese. In: KIERSZENBAUM. A. L; TRES, L. L. **Histologia e biologia celular: Uma introdução à patologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. Cap. 5, 151-168.

KIRICUTA I. L. emploi du grand épiploon dans la chirurgie du sein cancreux. **Presse Medicale** 1963;71:15-7.

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 ostectomia do rádio em coelhos. **Biotemas**, Florianópolis, v. 23, n. 3, p. 149-157, jan. 2010. <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2010v23n3p149>.

LAURCERIN, C. T; SAADIQ, F. E. Xenotransplantation in orthopaedic surgery. **Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 16, p. 4–8, 2008.

MARSH, D. Concepts of fracture union, delayed union, and nonunion. **Clinical Orthopaedics And Related Research**, n. 3558, p. S22-S30, 1998.

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.

MIRANDA, E. S.; CARDOSO, F. T. S.; MEDEIROS FILHO, J. F. D.; BARRETO, M. D.; TEIXEIRA, R. M. D. M.; WANDERLEY, A. L.; FERNANDES, K. E. Organic and inorganic bone graft use in rabbits' radius surgical fractures repair: an experimental and comparative study. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 13, n. 5, p. 245-248, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-78522005000500007>

MORAES, P. C.; PADILHA FILHO, J. G.; CANOLA, J. C.; SANTOS, L. A. D.; MACORIS, D. D. G.; ALESSI, A. C.; DÓRIA NETO, F. D. A. Biocompatibilidade do cimento de fosfato de cálcio implantado no rádio de coelhos. 2004. **Acta Cirúrgica Brasileira**, 19 (4): 351-359. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502004000400006>

MORAN, W. J.; PANJE, W. R. The free greater omental flap for treatment of mandibular osteoradionecrosis. **Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery**, v. 113, n. 4, p. 425-427, 1987.

MORISON, R. V. A. Case of Ascites due to Liver Cirrhosis treated by Operation. **Annals of surgery**, v. 38, n. 3, p. 361, 1903.

Nidoli, M. C; Nielsen, F. F; Melsen, B. Endochondral vs. intramembranous demineralized bone matrices as implants for osseous defects. **The Journal of craniofacial surgery**, v. 10, n. 3, p. 177-185, 1999.

NIIKURA, T.; LEE, S. Y.; SAKAI, Y.; NISHIDA, K.; KURODA, R.; KUROSAKA, M. Causative factors of fracture nonunion: the proportions of mechanical, biological, patient-dependent, and patient-independent factors. **Journal of Orthopaedic Science**, v. 19, n. 1, p. 120-124, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00776-013-0472-4>

OLIVEIRA, R. C. D.; SICCA, C. M.; SILVA, T. L. D.; CESTARI, T. M.; OLIVEIRA, D. T.; BUZALAF, M. A. R.; GRANJEIRO, J. M. Efeito da temperatura de desproteinização no preparo de osso cortical bovino microgranular. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular em subcutâneo de ratos. **Revista Federação Ornitológica do Brasil**, v.7, n. 3/4, p.85-93,1999.

OLOUMI, M. M.; DERAKHSHANFAR, A.; MOLAEI, M. M.; TAYYEBI, M. The angiogenic potential of autogenous free omental graft in experimental tibial defects in rabbit: Short-term preliminary histopathological study. **Journal of Experimental Animal Science**, v. 43, n. 3, p. 179-187, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jeas.2006.02.002>

O'SHAUGHNESSY, L. Surgical treatment of cardiac ischmæmia. **The Lancet**, v. 229, n. 5917, p. 185-194, 1937. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)97446-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)97446-4)

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. <https://doi.org/10.1089/pho.2006.24.169>

QUESENBERRY, K. E.; CARPENTER, J. W. (eds). **Ferrets, Rabbits and Rodents Clinical Medicine and surgery**. 2nd ed. St. Louis: Saunders, 2003. P. 151.

QUESENBERRY, K. E. Rabbits. In: BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. (Ed.). **Saunders manual of small animal practice**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994. 1346 p.

REE, J. J; BALTZER, W. I; TOWNSEND, K. L. (2016). Augmentation of arthrodesis in dogs using a free autogenous omental graft. **The Canadian Veterinary Journal**, 57(8), 835.

REDDI, A H. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. **Nature biotechnology**, v. 16, n. 3, p. 247–252, 1998.

[http: doi: 10.1038/nbt0398-247](http://doi.org/10.1038/nbt0398-247)

SAIFZADEH, S; POURREZA, B; HOBENAGHI, R; NAGHADEH, B. D; KAZEMI, S. Autogenous greater omentum, as a free nonvascularized graft, enhances bone healing: an experimental nonunion model. **Journal of Investigative Surgery**, 22(2), 129-137, 2009. <https://doi.org/10.1080/08941930802566730>

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 (Doutor Em Medicina Veterinária) - Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2010.

SARAIVA, G. L; LAZARETTI-CASTRO, M. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 2002.

SCHENK, R. K. Biology of fracture repair. In: Browner, B. D. **Skeletal trauma: basic science, management, and reconstruction**. 3. ed. Philadelphia: SAUNDERS, 2003. v. 1, cap. 2, p. 29-73.

SENN, N. An experimental contribution to intestinal surgery with special reference to the treatment of intestinal obstruction. **Annals of surgery**, v. 7, n. 1, p. 1, 1888.

SILVA, P. S. A.; DEL CARLO, R. J.; SERAKIDES, R., MONTEIRO, B. S.; BALBINOT, P. D. Z.; ELEOTÉRIO, R. B.; VILORIA, M. I. V. Plasma rico em plaquetas associado ou não ao osso esponjoso autógeno no reparo de falhas ósseas experimentais. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782009000100020>

SMOLEC, O., KOS, J.; VNUK, D., PIRKIĆ, B.; STEJSKAL, M.; BOTTEGARRO, N. B.; KRESZINGER, M. Densitometry of calus mineralization in a critical size defect of a rabbit radius. **Veterinarski arhiv**, v. 80, n. 5, p. 627-36, 2010.

SOTOUDEH, A; JAHANSHAHI, G; JAHANSHAHI, A; TAKHTFOOLADI, M. A; SHABANI, I; SOLEIMANI, M. Combination of poly L-lactic acid nanofiber scaffold with omentum graft for bone healing in experimental defect in tibia of rabbits. **Acta cirurgica brasileira**, 27(10), 694-701, (2012). <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502012001000005>

STEVEN, L.S.; SCOTT, M.S. Urinary Sistem. In: **Fundamentals of veterinary clinical pathology**. Iowa: Iowa State. p. 277-336, 2002.

TANAKA, R.; SHUITI YAMAZAKI, J.; SENDYK, W. R.; PEREZ TEIXEIRA, V.; MIRANDA FRANÇA, C. Incorporação de enxerto ósseo em bloco: processo biológico e considerações relevantes. **Conscientiae Saúde**. 2008;7(3):323-7. <http://doi:10.5585/conssaude.v7i3.1301>

USTÁRIZ, F.; ARÉVALO GONZÁLEZ, E.; BECERRA DEPABLOS, G.; MONSALVE, L. D.; HERNÁNDEZ, G.; MOLINA, F.; LUCENA, M. Determinación de niveles de fósforo inorgánico y fosfatasa alcalina en jóvenes del Estado Mérida-Venezuela. **Revista de la Facultad de Farmacia. Merida**, v. 34, p. 30-34, 1998.

VAN DE GRAAFF, K. M. Membranas serosas e túnicas do trato gastrointestinal. **Anatomia Humana**. 6.ed. ed. São Paulo: Manole. 2003. Cap. 18, p. 637

VIEIRA, J. G. H. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arquivo Brasileiro Endocrinologia & Metabolismo**. Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, p. 415-422, dez. 1999. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27301999000600005>

VILARDO, F. E. S. Lagomorpha (Coelho, Lebre, Lebre-assobiadora). In: Cubas, Z. S.; Silva, J. C. R.; Catão-Dias, J. L. **Tratado de animais selvagens**. Roca, São Paulo, Brasil, p.415-431, 2007.

ANEXO I

ANEXO I - Autorização da Comissão de Ética na Utilização de Animais – CEUA.

Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Rua Ceará, S/N - Bloco 2T, sala 113 – CEP 38405-315
Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VoIP) 3423;
e-mail: ceua@propp.ufu.br, www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 142/16 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 076/16

Projeto Pesquisa: "ENXERTO LIVRE AUTOGENO DE OMENTO NO TRATAMENTO DE LESÃO ÓSSEA EXPERIMENTAL EM RÁDIO DE COELHOS".

Pesquisador Responsável: Francisco Cláudio Dantas Mota.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 8 de julho de 2016.

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