

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA**

**ENXERTO OU IMPLANTE HOMÓLOGO NA
CORREÇÃO DE DEFEITO ÓSSEO SEGMENTAR
FEMORAL EM CÃES ASSOCIADO À
INOCULAÇÃO DA FRAÇÃO DE CÉLULAS
MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA**

TESE DE DOUTORADO

FABIANO ZANINI SALBEGO

**SANTA MARIA, RS, BRASIL
2010**

**ENXERTO OU IMPLANTE HOMÓLOGO NA
CORREÇÃO DE DEFEITO SEGMENTAR
FEMORAL EM CÃES ASSOCIADO A INOCULAÇÃO DA
FRAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA
MEDULA ÓSSEA**

por

Fabiano Zanini Salbego

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em
Cirurgia Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),
como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Medicina Veterinária

Orientador: Prof. Alceu Gaspar Raiser

**Santa Maria, RS, Brasil
2010**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**ENXERTO OU IMPLANTE HOMÓLOGO NA CORREÇÃO DE
DEFEITO ÓSSEO SEGMENTAR FEMORAL EM CÃES
ASSOCIADO A INOCULAÇÃO DA FRAÇÃO DE CÉLULAS
MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA**

elaborada por
Fabiano Zanini Salbego

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Alceu Gaspar Raiser, Dr.
(Presidente/Orientador)

Ney Luis Pippi (UFSM)

Renato Xavier Faria (PUC-RS)

Emerson Antonio Contesini (UFRGS)

Marcelo Meller Alievi (UFRGS)

Santa Maria, 12 de janeiro de 2010

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida;

Aos meus pais, Francisco e Vera, pais maravilhosos que sempre me deram apoio incondicional durante toda a vida;

Aos meus outros pais, Milo (*in memórian*) e Ângela, Antônio Carlos e Marilene, que sempre estiveram e continuam presentes em todos os momentos;

À minha irmã, Juliana, pelo carinho e apoio durante o decorrer deste trabalho;

À minha namorada, Larissa, pelo amor, paciência e dedicação a mim conferidos durante a execução deste trabalho, além do apoio fisioterápico na reabilitação dos cães desta pesquisa;

Ao meu orientador, amigo e eterno professor Alceu Gaspar Raiser, que como exemplo profissional e humano, sempre dispensou apoio, amizade e ensinamento quando lhe foram solicitados, o meu muito obrigado;

Ao professor e amigo Alexandre Mazzanti, pelo apoio e disponibilidade em todos os setores durante todo o decorrer da pesquisa;

Ao professor e amigo Adriano Bonfim Carregaro, pelo apoio na anestesia e analgesia dos animais deste estudo;

Ao professor Ney Luiz Pippi, por todo o apoio e ensinamentos a mim dispensados durante a execução deste trabalho;

À professora Dominguita Graça, pela amizade, apoio, orientação e disponibilidade na interpretação da análise histológica deste trabalho;

À professora Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, pela amizade e apoio na parte laboratorial desta pesquisa;

Ao professor e amigo Carlos Jesus Haygert, pela disponibilidade e auxílio na avaliação radiológica e tomográfica deste trabalho;

Ao professor Flavio De La Corte, pelo auxílio durante a avaliação pós-operatória dos cães deste estudo;

Aos professores Luiz Carlos de Pelegrini e Carmen Godoy, pelo apoio na análise radiográfica nesta pesquisa;

Ao laboratório de cirurgia experimental, por disponibilizar a infra-estrutura fundamental para execução deste estudo;

Ao Laboratório de Radiologia Veterinária – UFSM, em especial ao grande amigo Cesar Guerra, pela amizade, apoio e disponibilidade na realização técnica dos incontáveis exames radiográficos durante o decorrer deste trabalho, o meu muito obrigado;

Ao laboratório de análises clínicas veterinárias da UFSM, em especial as amigas e colegas Daniele Brolo Martins e Luciele Varaschini, pelo apoio na análise hematológica deste trabalho;

Ao laboratório de Terapia Celular – UFSM, em especial as amigas e colegas Marina Gabriela Mori da Cunha e Débora Olsson, pelo apoio no processamento da medula óssea neste estudo;

Ao laboratório de virologia veterinária da UFSM, em especial aos amigos e colegas Renata Dezengrini e Marcelo Weiss, pelo apoio na análise do botão celular e biópsia nesta pesquisa;

Ao laboratório de Hemato-Oncologia do HUSM-UFSM, em especial a Dra. Liliane Zimmermann e Dra. Valúcia Scapim, pelo apoio na análise da citometria de fluxo neste trabalho;

Ao Setor de Diagnóstico por imagem do HUSM, em especial a Sabrina, pelo apoio com a realização das tomografias nestes estudo;

Ao Laboratório de Patologia Veterinária- UFSM, em especial ao professor Claudio Barros, pela disponibilidade das instalações durante a execução da primeira etapa deste trabalho;

Ao pessoal do NAVE-UFSM, em especial as amigas Gabriele Freitas e Virgínia Pohl e aos amigos André Vasconcelos e Thomas Trein, pelo apoio durante as anestésias dos cães neste estudo;

Ao Biotério Central – UFSM, em especial ao Amigo Silvano Noal, pela aquisição dos cães desta pesquisa;

À Analice Marchezan, pela disponibilidade e empenho na realização da avaliação estatística deste trabalho;

Aos amigos e colegas Rafael Festugato, Charles Pelizzari e Roberto Marinho, pelo apoio e disponibilidade, sempre presentes em todas as etapas deste estudo;

Aos amigos e colegas Daniel Mullher, Paula Basso, Rogério Rodrigues Santos (famoso Rogerão), Graziela Kopinitz, Debora Olsson, Guilherme Tognoli, Eduardo de Bastos Jr, Tiago Treichel, Camila Cartana; Rosmarini Passos, Fernanda Souza, Franciele Marconato e Priscila Morschbauer pela amizade e apoio ao longo deste trabalho;

Aos estagiários e amigos deste período (João Paulo, Lourenço Sausen, Arícia Sprada, Rosmarini Passos e Fernanda Souza), por todas as atividades da pesquisa e manutenção

dos animais deste estudo em diferentes momentos de sua execução, meu muito obrigado;

Aos funcionários do HVU-UFSM, em especial a Carla, Isabel, Nelci, Daves, Hilo, Alvarino, Paulo, Maria, Eva, Alceu, Élvio, Vagner, pelo apoio em diversos momentos ao longo desta pesquisa;

Ao HVU-UFSM, em especial ao colega Breno Viana Paim, pela disponibilidade das instalações durante a pesquisa;

Ao PPGMV-UFSM, em especial aos professores Cláudio Barros, Eduardo Flores, Agueda Castagna de Vargas e Adriano Bonfim carregaro, pelo auxílio em diversos momentos ao longo deste período;

À CAPES, pela bolsa à mim conferida;

À todos aqueles que auxiliaram de certa forma na execução deste trabalho;

Aos animais, vítimas solicitadas pela ciência em benefício da humanidade, que com os seus olhos humildes nos falam da sua vontade de viver, o meu respeito e eterna gratidão.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	25
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1 Cicatrização óssea normal	27
2.2 Enxertos e implantes ósseos.....	29
2.2.1 Definição e classificação.....	29
2.2.2 Função	30
2.2.3 Vantagens e desvantagens da enxertia óssea.....	32
2.2.4 Indicações e contra-indicações.....	32
2.2.5 Colheita, preparo e conservação do enxerto.....	33
2.2.6 Controle de infecção.....	35
2.2.7 Hidratação do enxerto.....	37
2.2.8 Resistência biomecânica.....	38
2.2.9 Implantação cirúrgica.....	41
2.2.10 Métodos de fixação do enxerto.....	43
2.2.11 Incorporação e rejeição.....	47
2.2.12 Avaliação dos resultados.....	51
2.2.13 Complicações	52
2.3 Terapia celular.....	54
2.3.1 Características gerais das células-tronco.....	54
2.3.2 Medula Óssea e a cicatrização de fraturas.....	55
2.3.2.1 Suporte celular.....	58
2.3.3 Marcação celular.....	59

2.3.4 Estudos clínicos com cicatrização óssea.....	60
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	63
3.1 Fase Experimental I - <i>Ex Vivo</i>	63
3.1.1 Colheita, preparo e conservação de ossos corticais.....	63
3.1.2 Avaliação Radiográfica dos implantes.....	63
3.1.3 Tamanho e Volume dos Implantes.....	64
3.1.4 Densidade óssea dos implantes.....	64
3.1.5 Hidratação dos implantes.....	65
3.1.6 Teste de resistência biomecânica.....	65
3.1.7 Avaliação Estatística do teste de resistência.....	68
3.2 Fase experimental II - <i>in vivo</i>	68
3.2.1 Comitê de Ética em Pesquisas com Animais.....	68
3.2.2 Aquisição dos animais e aclimatação.....	68
3.2.3 Delineamento Experimental.....	69
3.2.4 Pré-Operatório.....	69
3.2.5 Anestesia	71
3.2.6 Colheita de medula óssea.....	71
3.2.7 Avaliação da medula óssea.....	73
3.2.8 Contagem da fração de células mononucleares na bolsa de colheita e quantificação das células CD34+.....	73
3.2.9 Processamento da medula óssea para obtenção da fração de células mononucleares.....	73
3.2.10 Marcação da fração de células mononucleares do botão celular.....	75

3.2.11 Contagem e viabilidade da fração de células mononucleares do botão celular.....	76
3.2.12 Técnica operatória.....	76
3.2.13 Pós-Operatório.....	78
3.2.14 Avaliação da fluorescência do marcador celular.....	81
3.2.15 Avaliação Radiográfica.....	81
3.2.16 Avaliação clínica	82
3.2.17 Avaliação Deambulatória.....	82
3.2.18 Avaliação Macroscópica.....	82
3.2.19 Avaliação da densidade óssea.....	87
3.2.20 Avaliação Histológica.....	87
3.2.21 Avaliação Estatística.....	90
3.2.22 Reabilitação dos animais da pesquisa.....	91
4. RESULTADOS	92
4.1 Colheita e conservação de ossos corticais.....	92
4.2 Avaliação radiográfica dos implantes.....	92
4.3 Densidade óssea dos implantes.....	92
4.4 Tamanho e Volume dos Implantes.....	92
4.5 Hidratação dos implantes.....	93
4.6 Teste de resistência biomecânica.....	93
4.7 Avaliação Estatística do teste de resistência.....	94
4.8 Colheita de medula óssea.....	94
4.9 Acondicionamento, obtenção, marcação e viabilidade do botão celular.....	96

4.10 Anestesia e técnica operatória.....	97
4.11 Obtenção de micro-fragmento ósseo para avaliação da marcação celular.	103
4.12 Avaliação clínica.....	103
4.13 Avaliação Deambulatória.....	104
4.14 Avaliação radiográfica.....	104
4.15 Avaliação macroscópica e colheita de material para histopatologia.....	121
4.16 Avaliação densitométrica do fragmento de biópsia.....	126
4.17 Avaliação histológica.....	126
4.18 Avaliação estatística	137
4.19 Reabilitação dos animais pós-biópsia.....	137
5. DISCUSSÃO.....	140
5.1 Colheita e conservação de ossos corticais.....	140
5.2 Hidratação dos implantes e teste de resistência biomecânica.....	143
5.3 Colheita e processamento da medula óssea autógena.....	146
5.4 Aplicação da fração de células mononucleares da medula óssea.....	151
5.5 Anestesia e técnica operatória.....	153
5.6 Suporte celular.....	160
5.7 Avaliação clínica pós-operatória	161
5.8 Avaliação do processo cicatricial ósseo.....	162
5.9 Avaliação Deambulatória.....	166
5.10 Marcação celular.....	166
5.11 Análise histopatológica.....	168
5.12 Reabilitação dos animais da pesquisa.....	172

6. CONCLUSÕES.....	173
7. REFERÊNCIAS	174
8. APÊNDICES.....	194

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

ENXERTO OU IMPLANTE HOMÓLOGO NA CORREÇÃO DE DEFEITO ÓSSEO SEGMENTAR FEMORAL EM CÃES ASSOCIADO A INOCULAÇÃO DA FRAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA

AUTOR: FABIANO ZANINI SALBEGO

ORIENTADOR: ALCEU GASPAR RAISER

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 12 de janeiro de 2010

As falhas ósseas decorrentes de trauma, complicações pós-operatórias e cirurgias mutilantes, associadas à remoção de neoplasias, fazem parte da rotina dos hospitais e clínicas veterinárias. Os enxertos ósseos, dentre todas as suas variantes, representam a principal alternativa viável na correção estrutural de grandes perdas ósseas. Na atualidade, a busca por alternativas para corrigir estes problemas e o grande potencial da terapia celular, tem levado inúmeros pesquisadores a ingressar nesta linha de estudo. No presente trabalho, buscou-se avaliar a influência da hidratação de implantes ósseos conservados em glicerina 98% sobre a resistência biomecânica dos mesmos; a viabilidade de um protocolo de colheita de medula óssea, para aplicação na rotina clínico-cirúrgica; e o efeito da aplicação intralesional da fração de células mononucleares da medula óssea, sobre a consolidação da interface enxerto-hospedeiro de cães submetidos à enxertia óssea segmentar, com implantes ósseos conservados em glicerina 98%. Esta pesquisa foi desenvolvida em duas fases. A primeira, *ex-vivo*, onde 108 fragmentos ósseos conservados em glicerina 98% foram separados em seis diferentes grupos, de acordo com o período de hidratação, sendo posteriormente submetidos a teste de compressão axial para avaliação de sua resistência biomecânica. A segunda fase, *in-vivo*, onde 20 cães sem raça definida e peso médio de 13kg, foram separados em quatro diferentes grupos de acordo com o tipo de enxerto empregado e com a aplicação ou não da fração de células mononucleares da medula óssea. Todos os animais foram submetidos a um protocolo de colheita de medula óssea, obtendo-se um volume final de 5ml kg⁻¹ de peso corporal. A medula óssea colhida foi analisada por meio de mielograma e posteriormente submetida ao isolamento da fração de células mononucleares por técnica já consagrada na literatura. Um defeito ósseo femoral diafisário foi criado e reparado com o próprio segmento removido (grupos I e III) ou com um segmento ósseo conservado em glicerina 98% (grupos II e IV). A fração de células mononucleares da medula óssea, após isolamento, foi injetada por via intralesional nos cães dos grupos tratados (I e II), enquanto os grupos controle (III e IV) receberam a injeção do mesmo volume, porém, de solução de cloreto de sódio a 0,9%. A progressão da consolidação óssea das interfaces enxerto-hospedeiro foi acompanhada por exames radiográficos seriados até os 90 dias após a intervenção cirúrgica, enquanto a presença das células mononucleares, até os primeiros sete dias após a implantação, foi acompanhada pela detecção da fluorescência do nanocristal Qtracker-665, utilizado como marcador celular. De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que: a hidratação do implante ósseo conservado em glicerina 98%, não produz alteração estatisticamente significativa na resistência biomecânica do osso cortical para os diferentes tempos avaliados. Contudo, a densidade mineral óssea possui estreita relação com esta propriedade; O protocolo de colheita de medula óssea em volume reduzido a 5ml kg⁻¹ de peso corporal, obtidos de diferentes ossos longos, demonstrou-se adequado para isolamento da fração de células mononucleares e obtenção de um botão celular com adequado número de células e alta viabilidade, essenciais ao sucesso de sua aplicação terapêutica; a consolidação das interfaces enxerto-hospedeiro proximal e distal aos 90 dias após a cirurgia não apresentou diferença clínica e radiográfica entre os grupos controle e tratados com a fração de células mononucleares da medula óssea. Porém, não se pode afirmar que a terapia celular empregada neste estudo, não seja bom adjuvante da cicatrização óssea, pois se acredita, que a restrição na deposição de carga no foco de fratura, proveniente do reduzido exercício pós-operatório, tenha influenciado diretamente no resultado da consolidação.

Palavras-chave: células mononucleares, medula óssea, enxerto ósseo, fêmur, cão.

ABSTRACT

Doctorate Thesis
Program of Post Graduation in Veterinary Medicine
Universidade Federal de Santa Maria

GRAFT OR HOMOLOGOUS IMPLANT IN THE CORRECTION OF FEMORAL SEGMENTAL BONE DEFECT IN DOGS ASSOCIATED TO INOCULATION OF BONE MARROW MONONUCLEAR CELL FRACTION

AUTHOR: FABIANO ZANINI SALBEGO

TUTOR: ALCEU GASPAR RAISER

Date and place of defense: Santa Maria, January 12, 2010th

Bone defects due to trauma, postoperative and mutilating surgery complications, associated to removal of neoplasia, are part of the routine of hospitals and veterinary clinics. Bone grafts, within all their variants, represent the main viable alternative in the structural correction of great bone losses. Currently, the search for alternatives to correct these problems and the great potential of cellular therapy, have led numerous researchers to ingress into this line of study. The present work aimed to evaluate the influence of the hydration of bone implants conserved in glycerin 98% over their biomechanical resistance; the viability of a bone marrow harvesting protocol, for application in the clinical surgical routine; and the effect of intralesional application of bone marrow mononuclear cell fraction, over the consolidation of graft-host interface of dogs submitted to segmental bone grafting, with bone implants conserved in glycerin 98%. This research was developed in two phases. The first, *ex-vivo*, in which 108 bone fragments conserved in glycerin 98% were separated in six different groups, according to hydration period, and later were submitted to axial load test for biomechanical resistance evaluation. The second phase, *in-vivo*, in which 20 mongrel dogs, with mean weight of 13kg, were divided in four different groups according to the type of graft employed and with or without application of bone marrow mononuclear cell fraction. All animals were submitted to a bone marrow harvesting protocol, obtaining a final volume of 5ml kg⁻¹ of body weight. The collected bone marrow was analyzed by means of myelogram and later submitted to isolation of the mononuclear cell fraction by a technique already affirmed in the literature. A diaphyseal femoral bone defect was created and repaired with the same removed segment (groups I and III) or with a bone segment conserved in glycerin 98% (groups II and IV). The bone marrow mononuclear cell fraction, after isolation, was injected via intralesional route in dogs of the treated groups (I and II), whereas the control group (III and IV) received an injection of the same volume, however, of 0.9% sodium chloride solution. The bone consolidation progress of the graft-host interfaces was followed by serial radiographic exams up to 90 days after surgical intervention, whereas the presence of mononuclear cells was followed up to seven days after implantation, by detection of Qtracker-665 nanocrystal fluorescence, used as cell marker. According to the results obtained, it can be concluded that: hydration of bone implant conserved in glycerin 98% does not produce statistically significant alterations in the biomechanical resistance of cortical bone for the different evaluated times. However, the bone mineral density has a close relationship with this property; bone marrow harvesting protocol with reduced volume of 5ml kg⁻¹ of body weight, obtained from different long bones, proved to be adequate for isolation of mononuclear cell fraction and for obtaining a cell button with adequate number of cells and high viability, essential for the success of its therapeutic application; the consolidation of proximal and distal graft-host interfaces at 90 days after surgery no showed clinical and radiographic difference in the groups control and treated with bone marrow mononuclear cell fraction. Nevertheless, it cannot be confirmed that the cellular therapy used in this study is not an effective bone healing adjuvant, as it is believed that the restriction of load deposition on the focus of the fracture, achieved by reduced postoperative exercise, has influenced directly on the result of the consolidation.

Key words: mononuclear cells, bone marrow, bone graft, femur, dog.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Valores quantitativos relacionados ao aspecto radiográfico da consolidação óssea das interfaces implante osso-receptor proximal e distal.....	86
Tabela 02	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Fases do processo de consolidação das fraturas.....	90
Tabela 03	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Valores médios do volume, densidade mineral óssea e carga suportada pelos diferentes grupos avaliados.....	96
Tabela 04	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Colheita de medula óssea (MO) autógena e respectivos volumes obtidos no procedimento.....	98
Tabela 05	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Volume do botão celular, Viabilidade celular, contagem de células mononucleares e CD34+, e número de células administradas por kg de peso corporal.....	99
Tabela 06	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Tempo de duração dos procedimentos em geral: colheita, processamento e técnica operatória.....	101
Tabela 07	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Quantificação do volume de sangue perdido durante a intervenção cirúrgica.....	102
Tabela 08	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células	

	mononucleares da medula óssea. Fluorescência do botão celular e microfragmentos ósseos marcados com nanocristal Q- tracker 665, obtidos aos sete dias de pós-operatório.....	105
Tabela 09	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Espaço existente entre as interfaces implante-osso, proximal e distal, no período pós-operatório imediato.....	108
Tabela 10	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Estabilidade das interfaces implante osso-receptor proximal e distal aos 90 dias de pós-operatório.	123
Tabela 11	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Valores médios da densidade óssea obtida na interface implante osso-receptor proximal.....	128
Tabela 12	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Sinopse das alterações histopatológicas gerais, observadas na interface implante osso-receptor proximal.....	130
Tabela 13	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Alterações histopatológicas observadas no material amorfo anfófilico acelular, presentes por entre as trabéculas ósseas da interface implante osso-receptor proximal aos 90 dias de pós-operatório.....	131
Tabela 14	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Fase do processo de consolidação do calo ósseo na interface implante osso-receptor proximal aos 90s dias de pós-operatório nos diferentes grupos avaliados, segundo Allen <i>et al.</i> (1980).....	132
Tabela 15	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Resultados obtidos na reabilitação dos animais da pesquisa.....	139

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. (A) Segmentos ósseos corticais conservados em glicerina 98% por período não inferior a 1 ano. (B, C e D) Avaliação radiográfica dos segmentos ósseos corticais. (E, F e G) Aferição das dimensões dos segmentos ósseos.....	66
Figura 02	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. (A) Topograma. (B) Imagem de um corte de tomografia computadorizada empregado na avaliação da densidade óssea.....	67
Figura 03	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. (A) Modelagem do segmento ósseo. (B, C e D) Teste de compressão axial em torno calibrado.....	70
Figura 04	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Organograma representativo dos diferentes grupos de cães avaliados de acordo com o tipo de implante e tratamento com a fração de células mononucleares da medula óssea.....	72
Figura 05	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Colheita e filtração da medula óssea autógena.....	74
Figura 06	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Processamento e isolamento da medula óssea autógena para a obtenção da fração de células mononucleares.....	77
Figura 07	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Contagem e análise da viabilidade da fração de células mononucleares do botão celular.....	79
Figura 08	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar	

	femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Técnica de enxertia de segmento ósseo cortical em diáfise de fêmur canino fixado com placa de compressão dinâmica, associada a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. (A) Seção óssea com fio serra Gigli para confecção do defeito ósseo. (B) Hidratação do implante ósseo conservado em glicerina 98%. (C) Fixação do implante à placa de compressão dinâmica. (D) Aplicação da esponja de colágeno no interior do enxerto. (E e F) Aspiração da fração de células mononucleares da medula óssea e injeção intralesional. (G) Aspecto final do implante ósseo no leito receptor.....	80
Figura 09	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Desenho esquemático do procedimento de colheita e análise da fluorescência dos microfragmentos ósseos.....	83
Figura 10	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Análise da fluorescência do marcador nanocrystal Qtracker-665. (A-B-C) Botão Celular. (D-E) Microfragmentos ósseos colhidos aos sete dias após a enxertia. (Ampliação da objetiva: 100X em D e 40X em E).....	84
Figura 11	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Avaliação radiográfica do implante homólogo no período pós-operatório imediato. (A) Incidência médio-lateral. (B) Incidência Antero-posterior.....	85
Figura 12	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Desenho esquemático do procedimento de biópsia óssea segmentar.....	89
Figura 13	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Desenho esquemático da marcação, secção e orientação dos cortes histológicos.....	91
Figura 14	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar	

	femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. (A) Valor médio da resistência à deformação, dado em quilogramaforça por centímetro cúbico de osso, para os diferentes grupos avaliados. (B) Comparação entre volume, carga e densidade, apresentadas pelos diferentes grupos avaliados.....	95
Figura 15	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Progressão para os diferentes graus de claudicação observados no membro pélvico dos cães nos diferentes grupos avaliados, segundo Tudury e Raiser (1985).....	106
Figura 16	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Avaliação radiográfica do grau de consolidação óssea das interfaces osso-implante proximal e distal nos cães do grupo I e II (Tratado autólogo e homólogo), aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório.....	109
Figura 17	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Avaliação radiográfica do grau de consolidação óssea das interfaces osso-implante proximal e distal nos cães do grupo III e IV (Controle autólogo e homólogo), aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório.....	110
Figura 18	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Comparação entre o grau de consolidação óssea da interface osso-implante proximal entre os cães dos diferentes grupos avaliados, aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório.....	111
Figura 19	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Comparação entre o grau de consolidação óssea da interface osso-implante distal entre os cães dos diferentes grupos avaliados, aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório.....	112
Figura 20	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Aspecto radiográfico antero-posterior	

	da evolução cicatricial das interfaces osso-implante proximal e distal de um cão do grupo I (Tratado autólogo), aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório. Incidência antero-posterior.....	113
Figura 21	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Aspecto radiográfico (látero-medial) da evolução cicatricial das interfaces osso-implante proximal e distal de um cão do grupo I (Tratado autólogo), aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório. Incidência médio-lateral.....	114
Figura 22	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Aspecto radiográfico antero-posterior da evolução cicatricial das interfaces osso-implante proximal e distal de um cão do grupo II (Tratado homólogo), aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório. Incidência antero-posterior.....	115
Figura 23	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Aspecto radiográfico látero-medial da evolução cicatricial das interfaces osso-implante proximal e distal de um cão do grupo II (Tratado homólogo), aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório. Incidência médio-lateral.....	116
Figura 24	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Aspecto radiográfico da evolução cicatricial das interfaces osso-implante proximal e distal de um cão do grupo III (Controle autólogo), aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório. Incidência antero-posterior.....	117
Figura 25	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Aspecto radiográfico da evolução cicatricial das interfaces osso-implante proximal e distal de um cão do grupo III (Controle Autólogo), aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório. Incidência médio-lateral.....	118
Figura 26	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Aspecto radiográfico da evolução	

	cicatricialdas interfaces osso-implante proximal e distal de um cão do grupo IV (Controle homólogo), aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório. Incidência antero-posterior.....	119
Figura 27	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Aspecto radiográfico da evolução cicatricialdas interfaces osso-implante proximal e distal de um cão do grupo IV (Controle homólogo), aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório. Incidência médio-lateral.....	120
Figura 28	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Complicações decorrentes do procedimento de enxertia óssea de segmento cortical diafisário femoral em cão. (A-B) Afastamento da superfície de contato da placa de compressão com o fragmento distal, com alteração do eixo axial femoral e fratura do implante aos 30 e 60 dias de pós-operatório. (C_D) Alteração dos tecidos moles adjacente ao foco de fratura no período pós-operatório imediato. (E e F) Posicionamento errôneo crâniolateral da placa e compressão.....	122
Figura 29	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Aspecto macroscópico das interfaces enxerto/implante osso-receptor aos 90 dias de pós-operatório nos diferentes grupos avaliados, após a remoção da placa de compressão. (A) Tratado autólogo. (B) Tratado homólogo. (C) Controle autólogo. (D) Controle homólogo.....	124
Figura 30	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Aspecto macroscópico da colheita e conservação do fragmento ósseo cortical segmentar aos 90 dias de pós-operatório. (A –B) Aspecto macroscópico antes e após a remoção da placa de compressão. (C-D-E-F-G) Confecção da janela óssea e remoção do segmento ósseo.....	125
Figura 31	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Procedimento de análise da densidade óssea por tomografia computadorizada dos segmentos corticais colhidos	

- aos 90 dias de pós-operatório. (A-B) Aspecto do tomógrafo e painel de controle. (C-D) Disposição dos implantes durante a realização dos cortes. (E-F) Topograma dos fragmentos de biópsia..... **127**
- Figura 32** Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Valores referentes à densidade óssea aferida nas regiões das interfaces implante osso-receptor aos 90 dias de pós=operatório..... **129**
- Figura 33** Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Análise histológica do segmento ósseo cortical colhido na interface implante osso-receptor proximal, no grupo I (tratado autólogo). (A) Metaplasia cartilaginosa na interface implante osso-receptor proximal. Coloração: Hematoxilina e Eosina de Harris, aumento 50x. (B) Interface exibindo metaplasia cartilaginosa, hemorragia e presença de MAs. Coloração: Hematoxilina e Eosina de Harris, aumento 100x. (C) Presença de MAs nos espaços entre as trabéculas ósseas. Hematoxilina e Eosina de Harris, aumento 100x. (D) Presença de MAs, medula óssea e proliferação de tecido conjuntivo fibroso nos espaços entre as trabéculas ósseas. Hematoxilina e Eosina de Harris, aumento 100x..... **133**
- Figura 34** Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Análise histológica do segmento ósseo cortical colhido na interface implante osso-receptor proximal, no grupo II (tratado homólogo), corado com hematoxilina-eosina de Harris. (A e B) Presença de MAs, medula óssea e proliferação de tecido conjuntivo fibroso nos espaços entre as trabéculas ósseas. Hematoxilina e Eosina de Harris, aumento 200x. (C) Presença de MAs, medula óssea e proliferação de tecido conjuntivo fibroso nos espaços entre as trabéculas ósseas. Hematoxilina e Eosina de Harris, aumento 100x. (D) Osteoclasto fazendo remodelamento ósseo. Hematoxilina e Eosina de Harris, aumento 400x..... **134**
- Figura 35** Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Análise histológica do segmento ósseo cortical colhido na interface implante osso-receptor proximal, no grupo

- III (controle autólogo), corado com hematoxilina-eosina de Harris. (A) Presença de osteóide por entre o MAs. Hematoxilina e Eosina de Harris, aumento 400x. (B) Remodelamento ósseo. Hematoxilina e Eosina de Harris, aumento 400x. (C) Neovascularização por entre o MAs. Hematoxilina e Eosina de Harris, aumento 100x. (D) Interface implante osso-receptor proximal exibindo proliferação de tecido conjuntivo fibroso. Hematoxilina e Eosina de Harris, aumento 100x..... **135**
- Figura 36** Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Análise histológica do segmento ósseo cortical colhido na interface implante osso-receptor proximal, no grupo IV (controle homólogo), corado com hematoxilina-eosina de Harris. (A) MAs livre por entre a proliferação de tecido conjuntivo fibroso na interface implante osso-receptor proximal. Hematoxilina e Eosina de Harris, aumento 100x. (B) Marcação da extremidade com fio monofilamento com tinta nanquim preta. Hematoxilina e Eosina de Harris, Aumento: 50x. (C) Presença de MAs, medula óssea e osteóide por entre as trabéculas ósseas. Hematoxilina e Eosina de Harris, aumento 100x. (D) Presença de MAs, osteóide e medula óssea nos espaços entre as trabéculas ósseas. Hematoxilina e Eosina de Harris, Aumento: 200x..... **136**
- Figura 37** Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Aspecto radiográfico de diferentes tipos de implantes empregados na reconstrução cirúrgica do defeito ósseo produzido pelo procedimento de biópsia óssea. (A e B) Pino de Steimann intramedular associado a enxerto ósseo conservado em glicerina fixado por fio de cerclagem. (C e D) Haste intramedular bloqueada. (E e F) Pino intramedular associado a pino transcortical no foco de fratura..... **138**

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 01	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Ficha de avaliação radiográfica.....	194
Apêndice 02	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Normas e parâmetros da avaliação radiológica da cicatrização óssea.....	195
Apêndice 03	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Ficha de avaliação clínica.....	197
Apêndice 04	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Graus de claudicação modificados de Tudury e Raiser, (1985).....	198
Apêndice 05	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Ficha avaliação deambulatória.....	199
Apêndice 06	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Valores individuais de volume, resistência de densidade óssea dos implantes.....	200
Apêndice 07	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Dados estatísticos da avaliação dos parâmetros de volume, resistência e densidade óssea dos implantes entre os diferentes grupos.....	206
Apêndice 08	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Dados estatísticos da avaliação radiológica da cicatrização óssea entre os diferentes grupos estudados.....	207
Apêndice 09	Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Dados estatísticos referentes a densidade óssea do fragmento de biópsia dos diferentes grupos avaliados.....	211

LISTA DE ABREVIATURAS

CT – célula-tronco

CA – Cartilagem

FCM – Fração células mononucleares

MAs – Material Amorfo Anfifílico Acelular

MC – Marcador celular

MF – Medula Óssea Funcional

MO – Medula óssea

OS – Osteóide

OSB - Osteoblasto

OSC – Osteoclasto

PCD – Placa de compressão dinâmica

TB – Trabécula Óssea

TC – Tecido Conjuntivo

1. INTRODUÇÃO

A enxertia óssea é uma técnica de transplante de tecido ósseo cortical ou esponjoso sendo denominada de acordo com seu local de origem e composição (JOHNSON e HULSE, 2005). Segundo Millis e Martinez (2007), o enxerto ósseo pode ser considerado como o fator crítico entre a união óssea bem sucedida e a falha catastrófica. A aplicação adequada do enxerto ósseo pode ser o diferencial entre o salvamento do membro ao invés de sua amputação.

Diversas são as variáveis que irão proporcionar ou não o sucesso de um implante ósseo. Entre elas estão a capacidade osteoindutora e osteocondutora, o grau de antigenicidade, a rigidez na fixação entre leito doador e leito receptor, e a resposta do tecido hospedeiro.

Embora a enxertia de osso homogêneo seja bastante difundida, os pesquisadores que utilizam esse procedimento para reconstrução óssea não apresentam um consenso na preparação pré-implantação e armazenamento desses ossos. No entanto, é de consenso geral que a glicerina é um método eficiente e de baixo custo e que, tem a vantagem de combater a antigenicidade de enxertos não autógenos.

Melo et al. (1998) observaram que as características biológicas de ossos conservados em glicerina eram de um osso mais esbranquiçado e quebradiço à manipulação, sendo mais pronunciadas nos implantes conservados por períodos mais longos. Para evitar que os enxertos quebrassem os autores indicaram a reidratação, sendo que quanto maior o tempo, menos quebradiço seria o osso.

Considerando as inúmeras pesquisas que utilizam enxerto ósseo e a heterogeneidade de dados sobre o tempo de hidratação para enxertos conservados em glicerina a 98%, faz-se necessário definir o período mais apropriado, especialmente para melhorar a maleabilidade de determinados tecidos, como o osso, durante a implantação. Isso pode ser verificado mediante testes de resistência à compressão, pois, postula-se que ossos desidratados serão predispostos a fraturas mais facilmente que aqueles hidratados.

A força de compressão axial é aquela aplicada em uma direção e distribuída igualmente sobre a superfície da estrutura sobrecarregada (HULSE e HYMAN, 2007).

De acordo com Castania (2002), para a análise da resistência de enxertos ósseos, o principal teste a ser realizado em sua avaliação é a compressão axial, embora existam alternativas de testes não destrutivos.

Por outro lado, o atual estágio de pesquisas com células progenitoras tem apontado múltiplas possibilidades para reparação tecidual e aceleração dos processos reparadores. Com isso poderá ser diminuída a morbidade em relação ao paciente e minimizar o custo de seu acompanhamento pelas unidades hospitalares desde que se acelere ou amplie a possibilidade de integração dos implantes biológicos. As células-tronco são a fonte de todos os novos tecidos formados pelos sistemas de reparo e remodelação do organismo, sendo reguladas por sinais químicos e físicos que controlam sua ativação, proliferação, migração, diferenciação e período de sobrevivência (BIANCO et al., 2001). Conforme Verfaillie et al. (2002), estas células podem ser encontradas em diferentes tecidos, contudo, a fonte mais acessível, são as células mononucleares da medula óssea.

Os mecanismos pelos quais estas células auxiliam no reparo das lesões, ainda não está bem elucidado, porém pode compreender a ativação de células do próprio tecido (TAJBAKSHI, 2003) ou produzindo a diferenciação nas células do tecido alvo (VERFAILLIE, 2002). Recentemente, descobriu-se que as células-tronco hematopoéticas poderiam adquirir características de outras linhagens celulares diferentes das hematopoéticas (BURT et al., 2003).

O emprego de células-tronco não expandidas em cultura é amplamente utilizado e apresenta algumas vantagens a serem consideradas. Dentre elas, a simplicidade do procedimento, a possibilidade de implantação quase que imediata da fração celular ao paciente, o custo relativamente baixo, o procedimento minimamente invasivo e a ausência de requerimento de imunossupressão do paciente, fazem deste procedimento, um dos mais largamente utilizados (LUCARELLI et al., 2004).

Algumas pesquisas envolvendo células provenientes da medula óssea demonstraram a importância do suprimento adicional de células-tronco em locais desprovidos de formação óssea (LINDHOLM et al., 1988; GRUNDEL et al., 1991; WERNTZ et al., 1996; CURYLO et al., 1997). Muschler e Midura (2002) comentam que o principal objetivo do transplante de células-tronco é suprir a deficiência no número e/ou atividade destas células no local de interesse.

Baseado nestes fatores, o presente trabalho tem como objetivos avaliar: a influência de diferentes períodos de hidratação sobre a resistência de segmentos ósseos corticais provenientes da diáfise femoral de cães e conservados em glicerina 98% no intuito de determinar o período mais adequado para a hidratação dos implantes utilizados na segunda fase deste estudo; o protocolo de colheita de reduzido volume de medula óssea no cão quanto à concentração e viabilidade da fração de células mononucleares obtidas no botão celular, para aplicação clínica sem expansão em cultura; a influência da fração de células mononucleares da medula óssea sobre a consolidação de enxertos e/ou implantes ósseos conservados em glicerina 98%, aplicados em defeitos segmentares diafisários femorais em cães.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cicatrização óssea normal

Diferente de outros tecidos que sofrem cicatrização com desenvolvimento de tecidos reparadores pouco organizados, a cicatrização óssea é composta por um mecanismo complexo que resulta na restauração quase completa da arquitetura óssea normal (EINHORN 1998). Em termos histológicos clássicos, a cicatrização óssea pode ocorrer de duas maneiras: consolidação óssea primária ou direta, também conhecida como reconstrução osteonal e consolidação óssea secundária ou indireta, ou também chamada de calo intermediário (WEINSTEIN e BUCKWALTER, 2003; JOHNSON e HULSE, 2005; HULSE e HYMAN, 2007 e MILLIS e JACKSON, 2007).

Segundo Millis e Jackson (2007), a cicatrização óssea primária ou direta ocorre com pouca formação de calo, e é o tipo de consolidação esperada em formas estáveis de fixação e na ausência de lacunas de fratura. Greenbaum e Kanat (1993) descrevem a cicatrização primária como uma tentativa direta da cortical óssea em se reparar após a fratura, onde as corticais de ambos os lados da fratura tentam unir-se para restaurar a continuidade mecânica. Este processo só é permitido, quando ocorrer a fixação rígida da fratura por implantes metálicos com conseqüente restauração anatômica dos fragmentos. Nestas circunstâncias, a revascularização do calo tem início devido a reabsorção produzida pelos osteoclastos, com restabelecimento dos sistemas de Havers. Os novos vasos sanguíneos são acompanhados por células endoteliais e mesenquimais

perivasculares, precursoras de células osteoprogenitoras, que darão origem aos osteoblastos durante o processo cicatricial. Quando ocorre a consolidação óssea secundária, Schenk (2003) comenta que inicialmente, um calo ósseo precursor é formado, sendo basicamente constituído por cartilagem, que mais tarde sofrerá calcificação, ocorrendo nestes casos uma combinação entre os processos de ossificação intramembranosa e endocondral. A calcificação da cartilagem do calo da fratura ocorre por um mecanismo similar ao que ocorre na placa de crescimento. Neste processo, ocorre a formação de uma quantidade relativamente grande de calo, devido à instabilidade relativa no foco de fratura, como nos casos de fraturas estabilizadas por coaptação externa (MILLIS e JACKSON, 2007). O que determina se a união óssea ocorre de forma direta ou indireta, é a eficiência do implante em produzir estabilidade associado ao ambiente biológico na superfície da fratura (HULSE e HYMAN, 2007).

Conforme descreve Einhorn (1998), o impacto que origina a fratura resulta em lesão medular, cortical, periosteal e das partes moles adjacentes com conseqüente ruptura dos vasos sanguíneos locais, seguida por formação do hematoma fraturário com invasão de células inflamatórias e liberação de substâncias mensageiras. Kraus e Kirker-Head (2006) explicam que o reparo ósseo envolve a integração de fatores celulares, humorais e mecânicos. Fatores de crescimento ósseo, peptídeo ou glicoproteínas atuam coordenando a mitose celular, quimiotaxia, diferenciação e crescimento das células produtoras de matriz óssea, influenciando desta forma a cicatrização óssea (HERNDON et al., 1992).

Quando ocorre consolidação da fratura, os principais componentes do sistema vascular aferente normal (artéria nutriente, artérias metafisária e periosteal) ficam reforçados (HULSE e HYMAN, 2007). Segundo Asahara et al. (1997), além da replicação de capilares a partir de vasos já existentes, ocorre também vasculogênese na vida adulta. Como explicam Hulse e Hyman (2007), além destes componentes, a área lesada recebe um suprimento sanguíneo novo e temporário, chamado de suprimento sanguíneo extra-ósseo de consolidação, o qual é proveniente dos tecidos adjacentes. O suprimento sanguíneo extra-ósseo é importante no suprimento de sangue nos estágios iniciais da consolidação, mesmo naquelas circunstâncias em que o suprimento vascular normal for restabelecido, quando a estabilidade da fratura permitir.

A fase inicial da cicatrização óssea está caracterizada por esta invasão de células inflamatórias e formação do hematoma. Na fase seguinte, ocorre angiogênese e tem

início o processo de formação de cartilagem. Por fim, os três estágios seguintes, compreendem o processo de calcificação e remoção da cartilagem, formação de tecido ósseo, e finalmente a remodelação óssea, como o mais longo destes estágios (EINHORN,1998). Segundo Millis e Probst (1996), em um animal hígido, é necessário haver bom suprimento sanguíneo, adequada redução dos fragmentos e boa estabilização da fratura para que ocorra uma consolidação adequada. Na dependência do material de fixação utilizado, em um animal adulto e hígido, uma fratura simples sem complicações, apresenta tempo de consolidação médio de 45 dias (PIERMATTEI e FLO, 1999).

Sabe-se que além das respostas oriundas da medula óssea, córtex e partes moles adjacentes a fratura, é o perióstio que possui a resposta cicatricial mais rápida e efetiva na correção de falhas ósseas, devido às células precursoras indiferenciadas que atuam no processo de cicatrização (MCKIBBIN, 1978). Tanto o osso em formação como aquele em reparo, possuem como base as células-tronco mesenquimais. Respondendo a demanda mecânica que visa à restauração das funções do esqueleto, estas células produzem citocinas regenerativas e sofrem replicação e diferenciação, formando matriz estrutural (KRAUS e KIRKER-HEAD, 2006).

No entanto, Carvalho et al. (2004) comentam que em algumas situações, a regeneração óssea não se procede da forma esperada, prolongando o tempo de consolidação e por vezes requerendo o emprego de métodos coadjuvantes para auxiliar a cicatrização. De acordo com Muschler et al. (2004), o retardo na consolidação, nos casos de traumas repetitivos, infecções e defeitos cicatriciais, pode estar associado a diminuição do contingente destas células. Por este motivo, o emprego de terapias capazes de acelerar o processo de reparação óssea (como a terapia celular), restaurando precocemente a função do osso, minimizando os custos e a morbidade do paciente, tem sido alvo incessante de pesquisadores do mundo todo (DOUAT, 2004).

2.2 Enxertos e implantes ósseos

2.2.1 Definição e classificação

A correção de inúmeros defeitos ósseos é realizada pela aplicação de enxertos e/ou implantes ósseos em humanos e animais. Os aloimplantes ósseos são considerados as principais fontes para a substituição de grandes falhas ósseas (WHEELER et al.,

2001). O enxerto ósseo é uma técnica de transplante de tecido ósseo cortical ou esponjoso (JOHNSON e HULSE, 2005), e é denominado de acordo com seu local de origem e composição (MILLIS e MARTINEZ, 2007). O termo “enxerto” difere do termo “implante” porque o primeiro refere-se ao emprego de tecido vivo enquanto o segundo, refere-se a material não viável ou ainda material não biológico (STEVENSON, 1998).

Os enxertos podem ser classificados de acordo com o sítio doador (STEVENSON, 1998). Um auto-enxerto é um tecido retirado de uma parte do corpo e transplantado para outro local no mesmo indivíduo. Um aloenxerto ou homoenxerto é um tecido obtido de um indivíduo e transplantado para outro da mesma espécie, porém, geneticamente diferente. Um aloimplante é um osso não viável, preparado para enxertia por alguma técnica de conservação, implantado em outro indivíduo. O xenoenxerto ou heteroenxerto significa o transplante de tecido de um indivíduo a outro de espécies diferentes. Os isoenxertos ou sinenxertos são tecidos transplantados de um indivíduo para outro geneticamente idêntico e da mesma espécie. Os adjetivos que se referem a estes termos são autogênico, autólogo ou autógeno, alogênico ou alólogo, xenogênico, isogênico ou singênico respectivamente (MILLIS e MARTINEZ, 2007).

Os enxertos também podem ser classificados, de acordo com a sua composição estrutural (JOHNSON e HULSE, 2005). Conforme descrevem Millis e Martinez (2007), quando o enxerto é composto de tecido trabecular com alta celularidade, denomina-se de enxerto esponjoso. Já quando é composto de osso compacto, denomina-se enxerto de cortical. Quando o mesmo apresentar a associação de osso trabecular com osso compacto passará a ser denominado de cortico-esponjoso. Ainda é possível classificar o enxerto em osteocondral, quando este for composto pela associação de cartilagem e osso subcondral ou ainda como enxerto medular, quando composto de células mesenquimais indiferenciadas da medula-óssea

2.2.2 Função

O enxerto ósseo possui quatro funções a considerar, entre elas: prover células progenitoras, fatores osteoindutores, matriz osteocondutora e suporte estrutural (MILLIS e MARTINEZ, 2007). Além de prover estabilização mecânica e estrutural ao

leito receptor, o enxerto também é responsável por propriedades osteogênicas (GOLDBERG e STEVENSON, 1987), que tem importante papel na nova formação óssea que irá se proceder, podendo ser oriundo de células do leito receptor ou de células viáveis do próprio enxerto (STEVENSON, 1998).

Quando ocorrer o agrupamento de células mesenquimais dos tecidos adjacentes na periferia do enxerto e estas sofrerem diferenciação em cartilagem ou tecido ósseo, esta propriedade é denominada de osteoindução (STEVENSON, 1998; JOHNSON e HULSE, 2005). Naquela situação, onde o enxerto servir de suporte para o crescimento tecidual orientando sua conformação, ocorrendo o crescimento da microcirculação, tecidos perivasculares e células progenitoras oriundas do leito receptor para o interior do enxerto, a propriedade é de osteocondução (GOLDBERG e STEVENSON, 1987; CORNELL e LANE, 1998; JOHNSON e HULSE, 2005). Segundo Fitch et al. (1997), conforme o tipo, os aloenxertos podem ter papel estrutural além de propriedades de osteoindução e osteocondução. Os enxertos ósseos podem ser fontes de células osteoprogenitoras (osteogênese), produzindo células diretamente ou induzindo a formação destas células a partir dos tecidos circundantes (osteoindução). Também podem proporcionar diferentes níveis de suporte mecânico, que pode variar desde a formação de treliças ocupadoras de espaço para invasão do tecido ósseo hospedeiro (osteocondução), até o suporte de sustentação do peso nas fraturas (JOHNSON e HULSE, 2005).

O enxerto ósseo cortical tem basicamente a função de prover suporte estrutural e osteocondução (MILLIS e MARTINEZ, 2007). Eles conferem primariamente uma sustentação mecânica, agindo como preenchedores de espaço ou escoras de sustentação de peso, juntamente com o dispositivo de fixação interna rígida que o fixa ao leito receptor (STEVENSON, 2005). Os aloimplantes corticais são excelentes meios de suporte mecânico, são osteocondutores, porém, estimulam pouca resposta osteogênica por serem acelulares. Já os autoenxertos de osso esponjoso, são altamente celulares, proporcionando capacidade osteogênica, osteoindutiva e osteocondutiva superior, no entanto como são mecanicamente fracos, não conferem suporte substancial à fratura (JOHNSON e HULSE, 2005). De acordo com Stevenson (2005), o osso cortical também funciona como um andaime ou uma treliça para orientar e sustentar o novo osso hospedeiro. Este processo de penetração e preenchimento do implante por capilares,

tecido perivascular e células osteoprogenitoras provenientes do leito receptor, atualmente chamado de osteocondução, era conhecido no passado como substituição gradativa. Além do auto-enxerto cortical fresco, quando a técnica de preservação não destruiu os fatores osteoindutivos, o aloimplante cortical conservado também pode apresentar potencial osteoindutivo.

2.2.3 Vantagens e desvantagens da enxertia óssea

As vantagens da enxertia óssea estão associadas às propriedades biológicas e mecânicas oferecidas pelo enxerto, que em inúmeras circunstâncias tornam-se a única alternativa no reparo de lesões com grave perda óssea (JOHNSON e HULSE, 2005; STEVENSON, 2005; MILLIS e MARTINEZ, 2007). As desvantagens deste procedimento dependem do tipo de enxerto utilizado, incluindo a invasão do local doador com fontes limitadas de auto-enxerto, rejeição imunomediada de aloenxertos e aloimplantes, possível transmissão de agentes infecciosos, fratura, dor, seroma, hemorragia, infecção do local de colheita e infecção e instabilidade no local do enxerto, resultado em falha (MILLIS e MARTINEZ, 2007).

2.2.4 Indicações e contra-indicações

Aloenxerto de tecido ósseo cortical são empregados no tratamento de fraturas de ossos longos com grave perda de segmentos ósseos ou para substituir tecido ósseo removido em procedimento mutilante necessário ao salvamento do membro (JOHNSON e HULSE, 2005). Os enxertos de osso cortical são escolhidos quando um suporte estrutural é necessário, servindo como ponte entre os defeitos ósseos (MILLIS e MARTINEZ, 2007). Stevenson (2005) comenta que a indicação clínica mais comum para os enxertos ósseos corticais é o reparo das diáfises de ossos longos gravemente fraturados ou a substituição de uma secção de osso longo removida em uma ressecção em bloco

Os enxertos corticais tubulares representam uma boa alternativa em diversas situações, como no tratamento de fraturas diafisárias múltiplas ou cominutivas com perda de segmentos ósseos (WADSWORTH e HENRY, 1976; HENRY e

WADSWORTH, 1981; ALEXANDER, 1983; SCHENA e McCURNIN, 1983; BLOOMBERG et al., 1984; JOHNSON et al., 1985; DUELAND et al., 1989; SINIBALDI, 1989; HOFMANN et al., 1995; PEIRMATTEI e FLO, 1999; ALIEVI et al., 2007; AMÊNDOLA et al., 2008), não união óssea (ALEXANDER, 1983; HOFMANN et al., 1995; PEIRMATTEI e FLO, 1999; WANG e WENG, 2003) e na reposição de perda óssea produzida por intervenção mutilatória (LaRUE et al., 1989; ARO e AHO, 1993; HOFMANN et al., 1995; PEIRMATTEI e FLO, 1999; MORELLO et al., 2001).

Segundo Reynolds et al. (1951), o uso da enxertia na correção de perdas ósseas tem sido o procedimento de eleição para ortopedia veterinária. Porém, em nem todos os casos com perda óssea é possível a realização de um procedimento de enxertia. As restrições à utilização de aloenxertos corticais são consideradas em algumas situações, como nos casos de fratura exposta em que ocorra infecção no foco de fratura, quando houver impossibilidade de fixar o enxerto adequadamente ao leito receptor (HOFMANN et al., 1995; MILLIS e MARTINEZ, 2007) ou ainda nos casos em que o local de enxertia tiver sido anteriormente submetido a radiação (ARO e AHO, 1993; EHRHART et al., 2005).

2.2.5 Colheita, preparo e conservação do enxerto

Devido à capacidade osteogênica superior, ausência de problemas imunológicos e facilidade de incorporação, o osso autólogo tem sido empregado com preferência em detrimento de osso conservado, pelos cirurgiões veterinários (ALEXANDER, 1983). No entanto, em um estudo utilizando ossos tratados com óxido de etileno, Johnson e Stein (1988) concluíram que o enxerto ósseo conservado é superior ao enxerto ósseo cortical colhido a fresco. Os motivos alegados foram que o enxerto a fresco é muito imunogênico, necessita de duas equipes cirúrgicas para realizar os dois procedimentos simultâneos além de implicar no sacrifício do doador a cada enxertia. Além disto, há dificuldade em se obter um doador saudável de porte compatível com o receptor. Segundo Pinto Júnior, (1995), a grande variação no tamanho dos esqueletos dos animais, reduz consideravelmente a possibilidade de se encontrar um doador de tamanho compatível com a conformação física do receptor. Weigel (1996) comentou

que ossos conservados apresentam vantagens em relação ao material colhido a fresco, pois existe uma possibilidade menor de rejeição por parte do receptor, além de poder haver a formação de um banco de ossos. Entretanto, a confecção e manutenção de um banco de ossos para medicina veterinária é ainda assunto discutível na literatura (HENRY e WADSWORTH, 1981; KERWIN et al., 1991; AMÊNDOLA et al., 2008).

O processo de preparação e conservação de aloenxertos corticais causa morte celular, não restando potencial para transplante de células vivas, o que faz com que estes enxertos sejam chamados de aloimplantes (MILLIS e MARTINEZ, 2007). Segundo JOHNSON e HULSE (2005), os aloimplantes são ossos tratados por meio de congelamento, autoclavagem ou preservação química, entre outros, de forma que não apresentem atividade celular. Na preparação do enxerto ou implante após a colheita, MILLIS e MARTINEZ, (2007) enfatizam que todos os tecidos moles incluindo o perióstio devem ser removidos, e a cavidade medular escarificada e limpa para remover toda medula, com o intuito de remover todo o material antigênico. Após este processo, o enxerto diminui intensamente ou elimina a imunogenicidade, tornando a rejeição imune uma causa improvável de falha do aloenxerto cortical.

Conforme Henry e Wadsworth (1981), os ossos devem ser colhidos sob plano profundo de anestesia ou ainda poucos minutos depois da eutanásia. O doador ideal deve ser hígido, esqueleticamente maduro e livre de infecção ou doença infecto-contagiosa, além de doença neoplásica (MILLIS e MARTINEZ, 2007). Alexander (1983) comenta que este enxerto colhido deve apresentar algumas características, dentre as quais não provocar reação de rejeição no leito receptor, ser de fácil aquisição, conservação e baixo custo. Roe et al. (1988), ainda mencionam que além do anteriormente citado, é necessário que o método de colheita e conservação seja viável, de fácil utilização e ainda, acessível à rotina das clínicas de pequenos animais. O acondicionamento correto em meio apropriado é fundamental para sua conservação e posterior utilização (PINTO JÚNIOR, 1990). É consenso que o emprego de técnica asséptica é crítica durante a colheita do implante, a menos que seja empregada alguma técnica de esterilização (ALEXANDER, 1983; STEVENSON, 2005), pois como comentam Denny e Butterworth (2006), quando utilizado *in vivo*, o enxerto não sobrevive na presença de infecção.

A enxertia óssea cortical pode ser realizada a fresco (ALEXANDER, 1983; SCHENA e MCCURNIN, 1983; GOLDBERG e STEVENSON, 1987). No entanto, diversas são as formas de conservação de ossos corticais que podem ser empregadas na conservação deste tecido, podendo citar entre elas o congelamento (HENRY e WADSWORTH, 1981; DUELAND et al. 1989; SINIBALDI, 1989; KERWIN et al., 1991; MUIR e JOHNSON, 1995; DEL CARLO et al., 1999; NATHER e GOH, 2000; RANDAL et al., 2002; YAMAMOTO et al., 2003; LI et al., 2004), a tintura de iodo a 2% (PINTO JÚNIOR, 1995), o óxido de etileno (JOHNSON et al., 1985; JOHNSON e STEIN, 1988; WAGNER et al., 1994), a liofilização (BURCHARDT et al., 1978; SCHENA et al., 1984; MACEDO et al., 1999; GALIA, 2004; ATALAR et al., 2007), a autoclavagem (YAMAMOTO et al., 2003), a radiação (RANDAL et al., 2002) e o mel (MSCHVIDOBADSE, 1978; GAIGA, 2002; AMENDOLA, 2003; ALIEVI et al., 2007; AMÊNDOLO et al. 2008).

Dentre a grande variedade de meios conservantes disponíveis, destaca-se a glicerina 98%, que tem demonstrado-se como um meio eficiente na conservação de ossos empregados em procedimentos de enxertia para a reconstrução de falhas ósseas (PINTO JR. et al., 1995; COSTA, 1996; MELO et al., 1998; DEL CARLO et al., 1999; CORONADO et al., 2000; CAVASSANI et al., 2001; GIOSO et al., 2002; ZILLOTTO et al., 2003; AMENDOLA et al. 2008). Num estudo com aloimplantes ósseos avaliando seis diferentes métodos de conservação Del Carlo et al. (1999), observaram que a glicerina a 98% em temperatura ambiente e o método de congelamento foram os que proporcionaram melhores resultados em cães.

2.2.6 Controle de infecção

A presença de infecção pode resultar em reabsorção do enxerto e osteomielite (MILLIS e MARTINEZ, 2007). O controle de infecção associado à técnica de enxertia é fundamental, pois o enxerto ósseo cortical dificilmente sobrevive na presença desta, sendo rejeitado com formação de seqüestro ósseo (DENNY e BUTTERWORTH, 2006). Por este motivo preconiza-se o emprego de técnica asséptica em sua colheita (STEVENSON, 2005) e a assepsia rigorosa é fundamental ao longo de todo o procedimento de implantação (MILLIS e MARTINEZ, 2007). Como observado em algumas pesquisas, mesmo realizando colheita dos implantes ósseos de forma asséptica,

Barrios et al. (1994) e Ferreira (2008) registraram ainda um pequeno percentual de 6,6% e 2,7% de contaminação.

Embora a infecção deva sempre ser prevenida em todo procedimento cirúrgico, a crença de que as infecções ósseas são difíceis de tratar não é verdadeira. Atualmente, as cefalosporinas atravessam facilmente as membranas capilares, tanto em osso normal quanto infectado e tem ampla distribuição no fluido intersticial ósseo (JOHNSON e HULSE, 2005), no entanto, o problema pode residir no fator resistência bacteriana. Millis e Martinez (2007) comentam que o uso de antibióticos na enxertia óssea é recomendado de forma profilática, podendo estender sua utilização no período pós-operatório.

A profilaxia antimicrobiana consiste na utilização de antibióticos para prevenir a infecção de tecidos não-infeccionados. Bubenik e Smith (2007) citam que esta é empregada em procedimentos ortopédicos limpos envolvendo a implantação de materiais estranhos, intervenções cirúrgicas com duração de mais de duas horas e em artroscopia. De acordo com Raiser (1995), para uma melhor eficiência da profilaxia antimicrobiana, nos casos em que não se utiliza a infusão contínua do medicamento, esta pode ser realizada administrando-se a dose terapêutica do antimicrobiano por via intravenosa em *bolus*, repetindo-se a mesma em intervalos determinados pela constante de eliminação do antibiótico.

A glicerina 98% possui atividade antimicrobiana por agir como agente fixador e desidratante de atuação rápida, tornando-se assim um poderoso antisséptico (PIGOSSI et al., 1971; ALVARENGA, 1992; PAULO, 1997; CORONADO et al., 2000; KRAUSPENHAR, 2003). Embora provoque desidratação tecidual, a glicerina apresenta bons resultados na preservação de tecidos porque conserva a integridade celular (OKAMOTO et al., 2000). No entanto, em função deste conservante não destruir todas as formas de microorganismos, associado ao risco de contaminação durante a preparação pré-cirúrgica do implante, vários estudos utilizando implantes conservados em glicerina 98% e sem a ocorrência de infecção pós-operatória, recomendam imersão do mesmo em solução contendo agente antisséptico (RAISER et al., 2000; MAZZANTI et al., 2004; SALBEGO et al., 2007).

2.2.7 Hidratação do enxerto

Devido a ação desidratante da glicerina, o material conservado torna-se ressecado e de difícil manuseio, o que requer uma hidratação prévia a sua implantação cirúrgica no leito receptor, como ocorre com os implantes teno-ósseos (SALBEGO et al., 2007), para recobrar sua maleabilidade cirúrgica e nos casos de osso cortical, para recobrar a maleabilidade e preservar sua resistência (AMENDOLA et al., 2008). Analisando as características de ossos conservados em glicerina, Melo (1997) indicaram a reidratação para evitar que os enxertos quebrassem, sugerindo que quanto maior o tempo, menos quebração seria o osso. No entanto, em um estudo comparando a resistência a compressão entre ossos bovinos congelados e liofilizados reidratados, Macedo et al. (1999) concluíram que não houve diferença de resistência estatisticamente significativa entre os ossos hidratados e não hidratados, e nem entre os grupos estudados.

Dentre os diversos materiais conservados em glicerina a 98%, o cordão umbilical bovino (MAZZANTI et al., 2000), o centro tendinoso de diafragma ovino (MAZZANTI et al., 2001), a cartilagem auricular de cão (RAPPETI et al., 2003) e o centro frênico de diafragma canino (BRUN et al., 2004) foram reidratados por um período de 15 minutos antes da implantação; o peritônio bovino (DALECK et al., 1992; COSTA et al., 1999), o pericárdio equino (RANZANI et al., 1990) e osso cortical de cão (CAVASSANI et al., 2001; ZILIOOTTO et al., 2003; COSTA et al., 2005) foram reidratados durante 10 minutos; o tendão homólogo (OLIVEIRA et al., 2003) foi reidratado por 20 minutos e a aorta abdominal (OLIVEIRA et al., 2004) por período indeterminado; a cartilagem da pina de cão foi reidratada por 30 minutos (CONTESINI et al., 2001) e 24h (CONTESINI et al., 2003); o segmento tenopatelar homólogo (MAZZANTI et al., 2004; SALBEGO et al; 2007), e tendões caninos (RAISER et al., 2001) foram reidratados durante 24h antes da implantação.

Em função da grande disparidade entre os período de hidratação de diversos tipos teciduais conservados em glicerina 98%, por período não inferior a 30 dias, incluindo ossos corticais e implantes teno-ósseos, Salbego et al. (2006) analisaram a resistência óssea a compressão axial das diáfises ósseas de fêmures de cães, as quais foram conservadas na glicerina 98% por período mínimo de 30 dias e submetidas a diferentes períodos de hidratação. Neste estudo os ossos foram hidratados por uma, seis,

12 e 24h, obtendo melhor resultado no grupo de seis horas. No entanto, a conclusão do estudo, sugeriu o aumento do número de amostras por grupo avaliado visando melhorar a confiabilidade estatística. Atualmente, não existe um consenso sobre o período de hidratação mais apropriado para a implantação de ossos corticais conservados em glicerina.

3.2.8 Resistência biomecânica

A densitometria óssea é uma técnica não invasiva que mede a massa óssea e o risco de fratura, expressando a quantidade de tecido mineralizado na área analisada em g/cm^2 (SANTIAGO e VITRAL, 2006). A medida da densidade mineral óssea pode ser realizada por diferentes métodos de avaliação, dentre os quais podemos citar a radiografia convencional (LEWIECKI e BORGES, 2006), a absorciometria radiográfica (LEWIECKI e BORGES, 2006), a absorciometria por fóton simples (IBÁÑEZ, 2003), a absorciometria por fóton duplo (LEWIECKI e BORGES, 2006), a absorciometria de energia simples de raios X (NORDSTRÖM, 2004), a absorciometria de energia dupla de raios X (LEWIECKI e BORGES, 2006), a ultrasonografia quantitativa (MEIRELES, 1999), a tomografia computadorizada (IBÁÑEZ, 2003; LEWIECKI e BORGES, 2006), a microtomografia computadorizada (TURNER, 2001) e a ressonância magnética (TAKAHASHI et al., 1999).

Segundo Mears (1979), o osso cortical diafisário é definido como um material composto basicamente por hidroxiapatita e colágeno, e que *in vivo* encontra-se em processo de cicatrização e remodelação constante. As características viscoelásticas do mesmo são conferidas devido a sua estrutura não homogênea, presença de fluidos e de trabéculas ósseas. A resistência óssea é variável ao longo do tempo, conforme a idade, a posição anatômica, a intensidade de forças e o nível de atividade exigido (CAMARGO et al., 2002).

Ossos longos estão sujeitos a forças fisiológicas e não fisiológicas. Quando se testa a resistência, pode-se aferir sobre o osso as quatro forças primárias, entre elas a compressão axial, a tensão axial, o envergamento e a torção. As forças fisiológicas são transmitidas ao osso, pela superfície articular e contração muscular. Normalmente estas forças são produzidas pela sustentação de peso, contração muscular e atividades físicas

associadas, e não excedem a resistência limite do osso, não sendo responsáveis por fraturas, exceto em casos especiais. Já as forças não fisiológicas podem ser transmitidas diretamente ao osso e facilmente excedem o limite da resistência óssea causando fratura. Estas ocorrem em situações incomuns, como acidentes automobilísticos, ferimentos por arma de fogo e quedas. De acordo com a forma na qual os ossos são submetidos às diferentes cargas, são produzidos os padrões específicos de fraturas (HULSE e HYMAN, 2007).

Com a finalidade de determinar as propriedades biomecânicas de diferentes materiais, Souza, (1974) comenta que podem ser realizados dois tipos de testes: os destrutivos, que compreendem os testes de tração, impacto, torção, compressão, flexão e fadiga e os não destrutivos, principalmente baseados na aplicação de ultra-som e raios-X, entre outros.

Conforme Castania (2002), para a análise da resistência de enxertos ósseos, o principal teste a ser realizado em sua avaliação é a compressão axial. Esta força é aquela aplicada em uma direção e distribuída igualmente sobre a superfície da estrutura sobrecarregada (HULSE e HYMAN, 2007). No entanto, Muller et al. (2006), compararam o uso do ultra-som linear com a compressão mecânica em diáfises femorais humanas para avaliar a ocorrência de microfissuras, concluindo que o método ecográfico pode ser utilizado de forma confiável para substituir o teste compressivo, não sendo necessária desta forma, a destruição do osso.

Quando escolhidos com a finalidade de reparar perda óssea, os implantes ósseos devem apresentar resistência estrutural adequada. Segundo Schimidt et al., (1994), os testes biomecânicos têm se tornado cada vez mais comuns na avaliação da rigidez do segmentos ósseos, enquanto cargas fisiológicas são aplicadas para avaliar a sua estabilidade mecânica. Ziliotto et al. (2003) citaram que os implantes ósseos conservados em glicerina podem sofrer fraturas no momento da colocação de parafusos, por apresentarem menor resistência que o osso colhido a fresco. O osso conservado em glicerina apresenta-se mais esbranquiçado e quebradiço à manipulação, sendo esta característica mais pronunciada naqueles implantes conservados por períodos mais prolongados (MELO, 1997).

Diversos testes para avaliar a resistência biomecânica óssea têm sido empregados (DEL CARLO et al., 1999), considerando-se que a maioria dos métodos de

conservação produzem efeitos deletério sobre a resistência óssea (WEIGEL, 1996; CORNU et al., 2003; BALL et al., 2004; AMENDOLA et al., 2008).

A resistência à compressão axial, foi avaliada em ossos corticais de fêmures de cães, conservados em mel ou glicerina a 98% por período não inferior a 30 dias, num estudo realizado por Amendola et al. (2008). Neste estudo, concluiu-se que a glicerina é estatisticamente mais eficiente, em relação o mel, na manutenção da resistência axial, e que a hidratação é fundamental na retomada da maleabilidade óssea e, dessa forma, na manutenção de sua resistência.

Ao estudar a aplicação de aloimplantes ósseos congelados nas faces laterais dos fêmures de coelhos, Li et al. (2004) observaram que a resistência óssea havia diminuído em 38% até a 16^a semana, após implantação, sendo que a partir desse momento, conforme o leito doador ia sendo substituído pelo receptor, a resistência ia sendo progressivamente recobrada. Ao aplicar enxertos osteocondrais no joelho de coelhos e avaliar a resistência desses implantes, Nam et al. (2004), observaram que ocorriam perdas de propriedades estruturais do osso em um curto período inicial e que estas, eram recobradas com o passar do tempo.

Durante as primeiras fases da consolidação óssea, as fraturas são bastante sensíveis aos diferentes movimentos aos quais são submetidas, e o efeito de compressão axial atua como importante adjuvante na união dos segmentos ósseos (EPARI et al., 2006). Para estudar o efeito da falta de uso dos membros sobre o grau de resistência óssea em tíbias de ratos, Silva e Volpon (2004) utilizaram 53 animais que permaneceram suspensos pelas caudas por 21 dias consecutivos, sem permitir que os membros dos mesmos tocassem qualquer superfície durante todo esse período. Como resultado, foi observado biomecanicamente que os ratos apresentaram perda de resistência óssea significativa, que foi comprovada mediante a realização de testes de flexão em três pontos diferentes do osso.

Estudando as variações entre as propriedades micromecânicas de diferentes regiões do fêmur de ratos, Ramasamy e Akkus (2006) observaram que a deposição de minerais não varia conforme o local avaliado, no entanto, a orientação das fibras colágenas apresenta disposição mais homogenia na porção anterior em relação à posterior, concluindo que a orientação das fibras tem importante papel no mecanismo

das fraturas.

Muller et al. (2006) comentam que as microfissuras produzem importante efeito deletério sobre a qualidade óssea, aumentando de forma significativa o risco de fraturas. Devido ao importante papel destas microfissuras na perda de resistência óssea, Reilly e Currey (2000) estudaram o seu efeito sobre a resistência ao impacto em tíbias e úmero bovinos. Um grupo de ossos foi inicialmente submetido a forças de arqueamento para sofrer microfratura e mais tarde sua resistência foi analisada por teste de impacto destrutivo, comparando este com o grupo controle, que não foi fragilizado. Como conclusão, observou-se que os ossos fragilizados apresentaram severa redução em sua resistência na superfície onde houve compressão.

Outro estudo utilizando segmentos ósseos de diáfises femorais humanas submetidas a implantação de prótese da articulação desse osso ao acetábulo, Wachter et al. (2001) avaliaram a porosidade e a densidade mineral do osso cortical por meio de tomografias computadorizadas, com o objetivo de comparar o grau de resistência dessas estruturas. Como resultados deste estudo, observaram que não existem correlações entre porosidade e elasticidade. No entanto, observaram que as propriedades biomecânicas apresentam estreita relação com a densidade mineral. Dessa forma, este estudo pode ser considerado um eficiente meio para prever a resistência óssea femoral de uma forma não destrutiva.

2.2.09 Implantação cirúrgica

Defeitos segmentares grandes requerem um dispositivo de fixação interna rígida e um enxerto cortical (STEVENSON, 2005). A reconstrução óssea exata da fratura apresenta a vantagem de que a estrutura óssea reconstruída sustenta a fixação ao mesmo tempo, que a fixação sustenta o osso (ROE, 2007). Conforme cita Stevenson (2005), o fêmur, juntamente com o úmero e a tíbia são os ossos mais comumente reparados por aloimplantes. Millis e Martinez (2007), comentam que o enxerto ósseo pode ser considerado como o fator crítico entre a união óssea bem sucedida e a falha catastrófica, pois a adequada aplicação deste pode ser o diferencial entre o salvamento do membro e sua amputação.

A imobilização rígida do enxerto é fundamental durante o processo de cicatrização (SINIBALDI, 1989; DENNY e BUTTERWORTH, 2006), pois enxertos

corticais de qualquer tipo estão fadados ao fracasso quando forem inadequadamente fixados (STEVENSON, 1998).

Hulse e Hyman (2007) relatam que a quantidade de calo ósseo formada durante a consolidação depende diretamente do grau de movimentação no foco de fratura, por isso quanto maior a instabilidade, maior o diâmetro dos calos interno e externo. Independente do dispositivo de fixação metálica utilizado, este ficará sujeito a danos de fadiga aumentados até que seja formado um calo ósseo sólido (STEVENSON, 1999), e quanto mais distante do centro do osso o calo for depositado, maior a capacidade do osso lesado em resistir às forças de rotação e flexão (HULSE e HYMAN, 2007).

Além da estabilidade no foco de fratura, também é necessário que o ferimento esteja livre de infecção (STEVENSON, 2005), pois na presença desta, independente do dispositivo rígido de fixação interna, ocorrerá reabsorção do enxerto e osteomielite com formação de seqüestro ósseo (MILLIS e MARTINEZ, 2007).

Outro fator importante para o sucesso da enxertia é o contato entre as extremidades da interface enxerto-hospedeiro (SINIBALDI, 1989; STEVENSON et al., 1991). Segundo Stevenson (2005), é desejado que ocorra o máximo possível de contato na interface osso-receptor. Para Henry e Wadsworth (1981), no enxerto de osso cortical, o contato em uma área correspondente a 360° é considerado ideal para o sucesso do procedimento.

Por fim, o último fator a ser citado, embora não menos importante que qualquer um dos anteriores, diz respeito à preservação da vascularização do foco de fratura (HULSE e HYMAN, 2007; MILLIS e JACKSON, 2007; ROE, 2007). Segundo Roe (2007), a lesão cirúrgica dos tecidos ao redor da fratura deve ser minimizada para preservar a irrigação sanguínea. O suprimento vascular inicial necessário para a consolidação da fratura é de origem extra-óssea, proveniente dos tecidos adjacentes, por isso a manipulação extensa e o retalhamento destes tecidos durante a reparação da fratura, pode resultar em desvascularização dos fragmentos e consolidação tardia (MILLIS e JACKSON, 2007). Hulse e Hyman (2007) enfatizam que a preservação do suprimento nutricional inicial é vital para as células pluripotentes próximas ao local da fratura, o que pode ser obtido com o rebatimento delicado dos tecidos moles durante a redução aberta da mesma.

2.2.10 Métodos de fixação do enxerto

O implante aplicado na redução da fratura tem função de neutralizar as forças sustentadas pelo osso. Esse tipo de implante é chamado implante de apoio, visto que suporta todo o peso e resiste a todas as forças aplicadas ao osso (ROE, 2007).

Alguns métodos de estabilização cirúrgica podem ser empregados para fixar o enxerto ao leito receptor. Dentre eles cita-se o uso de pinos intramedulares (PINTO JR., 1995; BENEVENIA et al., 2000; VAN BOERUM et al., 2003), pinos intramedulares associados a fixação esquelética externa (BLOOMBERG et al., 1984), placas de compressão dinâmica (VANDER GRIEND, 1994; MUIR e JOHNSON, 1995; BENEVENIA et al., 2000; CASCIO et al., 2003; ALIEVI et al., 2007) ou ainda a haste intramedular bloqueada (MUIR e JOHNSON, 1995), esta pouco empregada para esta finalidade na medicina humana.

Estudando a ocorrência de fraturas em enxertos ósseos utilizados na reconstrução de grandes falhas em humanos, Thompson Jr. et al. (2000) concluíram que existe alta correlação ($P < 0,00005$) entre a presença de fratura e a penetração cortical no enxerto, e por este motivo recomendam o uso da haste intramedular associada ao cimento ósseo em detrimento de placa e parafusos corticais, como método preferencial.

Em uma pesquisa visando o tratamento de fraturas cominutivas de cães, Pinto Jr. (1995) empregou pino intramedular associado à bandagem esparadrapada na fixação do implante ósseo, relatando boa estabilização do foco de fratura. Em outro estudo, testando a fixação de enxerto ósseo cortical em cães com uso de pino intramedular associado a fixador esquelético externo, Bloomberg et al. (1984), obtiveram bons resultados, porém recomendam o uso de pinos intramedulares na fixação do enxerto, somente nos casos em que a placa de compressão dinâmica não possa ser empregada.

Comparando a fixação de enxertos ósseos por placas ou pinos intramedulares em tíbias de cães, Benevenia et al. (2000) observaram que ambos os sistemas foram satisfatórios, no entanto, mesmo sem uma diferença estatística relevante entre os dois métodos, o métodos de fixação por placa demonstrou-se mais eficiente na sustentação quando aplicadas forças de torção e arqueamento.

Outro artifício empregado na tentativa de estabilizar o implante ósseo cortical na fixação por placa de compressão dinâmica foi realizado por Straw et al. (1992), em que eles realizaram o preenchimento da cavidade medular com polimetilmetacrilato. Os autores verificaram ausência de interferência do composto na incorporação do enxerto.

Ao comparar a estabilização cirúrgica de enxertos ósseos corticais em ovelhas utilizando placa de compressão dinâmica e haste intramedular bloqueada, Muir e Johnson (1995) concluíram não haver diferença significativa quanto a área do calo ósseo e a qualidade de incorporação do enxerto. No entanto, Vander Griend (1994), comenta que quando comparada a fixação do enxerto entre placa e haste bloqueada, observa-se que devido a perfuração do mesmo para passagem dos parafusos, ocorre maior fragilização deste com predisposição a fratura pelo uso da placa, o que já não ocorre no uso da haste, pois o enxerto não é perfurado.

Em detrimento dos demais métodos de estabilização, o uso de placas e parafusos corticais para a fixação rígida de enxertos ósseos corticais é amplamente utilizada (HENRY e WADSWORTH, 1981; DUELAND et al., 1989; SINIBALDI, 1989; KERWIN et al., 1991; STRAW et al., 1992; CASCIO et al., 2003; ALIEVI et al., 2006; FERREIRA, 2008).

Roe (2007) comenta que ao optar-se pela colocação de uma placa para a estabilização de uma fratura, muitos fatores devem ser considerados, entre eles o tipo e tamanho da placa, o peso do animal, as dimensões do osso acometido, o tamanho dos fragmentos, o método de aplicação e as cargas esperadas. Segundo Millis e Martinez (2007), a placa de compressão dinâmica é um dos métodos de fixação rígida que garante ótima estabilidade na interface enxerto-hospedeiro. De acordo com Roe (2007), este tipo de placa compõe o principal sistema de placas ósseas, e sua denominação provém do desenho do orifício do parafuso, que quando corretamente aplicado promove a compressão dos fragmentos da fratura. A compressão é produzida por que os orifícios da placa são ovais e o contato com a cabeça do parafuso é inclinada. Dessa forma, quando o parafuso é inserido no final superior do orifício e é atarraxado, a cabeça do mesmo desliza pela inclinação e o fragmento ósseo que é fixado pelo parafuso, move-se com ele de acordo com a inclinação do orifício da placa, comprimindo os dois fragmentos.

Geralmente, o aloenxerto é fixado na interface enxerto-hospedeiro com placa óssea, sendo utilizado ao menos dois e preferencialmente três parafusos no osso hospedeiro proximal e distal, assim como no aloenxerto. Os parafusos, imediatamente proximal e distal ao enxerto são colocados excentricamente para produzir compressão na junção enxerto-hospedeiro (JOHNSON, 1988; SINIBALDI, 1989; KERWIN et al., 1991). No entanto, é importante ressaltar que a utilização da placa de compressão dinâmica só é viável nas situações onde a linha de fratura for transversa, pois quando a linha for oblíqua, a compressão promove o cisalhamento dos fragmentos (ROE, 2007).

O número de parafusos e a forma com que são empregados na fixação da placa ao enxerto e ao osso receptor é um fator importante no sucesso do procedimento. Sinibaldi (1989) comenta que o enxerto deve ser fixado à placa de compressão por no mínimo dois parafusos. Já a fixação do implante ao osso receptor, tanto proximal como distal ao enxerto, também não deve ser feita por menos de dois parafusos, sendo que em raras situações, o emprego de dois parafusos proximais e dois distais, consegue prover boa estabilidade ao foco de fratura (SINIBALDI, 1989). Dessa forma, as recomendações encontradas na literatura indicam o uso de no mínimo três (HENRY e WADSWORTH, 1981), sendo considerado adequado um número entre quatro e cinco parafusos em cada um dos segmentos ósseos (DUELAND et al., 1989; SINIBALDI, 1989; ROE, 2007). A fixação inicial da placa ocorre geralmente no enxerto e em seguida no osso hospedeiro. Roe (2007) salienta que em muitas situações, os parafusos podem não ser viáveis para serem colocados em todos os orifícios da placa.

A resistência na fixação do parafuso também está na dependência da região do osso em que o este é implantado. Em um trabalho estudando diferentes porções de tíbias e fêmures, Neto et al. (1999) concluíram que o osso diafisário, é qualitativamente e quantitativamente mais resistente que o osso metafisário. Neste estudo foram aplicados parafusos metálicos nas duas regiões, abrangendo as duas corticais. Estes parafusos foram submetidos a testes de extração, demonstrando que a resistência da cavidade espiral produzida pelo parafuso, depende significativamente do local em que este é inserido.

A aplicação de parafusos para a fixação da placa produz fragilidade óssea. Comparando a resistência à força de rotação, entre dois grupos ossos compostos por tíbias, estabilizadas com placas metálicas, onde no primeiro grupo os parafusos

abrangiam somente uma das corticais ósseas, e no segundo, abrangiam as duas corticais, Remiger et al. (1997), concluíram que as tíbias com orifícios em uma cortical apresentaram resistência significativamente maior do que as que tiveram as duas corticais perfuradas.

Roe (2007) cita que as placas ósseas são feitas principalmente de aço inoxidável 316L, e que embora existam outras composições mais maleáveis, além do titânio, que favorecem a modelagem das placas aos defeitos ósseos, estas não são tão resistentes. No entanto, independente da composição, é importante conformar a placa de acordo com a superfície óssea, para obter uma boa fixação e produzir a estabilidade desejada (JOHNSON e HULSE, 2005; ROE, 2007). Além destes cuidados, Fitch. et al. (1997) comentam que a estabilidade da junção enxerto-hospedeiro pode ser aumentada ao se realizar a fixação do enxerto por osteotomia em degrau.

Hulse e Hyman (2007) enfatizam, que o emprego de implante deve ser associado com a lesão vascular que ocorre durante a cirurgia, por isso, deve-se ter atenção redobrada aos princípios da cirurgia atraumática para que os resultados obtidos sejam satisfatórios. A principal preocupação reside na manipulação dos fragmentos fraturados durante o posicionamento do implante. A necessidade de rebater os tecidos ao redor da fratura, por vezes em área extensa, pode posteriormente desvitalizar partes do osso, retardando a consolidação e aumentando o risco de infecção (ROE, 2007).

Quando aplicado de forma correta em uma fratura simples, placas e parafusos ósseos atuam juntamente ao osso, proporcionando uma combinação que apresenta rigidez e resistência, assemelhando-se ao osso normal (HULSE e HYMAN, 2007), produzindo desta forma excelente estabilidade no local da fratura, resistindo bem à tensão, compressão e rotação aplicadas ao foco de fratura (ROE, 2007). Quando o osso e a placa não trabalharem mecanicamente juntos, devido a uma implantação incorreta, a placa é forçada a resistir a todas as forças aplicadas ao membro, ficando mais suscetível a flexão, o que geralmente resulta em fratura do implante e falha no procedimento.

A determinação do momento adequado para a remoção do dispositivo de fixação pode ser difícil. Para que esta decisão seja correta, ela deve ser baseada na avaliação radiográfica da fratura em cicatrização, sendo obrigatório o conhecimento da aparência radiográfica da cicatrização óssea associada aos diferentes sistemas de fixação (JOHNSON e HULSE, 2005). Durante a fase reabsortiva, o enxerto torna-se mais fraco

que o osso hospedeiro ou que o enxerto não remodelado, permanecendo frágil por período considerável após a correção cirúrgica. Por este motivo, os dispositivos de fixação devem permanecer no local por meses a anos para possibilitar a substituição do enxerto, que em alguns pacientes pode nunca ocorrer completamente. Na maioria dos casos, a fixação geralmente não é removida, e quando for necessária, não deve ser feita em período inferior a 18 a 24 meses, sendo removida apenas quando a consolidação radiográfica tiver ocorrido (MILLIS e MARTINEZ, 2007). Segundo Johnson e Hulse (2005), a remoção da placa deve ser feita somente 3 a 4 meses após a união óssea radiográfica ter sido observada. No entanto, Stevenson (2005) salienta que a aparência radiográfica pode não apresentar boa correlação com a força mecânica real, complicando as decisões clínicas relativas a remoção dos implantes metálicos.

Em um trabalho com cães submetidos à enxertia óssea cortical fixada por placa, Sinibaldi (1989) observou que o melhor momento para remoção da placa é entre o segundo e terceiro ano após a implantação. Millis e Martinez (2007) descrevem que a remoção dos parafusos deve seguir uma ordem intercalar para produzir pressão elevada ao osso. Após 2 a 3 meses da primeira remoção, todos os parafusos são removidos, exceto dois de cada lado do aloimplante. A placa toda deverá ser removida, apenas 3 a 6 meses mais tarde. Johnson e Hulse (2005) indicam a remoção da placa, quando esta for implantada em locais com pouca cobertura tecidual, como rádio e tíbia, haja vista que a condução de frio, produzida pelo implante, gera desconforto ao paciente.

2.2.11 Incorporação e rejeição

Burchardt (1983) define o processo de substituição do tecido ósseo necrótico por osso novo viável como incorporação. Neste processo ocorre reabsorção do tecido morto com posterior intracrescimento de novo tecido ósseo. Millis e Martinez (2007), comentam que em alguns pacientes, a substituição do enxerto pode nunca ocorrer completamente. Este processo de incorporação do enxerto ósseo é complexo e sua velocidade e incorporação completa dependem diretamente de múltiplas variáveis, no entanto nenhuma variável isolada determina por si só o sucesso da incorporação (STEVENSON et al., 1996; STEVENSON et al., 1997). Grandes segmentos ósseos requerem maior tempo para serem incorporados quando comparados a segmentos

menores (MILLIS e MARTINEZ, 2007). Para a incorporação bem sucedida de qualquer enxerto cortical é exigida a estabilidade absoluta, considerada o principal fator responsável pela consolidação (SINIBALDI, 1989; STEVENSON, 1999; STEVENSON, 2005; MILLIS e MARTINEZ, 2007).

Outros fatores relevantes para a ocorrência de incorporação adequada de um enxerto cortical são a irrigação sanguínea, a ausência de infecção e o contato ósseo (STEVENSON, 2005; MILLIS e MARTINEZ, 2007). Durante a fase inicial as células inflamatórias invadem a região e ocorre a neovascularização, no entanto, a movimentação da interface enxerto-hospedeiro evita ou impede este processo (STEVENSON, 2005). Millis e Martinez (2007) citam que o aloenxerto cortical é revascularizado, reabsorvido e substituído lentamente pelo tecido do hospedeiro, com o enxerto atuando como suporte para formação de novo osso. Este processo lento de reabsorção e remodelamento que resulta na reconstrução dinâmica e consolidação da fratura, foi chamado no passado de substituição demorada ou substituição tardia.

Bauer e Muschler (2000), descrevem os principais eventos biológicos ocorridos junto ao enxerto durante o processo de incorporação. Dentre eles são citados a formação de hematoma, a inflamação, migração e proliferação de células mesenquimais com formação de tecido fibrovascular dentro e ao redor do enxerto, a revascularização do enxerto pelos canais de Havers e Volkmann, a reabsorção osteoclástica da superfície do enxerto e a formação óssea nas superfícies do enxerto, seja por via intramembranosa e/ou endocondral. A incorporação dos enxertos corticais se inicia primeiramente mais por parte dos osteoclastos do que dos osteoblastos (STEVENSON, 2005). Após a reabsorção, ocorre a liberação de proteína morfogenética, a qual estimula a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos. Conforme a consolidação da fratura progride, ocorre deposição seqüencial de tecidos como cartilagem e osso, o que aumenta o volume do calo e a estabilidade do foco de fratura (MILLIS e JACKSON, 2007).

Millis e Martinez (2007) comentam que durante o remodelamento da interface enxerto-hospedeiro, todo enxerto ósseo alogênico sofre reabsorção lenta, resultando inicialmente em aumento da porosidade da arquitetura do enxerto. Este processo de reabsorção e remodelamento acarreta na diminuição da resistência mecânica da construção hospedeiro-enxerto e potencialmente coloca o local da enxertia em risco de

falhar. Este risco persiste até que o remodelamento e a reabsorção do enxerto tenham ocorrido, com substituição do enxerto por osso novo do hospedeiro. Segundo Stevenson (2005), o processo de reabsorção do osso cortical tem intensa atividade duas semanas após a implantação, aumentando esta atividade até a sexta semana ou mais, e posteriormente se reduz gradualmente a níveis quase normais ao final de um ano. Radiograficamente é observado aumento da radiolucência (luminosidade). A atividade de formação óssea é mais intensa aos cinco a seis meses após a correção, sendo maior, nas porções distais e proximais do enxerto (JOHNSON e STEIN, 1988), e menor na região central do mesmo (WAGNER, 1994; MILLIS e MARTINEZ, 2007).

Vários fatores, entre eles, as propriedades biológicas do enxerto, a resposta do leito receptor, a estabilidade da fixação e a resistência mecânica do enxerto influenciam no processo de incorporação de um enxerto ósseo não-vascularizado (STEVENSON e HOROWITZ, 1992; BAUER e MUSCHLER, 2000). Também o tamanho do enxerto é fator importante no processo de consolidação (SINIBALDI (1989). Stevenson et al. (1996) citam que, embora o enxerto e o ambiente do leito receptor contribuam de forma isolada para o processo de incorporação, é a interação entre estes dois fatores que determina o sucesso ou não da enxertia.

O tamanho do enxerto influencia no processo de consolidação. Os enxertos pequenos podem ser reabsorvidos e substituídos gradualmente, no entanto os enxertos maiores requerem maior tempo para que ocorra a reabsorção completa, a qual pode nunca ocorrer (SINIBALDI, 1989). A diferença de tamanho entre o enxerto e o osso-receptor, não interfere na fixação da placa nem retarda a consolidação, guardadas as devidas proporções (SCHENA e MCCURNIN, 1983). No entanto, o tamanho e forma do enxerto, devem proporcionar uma área de contato entre este e osso-receptor em torno de 75% a 100%, para proporcionar adequada incorporação (FITCH et al., 1997). Vander Griend (1994) destaca que quando a fixação for adequada, a distância de 2mm ou menos entre o enxerto e o osso-receptor não interfere com evolução da consolidação, enquanto espaços maiores requerem mais tempo para consolidar. Segundo Bauer e Muschler (2000), quando a fixação do enxerto ósseo não for adequada, ocorrerá formação de tecido de granulação e fibrose na interface enxerto-osso receptor, impedindo sua incorporação.

O processo de reabsorção deve ocorrer antes, para que o novo osso possa ser formado. Contudo, a modulação da resposta inflamatória e do sistema imune, embora não adequadamente entendida, é fundamental na manutenção do balanço entre reabsorção e formação óssea, para permitir que o enxerto seja revascularizado e substituído sem perda considerável de resistência (STEVENSON e HOROWITZ, 1992). De acordo com Millis e Martinez (2007), a resistência do osso é voltada para o equilíbrio entre formação de osso e sua reabsorção. Todo tecido biológico necessita de estímulos mecânicos para sobreviver, em especial o osso, que é remodelado ao longo de toda a vida. O estresse mecânico elevado altera este equilíbrio, e o estado de desuso produz reabsorção. A remodelação óssea ocorre de forma construtiva ou destrutiva de acordo com o estresse mecânico ao qual o osso é submetido. Quando este for sobrecarregado, ou seja, submetido a forças que causam deformações plásticas, as quais produzem lesões internas sem que ocorra fratura, ele reage a essa sobrecarga com uma rápida e massiva hipertrofia (CHAMAY e TSCHANTZ, 1972). Gould (1993) explica que a Lei de Wolf relaciona o crescimento ósseo aos estresses e estiramento localizados no osso, ou seja, a capacidade do osso de adaptar-se às mudanças de tamanho, forma e estrutura, dependendo dos estresses mecânicos submetidos a esse tecido.

Chamay e Tschantz (1972) descrevem que o estresse mecânico estimula o modelamento e remodelamento ósseo. Os ossos sujeitos a estiramento mecânico desenvolvem cargas elétricas, onde nas regiões que sofrem compressão (tendem a ser côncavas) predominam cargas negativas, e nas regiões que sofrem estiramento (tendem a ser convexas) predominam cargas positivas. Nas regiões comprimidas predomina a atividade osteoclástica, e nas regiões distendidas predomina a atividade osteoblástica. Desta forma, quando um osso é submetido a uma carga mecânica, ele modifica sua estrutura por aposição óssea na sua concavidade e por reabsorção na sua convexidade.

Podemos determinar a incorporação de um enxerto ósseo baseado em sua análise histológica ou em sua avaliação clínica. Histologicamente define-se como incorporado, quando ocorrer revascularização e substituição do mesmo por osso novo do leito receptor. Quanto ao ponto de vista clínico, é considerado incorporado, quando ocorrer união das interfaces enxerto-hospedeiro, sendo possível a sustentação do peso ao apoio sem manifestação de dor ou fratura (STEVENSON e HOROWITZ, 1992).

Millis e Jackson (2007) comentam que o período de consolidação óssea previsto é variável, sendo influenciado pela idade e raça do animal, localização e configuração da fratura, grau de lesão dos tecidos moles adjacentes, presença de defeitos ósseos e pelo tipo de fixação aplicada. Durante este período, as radiografias devem ser realizadas em intervalos regulares para certificar que a consolidação esteja progredindo de forma apropriada. Até que a consolidação adequada tenha ocorrido, a atividade física deve ser restrita, porém não ausente (MILLIS e MARTINEZ, 2007).

O processo de rejeição tem sido considerado quando ocorrer reabsorção do enxerto ósseo ou este apresentar falha mecânica prematura (STEVENSON e HOROWITZ, 1992). Segundo Burchardt (1983), os sinais de inflamação com presença linfocitária, ruptura vascular, encapsulamento fibroso, reabsorção da periferia do enxerto e não-união ou fratura por fadiga, caracterizam o processo de rejeição do enxerto ósseo. Aparentemente, o componente mais imunogênico do osso é a medula óssea.

2.2.12 Avaliação dos resultados

O progresso da consolidação pode ser avaliado clinicamente (STEVENSON e HOROWITZ, 1992) e por meio de imagem radiográfica (JOHNSON e HULSE, 2005; MILLIS e MARTINEZ, 2007). A avaliação funcional do membro pélvico pode ser realizada de acordo com os parâmetros estabelecidos por Tudury e Raiser (1985), classificando o apoio do membro ao solo em diferentes graus de claudicação. O emprego da radiografia permite a avaliação da consolidação de forma não invasiva, e deve ser realizada no pós-operatório para avaliar o alinhamento da fratura e a posição do implante, devendo ser repetidas a cada quatro semanas durante o processo normal de cicatrização (JOHNSON e HULSE, 2005).

O progresso da consolidação pode também ser avaliado pela análise histológica do calo ósseo (STEVENSON e HOROWITZ, 1992) em fragmentos ósseos colhidos por biópsia (LaRUE et al, 2005). De acordo com LaRue et al. (2005), o trépano de Michelle, dispositivo bastante empregado em medicina veterinária para a realização de biópsias ósseas, poderia provocar fratura do osso devido ao tamanho do orifício produzido no ato da biópsia. Este procedimento, quando realizado com um planejamento inadequado, pode resultar em amostras insuficientes para avaliação ou sérias complicações. A

hemorragia produzida pela biópsia óssea pode ser facilmente contida com o emprego de cera óssea ou esponja hemostática. Em seu estudo, Camargo et al. (2002) avaliaram o enfraquecimento causado pela confecção de janela óssea cortical na diáfise femoral de cães. Foram avaliados dois grupos, em que em um, foi confeccionada um janela circular e no outro uma janela quadrada, com a diagonal semelhante ao diâmetro da janela circular. Ao submeterem os ossos ao teste de tensão torcional, observaram que não havia diferença significativa entre a resistência nos dois grupos de ossos. Segundo LaRue et al. (2005), uma vez colhido o material, este deve ser acondicionado tão logo quando possível em solução de formalina neutra tamponada a 10%, para evitar o ressecamento e preservar a integridade do tecido.

A avaliação da rejeição do implante será considerada quando ocorrer reabsorção do enxerto ósseo ou houver falha mecânica prematura, o que poderá ser acompanhado por exame radiográfico (STEVENSON e HOROWITZ, 1992) ou por avaliação clínica (BURCHARDT, 1983). No entanto, a avaliação histológica é uma tarefa complicada, porque embora as biópsias ósseas auxiliem no diagnóstico de lesões ósseas líticas ou proliferativas (LaRUE et al., 2005), elas podem não ser representativas para rejeição, pois o infiltrado celular geralmente não é uniforme (STEVENSON e HOROWITZ, 1992).

2.2.13 Complicações

Muitas complicações podem ocorrer com o reparo e posterior consolidação de uma fratura (MILLIS e JACKSON, 2007). As principais complicações associadas com aloenxertos corticais incluem fraturas do enxerto, não-união da interface enxerto-hospedeiro, rejeição e infecção (JOHNSON, 1988; SINIBALDI, 1989), além de afrouxamento do implante e instabilidade do foco de fratura.

Millis e Jackson (2007) descrevem a instabilidade como a causa mais comum de fraturas tardias ou não uniões, que poderiam evoluir para união óssea, se inicialmente tivessem recebido fixação óssea apropriada. A cartilagem, e especialmente o osso, possuem menor tolerância a movimentação no foco de fratura antes de falharem, por isso o movimento excessivo na interface enxerto-hospedeiro causa falha dos tecidos e

lesão aos vasos que cruzam a linha de fratura, resultado em consolidação tardia ou não-união óssea.

Em um estudo retrospectivo, analisando as falhas no tratamento de fraturas cominutivas em ossos longos de cães, tratadas por implantação de aloenxerto cortical, Henry e Wadsworth (1981) classificaram os fatores associados à falha da enxertia, os quais foram divididos em três categorias: Não-significantes; possivelmente significantes e definitivamente significantes. Já Stevenson (1998), classifica estes fatores como deficiência da vascularização e angiogênese, deficiência da resposta ósseo-cartilaginosa e deficiência de força, estabilidade e continuidade óssea.

A osteomielite é definida como inflamação do osso e do seu conteúdo medular. A infecção local dos tecidos moles ou a osteomielite produzem necrose tecidual e retardam a consolidação (MILLIS e JACKSON, 2007). Segundo Bubenik e Smith (2007), a maior parte das infecções decorre de bactérias, sendo que fungos têm participação mais modesta, enquanto os vírus e parasitas raramente estão envolvidos. Tomford et al. (1981) realizaram estudo para verificar a prevalência de infecção em pacientes humanos submetidos à implantação de tecido ósseo alógeno liofilizado. A taxa de infecção foi de 6,9%, ocorrendo em mais da metade desses pacientes infecções leves, ou seja, alterações que não afetaram a recuperação. Os demais sofreram alterações graves, o que exigiu nova intervenção. Os agentes envolvidos nestes casos foram o *Staphylococcus epidermidis* e o *Staphylococcus aureus*. Problemas como infecção, união retardada, não-união e fratura do enxerto, são descritas por Mankin et al. (1983) como complicações tardias associadas a enxertia óssea em pacientes humanos. Problemas semelhantes foram observados por Ortiz-Cruz et al. (1997).

Millis e Jackson (2007) salientam que a presença da lacuna entre as faces de contato enxerto-hospedeiro, pode interferir na consolidação. A redução inadequada dos fragmentos fraturados ou a presença de grandes lacunas de fratura resultantes de perda óssea podem resultar em união tardia ou não-união. Além deste fator, os tecidos moles também podem ficar interpostos na lacuna entre as margens da fratura impedindo a formação do calo.

Estudando as fraturas ocorridas em enxertos ósseos corticais em humanos, Thompson Jr. et al. (2000), concluíram que existe alta correlação entre a presença de fratura e a penetração cortical no enxerto. Estes dados comprovam que a aplicação de

parafusos no enxerto para a fixação da placa ou de outro método de estabilização produzem fragilidade óssea.

2.3 TERAPIA CELULAR

2.3.1 Características gerais das células-tronco

A célula-tronco é um tipo especial de célula que tem a capacidade única de se auto-renovar e dar origem a células especializadas (BERESFORD, 1989). Souza et al. (2005) comentam que estas células são pluripotentes e possuem a capacidade de colonizar todo o organismo ou regenerar segmentos de um tecido lesado. Elas também podem desempenhar a função de uma célula progenitora quando supridas as condições apropriadas (CAPLAN, 1991).

Segundo Bianco et al. (2001), as células-tronco e as células progenitoras são a fonte de todos os novos tecidos formados pelos sistemas de reparo e remodelação do organismo, sendo reguladas por sinais químicos e físicos que controlam sua ativação, proliferação, migração, diferenciação e período de sobrevivência. Atualmente, estas células auxiliam na compreensão dos mecanismos de reparo e regeneração tecidual, sendo por isso, consideradas como a esperança no tratamento e cura de diversas doenças (DIELBOLD et al., 2000). Elas apresentam importante papel no reparo e reconstrução de tecidos lesados, atuando na substituição de células perdidas ou no restabelecimento da função de órgãos ou tecidos (FILIP et al., 2004).

Dentre as características apresentadas pelas células-tronco, pode-se considerar como principais a sua capacidade de proliferação indefinida, de auto-renovação, de produção de diferentes linhagens celulares e de regeneração tecidual (SILVEIRA et al., 2006). Segundo Brugger et al. (2000), dentre todas estas características, a auto-renovação e a diferenciação, recebem destaque, pois são elas que tornam as células-tronco muito especiais, por permitir que elas dêem origem a diferentes tecidos do organismo.

Verfaillie et al. (2002) relatam que estas células podem ser encontradas em diferentes tecidos, contudo, a fonte mais acessível, são as células mononucleares da medula óssea. Além desta fonte, as células-tronco podem ser obtidas de diversos

tecidos, como o sangue periférico (GARDERET et al, 2003), o cordão umbilical (PRANKE et al., 2001; PANEPUCCI et al., 2004), o fígado (OVERTURF et al., 1997), a placenta (KOGLER et al., 2004) e o tecido adiposo (ZUK et al., 2001).

Mendez-Otero et al. (2007) comentam que atualmente é reconhecido, que a maioria dos tecidos apresentam uma reserva de células-tronco residentes que possuem limitada capacidade de regeneração tecidual, sendo assim empregadas no reparo de pequenas lesões. No entanto, os mecanismos pelos quais estas células auxiliam no reparo das lesões, ainda não está bem elucidado, podendo compreender a ativação de células do próprio tecido lesado (TAJBAKSHI, 2003) ou ainda por indução da diferenciação das células do tecido alvo (VERFAILLIE, 2002).

Muitas pesquisas demonstram que a recuperação funcional obtida em órgão e tecidos que sofreram danos, após a inoculação de células-tronco, não é condizente com o número de células transplantadas que se incorporaram ao tecido lesado. Isto sugere que após sua implantação no local da lesão, ocorra liberação de citocinas e fatores tróficos por células locais, o que atrairia outras células-tronco. Estas, respondem a fatores quimiotáticos, identificando e migrando até o local da lesão e também liberando outras substâncias. As formas através das quais as células-tronco e seus produtos secretórios atuam no local da lesão, são muito diversificadas, podendo citar o suporte a moléculas ou enzimas que corrigem defeitos metabólicos, a modulação do sistema imune e da resposta inflamatória, a atração de células-tronco do tecido adjacente entre outros (SCHWINDT et al., 2005).

Segundo Vollweiler et al. (2003), o maior dos problemas na terapia celular com o emprego de células-tronco adultas, reside na capacidade desta célula se diferenciar na célula especializada do órgão alvo do tratamento.

2.3.2 Medula Óssea e a cicatrização de fraturas

As primeiras células-tronco bem caracterizadas e com grande capacidade de auto-renovação e potencial proliferativo foram às células do sangue (VOLLWEILER et al., 2003). De acordo com Gronthos et al. (2003), a maioria dos tecidos corporais apresenta pequena quantidade de células-tronco quando comparado a medula óssea. Por

este motivo, dentre as diversas fontes de células-tronco, a medula óssea tornou-se a mais pesquisada e utilizada, devido a sua disponibilidade imediata e reserva praticamente ilimitada (MUSCHLER et al., 2004). O aspirado de medula óssea é a fonte mais acessível de células-tronco adultas pluripotentes, contendo em média quarenta milhões de células nucleadas por mililitro (MUSCHLER et al., 1997).

Conforme descreve Bonnet (2003), as células-tronco hematopoéticas representam um grupo de células indiferenciadas presentes na medula óssea, que têm a função de repor as células sanguíneas que vão sendo eliminadas. Estas células são raras na medula óssea, e sua semelhança aos pequenos linfócitos é o que dificulta sua identificação (VOLLWEILER et al., 2003). Dentre as células-tronco estudadas, as hematopoéticas são aquelas que melhor estão caracterizadas, e por este motivo foram empregadas no transplante de medula óssea em humanos (HOLMBERG, 1985) e animais (WIJEWARDANA et al., 2007). Segundo Burt et al. (2003), recentemente descobriu-se que as células-tronco hematopoéticas poderiam adquirir características de outras linhagens celulares diferentes da hematopoética. A utilização de células-tronco hematopoéticas do sangue periférico e da medula óssea apresentam potencial terapêutico para diferentes patologias no cão, como doenças vasculares (HE et al., 2003); doenças do miocárdio (KOVACIC et al., 2004) e afecções do tecido ósseo (ARINZEH et al., 2003; DE KOK et al., 2003). Nakage e Santana (2006) salientam que são a capacidade de reconstituição hematopoética e a plasticidade das células-tronco, que permitem que várias propostas científicas e terapêuticas sejam desenvolvidas em modelos experimentais em cães.

Já as células-tronco mesenquimais da medula óssea, sofrem renovação (JIANG et al., 2002) e podem originar células de diferentes tecidos corporais, como o osso, o tecido adiposo, e a cartilagem (MEIRELLES et al., 2006). Estas células apresentam potencial para dar origem aos tecidos das linhagens ectodérmica (GRONTHOS et al., 2003) e endodérmica (REYES et al., 2002). Na última década, várias pesquisas sugeriram que as células-tronco adultas derivadas da medula óssea, se postas em um microambiente apropriado, poderiam se diferenciar em qualquer tipo de célula de um organismo adulto (MENDEZ-OTERO et al., 2007).

Muschler et al. (1997), citam que quando se realiza a colheita da medula óssea por aspiração com agulha, é mais efetivo proceder com várias punções restringindo o volume aspirado a dois mililitros em detrimento de uma única punção em um ponto

isolado com colheita de maior volume. Além disto, existe variação entre a proporção de células tronco encontradas nos diferentes ossos longos em cães (GOLFIER et al., 2000), sendo que esta proporção é maior também, quando se compara a medula óssea do neonato com a medula óssea adulta (TURNER et al., 1996).

Greenbaum e Kanat (1993), comentam que muitas pesquisas utilizam células-tronco mesenquimais provenientes da medula óssea expandidas em cultura, no entanto este processo é mais oneroso, requer tempo entre a colheita das células, cultivo e implantação, além de exigir mais aparato técnico. Por outro lado, o emprego de células-tronco não expandidas em cultura, é também amplamente utilizado e apresenta algumas vantagens a serem consideradas. Dentre elas, a simplicidade do procedimento, a possibilidade de implantação quase que imediata da fração celular ao paciente, o custo relativamente baixo, o procedimento minimamente invasivo e o não requerimento de imunossupressão do paciente, fazem deste procedimento, um dos mais largamente utilizados (LUCARELLI et al., 2004).

De acordo com Bruder et al. (1998), para ocorrer formação e reparação óssea apropriada, devem estar presentes uma fonte de células-tronco com potencial de diferenciação em osteoblastos; fatores de crescimento ósseo para estimular a migração, proliferação e diferenciação destas células; um suporte tecidual acelular, para albergar as células no defeito ósseo; além de angiogênese, para formação de um rede vascular satisfatória no osso recém-formado. Muschler et al. (2003) citam que até mesmo a cicatrização óssea em tecidos sadios pode ser limitada pela deficiência de células-tronco.

Conforme ressaltam Muschler e Midura (2002), o principal objetivo do transplante de células-tronco mesenquimais é suprir a deficiência no número e/ou atividade destas células no local de interesse. A diminuição, do número destas células no tecido pode ocorrer por diversos motivos, como trauma prévio, infecção, irradiação prévia, defeitos teciduais, cicatrizes ou deficiência vascular. Algumas pesquisas, envolvendo células provenientes da medula óssea, demonstraram a importância do suprimento adicional de células-tronco em locais desprovidos de formação óssea (LINDHOLM et al., 1988; GRUNDEL et al., 1991; WERNTZ et al., 1996; CURYLO et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2008).

A literatura cita que no emprego da terapia celular, uma boa perspectiva nos

processos regenerativos pode ser obtida quando forem transplantadas células processadas em número maior ou igual 2×10^6 (SUTER et al., 2004) a 2×10^8 células mononucleares da medula óssea kg^{-1} do receptor (NAKAGE et al., 2005). Gengozian (2000) relata que quantidade de células-tronco necessárias para que ocorra adequada reconstituição hematopoética em cães é de 1,2 a $3,4 \times 10^6 \text{ kg}^{-1}$. Siena et al. (1989), ainda cita que a capacidade de recuperação hematopoética é proporcional a quantidade de células CD34^+ após o transplante.

Durante a cicatrização óssea, as células que atuam no reparo da lesão, geralmente estão diferenciadas e presentes no local. No entanto, a reparação da maioria das fraturas e a regeneração de segmentos ósseos mais extensos, acabam, muitas vezes, ultrapassando a capacidade funcional dos osteoblastos existentes no local da fratura. Por este motivo, os osteoblastos locais possuem uma participação limitada no processo de reparo ósseo, assim a presença de células-tronco osteoprogenitoras, que originam novos osteoblastos, torna-se fundamental para o sucesso do processo cicatricial (YOO e JOHNSTONE, 1998). Segundo Beresford (1989), a curta vida dos osteoblastos, faz com que a existência de células precursoras ósseas com atividade proliferativa e habilidade de se auto-renovar, influenciem de forma direta a capacidade óssea de se reparar na ocorrência de lesões e de evitar o acúmulo de micro-lesões decorrentes do trauma repetitivo.

2.3.2.1 Suporte celular

Segundo Potier e Petit (2005), a utilização de um material com função de suporte é imprescindível quando se deseja reconstituir defeitos em tecido ósseo adulto. Atuando como suporte para as células, o emprego de matrizes bioativas fornece uma superfície para a migração e aderência das células locais e células osteoprogenitoras, atuando como abrigo para o novo tecido em formação e facilitando a distribuição das células na região que requer preenchimento (BRUDER, 1998). Este arcabouço atuará na reposição do volume ósseo perdido, além de evitar a projeção de tecido muscular, das adjacências para o interior do defeito ósseo, servindo como guia e suporte do novo tecido ósseo em formação. Em nível microscópico, este suporte servirá como abrigo para a adesão, proliferação e diferenciação das células-tronco (POTIER e PETIT, 2005).

A esponja de colágeno tem sido empregada como suporte celular para a formação de diversos tecidos, como o tendão (JUNCOSA-MELVIN et al, 2006; OLSSON, 2008) e osso (TAY et al., 1998; MANKANI et al., 2001; OLIVEIRA, 2007), pois segundo o fabricante da esponja, esta não interfere no processo cicatricial.

2.3.3 Marcação celular

A identificação de células-tronco é realizada por meio de marcadores de superfície celular (KIRSCHSTEIN, 2001). Contudo, Asahara et al. (1997) comentam que a maior dificuldade no isolamento e caracterização de diferentes tipos celulares, ocorre devido a ausência de marcadores antigênicos específicos bem determinados.

De acordo com Faldyna et al. (2001), a análise rápida, objetiva e quantitativa de células em suspensão pode ser realizada por citometria de fluxo. As células-tronco de cães podem ser identificadas pela expressão do anticorpo monoclonal canino CD34⁺ (NAKAGE e SANTANA, 2006). Dentre elas, as células-tronco hematopoéticas derivadas da medula óssea, expressam o antígeno de superfície CD34, e com o auxílio de um anticorpo monoclonal dirigido contra este antígeno, podem ser identificadas na citometria de fluxo (HUSS et al., 2000; HARTNETT et al., 2002).

Na atualidade, novas alternativas para a marcação celular estão disponíveis, e dentre elas, os pontos quânticos (WU e BRUCHEZ, 2004). HASSAN et al. (2006) explicam que este material é formado de nanocristais semicondutores, que possuem as características de serem excitáveis e fotoestáveis, podendo ser estimulados por um único comprimento de onda. Segundo Borm (2006), depois de aplicado o foco de luz, os pontos quânticos brilham como sinais de néon e seu brilho dura até 48 horas após o início do estímulo. Conforme o tamanho dos pontos quânticos, a luz emitida pode ser diferente, como azul, verde e amarela para pontos menores e alaranjada, vermelha ou cinza para pontos maiores (ROCO, 2005).

De acordo com Parak et al. (2005), os nanocristais possuem a capacidade de marcar quase todo tipo de material de interesse biológico. Os pontos quânticos coloidais podem ser utilizados como marcadores fluorescentes capazes de localizar proteínas específicas dentro de células. Eles podem ligar-se às moléculas mísseis, dirigidas a alvos específicos no interior das células (WU e BRUCHEZ, 2004). MARSH

et al. (2007) comentam que esses marcadores fluorescentes são largamente empregados na área médica, como na decodificação do DNA, diagnóstico de infecções entre outras circunstâncias. Além do mais, a fluorescência do nanocristal pode ser detectada por pelo menos quatro gerações celulares, sendo que algumas células podem permanecer marcadas por até duas semanas (DONALDSON et al., 2007; GARON et al. (2007). Desta forma, a emissão de luz produzida pelos nanocristais pode ser detectada através da microscopia de fluorescência, pois esta capta as diversas manifestações da emissão de luz (JARES-ERIJIMAN e JOVIN, 2003).

2.3.4 Estudos clínicos com cicatrização óssea

Kraus e Kirker-Head (2006) comentam que a aplicação de células-tronco mesenquimais em modelos experimentais de defeitos ósseos resulta em proliferação e diferenciação em osteoblastos e osteoclastos, quando o ambiente mecânico e biológico provido é apropriado, e nesses casos, o defeito cicatriza em tempo menor.

Em um estudo com defeitos ósseos na ulna de cães, Grundel et al. (1991) descreveram a união completa da falha óssea após a administração local de um composto de aspirado de medula óssea associado ao fosfato de cálcio bifásico cerâmico.

Já Paley (1988), estudando a cicatrização do rádio e ulna de coelhos, observou a formação mais precoce e exuberante de calo ósseo, no grupo de animais que receberam um aspirado de medula óssea por via percutânea, em detrimento do grupo controle.

Estudando a artrodese do processo espinhoso em coelhos, Lindholm et al. (1988), observaram uma fusão vertebral mais rápida e estável no grupo tratado pela associação de matriz óssea desmineralizada e aspirado de células da medula, em detrimento dos grupos que receberam a matriz óssea ou o aspirado de forma isolada. Da mesma forma, em um estudo com artrodese vertebral póstero-lateral em coelhos, Curylo et al. (1997) descreveram maior grau de consolidação e formação óssea quando o enxerto ósseo autólogo foi associado à aspirados da medula óssea.

Comparando o efeito do aspirado de medula óssea com o enxerto de osso autólogo sobre a cicatrização óssea em defeitos ósseos segmentares em ratos, Werntz et al. (1996) observaram regeneração óssea estrutural completa nos animais tratados com o aspirado de medula. Com a utilização da medula óssea viva, ocorria a formação de osso

esponjoso em três semanas, progredindo em seis semanas para osso lamelar e com remodelação óssea em 12 semanas. No entanto, ocorreu uma escassa infiltração celular com mínima formação óssea, quando a medula óssea foi implantada morta.

O tratamento de defeitos ósseos diafisários em rádios de coelhos, com injeção percutânea de aspirados de medula óssea, produziu após duas a três semanas um maior volume de calo ósseo quando comparado aos grupos controle (SHARMA et al., 1992).

Um estudo comparativo entre a aplicação de soro fisiológico, aspirado de medula óssea, matriz óssea desmineralizada e associação de aspirado de medula óssea com matriz óssea desmineralizada foi realizado por Tiedman et al. (1991) no tratamento da pseudoartrose em modelos com cães. Como resultado, foi observado que a combinação entre matriz óssea desmineralizada e o aspirado de medula óssea apresentou resultado superior quando comparado aos demais tratamentos.

Para avaliar a cicatrização óssea em cães, Kraus e Kirker-Head (2006) desenvolveram um modelo de não-união óssea, criando um defeito segmentar de 21mm no fêmur de cães e fixando este com placa. Após duas semanas da criação do defeito, células-tronco mesenquimais autólogas foram colhidas, isoladas e cultivadas sendo implantadas no fêmur desses animais por intermédio de um cilindro de hidroxiapatita. Foi observado que ocorria neoformação óssea em área adjacente ao implante, infiltrando-se no osso receptor, estimulando o mesmo a formar novo tecido ósseo.

Bruder et al. (1998), estudando a correção de defeitos segmentares em fêmures de cães, promoveram a consolidação óssea no grupo tratado com aspirado de medula óssea associado à cerâmica porosa, enquanto no lado controle ocorreu o desenvolvimento de pseudoartrose.

Estudando o reparo de defeitos ósseos em tíbias de ovinos, Kon et al. (2000) empregaram um arcabouço poroso de hidroxiapatita associado ou não a inoculação de células-tronco mesenquimais. Eles observaram na histologia, que houve formação óssea nos dois grupos, com a diferença que no grupo controle, a formação óssea ocorreu na periferia do arcabouço, enquanto que no grupo tratado, ocorreu dentro dos microporos da cerâmica.

Administrando células-tronco osteoprogenitoras impregnadas em cilindros porosos de hidroxiapatita e fosfato-tricálcico no tratamento de defeitos ósseos

segmentares em fêmures de ratos, Kadiyala et al. (1997) observaram regeneração óssea completa. Garg et al. (1993) utilizaram aspirados de medula óssea para o tratamento de pseudoartroses de ossos longos e observaram consolidação completa em 85% dos casos.

Para comparar o efeito do enxerto de crista ilíaca, da hidroxiapatita e da associação entre o aspirado de medula óssea embebido em uma esponja colágena, associada à hidroxiapatita, Tay et al. (1998) realizaram um modelo de artrodese vertebral pósterolateral em coelhos. Eles observaram que os índices de fusão vertebral de 75% para o enxerto autólogo isolado, 20% para a hidroxiapatita isolada e 100% para a associação de aspirado de medula com hidroxiapatita.

Visando reduzir as complicações do tempo de manutenção prolongado de implantes em contato com o osso, Kitoh et al. (2004) empregaram células-tronco mesenquimais associadas ao plasma rico em plaquetas no alongamento ósseo em humanos, e observaram nesse estudo, a diminuição do tempo de osteogênese.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Fase Experimental I - *Ex Vivo*

3.1.1 Coleta, preparo e conservação de ossos corticais

Foram coletados 108 fêmures de cadáveres de cães adultos provenientes da rotina do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Santa Maria. A coleta foi realizada somente em cães encaminhados à eutanásia ou que sofreram óbito, sem histórico clínico de doenças sistêmicas que pudessem interferir na pesquisa. O procedimento de coleta baseou-se em método não-asséptico, realizado num período entre 2 a 4 horas após o óbito. O critério utilizado para seleção dos doadores baseou-se na escolha de pacientes livres de doenças infecto-contagiosas, neoplasias, portadores de osteopatia primária ou secundária, além de pacientes com histórico de procedimento cirúrgico nos membros posteriores ou alterações ortopédicas do esqueleto apendicular. O acesso para coleta foi realizado mediante incisão craniolateral da coxa estendendo-se do trocanter maior do fêmur até o côndilo lateral femoral, com rebatimento da musculatura adjacente. Os ossos foram medidos longitudinalmente por meio de uma linha traçada a partir do trocanter maior até a fossa supratroclear, sendo coletada a porção óssea diafisária correspondente ao terço médio desta medida, com auxílio de serra manual. Após a coleta, o perióstio foi rebatido com auxílio de um elevador de perióstio e a medula óssea foi removida permanecendo apenas a cortical óssea. Os fêmures foram identificados e posteriormente higienizados com solução hidroeletrólítica de cloreto de sódio a 0,9% durante 30 minutos e então conservados em solução de glicerina a 98% durante um período não inferior a 2 anos (Figura 01 - A).

3.1.2 Avaliação Radiográfica dos implantes

Os implantes foram selecionados para conservação em glicerina após a realização de exame radiográfico. Os mesmos foram identificados, marcados com grafite e em seguida radiografados em duas incidências de acordo com seus grupos de

avaliação (Figura 01 - B, C e D). Após a avaliação radiográfica os ossos foram encaminhados para a aferição e padronização das dimensões dos fragmentos ósseos.

3.1.3 Tamanho e Volume dos Implantes

Considerando-se o formato peculiar do osso cortical diafisário do fêmur de cães, algumas decisões foram tomadas visando facilitar a sua manipulação, além do cálculo de suas dimensões. Visando evitar o envergamento durante o teste de resistência, os fragmentos ósseos foram padronizados quanto ao comprimento, onde este deveria medir o equivalente ao diâmetro do osso. Os valores de diâmetro foram obtidos com uso de um paquímetro digital, sendo este valor marcado sobre o segmento ósseo para orientar o corte do mesmo. O corte foi realizado com o auxílio de uma serra fita de 2mm de diâmetro. Após o corte, os segmentos ósseos resultantes foram novamente mensurados quanto ao diâmetro, comprimento e espessura de cortical (Figura 01 - E, F e G). De posse desses valores, adotou-se por conveniência, o cálculo do volume do segmento ósseo baseado na fórmula do cilindro perfeito. Para obtenção do volume final, calculou-se o volume de um cilindro maciço tomando como referência as extremidades externas das corticais ósseas, medida esta que foi denominada de cilindro externo. Por sua vez, outro cilindro maciço foi calculado, porém agora, tomando como referência as extremidades internas das corticais ósseas, o qual foi denominado de cilindro interno. De posse destes dois valores, subtraiu-se o volume do cilindro interno do volume do cilindro externo, obtendo-se o valor do volume do segmento ósseo.

3.1.4 Densidade óssea dos implantes

Os fragmentos uma vez preparados e conservados em glicerina a 98% foram separados individualmente em frascos. Mais tarde, cada fragmento, devidamente identificado foi submetido à tomografia para avaliação de sua estrutura e densidade óssea, de acordo com seus respectivos grupos de hidratação. Foram realizados cortes com intervalos de 1mm entre si, dos quais foram selecionadas três regiões: duas correspondentes às extremidades laterais do fragmento ósseo e outra a região central do

mesmo. A leitura da densidade óssea foi realizada com auxílio do software E-Film, obtendo o valor da densidade destes três pontos e gerando uma média aritmética para o segmento ósseo. O esquema de avaliação da densidade óssea mediante tomografia dos segmentos ósseos esta representada na figura 02.

3.1.5 Hidratação dos implantes

Os 108 ossos foram separados em seis grupos distintos, diferenciados entre si pelo tempo de hidratação, denominados de grupo I, II, III, IV, V e VI que corresponderam respectivamente a tempo 0, 1h, 3h, 6h 9h e 12h. Cada grupo foi composto por 18 ossos. Todos os ossos foram hidratados em frascos individuais com solução de cloreto de sódio a 0,9% na proporção de 10:1 de solução em relação ao fragmento ósseo.

3.1.6 Teste de resistência biomecânica

A resistência dos ossos corticais foi testada com o auxílio de uma prensa de compressão axial. Os testes foram realizados no Laboratório de Materiais da Construção Civil (LMCC) da Universidade Federal de Santa Maria. Cada osso foi submetido à pressão longitudinal dada por um torno calibrado de Amsler. Para isso, o implante foi posicionado no sentido longitudinal entre as lâminas da prensa. A força imposta sobre o implante ósseo gerava deformação de um anel ligado a um marcador analógico que produzia um valor de leitura referente ao processo compressivo. Este valor foi posteriormente convertido para unidade de quilograma-força (kgf) com auxílio da fórmula $P = 1,3723 \times L + 5,35$, onde P indica o resultado em kgf. Os fragmentos ósseos foram destruídos após a compressão. O procedimento de compressão pode ser observado na figura 03.

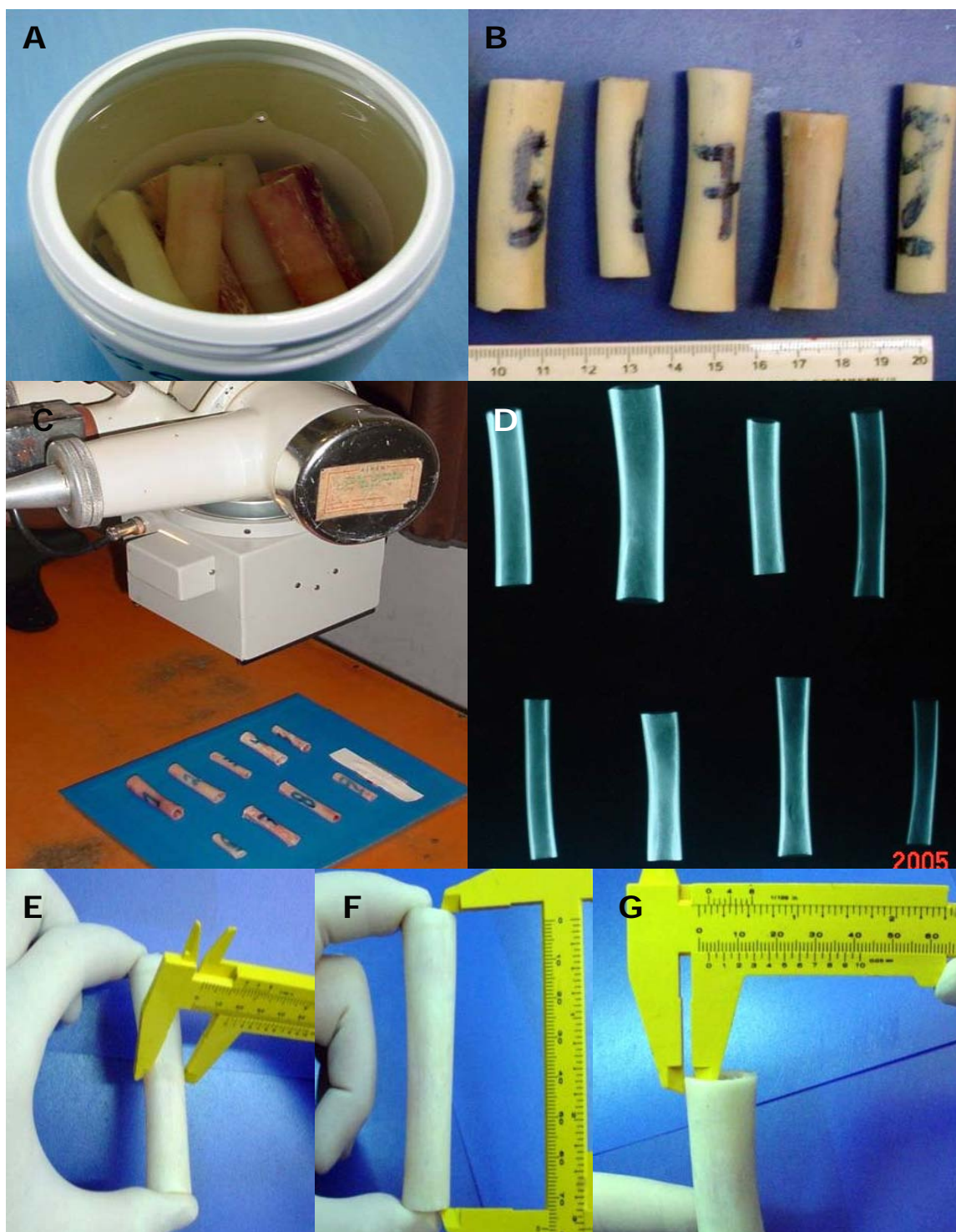


Figura 01 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. (A) Segmentos ósseos corticais conservados em glicerina 98% por período não inferior a 1 ano. (B, C e D) Avaliação radiográfica dos segmentos ósseos corticais. (E, F e G) Aferição das dimensões dos segmentos ósseos.

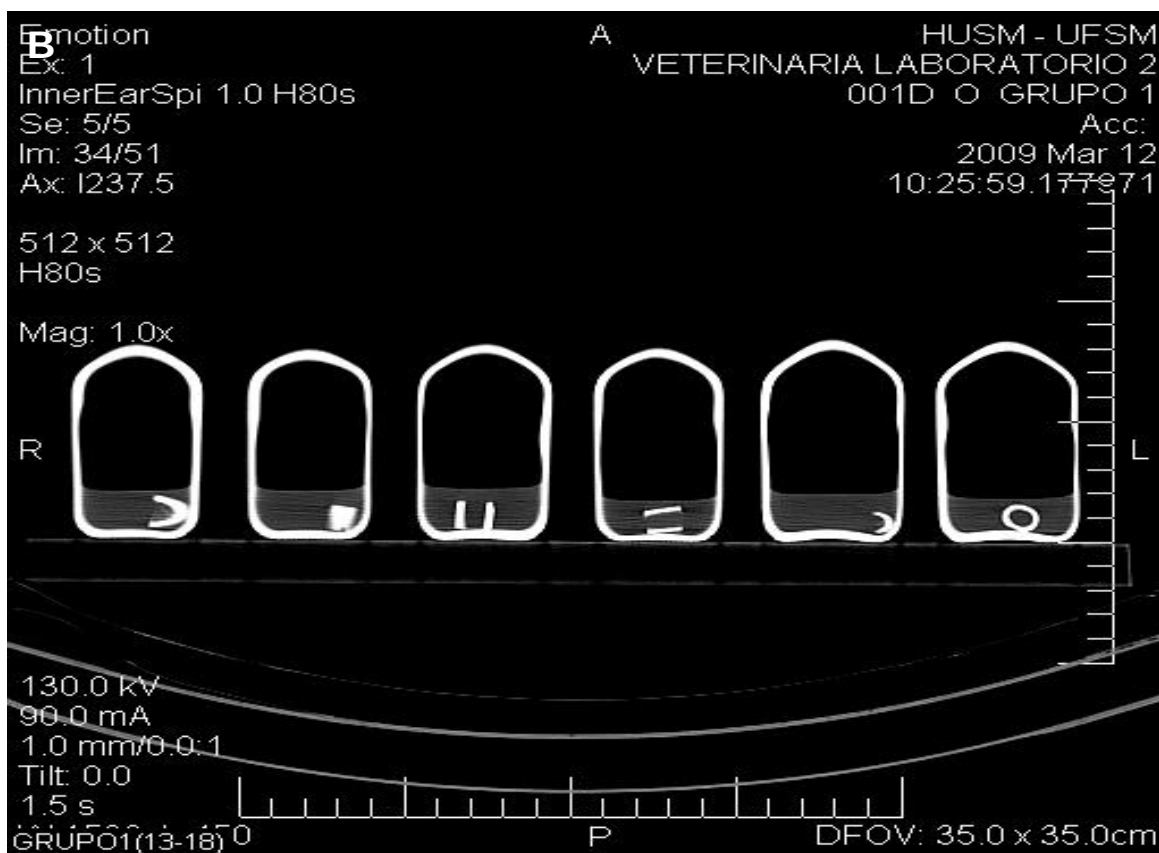
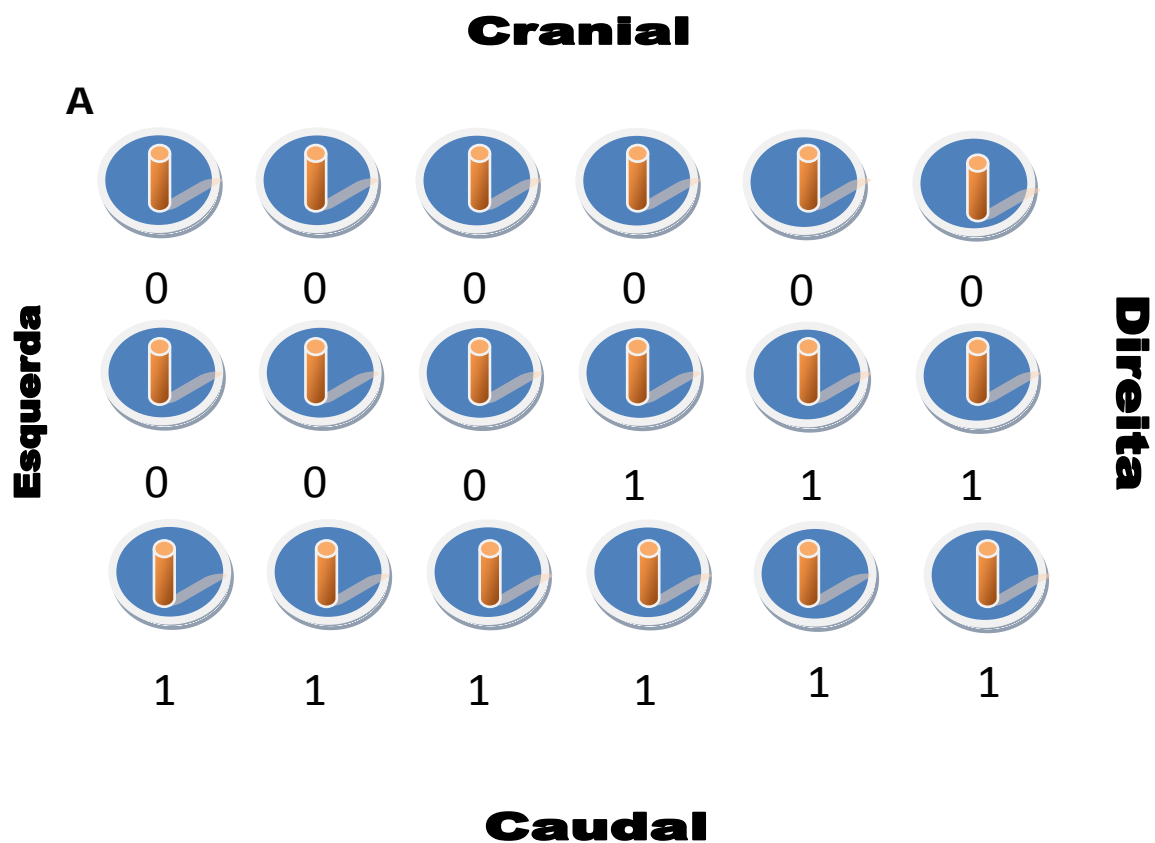


Figura 02 Enxerto ou implante homogêneo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. (A) Topograma. (B) Imagem de um corte de tomografia computadorizada empregado na avaliação da densidade óssea.

3.1.7 Avaliação Estatística do teste de resistência

A análise estatística foi realizada com o programa estatístico SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*), versão 7.0. A análise comparativa entre a resistência óssea nos diferentes grupos estudados foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, considerando significativo um $P < 0,05$. A correlação de Spearman foi utilizada para relacionar as variáveis analisadas.

3.2 Fase experimental II - *in vivo*

3.2.1 Comitê de Ética em Pesquisas com Animais

O presente projeto está registrado no Gabinete de Projetos do Centro de Ciências Rurais sob número 17977 e teve aprovação no Comitê de Ética e Bem Estar Animal da Universidade Federal de Santa Maria, conforme processo 23081.012646/2005-82. Possui, também, autorização para execução no Laboratório de Cirurgia Experimental desta mesma instituição.

3.2.2 Aquisição dos animais e aclimação

O presente experimento foi desenvolvido no Laboratório de Cirurgia Experimental da Universidade Federal de Santa Maria. Foram utilizados 20 cães, machos e fêmeas, hípidos e com peso corporal entre 10 e 17kg. O peso médio dos cães do grupo I foi de 12,8kg, do grupo II 13,4kg, do grupo III 14,6kg e do grupo IV 12,8kg. A adaptação dos animais as novas instalações foram realizadas por um período de 15 dias previamente ao experimento, onde os mesmos receberam adequado aporte nutricional e controle de endoparasitas e ectoparasitas. A alimentação baseou-se em ração com proteína bruta não inferior a 22%. O controle de ectoparasitas foi realizado pela administração de doramectina 1% na dose de 1/25kg. Para o controle de endoparasitas utilizou-se associação de praziquantel e pamoato de pirantel na dose de um comprimido para cada 10kg, administrado por via oral com repetição da dose primária em sete dias. Todos os cães foram previamente submetidos a exame clínico completo antes de serem selecionados para o experimento. Foram realizados nesse

período os exames laboratoriais de rotina, para assegurar-se da higidez dos mesmos. Considerando-se a importância do comportamento individual de cada animal para a obtenção dos resultados finais desta pesquisa, avaliou-se individualmente o temperamento de cada um dos animais submetidos ao experimento.

3.2.3 Delineamento Experimental

Os 20 cães foram separados em quatro grupos distintos, levando em consideração o emprego de osso autólogo ou implante homólogo conservado em glicerina 98% e o tratamento ou não com a fração de células mononucleares da medula óssea. A sinopse da distribuição dos quatro grupos conforme o tratamento empregado pode ser observado na figura 04.

3.2.4 Pré-Operatório

No dia anterior à cirurgia cada animal foi submetido a novos exames laboratoriais e a banho e tricotomia ampla dos pontos de colheita de medula óssea e do membro pélvico esquerdo. Cada um deles permaneceu em jejum sólido e líquido por um período de 8h anterior ao procedimento cirúrgico. Neste momento, também foi preparado para a hidratação, o implante ósseo cortical. O animal foi submetido a um procedimento anestésico de ultracurta duração para a realização do exame radiográfico dos membros pélvicos. Neste exame foram avaliadas a simetria dos membros pélvicos, as corticais ósseas e articulações coxofemorais e femoro-tibio-patelares.

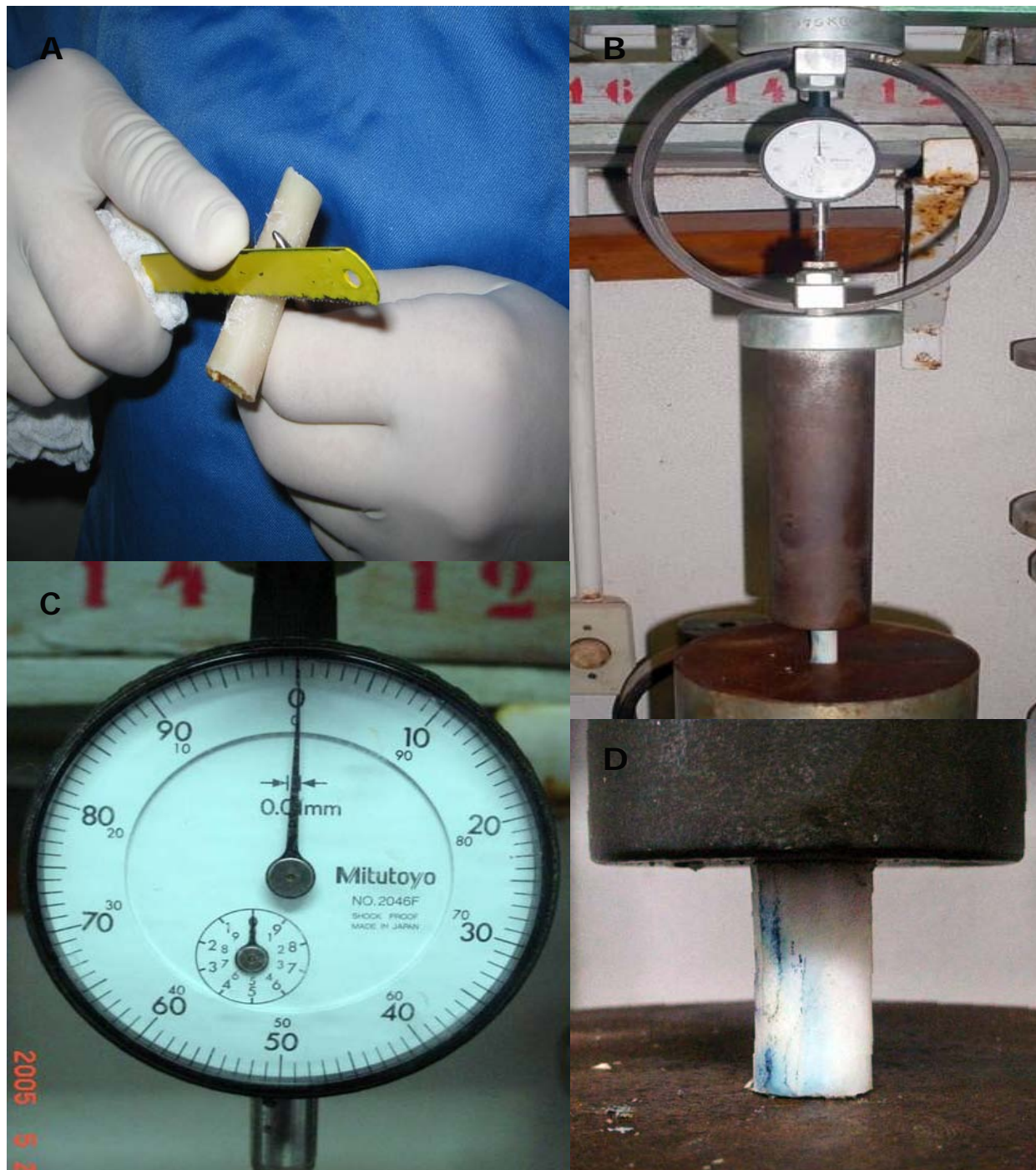


Figura 03 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. (A) Modelagem do segmento ósseo. (B, C e D) Teste de compressão axial em torno calibrado.

3.2.5 Anestesia

O procedimento anestésico foi separado em duas etapas: a primeira para colheita de medula óssea e a segunda, para realização da enxertia óssea cerca de duas horas após a colheita. O protocolo anestésico para colheita de medula óssea consistiu de medicação pré-anestésica com acepromazina ($0,1\text{mg kg}^{-1}$ IV), indução com propofol (5mg kg^{-1}) e manutenção com halotano. A analgesia foi assegurada pela administração intravenosa de cloridrato de fentanila conforme indicação pela variação no ritmo e frequência cardíaca, avaliados em monitor eletrocardiográfico. Em cada animal, foram aplicados 30mg kg^{-1} de cefalotina sódica IV, 30 minutos antes da anestesia como profilaxia antimicrobiana. O protocolo anestésico para a realização da intervenção cirúrgica utilizou maleato de acepromazina ($0,1\text{mg kg}^{-1}$ IV) como medicação pré-anestésica seguido de anestesia epidural com lidocaína 2% (com vasoconstritor, $1\text{ml } 4\text{kg}^{-1}$) associada a cetamina (2mg kg^{-1}) e sulfato de morfina ($0,1\text{mg kg}^{-1}$).

3.2.6 Colheita de medula óssea

Este procedimento foi realizado em diferentes pontos representados pela fossa intertrocanterica do fêmur direito e esquerdo e o tubérculo maior do úmero direito e esquerdo, para que fosse obtido o volume correspondente a 5ml de medula para cada kg de peso corporal. A colheita foi efetuada por aspiração com auxílio de uma agulha de Steiss acoplada a seringas descartáveis de 20ml previamente heparinizadas.

Com o animal em decúbito lateral (esquerdo ou direito), o qual variou conforme o ponto de coleta realizou-se a anti-sepsia das áreas de punção, seguindo-se o esquema álcool-iodo-álcool. A introdução da agulha no canal medular dos ossos foi realizada por pressão manual moderada à agulha, realizando-se movimentos de rotação alternados. O sangue colhido foi acondicionado e filtrado em bolsas especiais para coleta de medula óssea (*Bone Marrow Collection Kit*). Posterior ao processo de filtragem o sangue acondicionado em bolsa de transporte foi encaminhado ao laboratório para processamento e isolamento da fração de células mononucleares. O procedimento de colheita de medula óssea esta representado na figura 05.

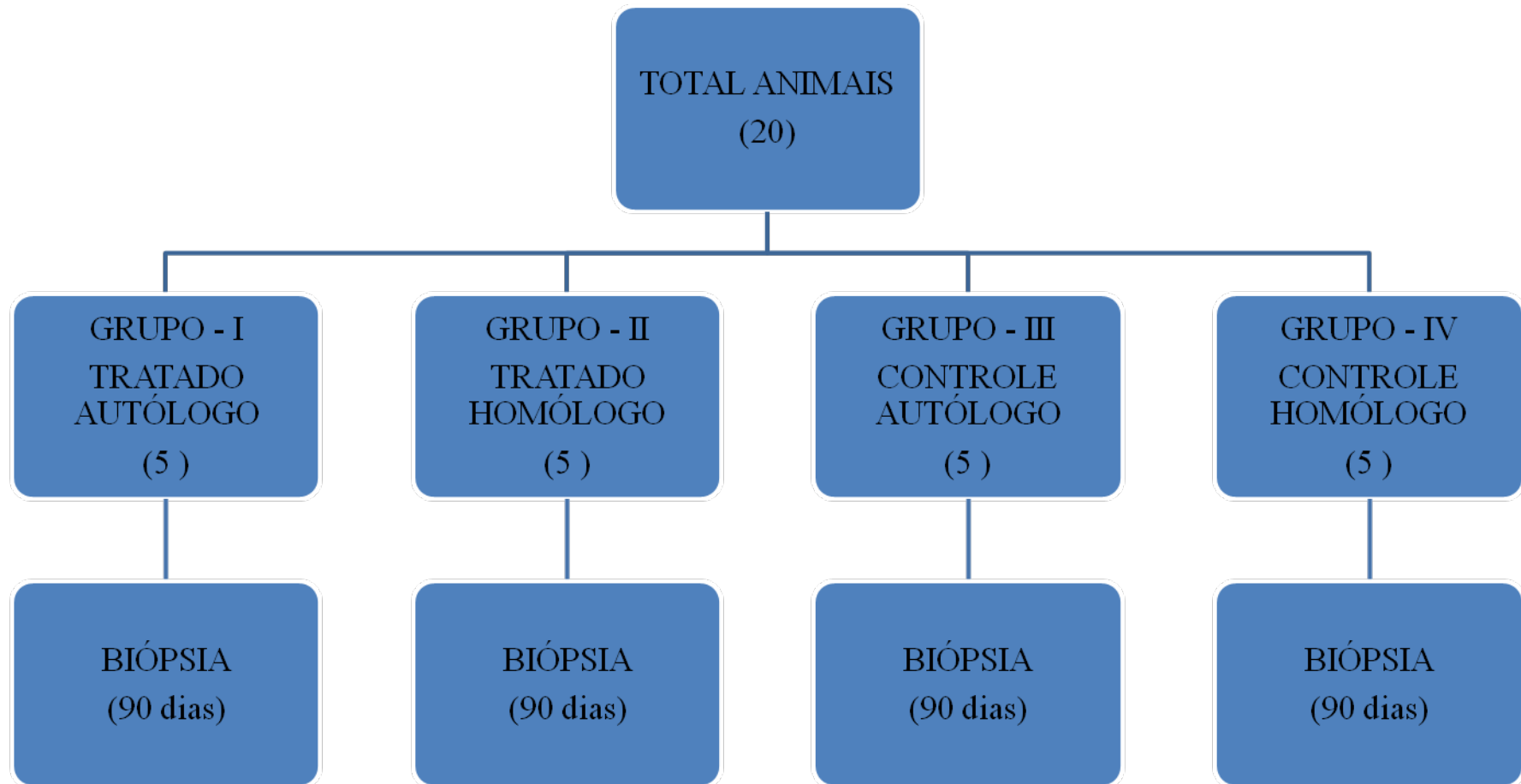


Figura 04 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Organograma representativo dos diferentes grupos de cães avaliados de acordo com o tipo de implante e tratamento com a fração de células mononucleares da medula óssea.

3.2.7 Avaliação da medula óssea

No momento inicial da colheita de medula óssea, um pequeno volume de aproximadamente 1,5ml foi colhido em uma seringa previamente heparinizada e encaminhado ao laboratório de análises clínicas. Neste momento eram verificadas as características morfológicas, viabilidade e celularidade da medula óssea. A análise foi realizada por técnica de microscopia ótica.

3.2.8 Contagem da fração de células mononucleares na bolsa de colheita e quantificação das células CD34+

Após a colheita de medula óssea e acondicionamento na bolsa do *kit* de colheita, uma alíquota de 1,5ml foi colhida previamente ao procedimento de filtragem, e encaminhada ao laboratório de análises clínicas para a realização da contagem do número de células mononucleares na bolsa de colheita. Outra alíquota de volume idêntico foi encaminhada para a quantificação das células CD34+ por citometria de fluxo, realizada no Laboratório de Hemato-oncologia do hospital universitário da UFSM.

3.2.9 Processamento da medula óssea para obtenção da fração de células mononucleares

No fluxo laminar foi acrescentado Ficoll em temperatura ambiente, em quantidade referente à 2/3 do volume total de medula óssea posto no tubo Falcon. Com uma pipeta Pasteur todo o meio com células foi despejado suavemente pela borda do tubo, sobre o Ficoll. A seguir o tubo foi tampado e centrifugado por 30 minutos a 1500rpm. Em outro tubo de 15ml, foram colocados 3ml de solução salina 0,9% e nele depositadas as células que permaneceram entre o Ficoll e as células vermelhas da medula óssea, após a centrifugação. Estas foram obtidas com uma pipeta Pasteur (1^a lavagem) e adicionadas ao tubo Falcon contendo solução fisiológica.

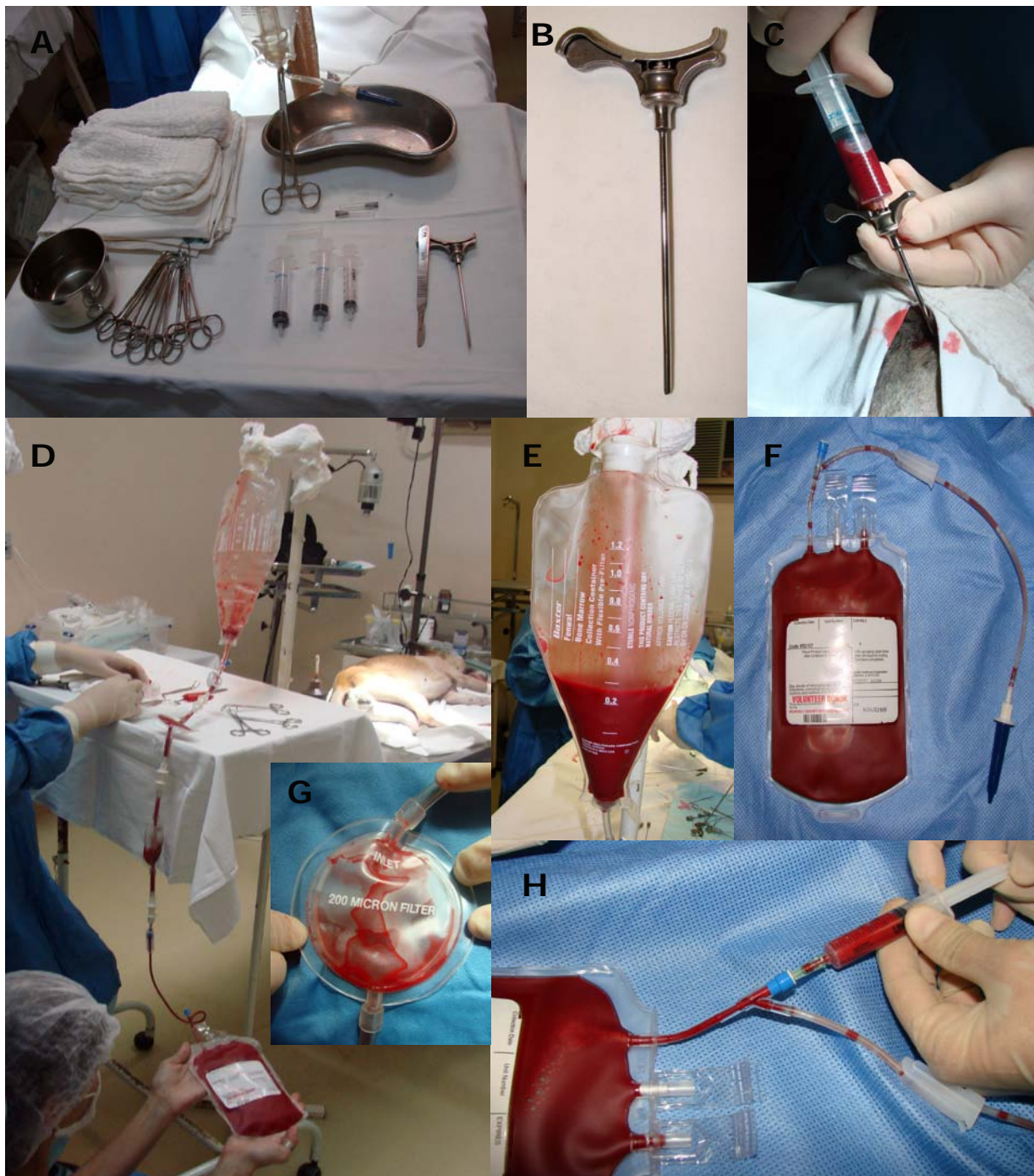


Figura 05 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Colheita e filtração da medula óssea autógena.

Após efetuou-se a mistura das células à solução com uma pipeta e procedeu-se centrifugação por 5 minutos (1500rpm). O sobrenadante foi descartado e o halo de células obtido foi novamente colocado em um tubo Falcon contendo mais 3ml de salina 0,9% (2ª lavagem). A seguir, as células foram ressuspensas, centrifugadas e o sobrenadante descartado. Finalmente foi repetida mais uma lavagem, descartando o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 1ml de solução salina 0,9%. Para a contagem celular foi considerado o número de diluições, inclusive aquela feita com o Azul de Tripán (marcador de células mortas) para avaliação das células mononucleares. Ao final, o conteúdo de 1ml de salina 0,9% acrescido de células foi acrescido de marcador celular nanocristal Qtraker e foi levado para incubar em estufa por 40 minutos. Ao final do processo, uma pequena alíquota do material foi encaminhada para a avaliação da marcação celular no microscópio de fluorescência enquanto o restante foi encaminhado para o centro cirúrgico e injetado nas junções entre o osso receptor e implante. O isolamento da fração de células mononucleares da medula óssea está representado na figura 06.

O procedimento foi realizado em sincronismo entre duas equipes: a cirúrgica e a laboratorial. O isolamento da fração de células mononucleares da medula óssea foi efetuado paralelamente no laboratório de isolamento e processamento pela equipe responsável por sua manipulação, enquanto simultaneamente, no bloco cirúrgico, foi efetuada a enxertia e fixação do enxerto/implante em seu leito receptor, pela equipe cirúrgica, para que a inoculação fosse efetuada antes da reaproximação anatômica dos tecidos abordados.

3.2.10 Marcação da fração de células mononucleares do botão celular

Ao final, o conteúdo de 1ml de salina 0,9% adicionado de células foi acrescido de marcador celular nanocristal Qtraker e foi levado para incubar em estufa por 40 minutos. Ao final do processo, uma pequena alíquota deste material foi separada em um Eppendorf e encaminhada para a avaliação da marcação celular no microscópio de fluorescência junto ao laboratório de virologia veterinária da UFSM.

3.2.11 Contagem e viabilidade da fração de células mononucleares do botão celular

Ao final do processamento e incubação, uma pequena alíquota foi encaminhada ao laboratório de análises clínicas para a contagem celular e avaliação da viabilidade das células. A contagem foi realizada de forma manual com auxílio de câmara de Neubauer e a viabilidade avaliada por meio da coloração de azul de tripam. (Figura 07)

3.2.12 Técnica operatória

Com o animal em decúbito lateral direito, foi realizada anti-sepsia do membro pélvico esquerdo, em todas as faces desde a região do tarso estendendo-se proximalmente até a região inguinal, empregando-se o esquema álcool-iodo-álcool. A extremidade distal do membro foi protegida por compressa estéril, enrolada e fixada ao membro por tiras de gaze. Os panos de campo foram posicionados de forma a expor a região femoral e articulação femoro-tíbio-patelar (AFTP) do membro pélvico esquerdo.

Momentos antes do início do procedimento, as compressas utilizadas na hemostasia tiveram seu peso aferido por uma balança de precisão. O peso das mesmas embebidas em sangue foi novamente mensurado ao final da intervenção cirúrgica, com o intuito de averiguar o volume de sangue perdido durante a intervenção cirúrgica.

O acesso ao fêmur foi realizado conforme técnica descrita por PIERMATEI e JOHNSON (2005). Uma vez realizada a exposição da diáfise femoral, produziu-se um defeito ósseo de espessura completa na diáfise femoral, removendo-se um segmento padronizado de 3,5cm, o qual foi realizado com fio serra de Gigli acoplado aos cabos em T. Durante a realização do corte, sob constante irrigação, foi imposta pressão contrária ao sentido de tração do fio serra na diáfise femoral, com auxílio de uma pinça auto-centrante.

Em momento anterior a fixação do segmento ou implante ósseo ao defeito, o interior do mesmo foi preenchido com esponja de fibrina, visando o suporte às células injetadas.

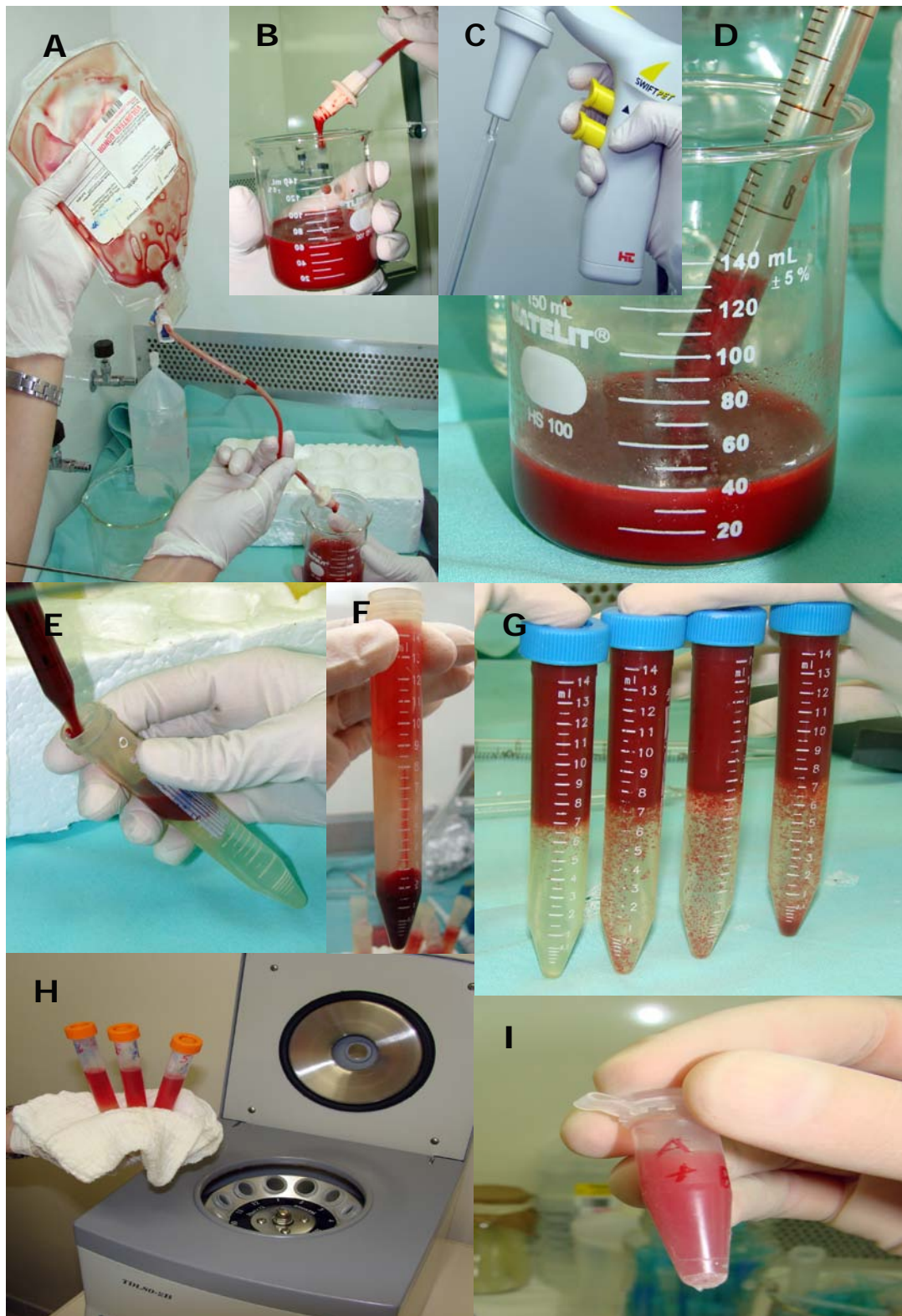


Figura 06 Enxerto ou implante homogêneo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Processamento e isolamento da medula óssea autógena para a obtenção da fração de células mononucleares.

Para reimplantação do segmento autólogo ou implante homólogo foi utilizada uma placa de compressão dinâmica e parafusos esponjosos e corticais, seguindo técnica descrita por COSTA et al. (2005). Após a fixação do segmento ósseo ao defeito, foram confeccionados dois orifícios com o auxílio de uma broca ortopédica de 1mm acoplada a uma parafusadeira de baixa rotação. Estes perfuraram somente a cortical externa, sem do realizados proximal e distalmente no segmento ósseo, ambos na face lateral.

Após este procedimento realizou-se a administração da fração de células mononucleares *in locu* por infiltração do concentrado de células no interior do implante através dos orifícios localizados na cortical lateral. Para tal procedimento, o volume do concentrado de células foi fracionado em duas porções iguais e injetado nas junções entre o osso receptor e implante. O enxerto fixado ao leito receptor e a injeção da fração de células mononucleares da medula óssea estão representados na figura 08.

A reaproximação dos planos anatômicos foi realizada mediante sutura da fásia lata com fio de poliglatina 910 nº 2-0 em padrão de sutura de Sultan. A redução do tecido subcutâneo foi realizada com mesmo fio, porém com diâmetro 3-0 e em padrão de sutura contínua simples. Para síntese da pele empregou-se pontos de Wolf com fio de náilon monofilamentar nº 4-0.

3.2.13 Pós-Operatório

No pós-operatório imediato foi mantida analgesia opióide durante três dias consecutivos administrada a cada 8 horas (cloridrato de tramadol, na dose de 5mg/kg por via subcutânea), uso de colar elisabetano e cuidados tópicos de higienização com retirada dos pontos cutâneos em 7 a 10 dias. Empregou-se o uso de antiinflamatório não esteróide por 10 dias consecutivos (meloxicam, na dose de 0,1mg kg⁻¹ por via subcutânea).

O experimento foi conduzido conforme normas do COBEA e, ao final, os cães foram catalogados em fichas apropriadas e doados de modo a serem observados, posteriormente, em longo prazo.

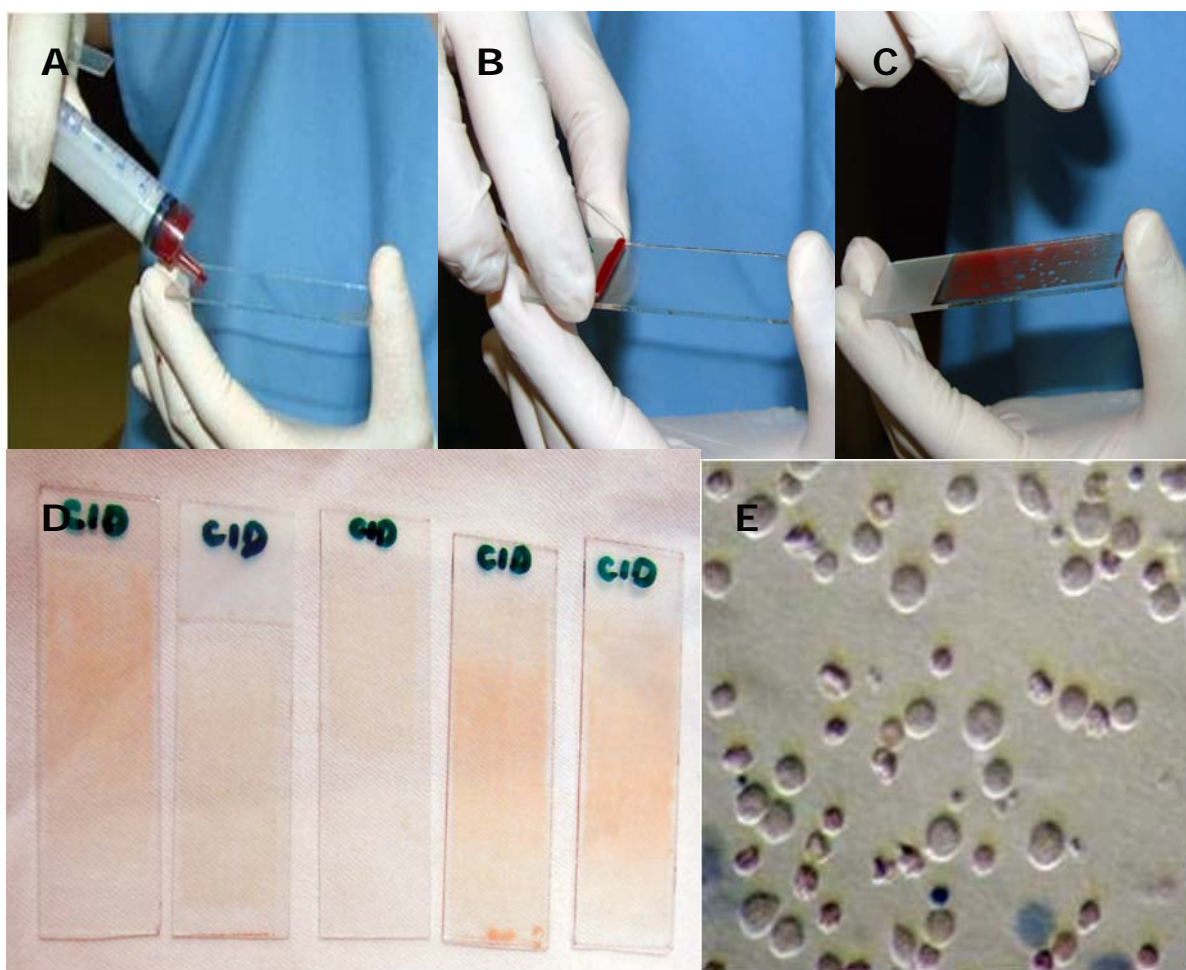


Figura 07 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Contagem e análise da viabilidade da fração de células mononucleares do botão celular.

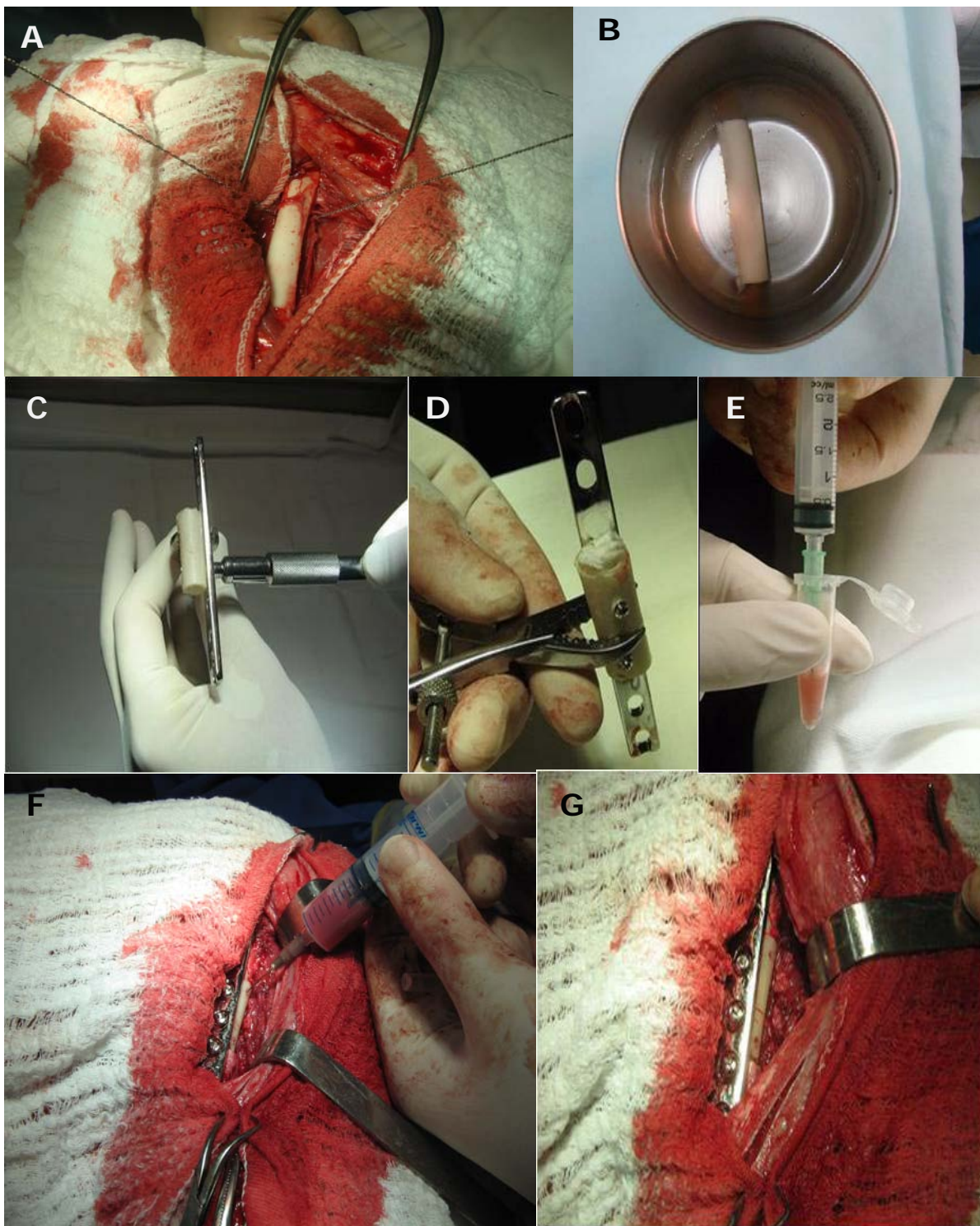


Figura 08 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Técnica de enxertia de segmento ósseo cortical em diáfise de fêmur canino fixado com placa de compressão dinâmica, associada a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. (A) Seção óssea com fio serra Gigli para confecção do defeito ósseo. (B) Hidratação do implante ósseo conservado em glicerina 98%. (C) Fixação do implante à placa de compressão dinâmica. (D) Aplicação da esponja de colágeno no interior do enxerto. (E e F) Aspiração da fração de células mononucleares da medula óssea e injeção intralesional. (G) Aspecto final do implante ósseo no leito receptor.

3.2.14 Avaliação da fluorescência do marcador celular

Aos sete dias de pós-operatório, os animais foram submetidos à biópsia de um microfragmento ósseo na região de transição entre o leito receptor e o enxerto. Na data predeterminada após a implantação, cada cão foi anestesiado e submetido à abordagem do segmento implantado para obtenção de microfragmentos obtidos com auxílio de uma broca de 1,5mm. Os microfragmentos foram distribuídos sobre lâminas de vidro estéreis, protegidos da exposição luminosa com papel alumínio esterilizado e encaminhadas para avaliação junto ao microscópio de fluorescência. O esquema de realização da biópsia de microfragmento para análise da fluorescência está representada na figura 09. O procedimento de colheita e análise dos microfragmentos pode ser observado na figura 10.

3.2.15 Avaliação Radiográfica

Para avaliação radiológica, além das imagens controle obtidas no período pré-operatório, foram realizadas imagens em posição antero-posterior e médio-lateral do membro operado imediatamente após a enxertia, aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório. A figura 11 demonstra o aspecto radiográfico do implante no pós-operatório imediato. Para todos estes exames os animais eram preparados previamente e submetidos à anestesia de ultracurta duração, realizada com propofol (na dose de 8mg/kg) por via intravenosa. O controle e arquivamento das imagens radiográficas, assim como as principais alterações ocorridas com os animais durante o procedimento, foram registrados na ficha de exame radiográfico, que consta no apêndice 01.

O alinhamento e a estabilidade do implante ósseo em relação aos segmentos proximal e distal do fêmur; as alterações ocorridas com a placa de compressão dinâmica e a inserção dos parafusos corticais e esponjosos; e os sinais de consolidação das interfaces osso/implante foram avaliados pelo exame radiográfico.

Ao final do experimento, as imagens radiográficas foram digitalizadas e catalogadas em mídia digital (CD). Esta mídia, acompanhada de uma ficha de avaliação, um termo de orientação e uma tabela de pontuações referentes ao grau de consolidação óssea (modificada de COOK, et al., 2004), foi encaminhada para avaliação dos

resultados por uma banca, composta por Médicos Veterinários radiologistas, mediante estudo cego. Os parâmetros utilizados para orientar a banca avaliadora quanto à quantificação radiográfica para os diferentes graus de consolidação constam na tabela 01. A carta de orientação da banca quanto a padronização das normas de avaliação constam no apêndice 02.

3.2.16 Avaliação clínica

A avaliação clínica foi realizada mediante inspeção diária da ferida cirúrgica nos primeiros 10 dias de pós-operatório. Realizou-se o acompanhamento periódico dos animais registrando-se as alterações comportamentais e fisiológicas que pudessem comprometer a evolução do experimento e acarretar o descarte do animal do grupo de avaliações. O apêndice 03 demonstra o modelo de ficha utilizada para esta avaliação.

3.2.17 Avaliação deambulatória

A avaliação do grau de deambulação dos pacientes (Apêndice 04) foi realizada semanalmente até o final da 12^a semana, seguindo os critérios estabelecidos por Tudury e Raiser (1985) para avaliar a marcha dos cães. As aferições foram realizadas no 2^o e 5^o dias de todas as semanas de avaliação, por um único avaliador, em um mesmo local com superfície uniforme e antiderrapante e com o animal livre de guia, em uma área de 6mx14m. Todos os dados foram registrados em uma ficha de avaliação deambulatória (Apêndice 05).

3.2.18 Avaliação macroscópica

A biópsia óssea foi realizada aos 90 dias de pós-operatório. Para tal procedimento o animal foi submetido ao mesmo protocolo anestésico empregado na cirurgia de osteossíntese. O paciente teve o membro esquerdo previamente preparado com tricotomia ampla, posicionado em decúbito lateral direito e com o membro esquerdo tracionado em sentido dorsal e preparado assepticamente para a intervenção cirúrgica.

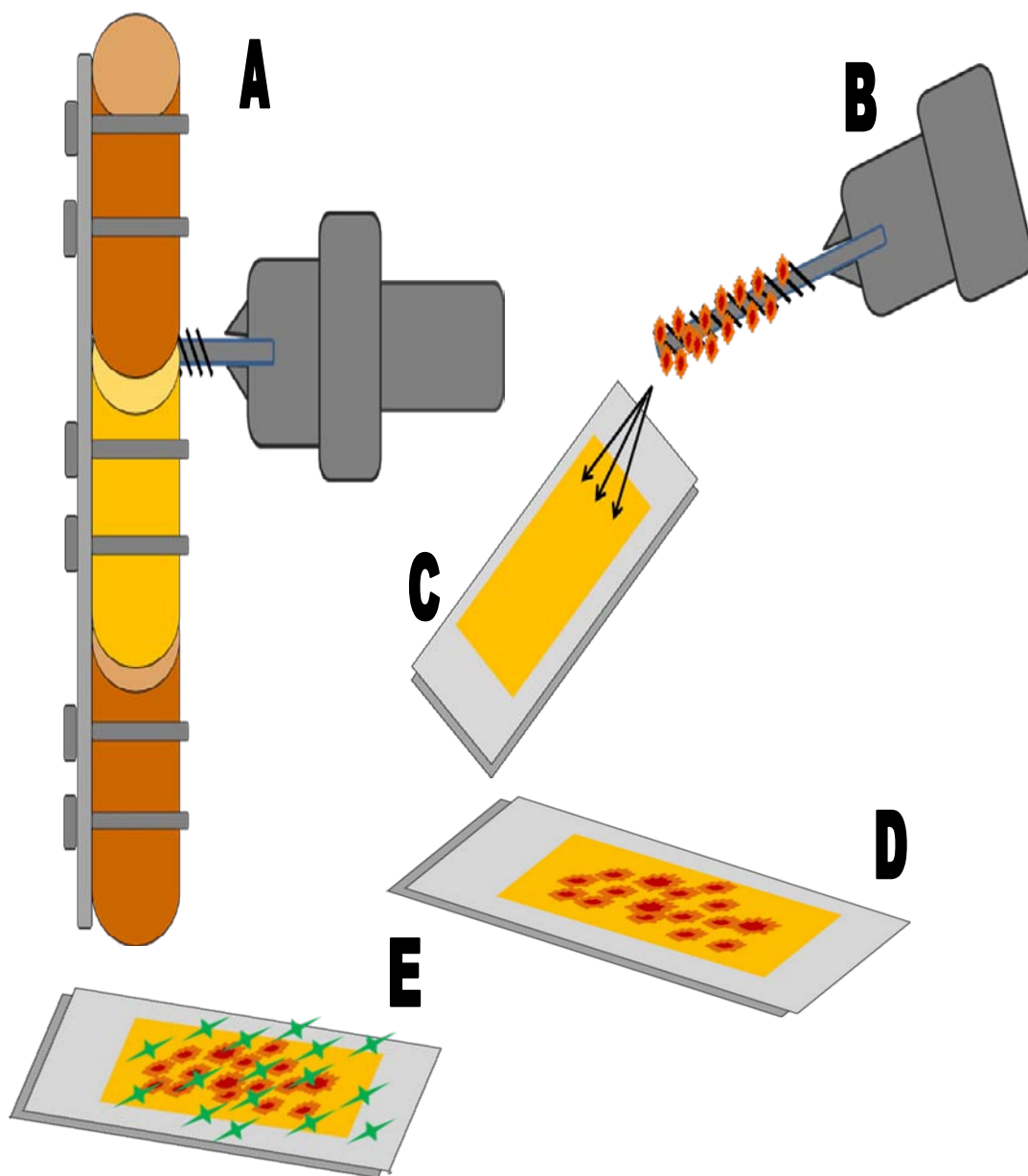


Figura 09 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Desenho esquemático do procedimento de colheita e análise da fluorescência dos micro-fragmentos ósseos.

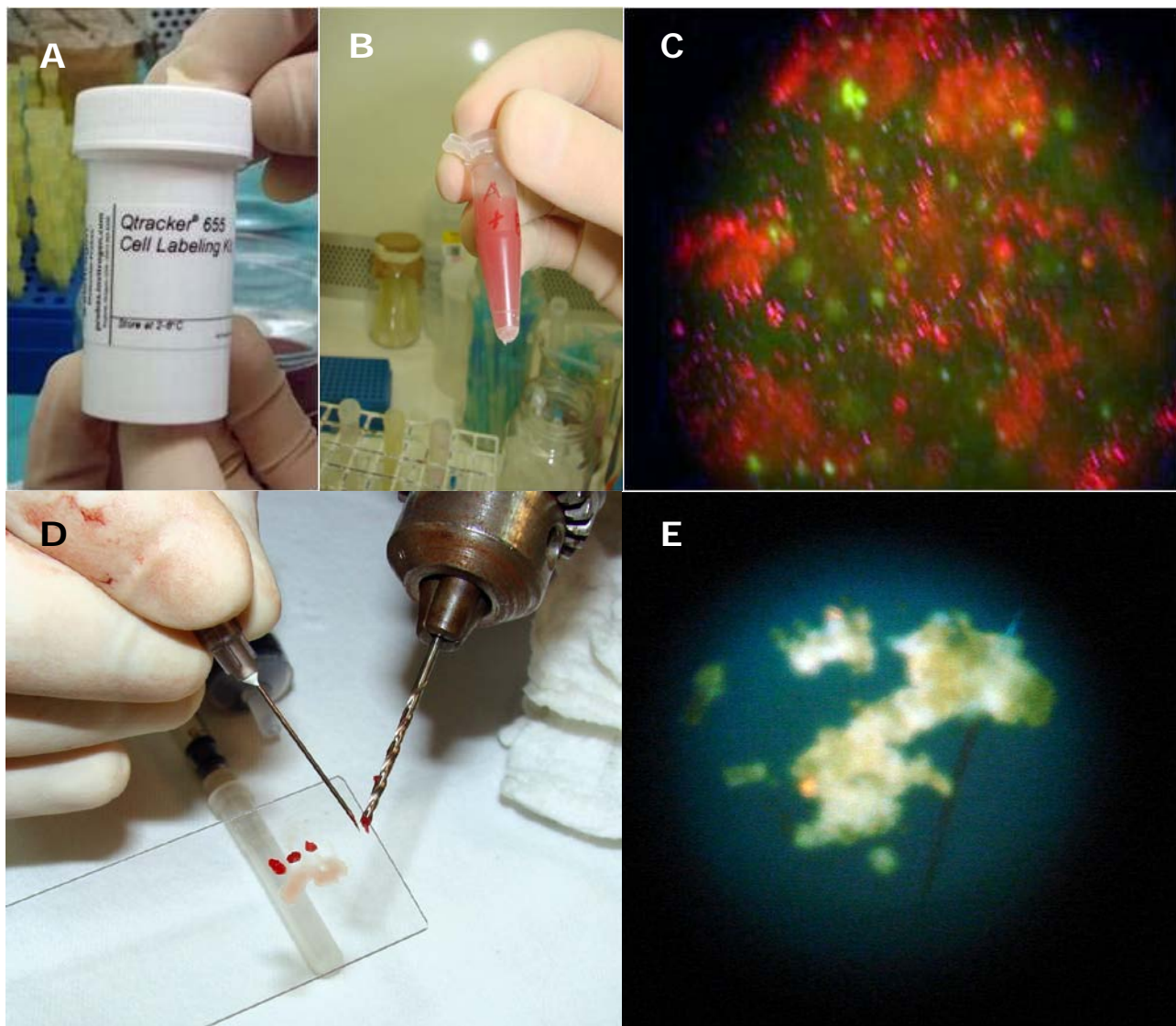


Figura 10 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Análise da fluorescência do marcador nanocristal Qtracker-665. (A-B-C) Botão Celular. (D-E) Micro-fragmentos ósseos colhidos aos sete dias após a enxertia. (Ampliação da objetiva: 100X em D e 40X em E)..

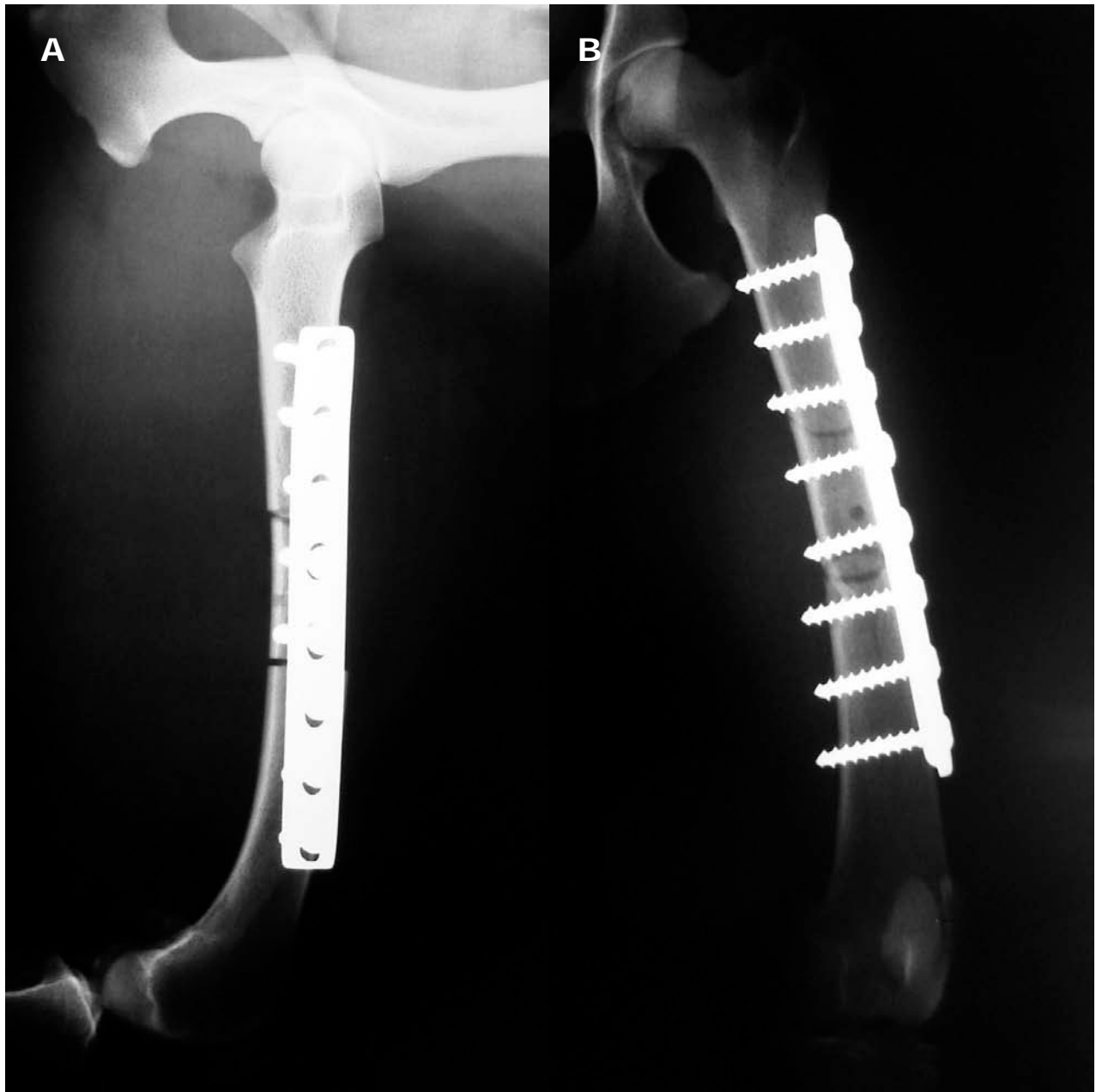


Figura 11 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Avaliação radiográfica do implante homólogo no período pós-operatório imediato. (A) Incidência médio-lateral. (B) Incidência Antero-posterior.

Tabela 01 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Valores quantitativos relacionados ao aspecto radiográfico da consolidação óssea das interfaces implante osso-receptor proximal e distal.

Graus de Consolidação	Característica
1	Nenhuma formação óssea entre as interfaces osso-implante
2	Formação óssea mínima entre as interfaces osso-implante
3	Formação óssea moderada entre as interfaces osso-implante
4	Formação óssea intensa com continuidade cortical parcial entre as interfaces osso-implante
5	Formação óssea intensa com continuidade cortical completa entre as interfaces osso-implante

Modificado de COOK et al. (2004)

Procedeu-se o acesso à diáfise femoral pelo mesmo acesso realizado na intervenção cirúrgica anterior, expondo-se a região de transição proximal distal do enxerto/implante com o osso receptor. Uma vez exposta a região, o enxerto/implante e sua relação com o leito receptor foram macroscopicamente avaliados e então a placa de compressão óssea era removida e a biópsia realizada com auxílio de uma perfuratriz acoplada a uma broca de corte de 2mm de diâmetro. Com o auxílio desta, colheram-se segmentos retangulares de aproximadamente 2cm x 0,5cm, obtidos nas junções com o osso receptor e na porção intermédia do implante. Um pequeno orifício foi realizado com broca de 1mm em uma das extremidades do fragmento ósseo colhido, a qual por convenção, identificava o segmento do osso receptor. Nesta extremidade o fragmento foi marcado com fio de seda número 2-0. O procedimento de biópsia óssea está esquematizado na figura 12. As amostras obtidas foram fixadas em formol tamponado à 10% e acondicionadas em frascos individuais sendo encaminhadas ao laboratório de patologia veterinária para análise individual dos fragmentos.

3.2.19 Avaliação da densidade óssea

Os fragmentos ósseos colhidos e preservados aos 90 dias foram posteriormente submetidos a exame de tomografia computadorizada com o intuito de avaliar a densidade óssea. Esta aferição foi realizada em três regiões do segmento ósseo: a extremidade marcada pelo fio (representativa do leito receptor), a região central (representativa da transição implante/enxerto-leito receptor) e a extremidade distal (representativa do implante/enxerto). Empregando-se o software E-Film, em cada um destes pontos foram realizadas três aferições em paralelo, para obtenção da densidade óssea, sendo que a média aritmética entre os três valores, compôs o valor final da densidade óssea correspondente para aquela região.

3.2.20 Avaliação Histológica

A colheita de fragmento ósseo para avaliação histopatológica foi realizada aos 90 dias de pós-operatório. O segmento de cortical óssea foi colhido após a remoção da placa de compressão, com auxílio de uma broca ortopédica de corte, acoplada a um

micromotor cirúrgico. Durante a colheita do fragmento procedeu-se irrigação constante do local, com soro fisiológico a temperatura ambiente. Os fragmentos ósseos recém colhidos foram preservados em formaldeído tamponado a 10%, por período não inferior a 30 dias.

Foram encaminhados fragmentos de tecido ósseo cortical identificados com a numeração 1 à 16 e com dimensões médias de 8x8x5mm. Uma das extremidades dos segmentos, indicada com fio preto multifilamentoso, foi marcada com tinta nanquim preta para melhor identificação desta extremidade durante o exame histopatológico e para a eventualidade de perda da marcação original.

Após descalcificação com ácido fórmico, as amostras sofreram processamento histológico automatizado padrão e as lâminas histológicas resultantes foram coradas com Hematoxilina e Eosina de Harris.

Por se tratar de tecido ósseo, de cada fragmento foram feitas duas lâminas histológicas, das quais foi escolhida a melhor para a avaliação histológica. As lâminas foram analisadas sob microscopia óptica e descritas as características histopatológicas. Foram feitas fotomicrografias das alterações observadas.

A fase do processo de consolidação da fratura (calo ósseo) dos segmentos ósseos corticais analisados, foi classificada de acordo com Allen *et al.* (1980), e consta na tabela 02. Na figura 13 pode ser observado o esquema de avaliação histopatológica.

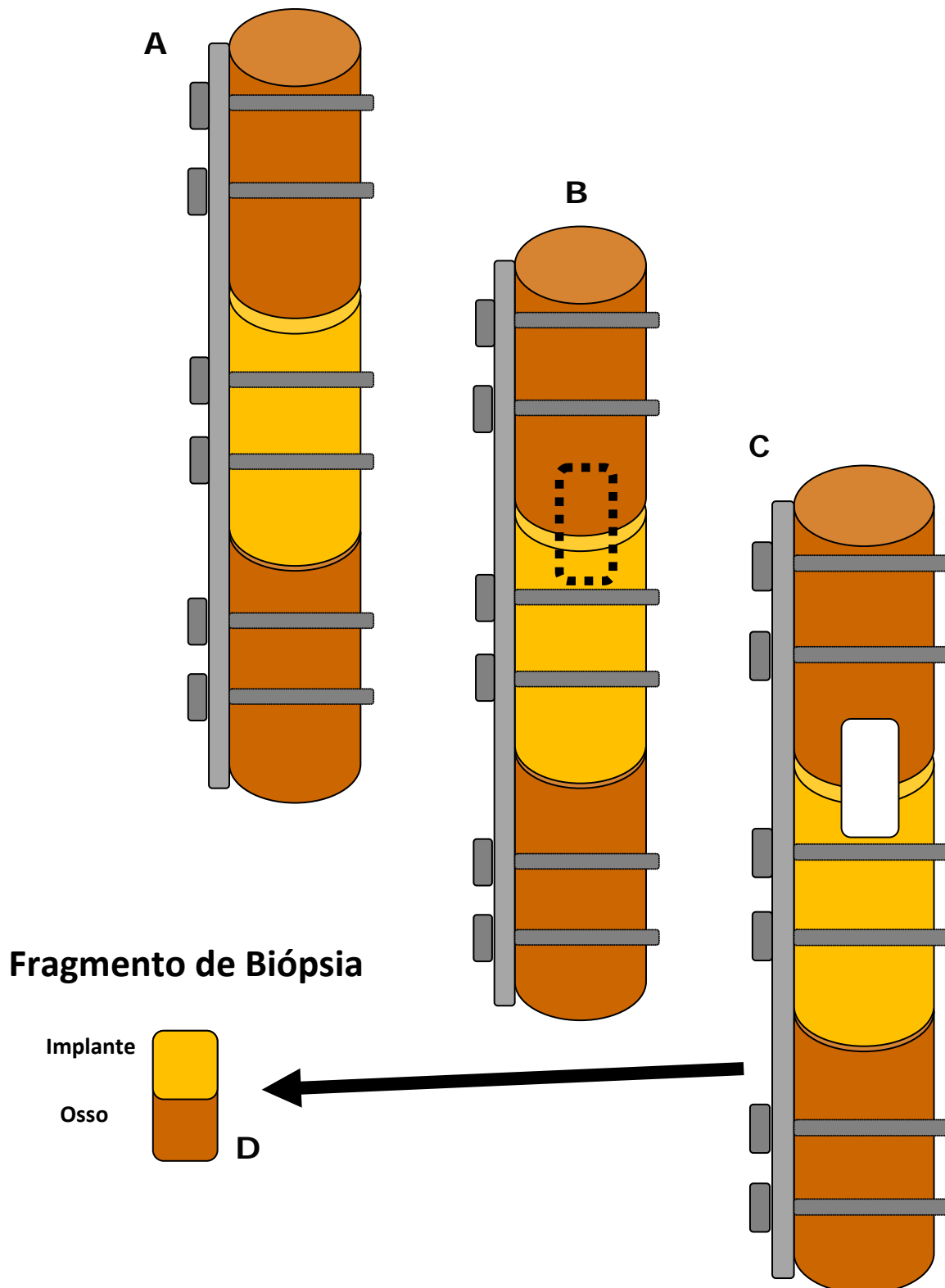


Figura 12 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Desenho esquemático do procedimento de biópsia óssea segmentar.

Tabela 02 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Fases do processo de consolidação das fraturas.

Fase	Aspecto Histológico
0	Ausência ou atraso no processo de cicatrização da fratura
1	União cartilaginosa incompleta (Fase Fibroblástica).
2	União cartilaginosa completa (Fase Cartilaginosa).
3	União óssea incompleta (Fase Osteogênica).
4	União óssea completa (Fase de Ossificação).

Modificado de Allen *et al.* (1980)

3.2.21 Avaliação Estatística

A análise estatística foi realizada com o programa estatístico SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*), versão 7.0.

Para a análise comparativa do grau de consolidação das interfaces ósseas, proximal e distal, foi empregado o teste de Kruskal-Wallis, considerando-se significativo um $P < 0,05$.

A comparação entre a densidade óssea dos fragmentos de biópsia foi realizada também pelo teste de Kruskal-Wallis, considerando-se um valor de $p < 0,05$, como significativo, sendo precedido pelo teste de Lilliefords para observar a normalidade ou não na distribuição dos dados.

3.2.22 Reabilitação dos animais da pesquisa

Após a colheita do fragmento ósseo, o defeito provocado foi cirurgicamente corrigido de acordo com cada caso. Os animais foram acompanhados até o final do tratamento quando foram encaminhados para adoção.

Fragmento de Biópsia

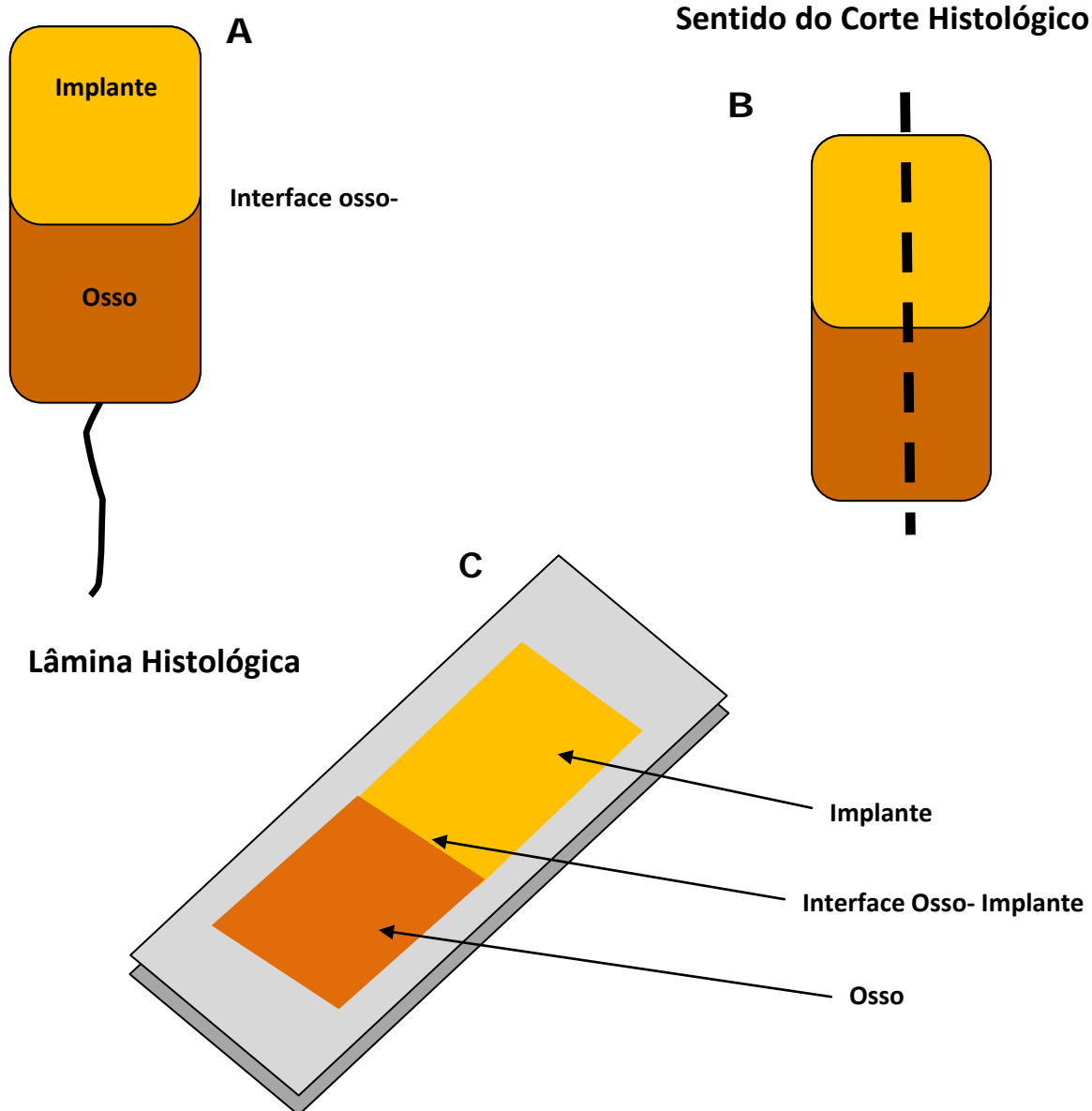


Figura 13 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Desenho esquemático da marcação, secção e orientação dos cortes histológicos.

4. RESULTADOS

4.1 Colheita e conservação de ossos corticais

O procedimento de colheita foi facilmente executado sem intercorrências. Em alguns animais o acesso tornou-se mais fácil devido a menor cobertura muscular, sendo a remoção das inserções musculares à diáfise femoral realizadas com maior facilidade. O uso de um pino ortopédico rosqueado de 4,0mm auxiliou na remoção do conteúdo medular. Durante todo o período de conservação na glicerina 98%, foram realizadas duas trocas do conservante: uma aos sete dias após a colheita e a outra seis meses após. Ao longo do período de conservação não foram verificadas alterações referentes a coloração do material conservante. No entanto, no momento da primeira troca aos sete dias, observou-se uma discreta diminuição da viscosidade do meio conservante.

4.2 Avaliação radiográfica dos implantes

A avaliação radiográfica dos segmentos ósseos corticais não evidenciou alterações estruturais que pudessem comprometer a avaliação da resistência.

4.3 Densidade óssea dos implantes

O exame de tomografia computadorizada demonstrou-se eficiente para a avaliação estrutural e aferição da densidade óssea dos segmentos ósseos corticais. Foi possível selecionar com clareza e aferir o valor de densidade óssea em três pontos distintos de cada fragmento ósseo.

4.4 Tamanho e Volume dos Implantes

Embora a aferição dos valores referentes ao diâmetro e comprimento tenha sido realizada com uma paquímetro, o emprego da serra fita produziu uma variação de ± 3 mm no comprimento do fragmento, decorrente do efeito de oscilação da mesma

durante o corte. Esta variação foi registrada momentos antes da realização do teste de resistência, visando o cálculo mais aproximado possível do volume de cada segmento.

4.5 Hidratação dos implantes

Os implantes foram hidratados em períodos correspondentes aos seus grupos de avaliação, sendo removidos dos frascos individuais contendo a solução, ao final do período predeterminado. Não foram observadas alterações macroscópicas nos fragmentos ósseos após a remoção das soluções de imersão. As proporções de solução em cada frasco foram mantidas em torno de 10:1 considerando-se solução e osso.

4.6 Teste de resistência biomecânica

Os dados individuais referentes ao volume, resistência e densidade óssea média dos fragmentos ósseos constam no apêndice 06.

O emprego da prensa de compressão axial demonstrou-se eficiente para a realização do teste de compressão dos 108 fragmentos testados. Em 37% destes fragmentos, a angulação do corte produzido pela serra fita, impossibilitou o posicionamento do eixo longitudinal do implante em um ângulo de 90° com a prensa de compressão e por este motivo o segmento mais longo de cada segmento foi cuidadosamente desgastado para permitir tal angulação. Os segmentos ósseos que apresentaram as mesmas características radiográficas e densitométricas dos demais, porém apresentaram valores de resistência muito discrepantes da média geral, foram eliminados de seus grupos.

Nos seis grupos avaliados, constatou-se que o grupo II suportou maior força compressiva por cm^3 de osso. Os demais grupos que apresentaram diminuição da resistência óssea foram os grupos VI, I, V, III e IV respectivamente, em ordem decrescente. O valor médio da resistência à deformação, dado em kgf por centímetro cúbico de osso, para os grupos de I a VI foi de 1,60; 1,64; 1,49; 1,24; 1,60 e 1,61 respectivamente e pode ser observado na figura 14-A. não apresentando diferença estatisticamente significativa entre os grupos, para este quesito.

A densidade óssea média apresentada foi de 1611 para o grupo I, 1648 para o II, 1482 para o III, 1596 para o IV, 1618 para o V e 1702 para o VI. A análise estatística, demonstrou haver diferença com significância estatística entre a densidade dos diferentes grupos. A comparação entre volume, carga e densidade, apresentadas pelos diferentes grupos avaliados pode ser observada na figura 14-B. A tabela 03 demonstra os valores médios para volume, densidade e carga suportada por cada um dos grupos avaliados. No apêndice 07, contam os dados estatístico referentes a comparação dos quesitos acima citados para os diferentes grupos avaliados.

4.7 Avaliação Estatística do teste de resistência

Não foi verificada diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) para a resistência óssea entre os seis grupos avaliados.

4.8 Colheita de medula óssea

O protocolo anestésico empregado para o procedimento de colheita demonstrou-se apropriado, produzindo boa relaxação muscular, facilitando a manipulação para a punção óssea.

A colheita de medula-óssea foi realizada sem complicações decorrentes do procedimento de punção. A punção lateral ao tubérculo maior no úmero foi de mais fácil execução quando comparada a punção na fossa intertrocantérica no fêmur. No entanto, o procedimento ocorreu de forma rápida e sem complicações, levando em média 25 minutos para a punção dos quatro sítios de colheita.

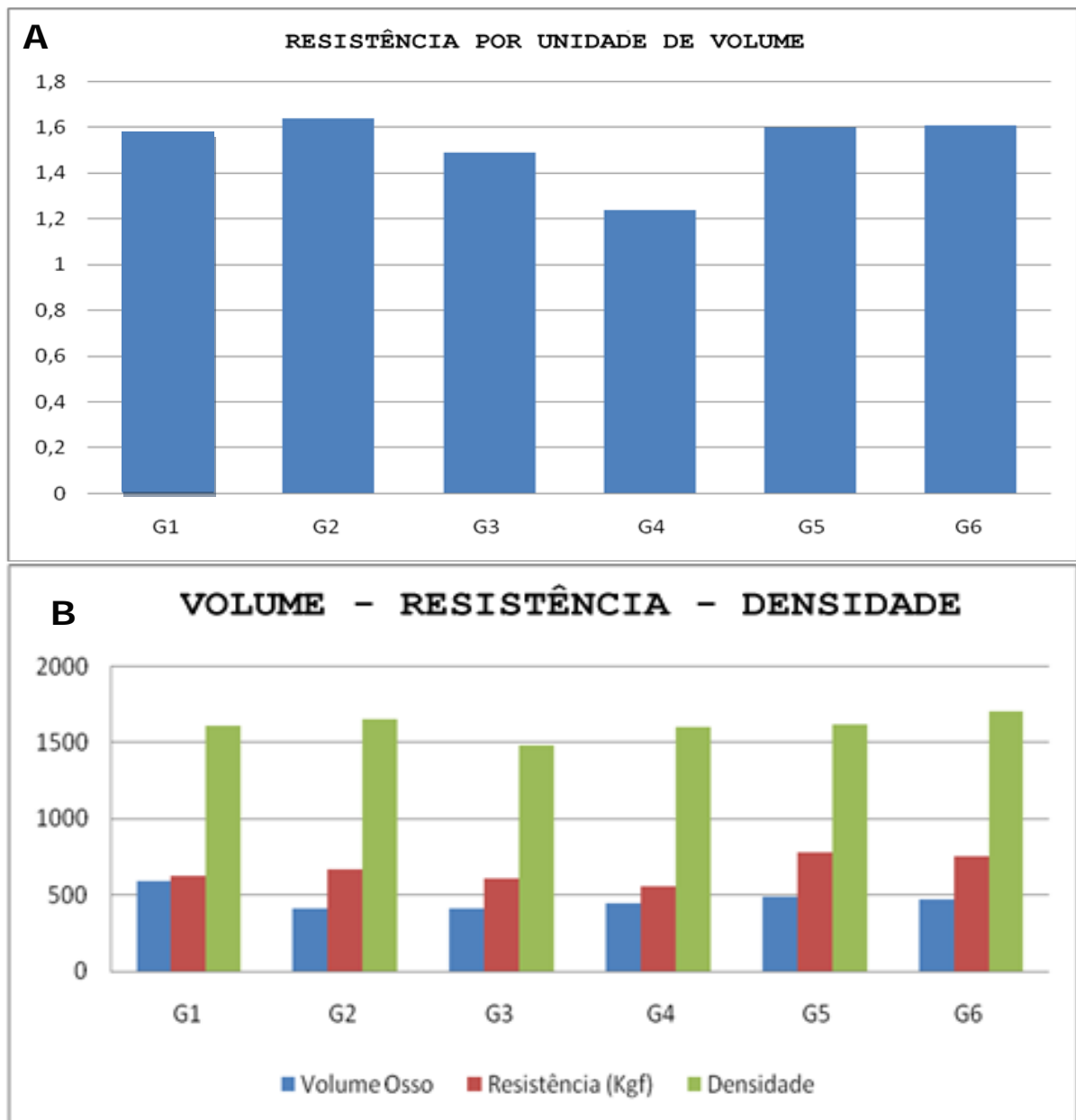


Figura 14 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. (A) Valor médio da resistência à deformação, dado em quilogramaforça por centímetro cúbico de osso, para os diferentes grupos avaliados. (B) Comparação entre volume, carga e densidade, apresentadas pelos diferentes grupos avaliados.

Tabela 03 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Valores médios do volume, densidade mineral óssea e carga suportada pelos diferentes grupos avaliados.

Grupo	Volume Ósseo (cm ³)	Resistência Óssea (kgf)	Densidade Óssea
I	593	627,39	1611
II	407	666,30	1648
III	407	607,84	1482
IV	446	552,81	1596
V	487	781,09	1618
VI	466	751,37	1702

A obtenção do volume de 5ml kg⁻¹ de peso corporal foi obtido com facilidade e rapidez. A coagulação da medula-óssea colhida, tanto na seringa acoplada a agulha de punção quanto na bolsa de colheita não foi verificada com o protocolo empregado.

Não foi observado processo doloroso nos pontos de punção durante o pós-operatório imediato e tardio. No entanto, nos cães número III, VII, XI, XVIII e XX foi observada hemorragia em um ou dois pontos de punção, a qual foi controlada por compressão digital até os primeiros 30 minutos pós-colheita. Nenhum dos cães anteriormente citados apresentava alterações hematológicas que justificassem tal ocorrência.

Os dados referentes à colheita de medula óssea e os respectivos volumes obtidos no procedimento são observados na tabela 04.

4.9 Acondicionamento, obtenção, marcação e viabilidade do botão celular

A utilização do conjunto de bolsas e filtros do kit de colheita de medula óssea demonstrou-se apropriado para a colheita de medula óssea no cão. A diluição empregada neste protocolo foi considerada satisfatória, evitando a coagulação na bolsa

da medula óssea recém colhida e mantendo boa fluidez favorecendo o processo de filtração das espículas ósseas.

O processo de centrifugação em Ficol para isolamento da fração mononuclear foi realizado sem complicações, levando em média 90 minutos. A viabilidade e a contagem das células mononucleares obtidas no botão celular foram consideradas satisfatórias quando considerado o volume de medula-óssea colhido e o volume final do botão celular disponível para administração no paciente.

O emprego da citometria de fluxo auxiliou na identificação das células CD34+, sendo realizada sem complicações.

Os valores da contagem celular obtida ficaram entre $0,47 \times 10^5$ a $5,98 \times 10^5$ células mononucleares da medula óssea por microlitro de botão celular. Já o número de células administradas por quilograma do receptor variou entre $5,09 \times 10^6$ a $51,25 \times 10^6$ células, com viabilidade média de 95,3%.

Os resultados detalhados referentes à viabilidade celular, contagem de células mononucleares e CD34+, e o número de células administradas por kg de peso corporal podem ser observados na tabela 05.

4.10 Anestesia e técnica operatória

O protocolo anestésico empregado mostrou-se adequado para a realização do procedimento de enxertia, proporcionando boa relaxação muscular, facilitando a manipulação trans-operatória e promovendo boa analgesia no pós-operatório imediato. O procedimento cirúrgico durou em média 80 minutos, com variação entre 65 e 120 minutos (tabela 06).

O acesso à diáfise femoral foi adequado para a realização da osteotomia e posterior fixação do enxerto/implante com placa de compressão dinâmica. Para este procedimento necessitou-se realizar a liberação do músculo adutor magno. Este procedimento foi realizado na região central da diáfise e ligeiramente acima e abaixo da área de secção, com o intuito de aplicar as pinças ósseas de redução. O rebatimento do perióstio na região foi realizado com auxílio de elevador periosteal sem a ocorrência de problemas ou maiores dificuldades.

Tabela 04 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Colheita de medula óssea (MO) autógena e respectivos volumes obtidos no procedimento.

Grupo	Cão	Peso (Kg)	MO Colhida por osso (ml)	Total de MO colhida (ml)	Cloreto sódio 0,9% (ml)	Volume Final da Bolsa (ml)
I (Tratdo Autólogo)	I	12	15	60	15	75
	II	10	12,5 (13)	52	13	65
	III	15	18,75 (19)	76	19	95
	IV	14	17,5 (18)	72	18	90
	V	13	16,25 (17)	68	17	85
II (Tratado Homólogo)	VI	16	20	80	20	100
	VII	16	20	80	20	100
	VIII	11	13,75 (14)	56	14	70
	IX	13	16,25 (17)	68	17	85
	X	11	13,75 (14)	56	14	70
III (Controle Autólogo)	XI	16	20	80	20	100
	XII	16	20	80	20	100
	XIII	16	20	80	20	100
	XIV	12	15	60	15	75
	XV	13	16,25 (17)	68	17	85
IV (Controle Homólogo)	XVI	17	21,25 (22)	86	22	108
	XVII	14	17,5 (18)	72	18	90
	XVIII	11	13,75 (14)	56	14	70
	XIX	10	12,5 (13)	52	13	65
	XX	12	15	60	15	75

Tabela 05 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Volume do botão celular, Viabilidade celular, contagem de células mononucleares e CD34+, e número de células administradas por kg de peso corporal.

Grupo	Cão	Peso	Nº CM da bolsa (cel/ μ l)	Volume BC (μ l)	CM/ μ l	CM/Kg	Viabilidade (%)	Células CD 34+ (%)	Células CD34+ (Nº cel/ kg)
I (Tratado Autólogo)	I	12	15.600	1300	$0,47 \times 10^5$	$5,09 \times 10^6$	80	0,14	$0,11 \cdot 10^6$
	II	10	14.200	1500	$1,71 \times 10^5$	$25,65 \times 10^6$	98	0,13	$0,10 \cdot 10^6$
	III	15	48.500	1500	$4,68 \times 10^5$	$46,8 \times 10^6$	90	0,22	$0,54 \cdot 10^6$
	IV	14	27.100	1200	$5,98 \times 10^5$	$51,257 \times 10^6$	99	0,22	$0,30 \cdot 10^6$
	V	13	22.600	1100	$2,90 \times 10^5$	$24,538 \times 10^6$	100	0,08	$0,09 \cdot 10^6$
II (Tratado Homólogo)	VI	16	20.100	800	$3,27 \times 10^5$	$16,35 \times 10^6$	95	0,15	$0,15 \cdot 10^6$
	VII	16	16.400	600	$3,62 \times 10^5$	$13,575 \times 10^6$	92	0,09	$0,07 \cdot 10^6$
	VIII	11	14.000	700	$4,81 \times 10^5$	$30,609 \times 10^6$	95	0,03	$0,02 \cdot 10^6$
	IX	13	23.700	500	$2,42 \times 10^5$	$9,307 \times 10^6$	96	0,05	$0,06 \cdot 10^6$
	X	11	14.800	600	$2,22 \times 10^5$	$12,109 \times 10^6$	98	0,06	$0,05 \cdot 10^6$
III (Controle Autólogo)	XI	---	---	---	---	---	---	---	---
	XII	---	---	---	---	---	---	---	---
	XIII	---	---	---	---	---	---	---	---
	XIV	---	---	---	---	---	---	---	---
	XV	---	---	---	---	---	---	---	---
IV (Controle Homólogo)	XVI	---	---	---	---	---	---	---	---
	XVII	---	---	---	---	---	---	---	---
	XVIII	---	---	---	---	---	---	---	---
	XIX	---	---	---	---	---	---	---	---
	XX	---	---	---	---	---	---	---	---

CM: Células Mononucleares

BC: Botão Celular

Na região central da diáfise, no local previsto onde o músculo adutor foi rebatido e a osteotomia segmentar realizada, ocorreu sangramento intenso, o qual foi quantificado pelo uso de compressas com peso pré-estabelecido. Os dados referentes ao período de duração dos procedimentos como à colheita de medula óssea, processamento e técnica operatória estão descritos na tabela 06. O volume de sangue perdido por cada animal durante o período trans-operatório está demonstrado na tabela 07.

A osteotomia com serra Gigli foi realizada sem complicações para a primeira secção na parte proximal da diáfise femoral, no entanto, a segunda secção no segmento distal tornou-se mais dificultosa, devido a instabilidade do segmento ósseo e dificuldade de contenção apropriada para o movimento angular do fio serra.

O implante ósseo somente foi removido da solução de hidratação no ato de sua fixação junto à placa de compressão, o qual pode ser realizado sem complicações. Somente no cão de número VII foi necessária a substituição do segmento ósseo por outro, devido à fratura do mesmo durante a implantação dos parafusos corticais.

A resistência oferecida pela cortical óssea para a perfuração e aplicação dos parafusos, foi maior no osso conservado quando comparado a cortical óssea do osso receptor.

A esponja de colágeno aplicada no canal medular e no espaço entre os parafusos e laterais das extremidades do implante serviu apropriadamente para esta finalidade, moldando-se com facilidade nos locais aplicados. Durante o preenchimento do canal do implante tomou-se o cuidado para não comprimir demasiadamente a esponja em seu interior, o que poderia acarretar em dificuldade na absorção das células injetadas no local.

O procedimento mais demorado foi à fixação do enxerto/implante ao osso receptor, principalmente no segmento distal do fêmur, envolvendo a maior parte do tempo operatório. A placa de compressão foi fixada na superfície lateral do fêmur, no entanto, no cão XV, esta ficou posicionada ligeiramente craniolateral.

Tabela 06 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Tempo de duração dos procedimentos em geral: colheita, processamento e técnica operatória.

Grupo	Cão	Tempo colheita (min)	Intervalo colheita-Cirurgia (min)	Tempo cirurgia (min)	Tempo retardo (min)	Tempo total (min)
I (Tratado Autólogo)	I	40	70	125	40	235
	II	35	65	110	35	210
	III	30	85	115	30	230
	IV	30	65	110	25	205
	V	25	80	100	25	205
II (Tratado Homólogo)	VI	30	70	120	35	220
	VII	25	80	115	30	220
	VIII	20	65	125	35	210
	IX	30	55	100	20	185
	X	40	60	130	40	230
III (Controle Autólogo)	XI	35	60	115	35	175
	XII	35	75	115	25	225
	XIII	35	85	110	20	230
	XIV	25	70	95	15	190
	XV	30	90	130	30	250
IV (Controle Homólogo)	XVI	35	65	110	25	210
	XVII	40	85	100	20	225
	XVIII	35	70	90	10	195
	XIX	20	70	100	25	190
	XX	25	65	110	25	200

Tabela 07 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Quantificação do volume de sangue perdido durante a intervenção cirúrgica.

Grupo	Cão	Peso das compressas		Sangue perdido (ml)
		Antes intervenção (g)	Após intervenção (g)	
I (Tratado Autólogo)	I	97	133	36
	II	150	173	23
	III	149	253	104
	IV	143	165	22
	V	149	275	126
II (Tratado Homólogo)	VI	190	208	18
	VII	151	260	109
	VIII	147	251	104
	IX	142	243	101
	X	155	184	29
III (Controle Autólogo)	XI	146	255	109
	XII	148	226	78
	XIII	149	172	29
	XIV	137	200	63
	XV	172	271	99
IV (Controle Homólogo)	XVI	150	213	63
	XVII	144	223	79
	XVIII	149	185	36
	XIX	153	276	123
	XX	149	264	115

4.11 Obtenção de micro-fragmento ósseo para avaliação da marcação celular

O procedimento teve tempo médio de duração de 25 minutos, sendo empregado antibiótico de forma profilática. O acesso à diáfise femoral para a realização do procedimento foi o mesmo empregado para a realização da enxertia, com o diferencial de apresentar fibrose junto à linha de sutura.

A exposição demonstrou-se apropriada para a aplicação da broca ortopédica de 1,5mm, permitindo a colheita fácil de fragmentos ósseos provenientes da interface enxerto-hospedeiro proximal e distal.

A quantidade de fragmentos ósseos contidos nas ranhuras da broca ortopédica foram considerados suficientes para a confecção das lâminas, sendo estes facilmente removidos da broca com o auxílio de uma agulha hipodérmica 26G.

A confecção das lâminas para microscopia e o acondicionamento em papel laminado foram realizados sem maiores dificuldades. Da mesma forma, não ocorreram complicações para a realização da sutura da fásia lata e do subcutâneo. Já para a síntese da pele, em todos os animais, um segmento de 0,5cm foi removido ao longo do contorno da incisão para o reavivamento das bordas.

A microscopia de fluorescência demonstrou-se adequada para a verificação da fluorescência da alíquota do botão celular assim como das lâminas dos fragmentos ósseos. O grau de fluorescência foi classificado em diferentes níveis de intensidade, de acordo com o avaliador. Os resultados referentes à marcação das células mononucleares do botão celular com o nanocristal Q-traker 665, antes e após o procedimento de biópsia estão demonstradas na tabela 08.

4.12 Avaliação clínica

A manutenção dos animais em baias individualizadas favoreceu em alguns aspectos o manejo dos animais. Embora com o emprego do colar elisabetano, não foi possível evitar o autotraumatismo dos ferimentos pelos cães de número IV, IX, XII, XVII e XVIII. Entretanto, foi apenas verificada a ocorrência de dermatite superficial decorrente da lambedura, sem casos de infecção ou deiscência da ferida cirúrgica. O aumento do linfonodo poplíteo foi verificado no membro operado em todos os cães.

Além do desconforto esperado, os animais não demonstram dor anormal ao toque nem a manipulação do membro operado. Os cães de número VIII, XII e XV apresentaram manifestação dolorosa exacerbada ao toque após sofrer impacto no membro operado junto à porta da baia. Estes animais receberam a partir deste momento, antiinflamatório não esteróide (meloxicam, $0,1\text{mg kg}^{-1}$, por via subcutânea) por um período de dois dias.

Quanto à avaliação do temperamento dos animais, foram classificados com temperamento sanguíneo 60% dos cães dos grupos I, II e IV e 80% dos cães do grupo III. Apresentaram temperamento sanguíneo os cães de número I, II, IV, VI, VII, X, XI, XII, XIII, XV, XVI, XIX e XX. Os demais animais apresentavam temperamento linfático.

4.13 Avaliação Deambulatória

A avaliação da marcha em ambiente antiderrapante e com os animais livres de guia, foi considerada adequada para tal procedimento. O espaço amplo permitia a avaliação do animal parado em estação, além de disponibilizar espaço físico livre de interferência externa para o passo, trote ou galope.

A progressão para os diferentes graus de claudicação observados no membro pélvico dos diferentes grupos avaliados, segundo Tudury e Raiser (1985), pode ser observada na figura 15.

Ao final dos 90 dias de avaliação pós-operatória, 80% dos cães dos grupos I e II e 40% dos cães dos grupos III e IV apresentavam-se em grau V de claudicação. Os cães de número VIII, XII, XIV, XV, XVII, XIX e XX apresentaram regressão quanto ao grau de claudicação. Este evento ocorreu na sétima semana para os cães XV e XIX, oitava semana para os cães XII e XX, e nona, décima e décima segunda para os cães VIII, XVII e XIV respectivamente.

4.14 Avaliação radiográfica

A relação de diâmetro do implante ósseo com o leito receptor foi idêntica para os cães I, II, III, IV, V, VI, VII, XI, XII, XIII, IX, XV e XX. Nos cães VIII, IX, XVII,

XVIII e XIX o implante apresentou maior diâmetro em relação ao leito receptor, enquanto nos cães X e XVI o diâmetro apresentado pelo implante foi menor. Na tabela 09, pode ser observado o espaço existente entre as interfaces implante-osso, proximal e distal, no pós-operatório imediato.

Tabela 08 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Fluorescência do botão celular e microfragmentos ósseos marcados com nanocristal Q- tracker 665, obtidos aos sete dias de pós-operatório.

Grupo	Cão	Botão Celular	Microfragmento Ósseo
I (Tratado Autólogo)	I	++	+
	II	++	++
	III	+++	++
	IV	+++	+
	V	+++	+
II (Tratado Homólogo)	VI	+++	+
	VII	+++	+
	VIII	++	+
	IX	+++	++
	X	++	+
III (Controle Autólogo)	XI	---	---
	XII	---	---
	XIII	---	---
	XIV	---	---
	XV	---	---
IV (Controle Homólogo)	XVI	---	---
	XVII	---	---
	XVIII	---	---
	XIX	---	---
	XX	---	---

+ - Discreta

++ - Moderada

+++ - Intensa

--- Fluorescência Ausente

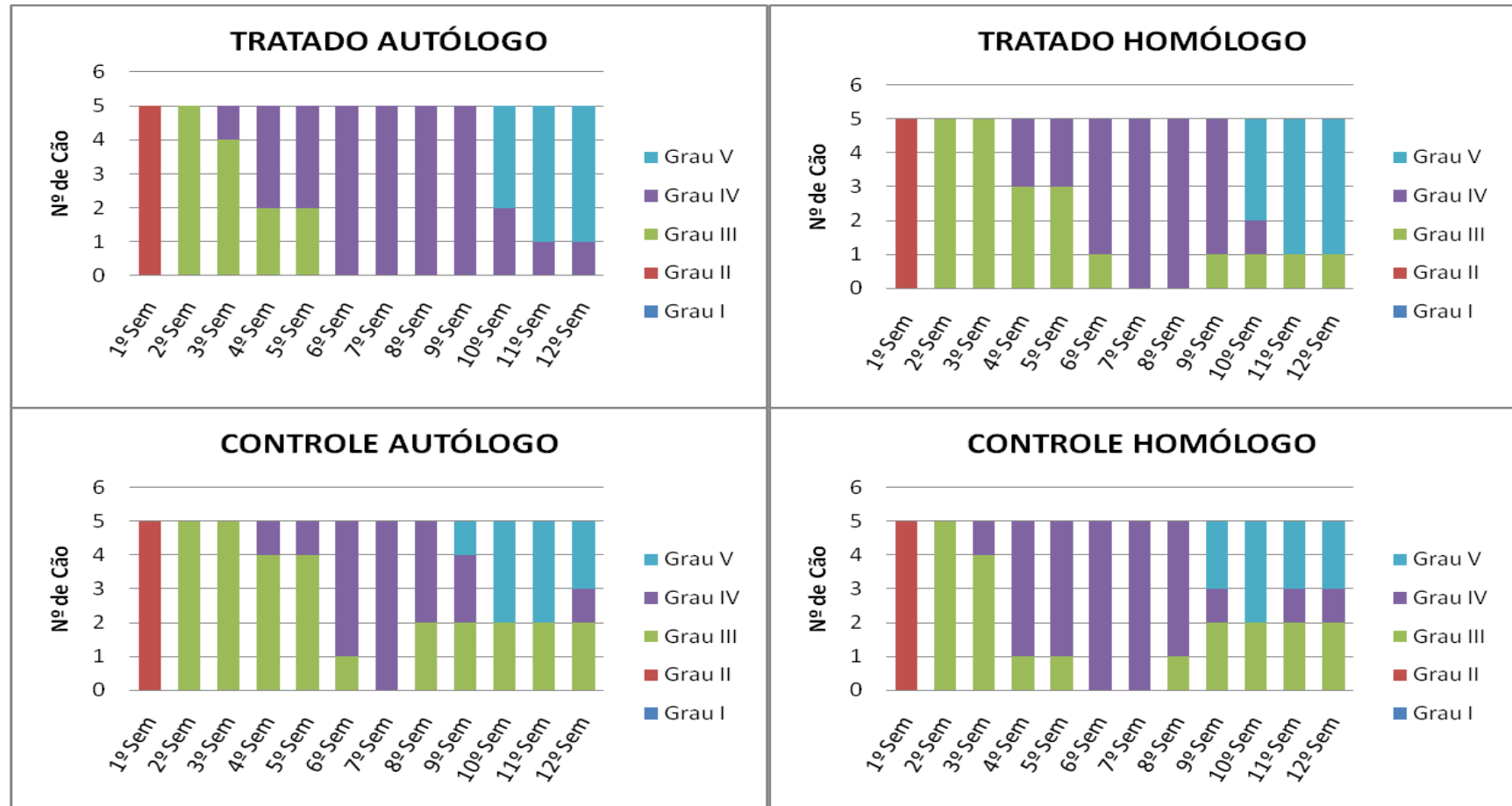


Figura 15 Exerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Progressão para os diferentes graus de claudicação observados no membro pélvico dos cães nos diferentes grupos avaliados, segundo Tudury e Raiser (1985).

Os resultados da avaliação radiográfica quanto ao grau de consolidação das interfaces osso-implante proximal e distal nos diferentes cães de cada grupo estão representadas nas figuras 16, 17 18 e 19.

O aspecto radiográfico da progressão da consolidação das interfaces osso-implante até os 90 dias de pós-operatório para os diferentes grupos avaliados podem ser observadas nas figuras 20 a 23 para os grupos tratados com a fração de células mononucleares da medula óssea e 24 a 27 para os grupos controle.

A consolidação de grau V (completa) para a interface enxerto-hospedeiro proximal ocorreu em 40% dos cães do grupo I e II, 20% nos cães do grupo III e foi ausente nos cães do grupo IV. Já para a interface enxerto-hospedeiro distal, o mesmo grau de consolidação ocorreu em 20% os cães do grupo I e IV, 40% dos cães do grupo II e 80% dos cães do grupo III.

Observou-se alteração discreta no alinhamento do eixo axial femoral nos cães XIX aos 30 dias; XI, XII e XX aos 45 dias e XI e XV aos 90 dias. A alteração do eixo axial mais pronunciada foi observada nos cães XIX aos 75 dias e XII e XX aos 90 dias.

Quanto à movimentação dos parafusos, foram contatadas alterações na posição dos mesmos, os quais foram identificados de forma seqüencial de números 01 a 08 contados em sentido proximal-distal. Qualquer deslocamento da cabeça do parafuso em relação a superfície da placa de compressão, foi considerada como migração.

No cão I, ocorreu migração do 6^o parafuso aos 60 dias e 4^o, 7^o e 8^o aos 75 dias. No cão II, o 5^o parafuso migrou aos 60 dias. No cão VIII, o 1^o, 2^o e 3^o parafusos migraram aos 60 dias. No cão X, ocorreu migração do 3^o aos 60 dias e 4^o aos 75 dias. No cão XI a migração ocorreu no 45^o dia, para os parafusos 2^o, 3^o e 4^o. No cão XII migraram o 1^o, 2^o e 3^o aos 45 dias e 4^o aos 60 dias. No cão XIII o 3^o, 4^o e 5^o aos 60 dias. No cão XIV ocorreu migração do 2^o e 3^o aos 90 dias. No cão XVII, do 2^o e 3^o aos 75 dias. No cão XIX do 7^o e 8^o aos 75 dias e do cão XX do 1^o, 2^o, 3^o e 4^o aos 60 dias.

Tabela 09 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Espaço existente entre as interfaces implante-osso, proximal e distal, no período pós-operatório imediato.

Grupo	Cão	Distância Implante osso-receptor	
		Interface Proximal (mm)	Interface Distal (mm)
I (Tratado Autólogo)	I	1	1
	II	1	1
	III	1	1
	IV	2	0
	V	2	1
II (Tratado Homólogo)	VI	2	2
	VII	1	1
	VIII	1	1
	IX	1	2
	X	2	1
III (Controle Autólogo)	XI	1	1
	XII	2	2
	XIII	1	1
	XIV	1	1
	XV	2	2
IV (Controle Homólogo)	XVI	1	1
	XVII	1	1
	XVIII	2	1
	XIX	1	2
	XX	1	1

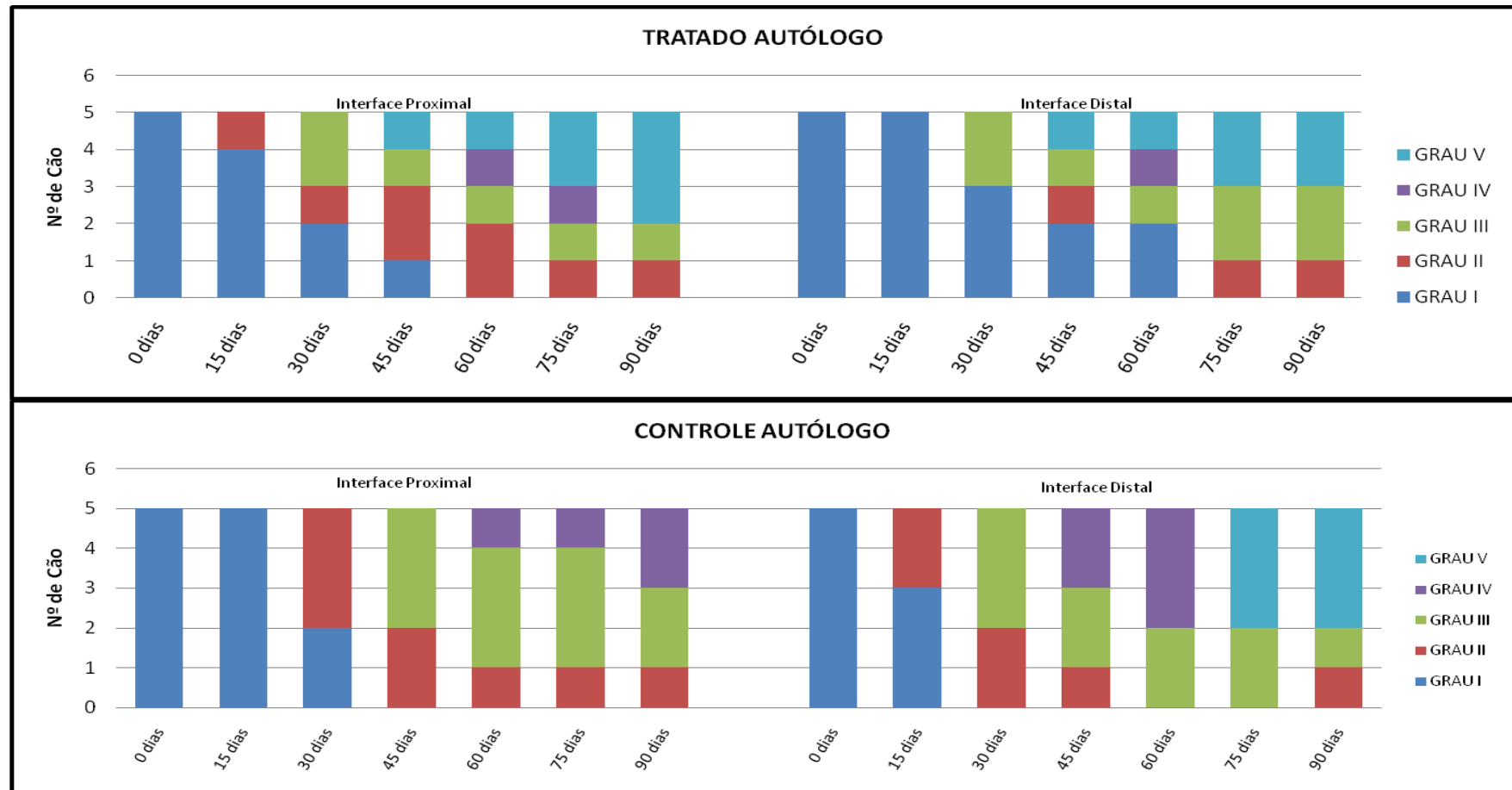


Figura 16 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Avaliação radiográfica do grau de consolidação óssea das interfaces osso-implante proximal e distal nos cães do grupo I e II (Tratado autólogo e homólogo), aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório.

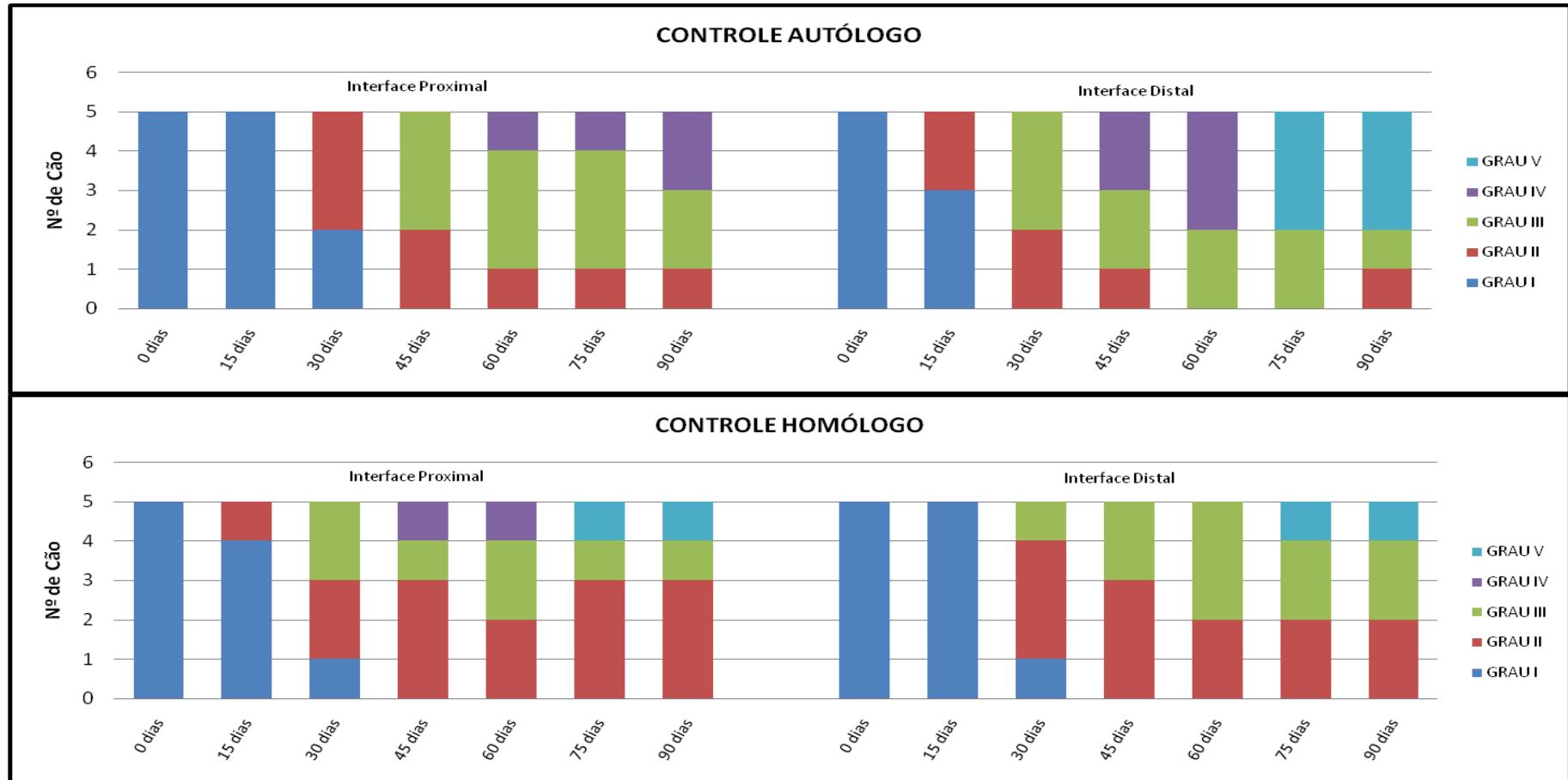


Figura 17 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Avaliação radiográfica do grau de consolidação óssea das interfaces osso-implante proximal e distal nos cães do grupo III e IV (Controle autólogo e homólogo), aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório.

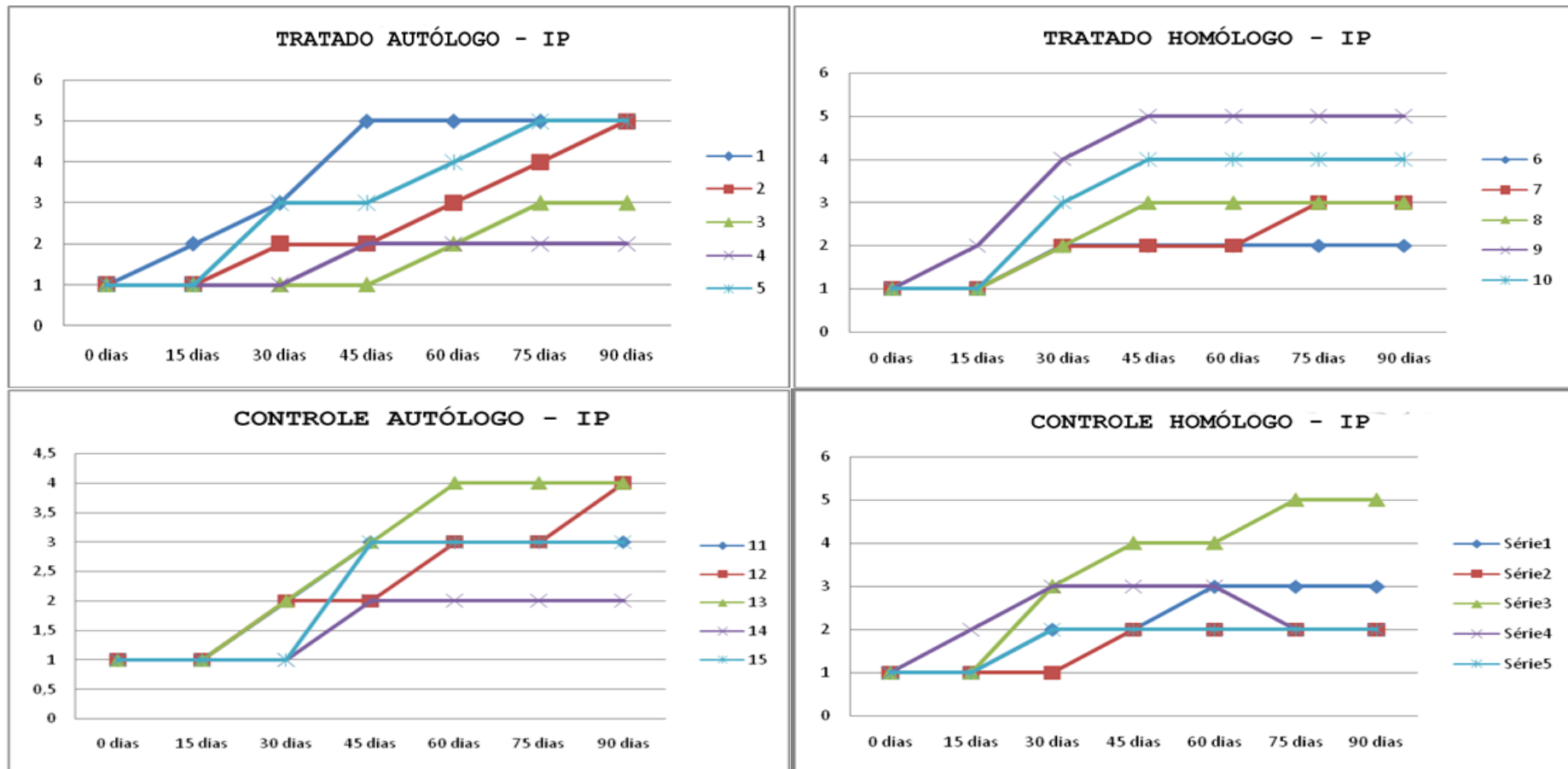


Figura 18 Exerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Comparação entre o grau de consolidação óssea da interface osso-implante proximal entre os cães dos diferentes grupos avaliados, aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório.

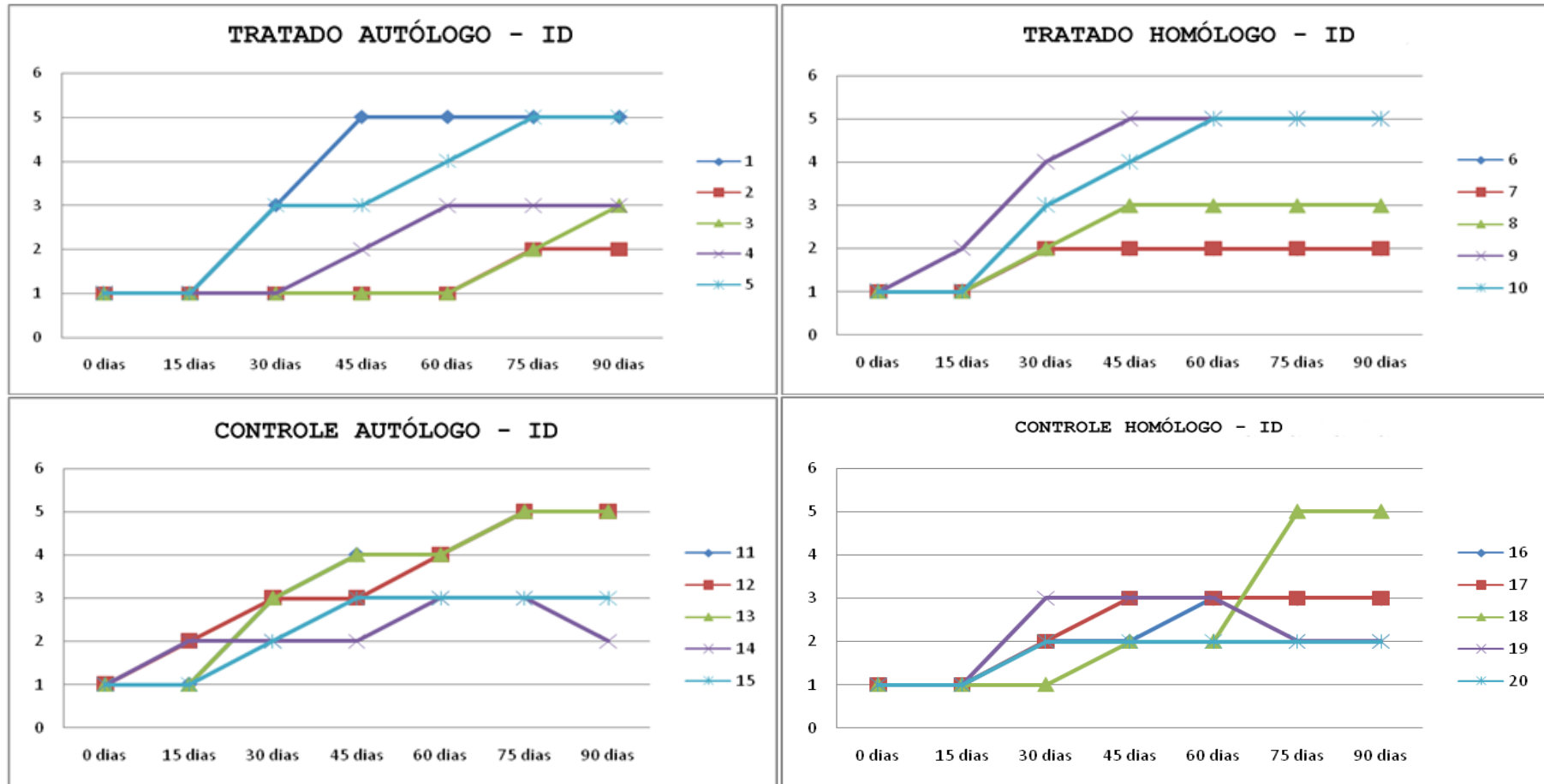


Figura 19 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Comparação entre o grau de consolidação óssea da interface osso-implante distal entre os cães dos diferentes grupos avaliados, aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório.

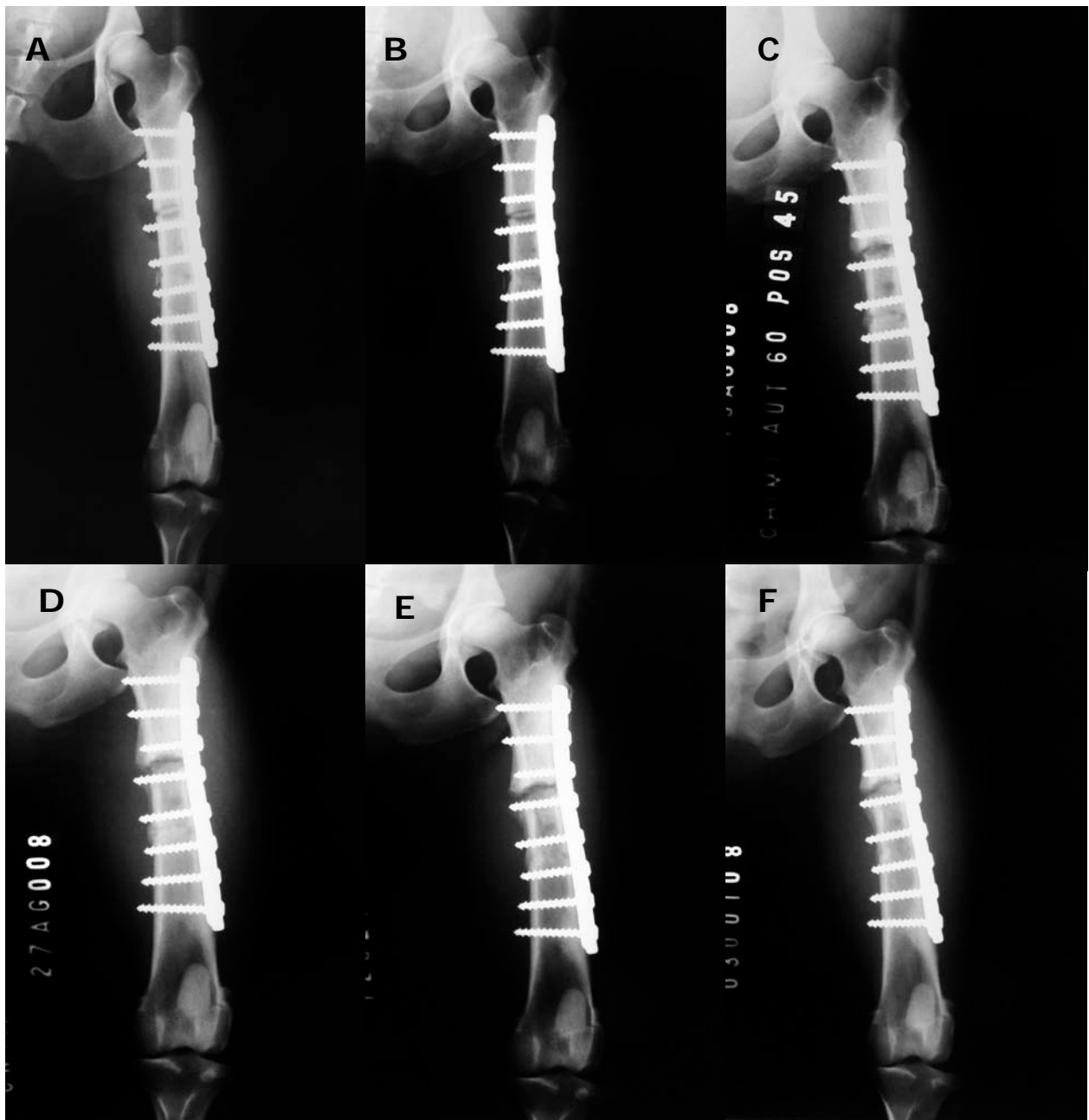


Figura 20 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Aspecto radiográfico antero-posterior da evolução cicatricial das interfaces osso-implante proximal e distal de um cão do grupo I (Tratado autólogo), aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório. Incidência antero-posterior.

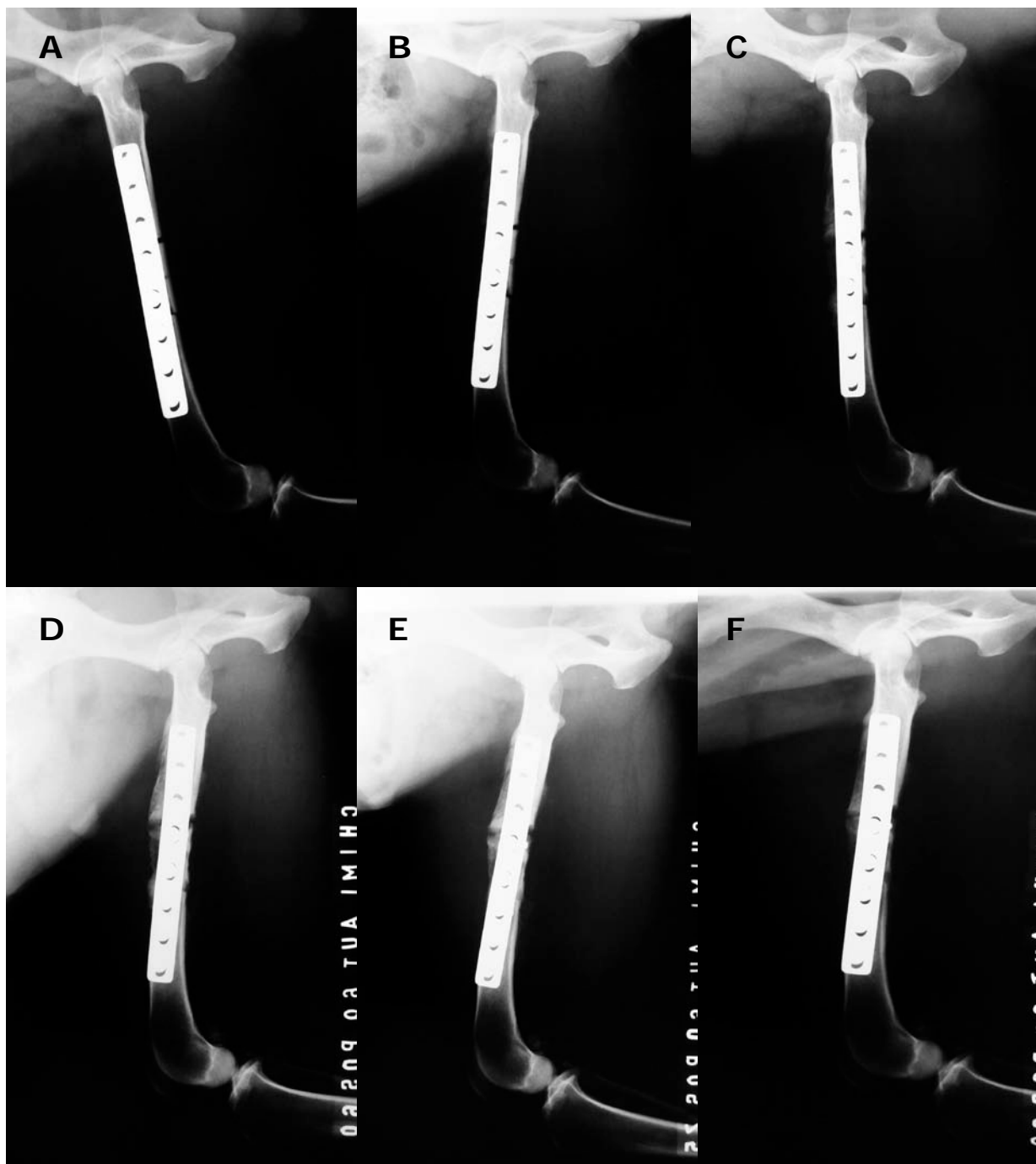


Figura 21 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Aspecto radiográfico (lâtero-medial) da evolução cicatricial das interfaces osso-implante proximal e distal de um cão do grupo I (Tratado autólogo), aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório. Incidência médio-lateral.



Figura 22 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Aspecto radiográfico antero-posterior da evolução cicatricial das interfaces osso-implante proximal e distal de um cão do grupo II (Tratado homólogo), aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório. Incidência antero-posterior.

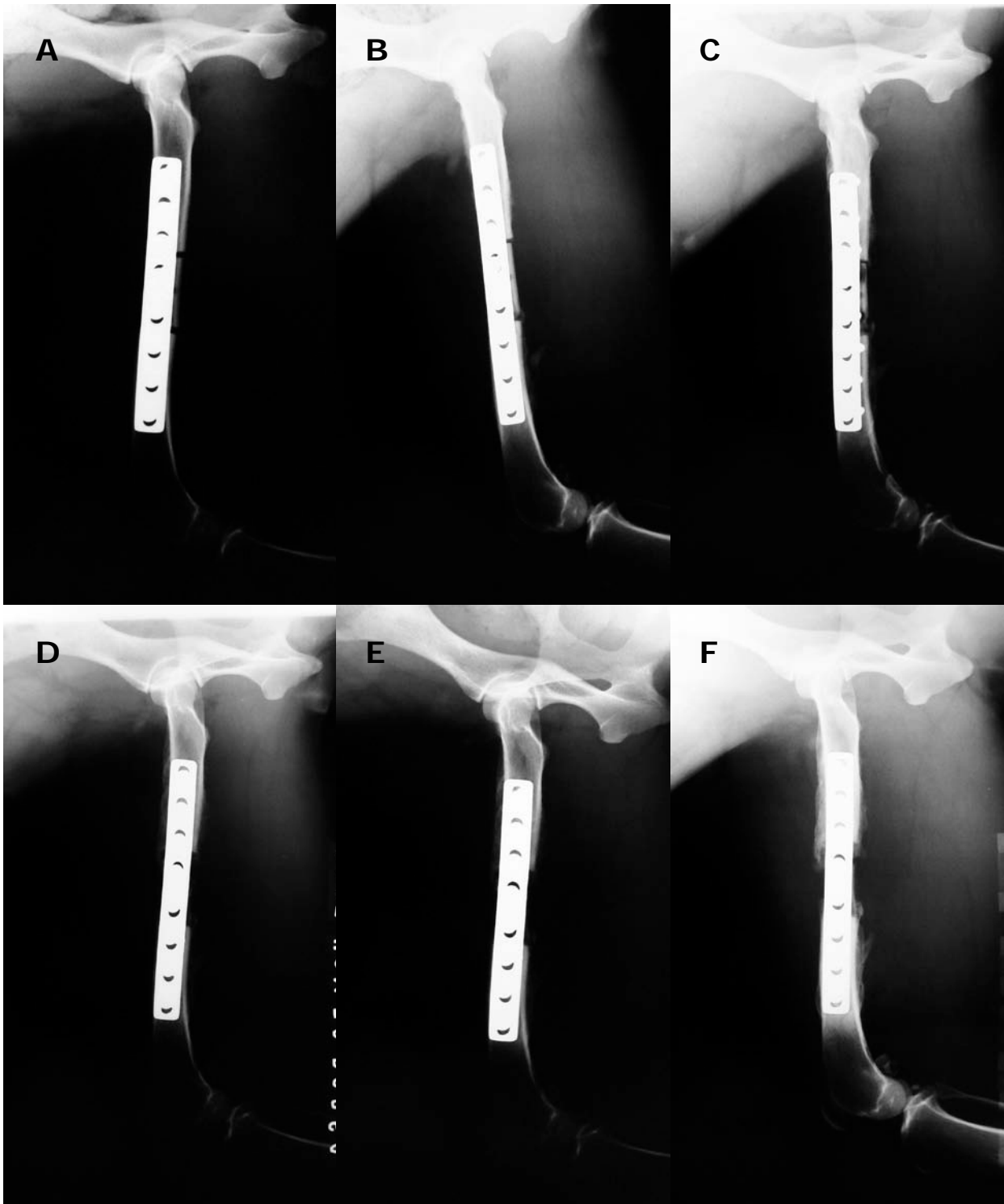


Figura 23 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Aspecto radiográfico látero-medial da evolução cicatricial das interfaces osso-implante proximal e distal de um cão do grupo II (Tratado homólogo), aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório. Incidência médio-lateral.

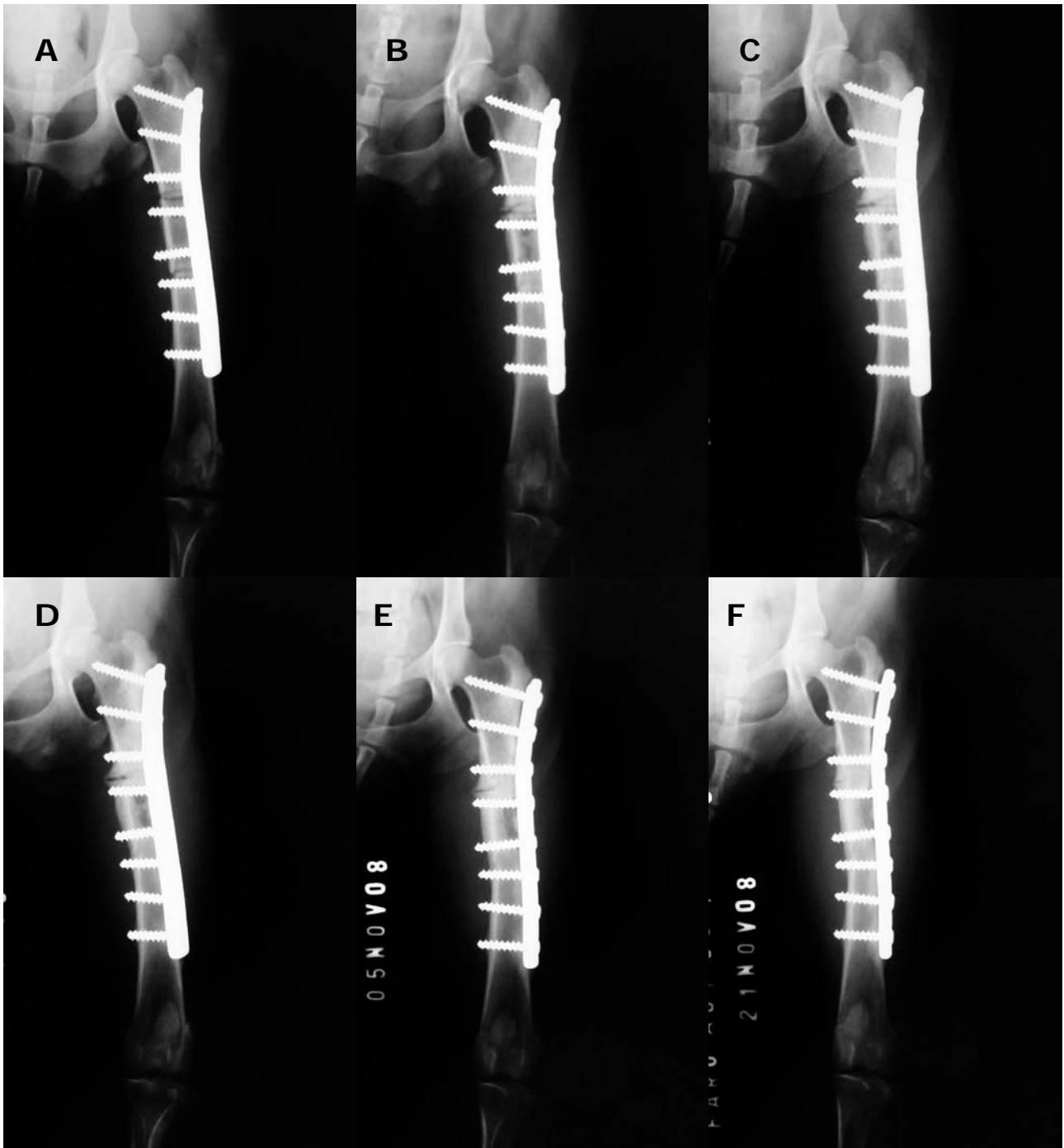


Figura 24 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Aspecto radiográfico da evolução cicatricial das interfaces osso-implante proximal e distal de um cão do grupo III (Controle autólogo), aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório. Incidência antero-posterior.

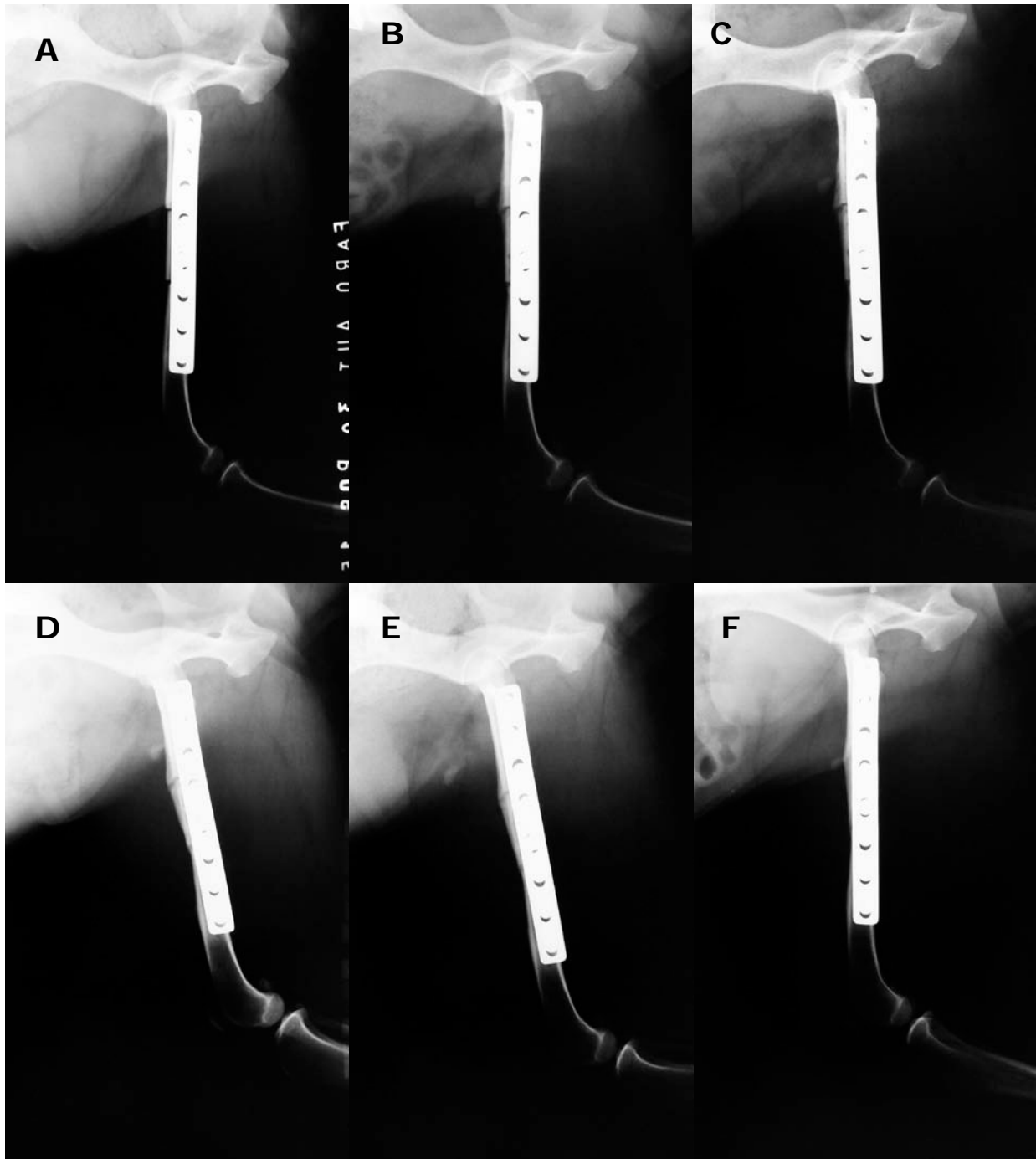


Figura 25 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Aspecto radiográfico da evolução cicatricial das interfaces osso-implante proximal e distal de um cão do grupo III (Controle Autólogo), aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório. Incidência médio-lateral.

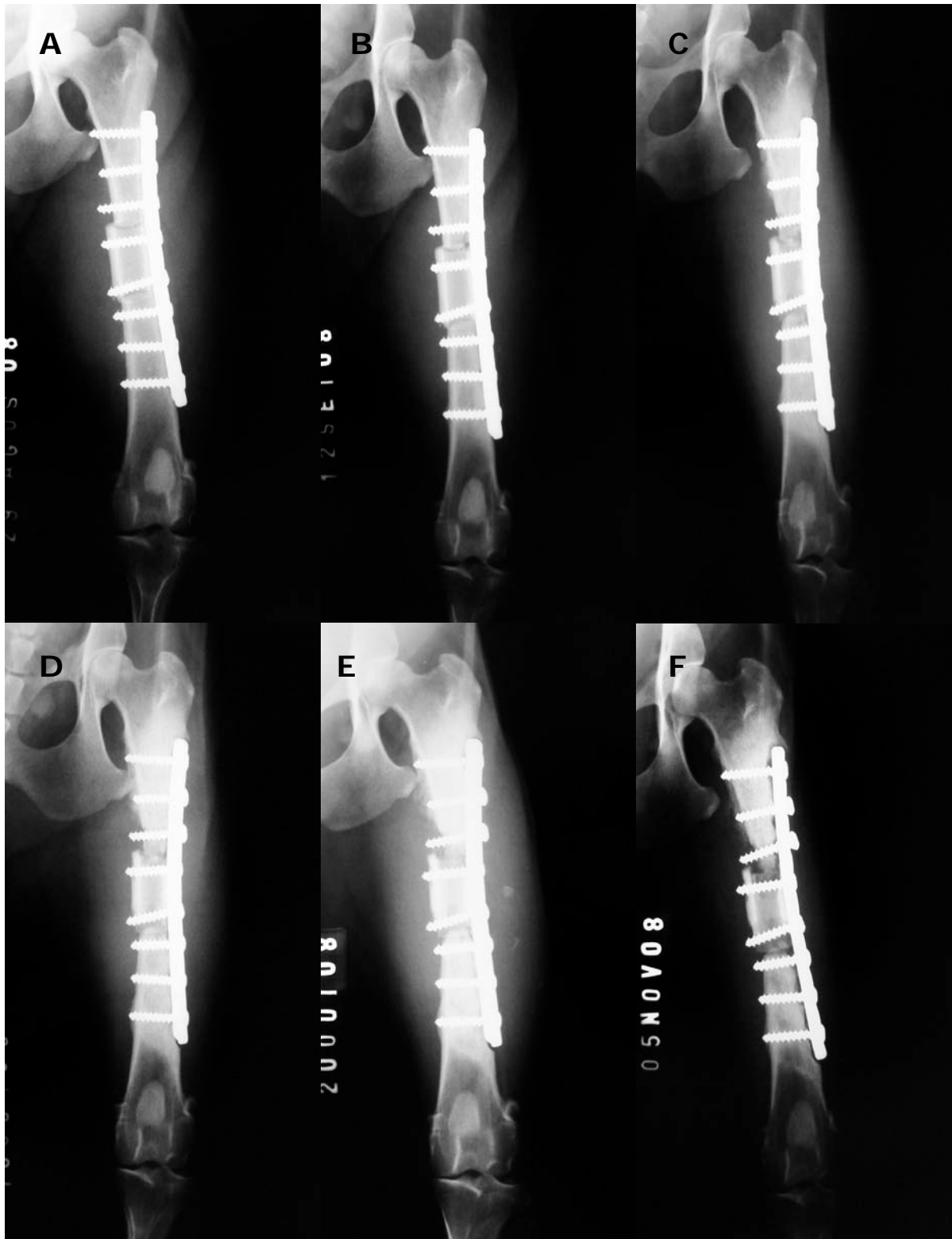


Figura 26 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Aspecto radiográfico da evolução cicatricial das interfaces osso-implante proximal e distal de um cão do grupo IV (Controle homólogo), aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório. Incidência antero-posterior.

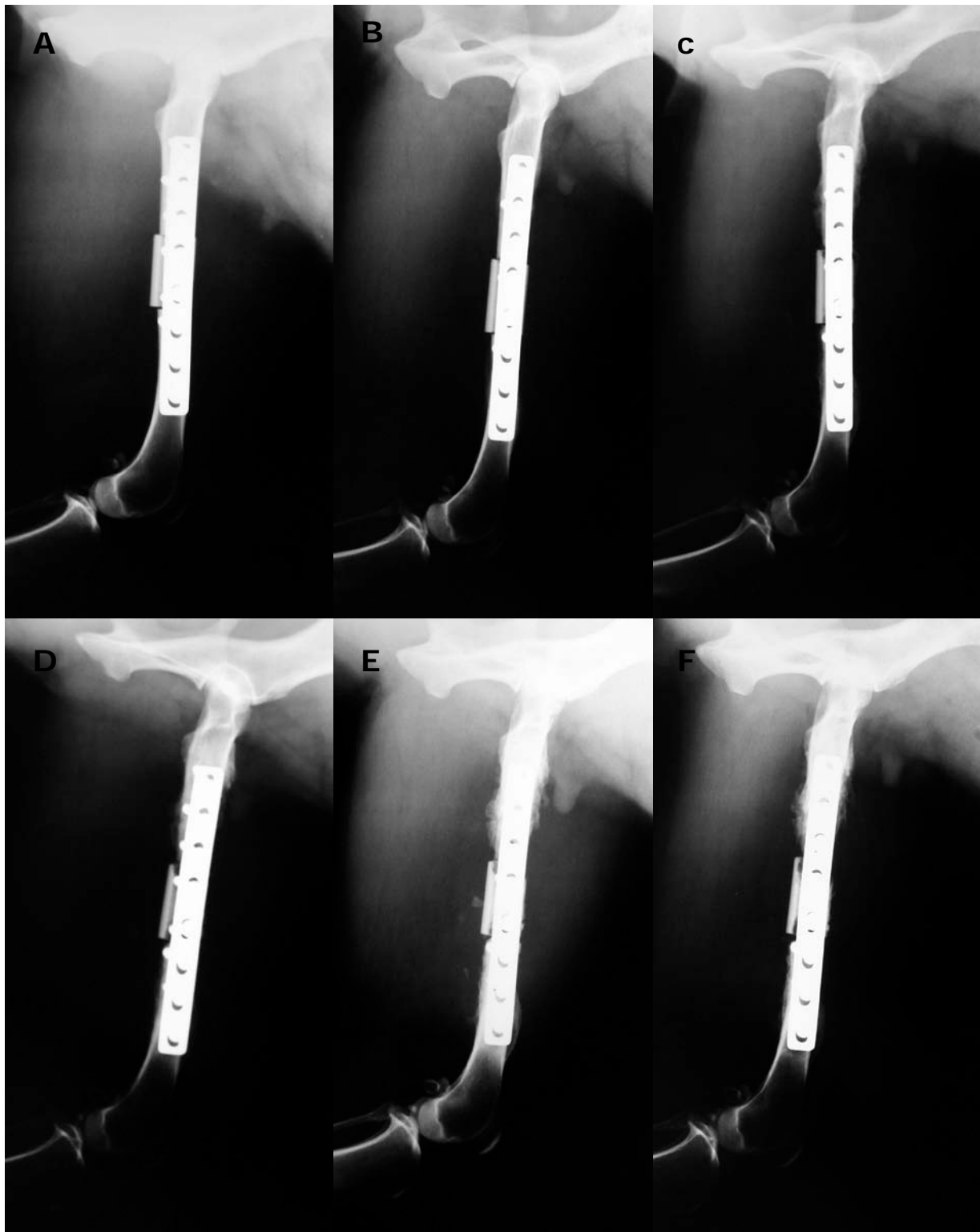


Figura 27 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Aspecto radiográfico da evolução cicatricial das interfaces osso-implante proximal e distal de um cão do grupo IV (Controle homólogo), aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório. Incidência médio-lateral.

As complicações decorrentes da enxertia óssea como alterações do eixo axial femoral, posicionamento errôneo do implante, migração de parafusos corticais, alterações nos tecidos moles adjacentes e fratura do implante podem ser observadas na figura 28.

No cão I, foi constatada fratura do implante aos 30 dias. Já no cão de número VII, observou-se importante alteração de tecidos moles no período pós-operatório imediato.

O auge da reabsorção óssea do implante ocorreu aos 30 dias nos cães XI e XIV; aos 45 dias nos cães I, IV, XII, XIII e XVIII; aos 60 dias nos cães II, III, V, VI, VIII, IX, X e XVI; aos 75 dias nos cães VII e XV e aos 90 dias nos cães XVII, XIX e XX.

O uso de propofol (8mg kg^{-1} , via intravenosa) para a realização dos exames radiográficos demonstrou-se apropriado para a execução do procedimento, permitindo bom posicionamento do membro operado e padronização das imagens radiográficas.

4.15 Avaliação macroscópica e colheita de material para histopatologia

Durante o acesso à diáfise femoral aos 90 dias para colheita de fragmento ósseo para avaliação histopatológica, observou-se grande aderência dos tecidos moles adjacentes ao fêmur. Ocorreu intensa reação periosteal que envolveu parcialmente o implante ósseo, tanto na interface proximal quanto distal.

Após a remoção da placa de compressão, foram verificadas as interfaces enxerto-hospedeiro quanto ao grau de estabilidade. Os dados referentes à estabilidade das interfaces enxerto-hospedeiro proximal e distal podem ser observados na tabela 10.

A secção da janela óssea na interface enxerto-hospedeiro proximal, para a remoção do fragmento de biópsia foi realizada sem complicações, e a broca de corte acoplada ao motor de média rotação demonstrou-se apropriada para o trabalho. A secção retangular da janela foi adequadamente orientada e delimitada pelos orifícios do 3º e 4º parafusos.

A luz do canal medular apresentou-se bastante reduzida de diâmetro na região do implante e extremidades dos fragmentos ósseos do receptor. A espessura da cortical óssea nessa região apresentava-se de três a quatro vezes maior que a espessura normal.

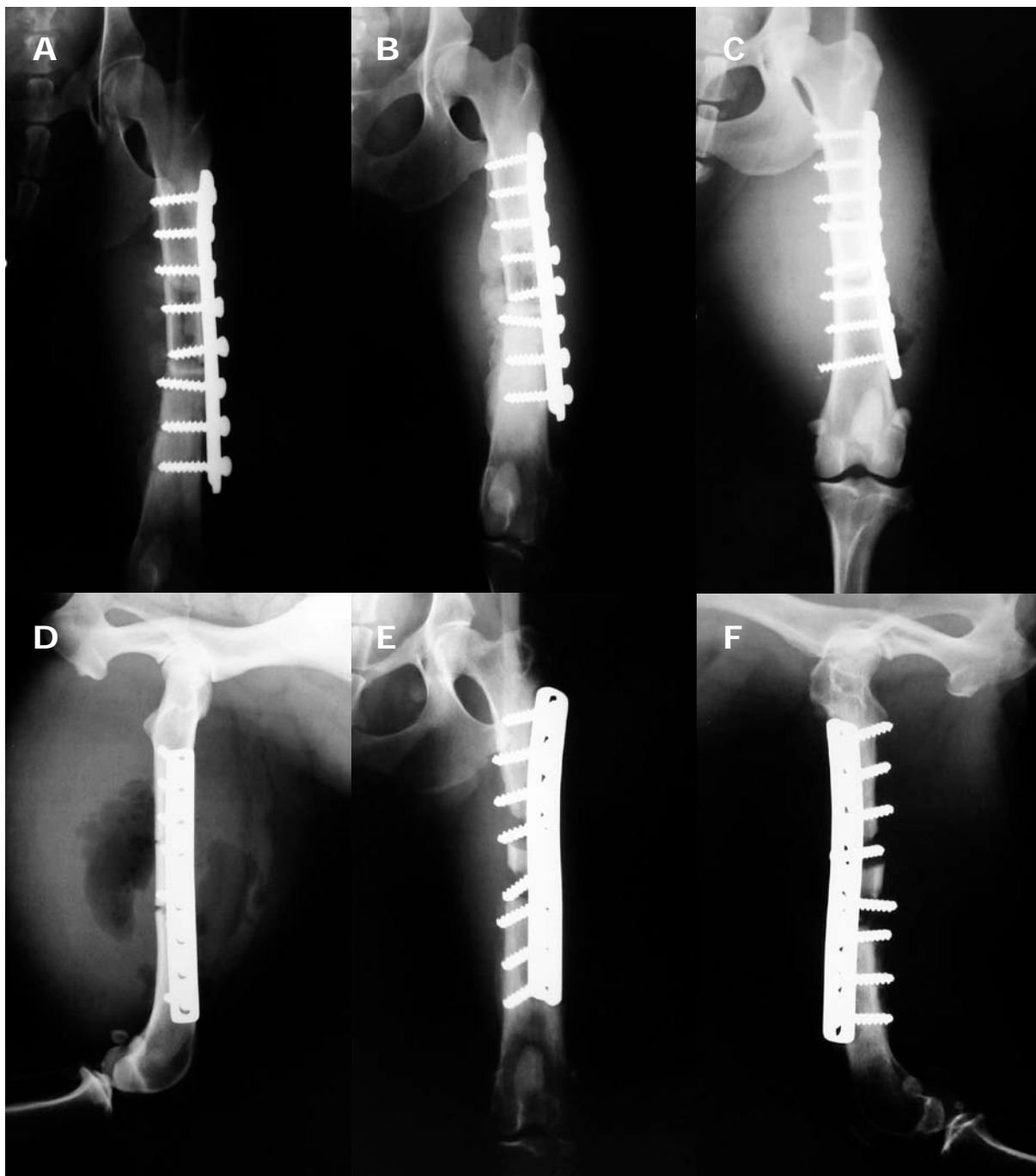


Figura 28 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Complicações decorrentes do procedimento de enxertia óssea de segmento cortical diafisário femoral em cão. (A-B) Afastamento da superfície de contato da placa de compressão com o fragmento distal, com alteração do eixo axial femoral e fratura do implante aos 30 e 60 dias de pós-operatório. (C_D) Alteração dos tecidos moles adjacente ao foco de fratura no período pós-operatório imediato. (E e F) Posicionamento errôneo crâniolateral da placa e compressão.

O aspecto macroscópico das interfaces implante osso-receptor aos 90 dias de pós-operatório nos diferentes grupos avaliados, após a remoção da placa de compressão, pode ser observado na figura 29.

A marcação da extremidade proximal do fragmento referente ao osso receptor, com fio de seda número 2-0 foi considerada satisfatória para identificação das porções ósseas no fragmento de biópsia. A figura 30 demonstra o aspecto do fragmento cortical colhido e sua conservação.

Tabela 10 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Estabilidade das interfaces implante osso-receptor proximal e distal aos 90 dias de pós-operatório.

Grupos	Cão	Interface Proximal	Interface Distal
I (Tratado Autólogo)	I	Estável	Estável
	II	Estável	Estável
	III	Estável	Instável
	IV	Estável	Estável
	V	Estável	Estável
II (Tratado Homólogo)	VI	Estável	Estável
	VII	Estável	Estável
	VIII	Instável	Instável
	IX	Estável	Estável
	X	Estável	Estável
III (Controle Autólogo)	XI	Estável	Estável
	XII	Estável	Instável
	XIII	Estável	Estável
	XIV	Estável	Instável
	XV	Instável	Instável
IV (Controle Homólogo)	XVI	Estável	Estável
	XVII	Estável	Instável
	XVIII	Estável	Estável
	XIX	Estável	Instável
	XX	Instável	Instável

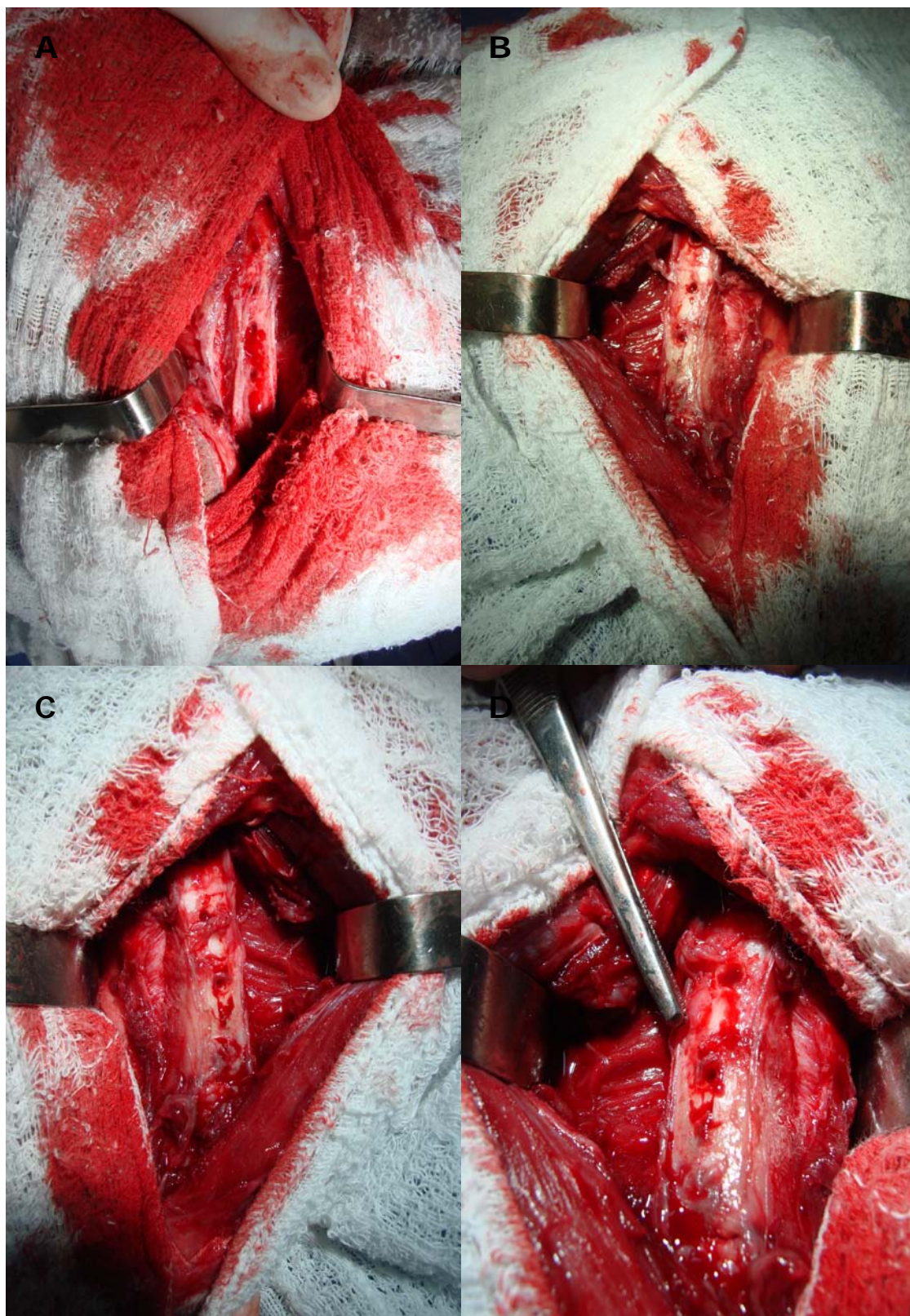


Figura 29 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Aspecto macroscópico das interfaces enxerto/implante osso-receptor aos 90 dias de pós-operatório nos diferentes grupos avaliados, após a remoção da placa de compressão. (A) Tratado autólogo. (B) Tratado homólogo. (C) Controle autólogo. (D) Controle homólogo

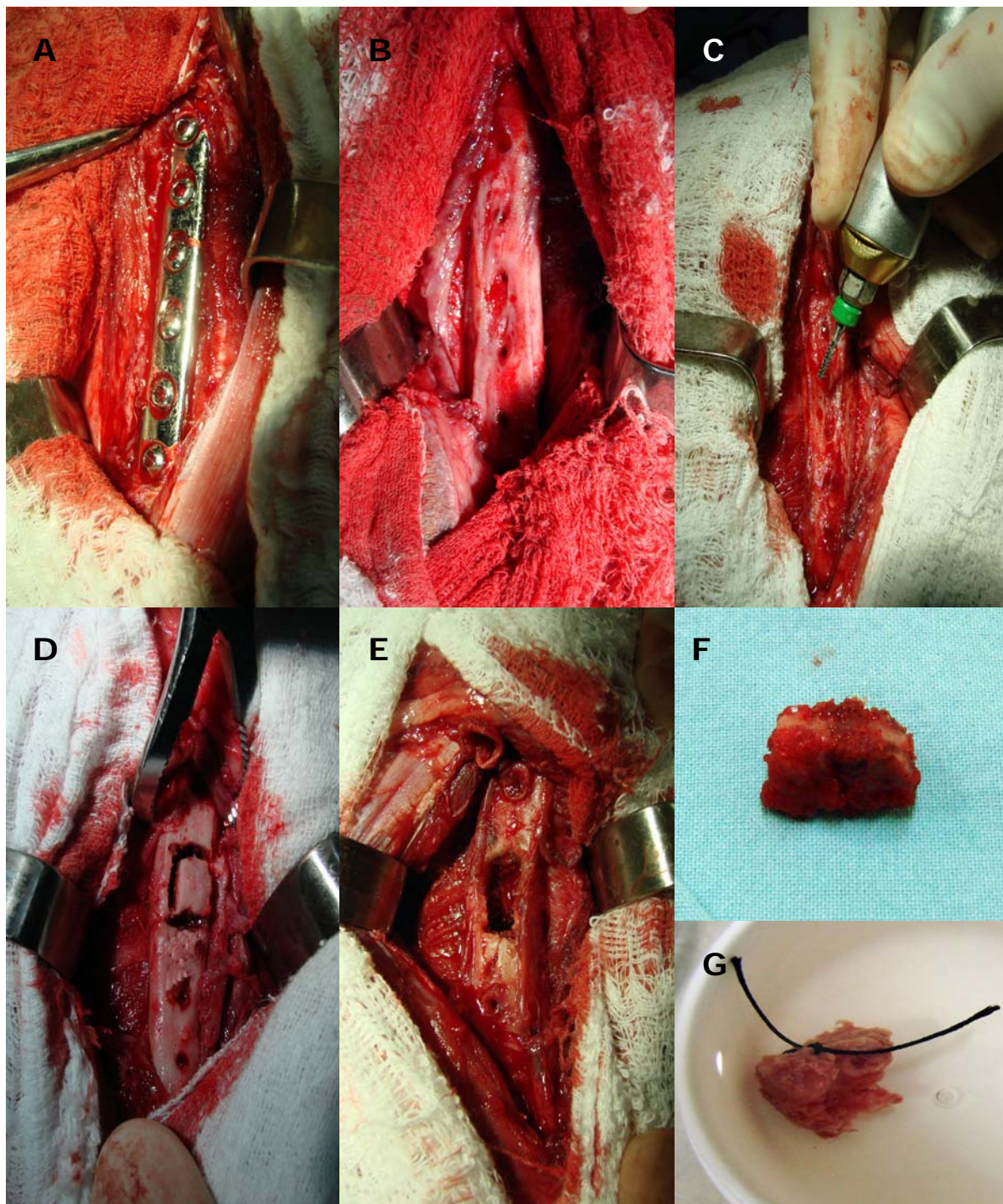


Figura 30 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Aspecto macroscópico da colheita e conservação do fragmento ósseo cortical segmentar aos 90 dias de pós-operatório. (A -B) Aspecto macroscópico antes e após a remoção da placa de compressão. (C-D-E-F-G) Confeção da janela óssea e remoção do segmento ósseo.

4.16 Avaliação densitométrica do fragmento de biópsia

A marcação do fragmento de biópsia foi adequada para orientar os segmentos corticais no momento da tomografia.

O emprego de placas de Petri de acrílico transparente permitiu a visualização dos fragmentos facilitando a orientação do posicionamento dos mesmos no momento do exame, como demonstra a figura 31.

Os valores referentes à densidade óssea aferidas nas regiões das interfaces osso-receptor podem ser observados na tabela 11. A figura 32, demonstra de forma comparativa, as diferenças entre os grupos com relação aos valores aferidos.

4.17 Avaliação histológica

A sinopse das principais alterações histopatológicas observadas sob microscopia óptica pode ser visualizada na tabela 12.

As alterações histopatológicas observadas no material amorfo anfófilico acelular (MAs) presente por entre as trabéculas ósseas dos segmentos ósseos corticais analisados estão representados **na** tabela 13.

Do ponto de vista histológico, considerou-se como calo ósseo a área de aparente proliferação tecidual presente nas amostras analisadas. A fase do processo de consolidação da fratura (calo ósseo) dos segmentos ósseos corticais analisados, consta na tabela 14, é classificada de acordo com Allen et al. (1980).

Foram realizadas fotomicrografias das alterações histopatológicas observadas sob coloração de hematoxilina-eosina, que podem ser visualizadas nos diferentes grupos nas figuras 33 a 36.

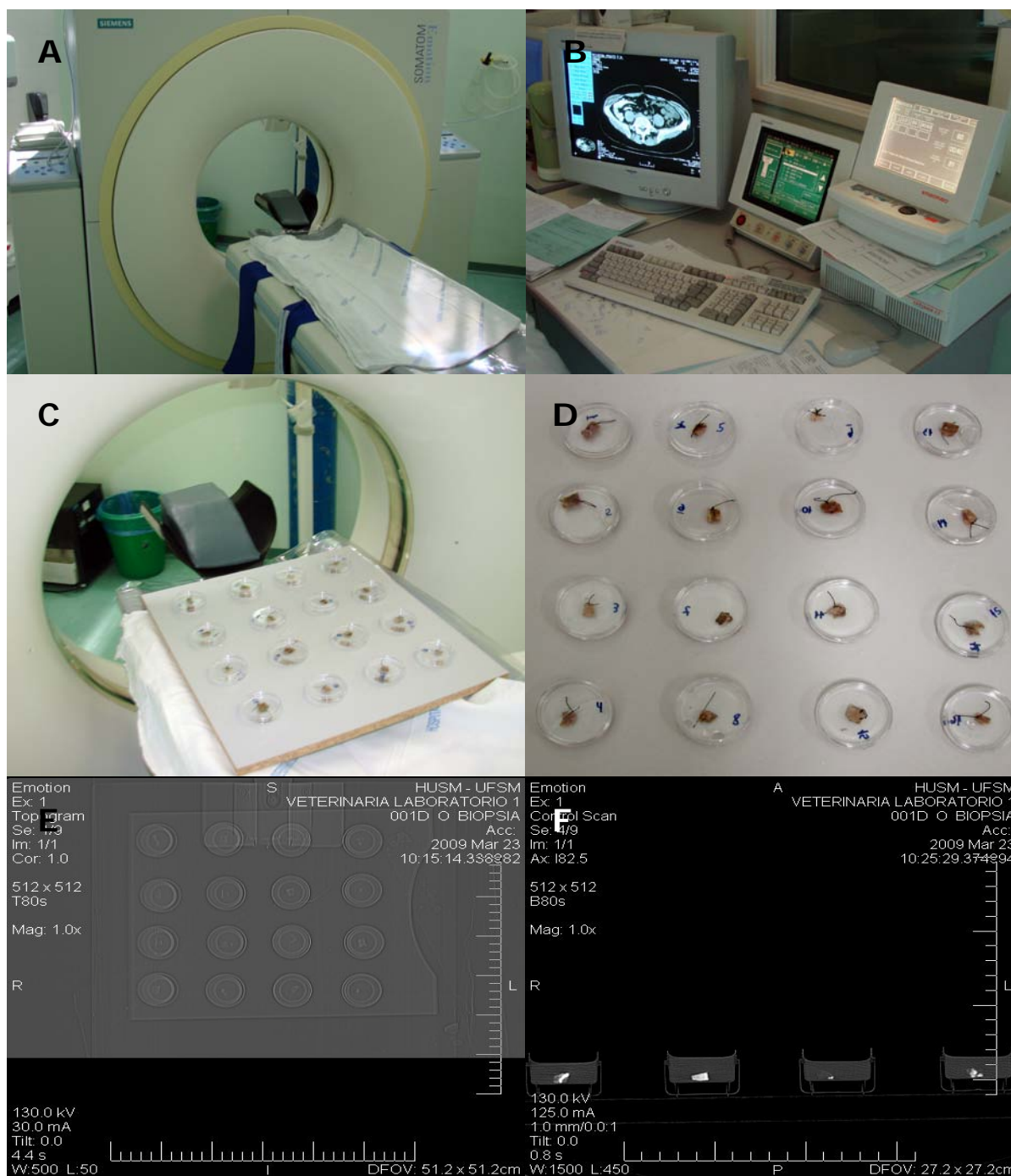


Figura 31 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Procedimento de análise da densidade óssea por tomografia computadorizada dos segmentos corticais colhidos aos 90 dias de pós-operatório. (A-B) Aspecto do tomógrafo e painel de controle. (C-D) Disposição dos implantes durante a realização dos cortes. (E-F) Topograma dos fragmentos de biópsia.

Tabela 11 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Valores médios da densidade óssea obtida na interface implante osso-reptor proximal.

Grupo	Cão	Densidade Óssea Proximal		Densidade Óssea Transição		Densidade Óssea Distal	
		Densidade	Desvio Padrão	Densidade	Desvio Padrão	Densidade	Desvio Padrão
I (Tratado Autólogo)	I	1387,0	420,2	1100,8	422,0	1038,1	462,9
	II	1044,0	178,0	987,3	154,3	943,2	93,9
	III	906,3	300,8	571,8	154,7	733,5	24,7
	IV	986,9	283,2	1044,9	250,4	953,7	240,8
	V	---	---	---	---	---	---
II (Tratado Homólogo)	VI	899,3	115,4	883,3	132,5	860,8	161,0
	VII	944,3	116,9	926,1	157,3	836,3	101,5
	VIII	865,7	186,5	663,5	256,0	690,1	272,9
	IX	397,3	58,0	681,9	344,0	815,1	338,9
	X	---	---	---	---	---	---
III (Controle Autólogo)	XI	2081,0	406,6	2122,8	189,1	1679,0	654,8
	XII	769,3	159,0	758,9	210,6	587,4	142,8
	XIII	758,3	139,4	1052,2	171,5	1251,8	78,3
	XIV	1359,8	254,7	1191,1	86,3	873,7	323,4
	XV	---	---	---	---	---	---
IV (Controle Homólogo)	XVI	1084,4	109,1	884,3	126,3	747,2	80,4
	XVII	1336,2	258,0	1180,0	122,7	1422,6	258,5
	XVIII	1002,6	101,7	1281,1	101,3	993,4	282,2
	XIX	1528,9	414,6	1399,9	282,8	732,8	203,5
	XX	---	---	---	---	---	---

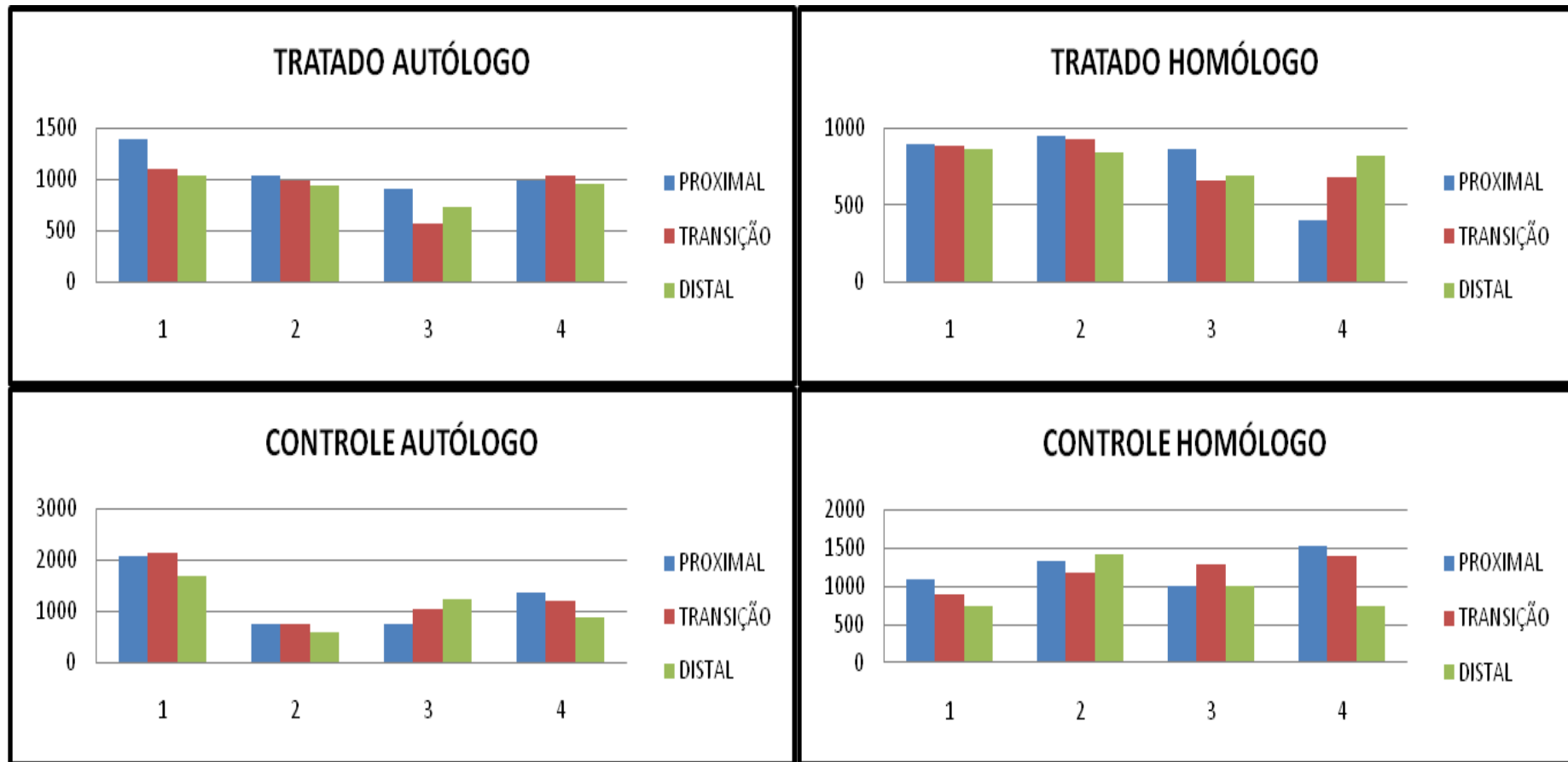


Figura 32 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Valores referentes à densidade óssea aferida nas regiões das interfaces implante osso-receptor aos 90 dias de pós-operatório.

Tabela 12 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Sinopse das alterações histopatológicas gerais, observadas na interface implante osso-receptor proximal.

Alteração	Descrição Histopatológica
I	Em todas as amostras examinadas, o espaço entre as trabéculas ósseas contém variável quantidade de MAs.
II	Em todas as amostras examinadas não há diferença histológica entre a extremidade marcada e extremidade não marcada.
III	Na maioria das amostras não há distinção histológica evidente da “interface” mencionada na requisição da análise.
IV	Quando reconhecível histopatologicamente, a interface entre a extremidade marcada e não marcada é composta basicamente por proliferação de tecido conjuntivo fibroso com áreas de metaplasia cartilaginosa e óssea bem ordenada (cicatrização óssea por primeira intenção).

Tabela 13 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Alterações histopatológicas observadas no material amorfo anfífilico acelular, presentes por entre as trabéculas ósseas da interface implante osso-receptor proximal aos 90 dias de pós-operatório.

Grupo	Cão	Neovascularização	Proliferação Tecido Fibroso	Remodelamento Ósseo	Presença Osteóide	Presença Medula Óssea
I (Tratado Autólogo)	I	Presente	Ausente	Presente	Presente	Presente
	II	Presente	Ausente	Presente	Presente	Presente
	III	---	---	---	---	---
	IV	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente
	V	---	---	---	---	---
II (Tratado Homólogo)	VI	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Presente
	VII	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Presente
	VIII	Ausente	Ausente	Presente (discreto)	Ausente	Presente
	IX	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente
	X	---	---	---	---	---
III (Controle Autólogo)	XI	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente
	XII	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Presente
	XIII	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
	XIV	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
	XV	---	---	---	---	---
IV (Controle Homólogo)	XVI	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente
	XVII	---	---	---	---	---
	XVIII	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Presente
	XIX	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Presente
	XX	---	---	---	---	---

Tabela 14 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Fase do processo de consolidação do calo ósseo na interface implante osso-receptor proximal aos 90s dias de pós-operatório nos diferentes grupos avaliados, segundo Allen *et al.* (1980).

Grupo	Cão	Calo Ósseo				
		Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4
I (Tratado Autólogo)	I		X			
	II			X		
	III		X			
	IV			X		
	V		-	-	-	-
II (Tratado Homólogo)	VI		X			
	VII		X			
	VIII		-	-	-	-
	IX		X			
	X					
III (Controle Autólogo)	XI		X			
	XII		X			
	XIII		X			
	XIV		-	-	-	-
	XV		-	-	-	-
IV (Controle Homólogo)	XVI		X			
	XVII		X			
	XVIII		X			
	XIX		X			
	XX		-	-	-	-

Grau 0: ausência ou atraso no processo de fratura

Grau 1: união cartilaginosa incompleta (Fase Fibroblástica).

Grau 2: união cartilaginosa completa (Fase Cartilaginosa).

Grau 3: união óssea incompleta (Fase Osteogênica).

Grau 4: união óssea completa (Fase de Ossificação).

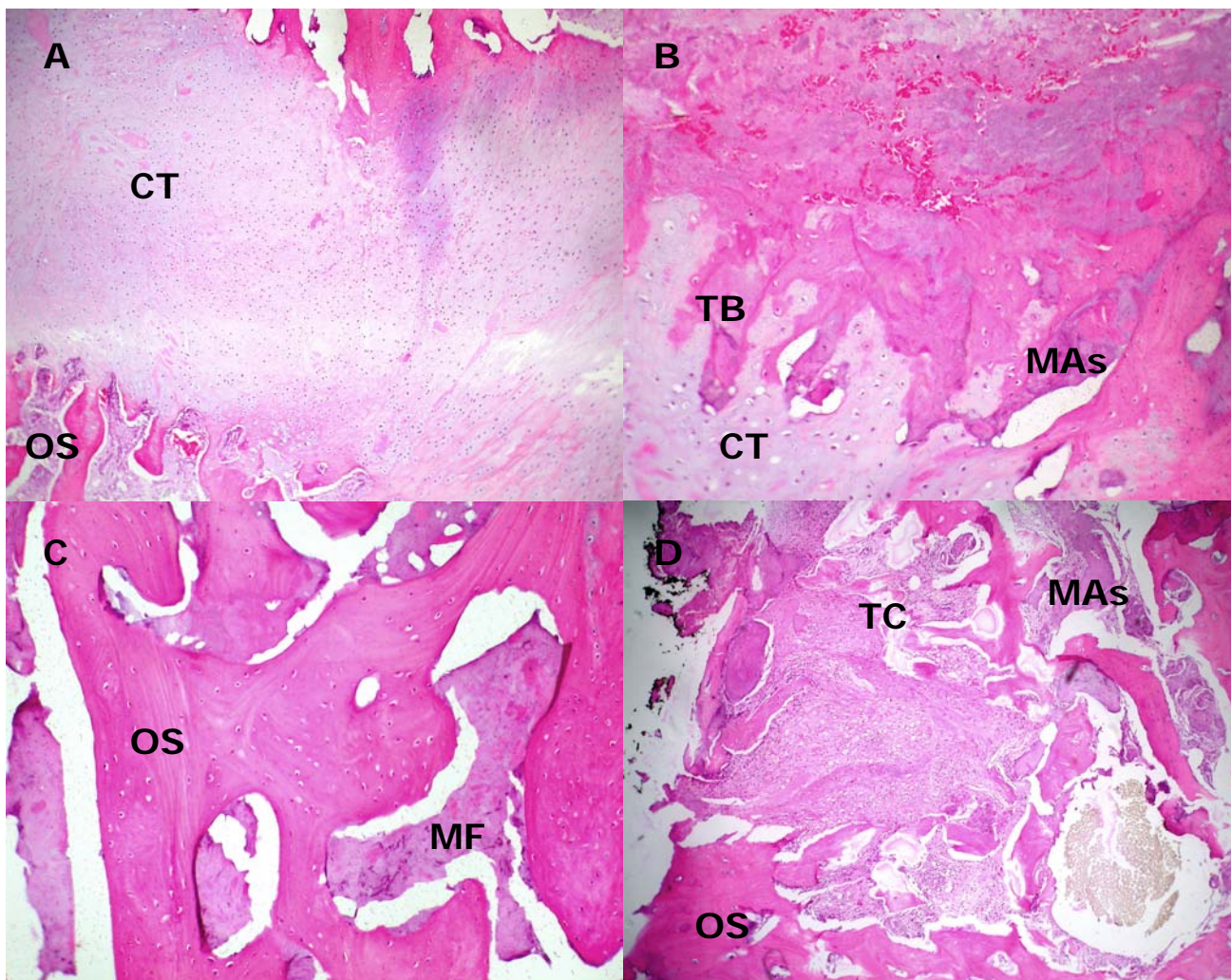


Figura 33 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Análise histológica do segmento ósseo cortical colhido na interface implante osso-receptor proximal, no grupo I (tratado autólogo). (A) Metaplasia cartilaginosa na interface implante osso-receptor proximal. Coloração: Hematoxilina e Eosina de Harris, aumento 50x. (B) Interface exibindo metaplasia cartilaginosa, hemorragia e presença de MAs. Coloração: Hematoxilina e Eosina de Harris, aumento 100x. (C) Presença de MAs nos espaços entre as trabéculas ósseas. Hematoxilina e Eosina de Harris, aumento 100x. (D) Presença de MAs, medula óssea e proliferação de tecido conjuntivo fibroso nos espaços entre as trabéculas ósseas. Hematoxilina e Eosina de Harris, aumento 100x.

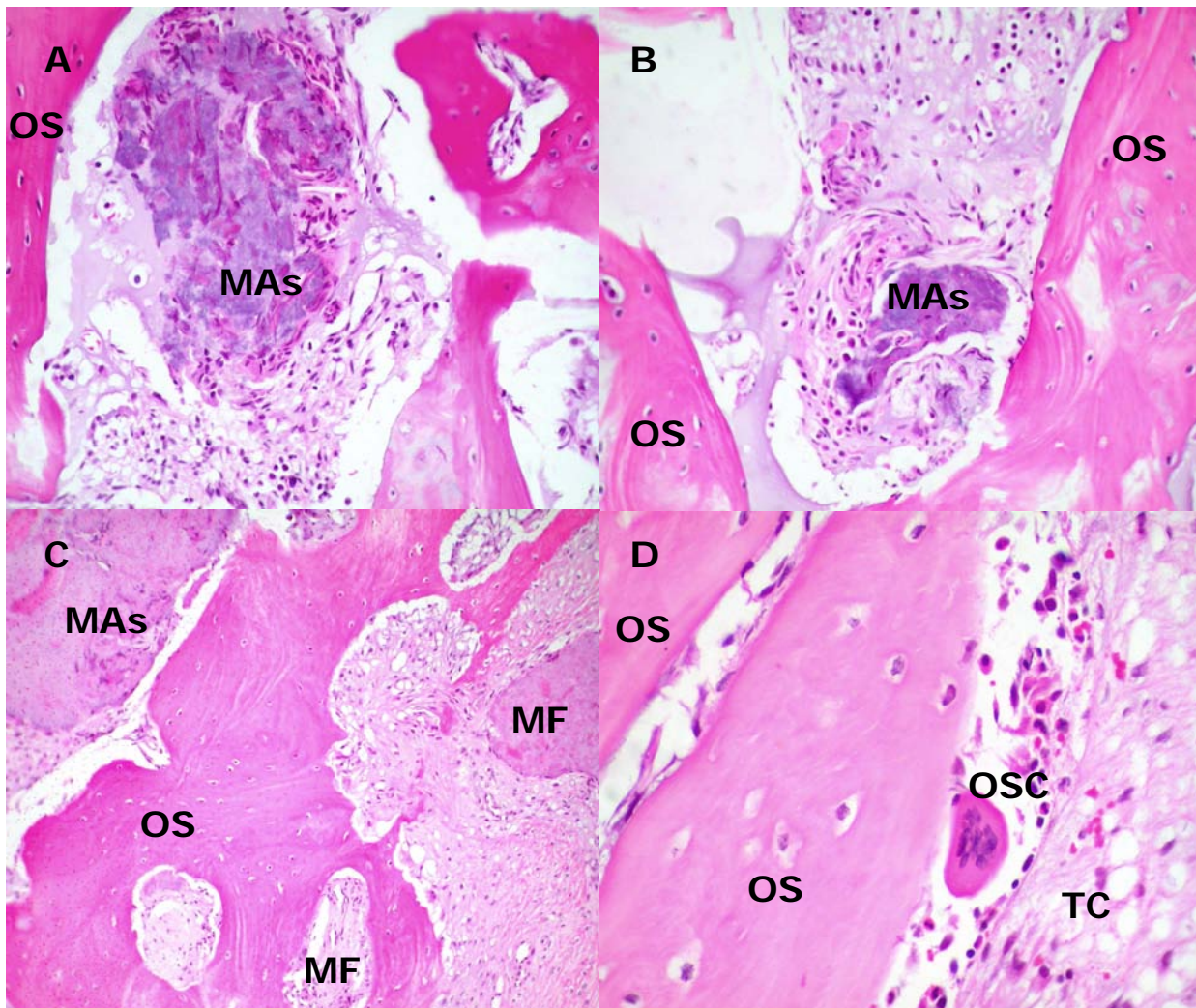


Figura 34 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Análise histológica do segmento ósseo cortical colhido na interface implante osso-receptor proximal, no grupo II (tratado homólogo), corado com hematoxilina-eosina de Harris. (A e B) Presença de MAs, medula óssea e proliferação de tecido conjuntivo fibroso nos espaços entre as trabéculas ósseas. Hematoxilina e Eosina de Harris, aumento 200x. (C) Presença de MAs, medula óssea e proliferação de tecido conjuntivo fibroso nos espaços entre as trabéculas ósseas. Hematoxilina e Eosina de Harris, aumento 100x. (D) Osteoclasto fazendo remodelamento ósseo. Hematoxilina e Eosina de Harris, aumento 400x.

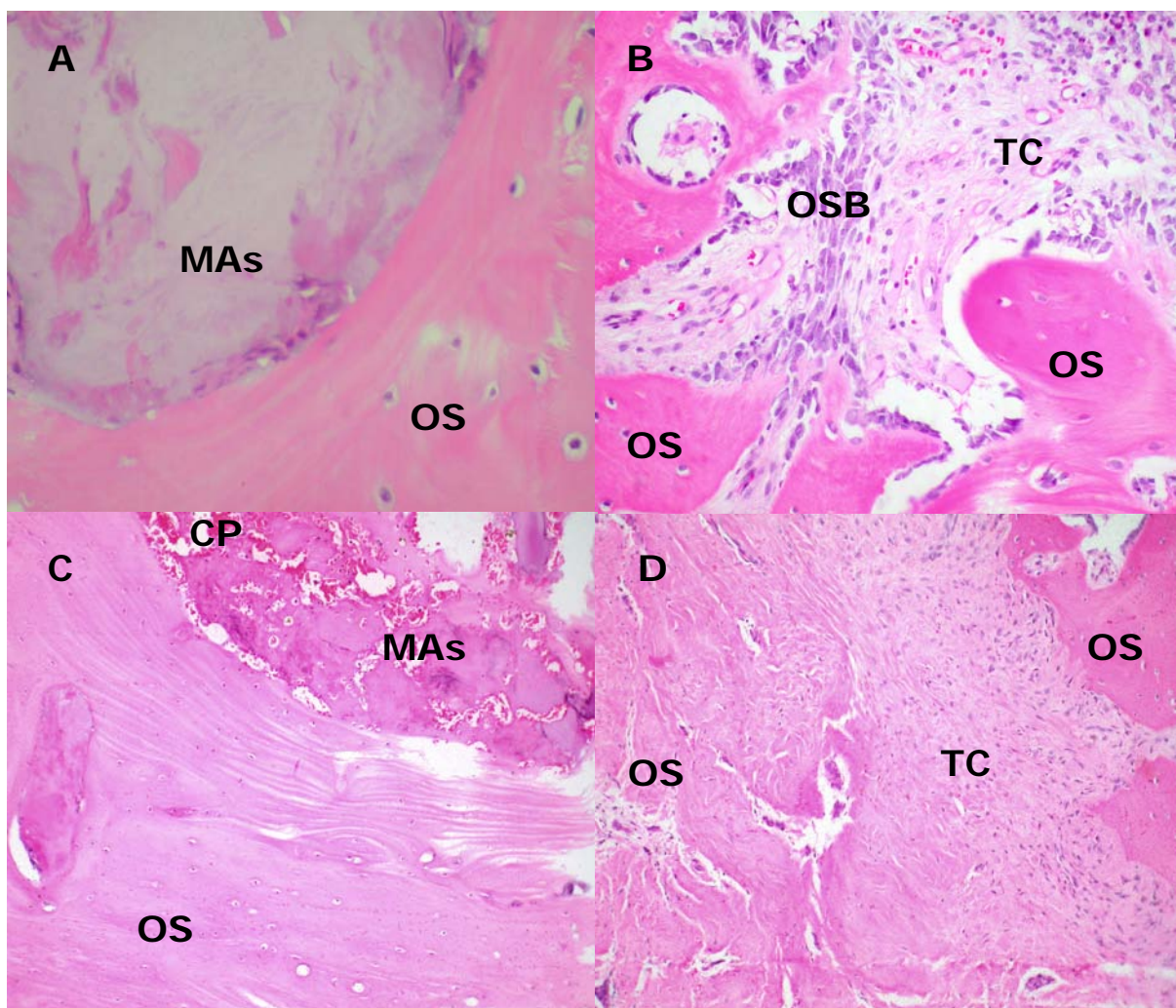


Figura 35 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Análise histológica do segmento ósseo cortical colhido na interface implante osso-receptor proximal, no grupo III (controle autólogo), corado com hematoxilina-eosina de Harris. (A) Presença de osteóide por entre o MAs. Hematoxilina e Eosina de Harris, aumento 400x. (B) Remodelamento ósseo. Hematoxilina e Eosina de Harris, aumento 400x. (C) Neovascularização por entre o MAs. Hematoxilina e Eosina de Harris, aumento 100x. (D) Interface implante osso-receptor proximal exibindo proliferação de tecido conjuntivo fibroso. Hematoxilina e Eosina de Harris, aumento 100x.

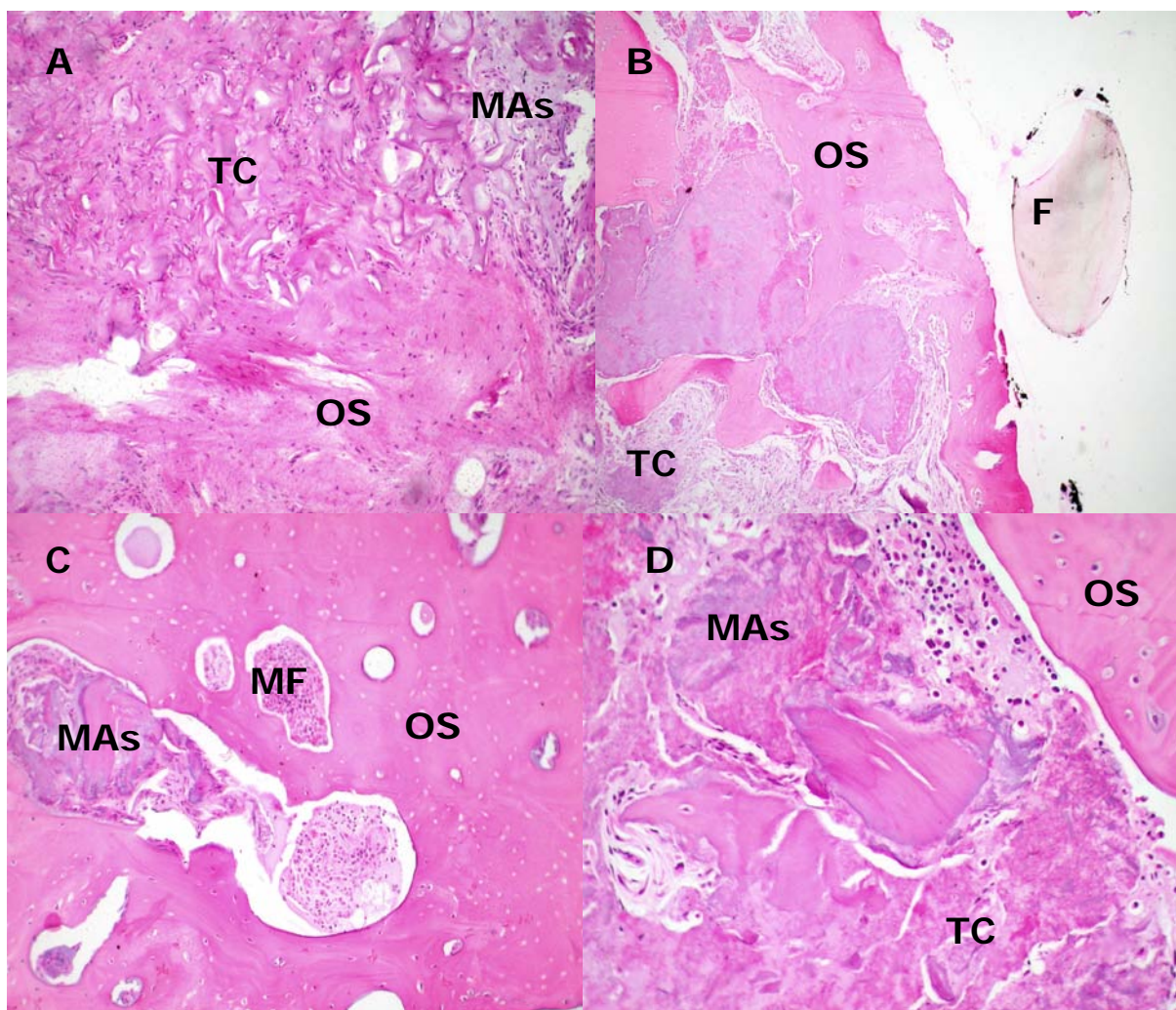


Figura 36 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Análise histológica do segmento ósseo cortical colhido na interface implante osso-receptor proximal, no grupo IV (controle homólogo), corado com hematoxilina-eosina de Harris. (A) MAs livre por entre a proliferação de tecido conjuntivo fibroso na interface implante osso-receptor proximal. Hematoxilina e Eosina de Harris, aumento 100x. (B) Marcação da extremidade com fio monofilamento com tinta nanquim preta. Hematoxilina e Eosina de Harris, Aumento: 50x. (C) Presença de MAs, medula óssea e osteóide por entre as trabéculas ósseas. Hematoxilina e Eosina de Harris, aumento 100x. (D) Presença de MAs, osteóide e medula óssea nos espaços entre as trabéculas ósseas. Hematoxilina e Eosina de Harris, Aumento: 200x.

4.18 Avaliação estatística

Não foi observada diferença estatística significativa ($P < 0,005$) entre os grupos avaliados com relação à avaliação radiográfica do processo de consolidação. Os dados estatísticos referentes a avaliação radiográfica do processo de consolidação na interface enxerto-hospedeiro proximal e distal, para os diferentes grupos avaliados, aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório podem ser observados no apêndice 08. Na avaliação da densidade óssea do fragmento de biópsia colhida na interface enxerto-hospedeiro proximal, não foi verificada diferença estatística significativa ($P = 1014$) entre os grupos avaliados. Os dados estatísticos, referentes a esta avaliação podem ser observados no apêndice 09.

4.19 Reabilitação dos animais pós-biópsia

Após a realização da colheita do fragmento ósseo para análise histopatológica, o defeito femoral provocado resultou em perda de segmento ósseo com conseqüente encurtamento do membro operado. Estes animais foram desde então submetidos a diferentes intervenções cirúrgicas para a realização de procedimentos distintos com o objetivo de realizar o salvamento do membro acometido pela lesão. Os animais com indicação de procedimentos fisioterápicos foram submetidos a diferentes protocolos conforme a necessidade individual, sendo os animais acompanhados até o final do tratamento. O aspecto radiográfico de alguns implantes empregados nestes procedimentos pode ser observado na figura 37. Os resultados finais referentes à reabilitação dos animais desta pesquisa encontram-se descritos na tabela 15. Os animais reabilitados foram encaminhados para adoção com apoio da ONG SOS Bichos de Rua, com sede em Santa Maria, RS. Atualmente 14 dos 20 animais foram doados à famílias interessadas, e os outros seis encontram-se em tratamento.

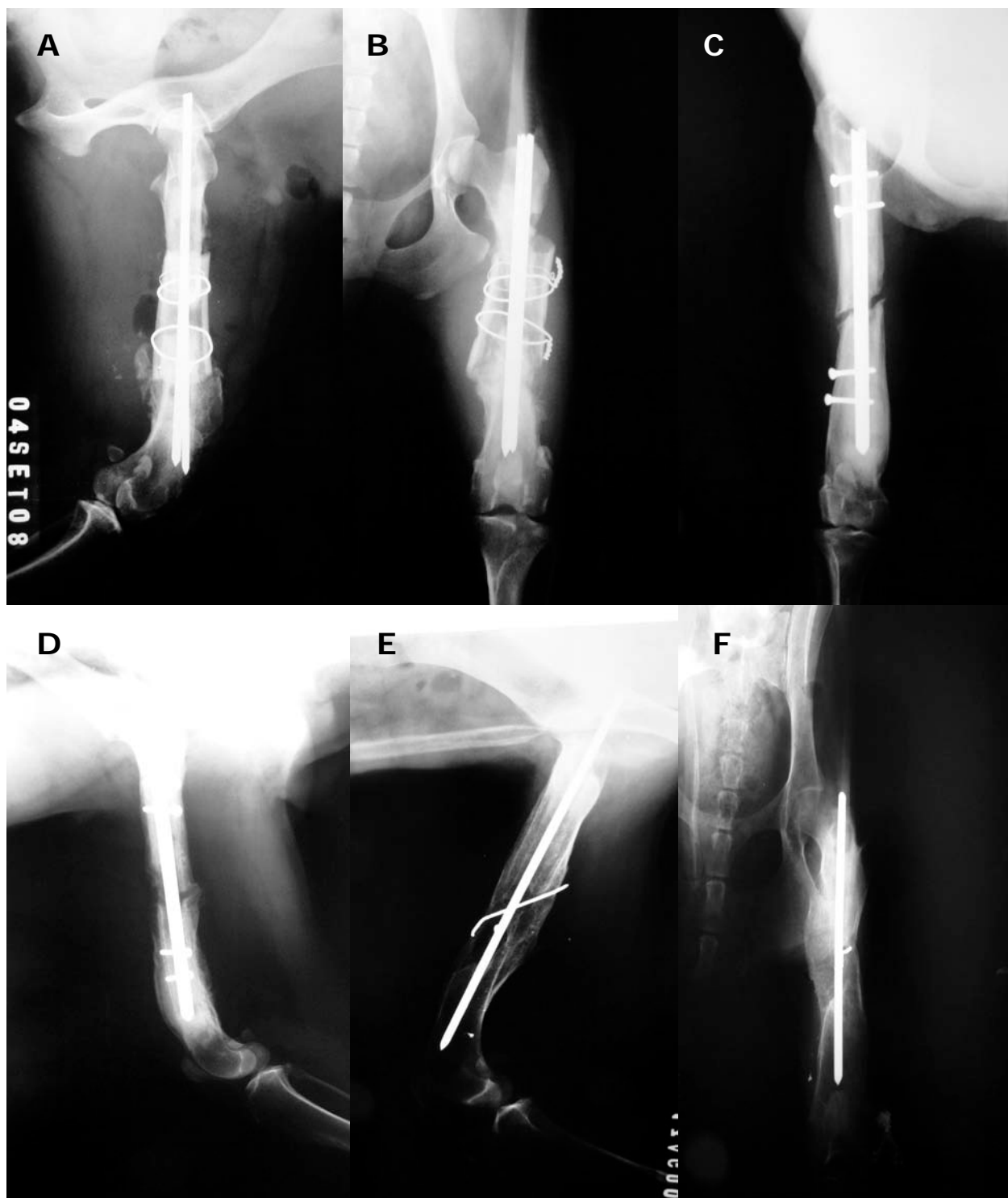


Figura 37 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Aspecto radiográfico de diferentes tipos de implantes empregados na reconstrução cirúrgica do defeito ósseo produzido pelo procedimento de biópsia óssea. (A e B) Pino de Steimann intramedular associado a enxerto ósseo conservado em glicerina fixado por fio de cerclagem. (C e D) Haste intramedular bloqueada. (E e F) Pino intramedular associado a pino transcortical no foco de fratura.

Tabela 15 Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado a inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea. Resultados obtidos na reabilitação dos animais da pesquisa.

Grupo	Cão	Resultado Clínico-Cirúrgico	Grau Claudicação*	Destino
I (Tratado Autólogo)	I	Retorno a função membro	V	Adoção
	II	Amputação	---	Adoção
	III	Retorno a função membro	III	Adoção
	IV	Em tratamento	II	Aguardando
	V	Retorno a função membro	IV	Adoção
II (Tratado Homólogo)	VI	Retorno a função membro	IV	Adoção
	VII	Retorno a função membro	V	Adoção
	VIII	Em tratamento	I	Aguardando
	IX	Retorno a função membro	VI	Adoção
	X	Retorno a função membro	V	Adoção
III (Controle Autólogo)	XI	Retorno a função membro	IV	Adoção
	XII	Retorno a função membro	IV	Adoção
	XIII	Retorno a função membro	IV	Adoção
	XIV	Em tratamento	I	Aguardando
	XV	Em tratamento	I	Aguardando
IV (Controle Homólogo)	XVI	Em tratamento	III	Aguardando
	XVII	Em tratamento	I	Aguardando
	XVIII	Retorno a função membro	IV	Adoção
	XIX	Retorno a função membro	IV	Adoção
	XX	Retorno a função membro	III	Adoção

*Modificado de TUDURY e RAISER (1985).

5 DISCUSSÃO

5.1 Colheita e conservação de ossos corticais

A escolha da glicerina como meio conservante para os implantes ósseos utilizados nesta pesquisa teve por base as propriedades apresentadas por este material, como destruição das propriedades imunogênicas do tecido conservado, facilidade de aquisição e baixo custo, pois de acordo com ALEXANDER (1983), estas são características que devem ser consideradas no momento da escolha de um enxerto ou implante ósseo. Acrescente-se a isso, que é necessário que o método de colheita e conservação seja viável, de fácil utilização e ainda acessível à rotina das clínicas de pequenos animais de acordo com ROE et al. (1988).

Além disto, os resultados adequados obtidos por outros autores, como Pinto Jr. et al. (1995), Costa (1996), Melo et al., 1998; Del Carlo et al. (1999), Coronado et al. (2000), Cavassani et al. (2001), Gioso et al. (2002) Ziliotto et al. (2003) e AMÊNDOLA et al. (2008), em pesquisas conservando ossos em glicerina foram decisivos para a escolha deste conservante, sendo que em alguns destes estudos (PINTO JR. et al., 1995; COSTA, 1996; MELO et al., 1998), a conservação de implantes ósseos em glicerina 98% apresentou altas taxas de incorporação.

Um dos cuidados observados durante a conservação dos implantes foi o de realizar a troca da glicerina após sete dias de conservação, haja vista que na fase inicial do processo, ocorre liquefação do meio por desidratação do implante, principalmente com aqueles de tecidos moles, interferindo com o efeito conservante da glicerina. Por este motivo, recomenda-se a troca do meio para garantir a manutenção de sua integridade e proporcionar o efeito conservante apropriado (SALBEGO et al., 2006). De acordo com Pinto Júnior (1990), o acondicionamento correto do implante em meio apropriado é fundamental para sua conservação e posterior utilização.

O tempo mínimo de conservação do implante na glicerina, recomendado na literatura é de 28 dias, para que ocorra a total inativação das propriedades imunogênicas do enxerto, assim como o controle da contaminação. Extrapolando este período, o presente trabalho conservou os implantes ósseos em glicerina 98%, por período não inferior a dois anos. Ao longo do experimento, considerou-se que a glicerina 98% atuou

como meio eficaz na conservação de ossos corticais em temperatura ambiente, corroborando com os resultados encontrados por Pinto JR. et al. (1995) e Costa (1996), sendo de fácil obtenção e baixo custo.

Embora Alexander (1983) descreva que a obtenção de enxertos ósseos corticais alógenos frescos seria facilmente realizada em Medicina Veterinária, não havendo necessidade da formação e manutenção de um banco de ossos, existem controvérsias quanto a esta questão, pois Fujiki et al. (2005) ressaltam a necessidade de uma equipe para manutenção além dos custos relacionados com as diferentes formas de armazenamento. No entanto, Salkeld (2001) afirma que as limitações para a obtenção de enxerto autólogo em volume apropriado para determinadas situações, torna atraente a possibilidade do desenvolvimento de um banco de ossos. A escolha pelo osso conservado em detrimento daquele colhido a fresco neste trabalho, baseou-se nas vantagens que o osso conservado possui e que são citadas por WEIGEL (1993), além de a glicerina ser de baixo custo e requerer mínimo envolvimento na conservação.

Na obtenção dos implantes utilizados na presente pesquisa foi tomado cuidado quanto a proporção entre o tamanho do osso doador e receptor. Além de ossos conservados apresentarem algumas vantagens em relação ao material colhido a fresco (WEIGEL, 1993), como o controle da antigenicidade, outro problema de compatibilidade a ser considerado é a diferença de porte entre doador e receptor. Segundo Pinto Júnior (1995), a grande variação no tamanho dos esqueletos dos animais, reduz consideravelmente a possibilidade de se encontrar um doador de tamanho compatível com a conformação física do receptor. A implantação de segmentos ósseos muito desproporcionais ao leito receptor pode dificultar consideravelmente o procedimento de fixação, resultando em instabilidade e por conseqüência falha da enxertia.

Conforme Henry e Wadsworth (1981), os ossos devem ser colhidos sob plano profundo de anestesia ou ainda poucos minutos depois da eutanásia, no entanto, no atual experimento, os implantes foram colhidos entre 2 a 4 hora após o óbito. Nos casos em que a colheita não podia ser realizada imediatamente após o óbito, os cadáveres eram mantidos em câmara frigorífica até o momento da mesma, por períodos não superiores a quatro horas, não sendo comprovada a presença de infecção nos receptores. De acordo com Vehmeyer et al. (2002), deve-se colher o implante no menor tempo possível após o

óbito, pois quanto maior o intervalo entre este e a colheita, maiores os riscos de contaminação.

A utilização de segmentos ósseos oriundos do defeito experimental produzido nos próprios animais da pesquisa, é uma vantagem referente à diminuição do número de eutanásias de animais doadores, como se observa nos estudos de Toombs e Wallace (1985), Nather et al. (2004), Alievi et al. (2007) e Ferreira (2008). Nesta pesquisa, os ossos provenientes dos cães do experimento não foram reutilizados, pois os implantes empregados no estudo requeriam no mínimo dois anos de conservação, o que comprometeria o andamento do trabalho. Além disso, não foi considerada a questão do sacrifício de animais doadores, pois os ossos utilizados neste estudo foram provenientes do setor de patologia veterinária do hospital veterinário da UFSM, tendo sido colhidos de animais vítimas de morte natural ou com indicação clínica de eutanásia.

A seleção dos doadores seguiu as recomendações de Millis e Martinez (2007), os quais descrevem o doador ideal como um indivíduo hígido, esqueleticamente maduro e livre de doença infecto-contagiosa, neoplásica ou de seqüelas decorrentes de trauma ósseo.

As colheitas sempre foram realizadas por duas pessoas, uma auxiliando a contenção e a outra realizando a dissecação, evitando o excessivo número de pessoas envolvidas no procedimento, pois como citam Segur et al. (2000), o aumento do número de indivíduos na equipe que manipula o doador, pode aumentar o risco de contaminação do implante. Embora a colheita dos implantes não tenha sido realizada sob assepsia estrita como é indicado por Alexander, (1983) e Stevenson (2005), o implante foi submetido a processo de esterilização química, já que este é um pré-requisito para a realização da colheita não asséptica. Além disto, Costa (1996) comenta que a colheita totalmente asséptica torna o procedimento mais trabalhoso e oneroso, embora diminua os riscos de contaminação.

Para Segur et al. (2000), a seleção apropriada dos doadores e os cuidados de assepsia são importantes na prevenção da contaminação do implante. Embora não realizada dentro de bloco cirúrgico e com estrito rigor asséptico, a colheita dos implantes, na presente investigação, procurou manter o máximo de assepsia possível durante a colheita e conservação, pois, segundo Denny e Butterworth (2006) a presença

de infecção pode resultar em reabsorção do enxerto e osteomielite, com formação de seqüestro ósseo.

De acordo com Melo et al. (1998), a cultura de microorganismos deve ser realizada tanto no momento da obtenção do implante como na sua utilização. Embora Ibrahim et al. (2004) comentem sobre a importância da realização de cultura do implante e do meio conservante, mesmo quando se utiliza de técnica asséptica em sua colheita, nesta pesquisa foram realizadas apenas culturas amostrais, do meio conservante e dos implantes do banco de osso empregado no experimento. Ainda, segundo esses autores, a identificação de implantes contaminados no momento de sua obtenção, permite submeter os mesmo a processo de esterilização, embora esta conduta não fosse adotada no presente trabalho, não foram observados sinais de infecção. Mesmo em pesquisas onde a colheita foi realizada de forma asséptica, como nos estudos de Barrios et al. (1994) e Ferreira (2008), os autores ainda registraram a ocorrência de contaminação dos implantes, embora em pequenas proporções, sendo 6,6% e 2,7% respectivamente.

5.2 Hidratação dos implantes e teste de resistência biomecânica

Devido à ação desidratante da glicerina, o material conservado neste meio torna-se ressecado e de difícil manuseio, por este motivo, a hidratação prévia a sua implantação cirúrgica no leito receptor, torna-se fundamental.

Embora Amêndola et al. (2008) tenham afirmado que a hidratação é fundamental na retomada da maleabilidade óssea e, dessa forma, na manutenção de sua resistência, em um trabalho comparando a resistência à compressão entre ossos bovinos congelados e liofilizados reidratados, Macedo et al. (1999) concluíram que não houve diferença de resistência estatisticamente significativa entre os ossos hidratados e não hidratados, e nem entre os grupos estudados. No presente trabalho, também não foi constatada diferença estatisticamente significativa quanto ao grau de resistência óssea, quando comparados os grupos submetidos aos diferentes tempos de hidratação dos ossos conservados em glicerina 98%.

A ausência de padronização no tempo de hidratação de diferentes tecidos conservados em glicerina 98% (RANZANI et al., 1990; DALECK et al., 1992; COSTA

et al., 1999; RAISER et al., 2000; CAVASSANI et al., 2001; CONTESINI et al., 2001; MAZZANTI et al., 2001; CONTESINI et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2003; RAPPETI et al., 2003; ZILLIOTTO et al., 2003; BRUN et al., 2004; MAZZANTI et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2004; COSTA et al., 2005; SALBEGO et al; 2008), incluindo o osso, foi o principal fator que influenciou a realização do teste de resistência biomecânica dos fragmentos ósseos do banco de ossos utilizado nesta pesquisa.

Os implantes foram utilizados após 12 horas de hidratação na expectativa de se minimizar fraturas ou fissuras na adaptação dos parafusos, embora não houvesse diferença estatística quanto à resistência compressiva entre os grupos avaliados ($P=0,0832$) (Apêndice 07). A hidratação foi realizada seguindo a observação de Melo (1997), que ao analisarem as características de ossos conservados em glicerina, indicaram a hidratação dos mesmos para evitar que estes quebrassem, sugerindo que quanto maior o tempo, menos quebradiço seria o osso. Deve-se ter em consideração, entretanto que no teste de resistência aplicado, as forças atuantes são diferentes daquelas que incidem no implante durante a perfuração. Os resultados obtidos demonstram que o período de 12h de hidratação não oferece maleabilidade adequada para evitar fissuras na adaptação dos parafusos.

A densidade mineral óssea foi aferida mediante a realização de tomografia computadorizada, a qual, segundo Ibáñez (2003) avalia a densidade óssea isolando a porção trabecular do osso da porção cortical. Para Lewiecki e Borges (2006), embora a radiografia convencional, também realizada na presente pesquisa, seja descrita como um método de avaliação da densidade mineral óssea, ser de fácil execução e ter baixo custo, ela é considerada um exame subjetivo e menos sensível na avaliação da densidade do osso. Neste tipo de exame, para que alterações na densidade óssea sejam detectadas visualmente, é preciso ocorrer perda mineral do osso em torno de 30-40%. Por este motivo, o emprego do exame radiográfico deve ser direcionado para o diagnóstico de lesões, assim como para o acompanhamento da consolidação da fratura e do posicionamento do implante, como empregado neste trabalho.

Em um estudo utilizando segmentos ósseos de diáfises femorais humanas submetidas à implantação de prótese da articulação desse osso com o acetábulo, Wachter et al. (2001) avaliaram a porosidade e a densidade mineral do osso cortical por meio de tomografias computadorizadas, com o objetivo de comparar o grau de

resistência dessas estruturas. Como resultados desta pesquisa, observaram que as propriedades biomecânicas apresentam estreita relação com a densidade mineral. Dessa forma, este estudo pode ser considerado um eficiente meio para prever a resistência óssea femoral de uma forma não destrutiva. Ao contrário do que ocorre nos testes destrutivos onde o implante é perdido, como realizado no presente estudo, a análise da resistência do implante, ao invés de amostral dentro de um banco de ossos, poderá ser realizada no próprio fragmento a ser implantado, conferindo mais segurança ao procedimento e diminuindo o risco de complicações pós-operatórias.

O exame radiográfico realizado previamente ao teste de compressão (Figura 01 B-C-D) demonstrou uniformidade na densidade óssea apresentada por todos os grupos avaliados, razão pela qual foram agrupados sem consideração de idade e tamanho, pois a área proporcional de cada um foi previamente calculada.

De acordo com a literatura (WEIGEL, 1993; CORNU et al., 2003; BALL et al., 2004; AMENDOLA et al., 2008), os implantes ósseos escolhidos com a finalidade de reparar perda óssea, devem apresentar resistência estrutural adequada. Além disso, a maioria dos métodos de conservação, como a glicerina 98% produzem efeitos deletérios sobre a resistência óssea. Nesta pesquisa, a análise radiográfica e densitométrica dos implantes ósseos submetidos ao teste de compressão axial, indicaram que estes fragmentos ósseos eram homogêneos, não apresentando fissuras ou alterações em sua estrutura. Além disto, estes dados permitiram a seleção mais apropriada dos implantes empregados no estudo, uma vez que a padronização dos mesmos foi baseada na exclusão de fragmentos com valores discrepantes na densidade mineral óssea.

Segundo Schimidt et al., (2003), os testes biomecânicos têm se tornado cada vez mais comuns na avaliação da rigidez de segmentos ósseos, enquanto cargas fisiológicas são aplicadas para avaliar a sua estabilidade mecânica. Embora diversos testes para avaliar a resistência óssea estejam disponíveis (DEL CARLO et al., 1999), a resistência biomecânica dos implantes empregados nesta pesquisa, foi aferida pelo teste de compressão axial, que segundo Castania (2002), é o principal teste a ser realizado para a análise da resistência de enxertos ósseos.

Os valores de resistência apresentados pelos implantes dos seis grupos avaliados neste estudo (apêndice 06), demonstraram não haver diferença estatisticamente significativa (apêndice 07) entre os tempos de hidratação testados. Supõe-se, que tais

resultados (figura 14, tabela 03), estejam diretamente relacionados a homogeneidade dos fragmentos ósseos com relação a suas características estruturais. Outro fator a ser considerado, é a alteração do eixo axial do fragmento submetido à compressão, o qual foi cuidadosamente orientado neste estudo, visando evitar possíveis perdas na resistência.

5.3 Colheita e processamento da medula óssea autógena

A escolha da medula óssea como fonte para obtenção da fração de células mononucleares empregadas neste trabalho baseou-se em sua ampla disponibilidade e facilidade de obtenção, pois segundo Covas e Zago (2004), a medula óssea é a fonte celular mais acessível para isolamento da fração de células mononucleares. Nesta pesquisa, o volume de 5ml kg^{-1} foi facilmente obtido, corroborando com os dados da literatura que descrevem a sua facilidade de obtenção e ampla disponibilidade. Gronthos et al. (2003) comentam que a maioria dos tecidos corporais apresentam pequenas quantidades de células-tronco quando comparados a medula óssea. Além disso, dentre as diversas fontes, a medula óssea tornou-se a mais amplamente pesquisada e utilizada, devido a sua disponibilidade imediata e reserva praticamente ilimitada (MUSCHLER et al., 2004).

De forma similar ao que é feito em humanos (PARKKALI et al., 2005), a autotransusão foi realizada concomitante com a colheita de medula óssea para isolamento da fração de células mononucleares em cães, nos estudos de Olsson (2008), Oliveira (2008) e Tognoli et al. (2009), que analisaram a influencia destas células no reparo de lesões do tendão calcâneo, osso e córnea respectivamente. Nestes estudos, o sangue foi colhido dos animais previamente à colheita de medula óssea e armazenado para ser autotransfundido no momento do procedimento, visando assim, compensar a queda da concentração dos níveis séricos de hemoglobina conforme citaram Parkkali et al. (2005) e Tognoli et al. (2007).

No presente trabalho, não se realizou autotransusão, pois considerou-se que o pequeno volume colhido produziu sinais clínicos nos animais que justificassem tal procedimento. Acredita-se que a colheita de volume reduzido de medula óssea produza menor espoliação do animal, podendo ser este o fator responsável pela não ocorrência de alterações clínicas que justificassem necessidade de transfusão. Tognoli et al. (2007),

realizando a colheita de medula óssea num volume de 10ml/kg, indicaram a autotransfusão em cães devido a redução dos níveis séricos de hemoglobina, mesmo esta não tendo sido significativamente expressiva. Estes autores também observaram que os cães não apresentassem alterações clínicas relevantes.

Segundo comentam Parkkali et al. (2005), a autotransfusão pré ou transoperatória é considerada prática dispendiosa e desnecessária em doadores de pequenos volumes de medula óssea, haja vista que em pacientes saudáveis, a concentração de hemoglobina não decresce em níveis constantes e permanentes. Já nos casos em que o hematócrito encontra-se em valores inferiores a 25% (RAISER, 1995), 21% (HARREL et al., 1997) ou 15% (CALLAN (2000), então a transfusão é indicada. Pelos motivos mencionados acima, no presente estudo não se recomendou a colheita prévia de sangue para autotransfusão concomitante à colheita de medula óssea em volumes de até 5ml kg⁻¹ no cão. Além do mais, para a aplicação deste procedimento na rotina clínico-cirúrgica, a doação de sangue prévia a colheita de medula óssea, aumentaria significativamente a agressão e espoliação sistêmica de um animal sabidamente enfermo, aumentando por consequência o risco na anestesia e tornando o procedimento inviável.

De acordo com Raskin (1998) e Muller et al. (2009), no cão e gato a medula óssea pode ser obtida na epífise dos ossos longos e na crista ilíaca ou borda acetabular. Em humanos, também o esterno é utilizado (MASSUMOTO et al., 1997). Na presente pesquisa, a medula óssea foi obtida por punção bilateral da região epifisária do fêmur e úmero, procedimento que foi realizado sem complicações. A escolha por estes locais baseou-se nas citações de Raskin (1998), o qual comenta que a medula óssea ativa encontra-se principalmente nas epífises e metáfises ósseas, pois com o envelhecimento do animal ocorre substituição desta por tecido adiposo.

A escolha pela punção de múltiplos ossos e colheita de reduzido volume de medula óssea, neste estudo, baseou-se em dois fatores descritos na literatura. O primeiro deles, comentado por Muschler et al. (1997), que citam que quando se realiza a colheita da medula óssea por aspiração com agulha, é mais efetivo proceder com várias punções restringindo o volume aspirado por osso, em detrimento de uma única punção em um ponto isolado com colheita de maior volume, como o realizado nos experimentos de Oliveira (2008), Olsson (2008) e Tognoli et al. (2009). Nesta situação, quando o pequeno volume de medula do canal é aspirado, o conteúdo do canal medular obtido a

partir deste momento, é composto basicamente de sangue periférico, proveniente da artéria nutrícia do osso, o que resulta em diluição da concentração das células no aspirado. Segundo Barros et al. (2001), isso pode comprometer o sucesso da enxertia, a qual depende do número total destas e de sua concentração na amostra. O outro fator, diz respeito à diferença existente entre a proporção de células-tronco encontradas nos diferentes ossos longos de cães (GOLFIER et al., 2000), que varia com a idade do indivíduo (TURNER et al., 1996).

Lareu et al. (2005) descrevem possíveis complicações durante a colheita de medula óssea, tais como fratura nos ossos longos ou lesão aos tecidos moles por penetração acidental da cavidade pélvica secundária ao deslizamento da agulha nas punções do ílio (RASKIN (1998). Na presente pesquisa não foram constatados problemas associados à este procedimento nem ao potencial risco de contaminação do canal medular e desenvolvimento de osteomielite que é uma complicação potencial citada por JUNIOR et al. (2008).

Enquanto Barros et al. (2001a) comentam sobre a dificuldade em se determinar o volume ótimo de aspirado, e que este pode ser definido de acordo com a anatomia local, Massumoto e Mizukami (2000) citam que, para atingir a concentração de células apropriadas para os processos regenerativos, é necessário que seja colhido entre 10 e 15ml kg⁻¹ de sangue da medula óssea do doador. Já Pizzo e Poplack (2005), em estudos com humanos, citam que o volume de 10ml kg⁻¹ representa a quantidade de medula ideal a ser colhida para que um número adequado de células-tronco seja atingido.

Tognoli et al. (2007), demonstraram que quando colhidos 10ml kg⁻¹ de medula óssea em cães hípidos, ocorre depleção acentuada nos valores de hemoglobina nestes animais. No entanto, ao se extrapolar a aplicação deste protocolo para a rotina clínico-cirúrgica, o volume de medula óssea requerido, associado ao procedimento anestésico e ao trauma decorrente, pode ser inaceitável para um paciente enfermo, o qual poderá não tolerar tal grau de espoliação. Por este motivo, no presente trabalho optou-se pela colheita de um volume de 5ml kg⁻¹ de medula óssea. Esse volume foi suficiente para fornecer a concentração celular adequada para emprego na terapia celular (Tabelas 04 e 05)

A realização da colheita da medula óssea nos animais dos grupos controle seguiu os mesmos moldes daquela realizada nos animais dos grupos tratados, e teve por objetivo, padronizar o trauma e o grau de espoliação à que os animais eram submetidos nesta pesquisa. A medula óssea destes animais, uma vez concluído o procedimento de colheita, era desprezada.

O uso do *Bone Marrow Collection Kit*, utilizado em humanos, foi empregado com sucesso para a colheita de medula óssea nos cães do projeto piloto deste estudo (figura05), assim como realizado nas pesquisas de Tognoli et al. (2009), Oliveira (2008) e Olsson (2008). No entanto, é importante salientar, que este conjunto de componentes, não é ideal para a colheita de medula óssea em animais de pequeno e médio porte, pois como as dimensões do material são projetadas para um ser humano, com peso médio de 70kg, a perda de material colhido (medula óssea) pelo contato com as paredes da bolsa e a tubulação de conexão com os filtros, pode ser significativa, principalmente quando o volume colhido for bastante reduzido. Por este motivo, na presente pesquisa, adotou-se o uso de bolsas de colheita de sangue de 500ml em substituição a bolsa do *Bone Marrow Collection Kit*, empregando-se apenas os filtros de 200 e 500 micras. Além do comentado anteriormente, o custo deste material deve ser considerado como fator restritivo, e assim como nos estudos realizados por Oliveira (2008), Olsson (2008) e Tognoli et al. (2009), nesta pesquisa o conjunto de filtros do *Bone Marrow Collection Kit* foram adequadamente higienizados e submetidos a re-esterilização para posterior utilização.

Em contraste com os resultados obtidos pelo protocolo de colheita de medula óssea utilizado por Oliveira (2008), neste estudo, a maior diluição da medula óssea com solução de cloreto de sódio 0,9%, e o aumento da concentração de anticoagulante demonstrou-se mais eficiente em evitar a coagulação na bolsa de colheita, mesmo quando a temperatura ambiente encontrava-se mais baixa, problema este comentado por aquela autora.

A lavagem das seringas com solução de cloreto de sódio 0,9% previamente heparinizadas (heparina 10.000UI) demonstrou-se eficiente em evitar a coagulação no interior da seringa durante o procedimento de colheita. Bacipalugo et al. (1992) comentam que quando empregados anticoagulantes com menor concentração pode

ocorrer coagulação da medula óssea em um curto período de tempo, inviabilizando seu uso terapêutico. No entanto, é importante comentar, que mesmo utilizando este protocolo, não é interessante permanecer mais do que um minuto com o volume de medula óssea colhido no interior da seringa, pois após este período poderá ocorrer a coagulação do aspirado. Por este motivo, preconiza-se que o volume de aspirado seja colocado o mais rapidamente possível no interior da bolsa de colheita, evitando assim a sua permanência excessiva no interior das seringas. O procedimento de massageamento da bolsa de colheita por um auxiliar durante o procedimento favorece a homogeneização do aspirado e evita a coagulação.

Além de diminuir o trauma e a espoliação do paciente, a colheita de volume reduzido de medula óssea, apresenta ainda, a vantagem de reduzir o tempo necessário para o processamento das células para isolamento da fração mononuclear. Esse processo requer tempo, pois é necessário realizar a diluição da medula óssea em um meio com gradiente de densidade, além de posteriores lavagens para sua remoção, o qual é tóxico para as células. Por isto, quando o volume processado for muito grande, o tempo pode ser aumentado consideravelmente. Os principais problemas relacionados ao tempo de processamento prolongado, dizem respeito ao prolongamento da anestesia com conseqüente risco ao paciente, predisposição a infecção por exposição prolongada dos tecidos (RAISER, 1995), além de comprometer a viabilidade das células transplantadas, a qual decresce com o passar do tempo.

O processamento da medula óssea foi realizado de acordo com técnica descrita por Olsson et al. (2009), modificada de Boyum (BOYUM, 1968), diferindo apenas no volume final do botão celular, o qual foi padronizado em 500 μ l.

Os estudos de Yuan et al. (2007) no reparo de defeitos ósseos mandibulares demonstraram que o emprego de células-tronco promoveu uma melhor cicatrização, quando comparado ao uso da substância carreadora isoladamente, assim como descreveu Oliveira (2008), estudando a cicatrização óssea em tíbias de cães. No entanto, o resultado obtido neste estudo, opõe-se ao destes autores, pois ao longo do período avaliado, não foi constatada diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) ou ainda resposta clínica, que justificasse diferença entre os grupos tratados e não tratados pela terapia celular.

De acordo com Aquino et al. (2002), o mielograma consiste no exame direto das células da medula óssea, e permite averiguar a hematopoese, as alterações no aspecto celular e a presença de células neoplásicas, assim como o grau de atividade das células medulares (DIELBOLD et al., 2000), sendo geralmente solicitado conforme forem encontradas alterações no hemograma (GOSSET, 2000). Embora os animais selecionados para este estudo não tenham apresentado alterações hematológicas que sugerissem a realização de um mielograma (Figura 07), assim como cita Gosset (2000), todos eles foram submetidos ao exame, para descartar quaisquer alterações que pudessem interferir com os resultados deste estudo, como a mielofibrose e mioesclerose (DIELBOLD et al., 2000). Por este motivo, adotou-se, na atual pesquisa, a realização deste exame, em que uma pequena alíquota de medula óssea, representada pelos primeiros mililitros obtidos durante o procedimento de colheita, era submetida ao mielograma, não tendo sido averiguada, em nenhum dos animais, alterações que comprometessem o desenvolvimento da pesquisa.

5.4 Aplicação da fração de células mononucleares da medula óssea

Conforme comentam Barros et al. (2001a), o importante papel das células-tronco na reparação óssea, associada a pequena quantidade destas células em relação às células nucleadas da medula óssea, têm direcionado as pesquisas para o seu isolamento, purificação e concentração. Diversos estudos demonstram que existem resultados superiores na terapia celular quando se empregam células-tronco expandidas em cultura em detrimento de aspirados de medula óssea (KADIYALA et al., 1997). No entanto, este processo é mais oneroso, requer tempo entre a colheita das células, cultivo e implantação, além de exigir mais aparato técnico (GREENBAUM e KANAT, 1993). No que diz respeito à utilização da fração de células mononucleares da medula óssea, isoladas e não expandidas em cultura, é importante ressaltar que os resultados obtidos por diversas pesquisas, são mais promissores quando comparados a utilização do aspirado não processado, principalmente quando a concentração celular no botão obtido é adequada. Lucarelli et al. (2004) comentam que o uso de células não expandidas em cultura apresenta vantagens, como menor custo, facilidade de execução, menor tempo de espera para obtenção do botão celular e menor aparato técnico, além de ser um procedimento minimamente invasivo. Por estes motivos, o presente trabalho optou pela

utilização da fração de células mononucleares da medula óssea provenientes de aspirados de medula, após seu isolamento (Figura 06).

Para Mendez-Otero et al. (2007), a maioria dos tecidos apresentam uma reserva de células-tronco residentes que possuem limitada capacidade de regeneração tecidual, sendo assim empregadas no reparo de pequenas lesões. No entanto, lesões maiores não são facilmente reparadas por estas células presentes nos tecidos, o que faz com que a dimensão do defeito ósseo produzido nesta pesquisa seja considerada adequada para o propósito do trabalho.

De acordo com Muschler e Midura (2002), o principal objetivo do transplante de células-tronco é suprir a deficiência no número e/ou atividade destas células no local de interesse. Desta forma, considera-se que no emprego da terapia celular, uma boa perspectiva nos processos regenerativos pode ser obtida quando forem transplantadas células processadas em número maior ou igual 2×10^6 (GENGOZIAN, 2000; SUTER et al., 2004) a 2×10^8 células mononucleares da medula óssea por kg^{-1} do receptor (NAKAGE et al., 2005).

O número de células mononucleares obtidas por microlitro de botão celular, neste trabalho ($0,47 \times 10^5$ a $5,98 \times 10^5$)(Tabela 05), permitiu de acordo com o volume final do botão celular, administrar valores entre $5,09 \times 10^6$ a $51,25 \times 10^6$ células kg^{-1} , o que de acordo com as recomendações da literatura anteriormente citada, atingem os valores considerados satisfatórios para emprego na terapia celular. Além disto, a média da viabilidade celular obtida neste estudo (95,3%), também está dentro dos padrões preconizados para esta terapia, pois de acordo com Suter et al. (2004), considera-se aceitável uma viabilidade mínima de 90%.

O volume de 5ml kg^{-1} de medula óssea colhido neste experimento mostrou-se suficiente para a obtenção da fração de células mononucleares da medula óssea em concentração e viabilidade apropriadas (Tabelas 04 e 05) para uso terapêutico, não requerendo a colheita de volumes maiores como aqueles empregados nos estudos de Tognoli et al. (2009), Tognoli et al. (2007), Oliveira (2008) e Olsson (2008), os quais inviabilizam o uso na rotina clínico-cirúrgica de pequenos animais, por demandar maior espoliação do paciente enfermo, além de aumentar o tempo de processamento.

Gengozian (2000) relata que a quantidade de células-tronco recomendada para

reconstituição hematopoética em cães é de 1,2 a $3,4 \times 10^6 \text{ kg}^{-1}$. Além disso, Siena et al. (1989) comentam que a capacidade de recuperação hematopoética é proporcional a quantidade de células CD34^+ após o transplante, o que torna importante a identificação e quantificação desse grupo celular. De acordo com Faldyna et al. (2001), a análise rápida, objetiva e quantitativa de células em suspensão pode ser realizada através da citometria de fluxo, técnica esta empregada no presente estudo na identificação e quantificação das células-tronco hematopoéticas. Nakage e Santana (2006) comentam que as células-tronco de cães podem ser identificadas pela expressão do anticorpo monoclonal canino CD34^+ . Dentre estas células, as hematopoéticas derivadas da medula óssea expressam o antígeno de superfície CD34 , e com o auxílio de um anticorpo monoclonal dirigido contra este, podem ser identificadas na citometria de fluxo (HUSS et al., 2000; HARTNETT et al., 2002). Por meio desta análise, é possível quantificar a proporção de células-tronco hematopoéticas dentre o total de células mononucleares da medula óssea obtidas no botão celular após o isolamento. Realizando este procedimento, obteve-se na presente pesquisa valores entre $0,02 \times 10^6$ a $0,54 \times 10^6$ células tronco-hematopoéticas por kg, os quais representam 0,03% a 0,22%, do total de células mononucleares no botão celular, respectivamente. Estes valores (Tabela 05) estão entre aqueles considerados satisfatórios do ponto de vista de sua aplicação terapêutica.

5.5 Anestesia e técnica operatória

A escolha do fêmur como modelo experimental nesta pesquisa baseou-se no fato deste osso, juntamente com o úmero e tibia, serem os ossos mais comumente reparados por aloimplantes (STEVENSON, 2005). Estes ossos são comumente acometidos por fratura decorrentes de falha nos métodos de osteossíntese e acidentes automobilísticos (DUELAND et al., 1989; SINIBALDI, 1989). Outro fator determinante na escolha do osso utilizado, diz respeito à vasta cobertura tecidual disponível no local da enxertia, pois segundo Stevenson et al. (1996), a utilização de implantes em áreas com menor cobertura muscular podem apresentar resultados diferentes, haja vista que o ambiente adjacente ao implante influencia em sua incorporação.

A utilização de antibiótico no período trans-operatório de ambos os procedimentos, colheita de medula e enxertia, baseou-se em recomendações descritas na

literatura, que afirmam que o uso de antibióticos nestes casos é recomendado de forma profilática, podendo estender sua utilização no período pós-operatório (MILLIS e MARTINEZ, 2007). Segundo Bubenik e Smith (2007), a profilaxia antimicrobiana consiste na utilização de antibióticos para prevenir a infecção de tecidos não infectados, sendo empregada em procedimentos ortopédicos limpos que envolvam a implantação de materiais estranhos, como nas cirurgias com duração de mais de duas horas e em artroscopia. A conduta na administração do antibiótico, realizada 30 minutos antes do início da intervenção, e repetida a cada duas horas após a dose inicial, baseou-se na constante de eliminação do fármaco, que segundo Raiser (1995), permite adequada manutenção da concentração sérica do antibiótico em nível tecidual. Algumas características como amplo espectro de ação, boa penetração no tecido ósseo, bom intervalo de eliminação, facilidade de aquisição e baixo custo, foram consideradas na escolha do antibiótico a ser empregado nesta pesquisa. De posse destas características, a cefalotina sódica foi o antibiótico de escolha, tendo sido adequado para o procedimento em questão.

Embora as propriedades antibacterianas da glicerina 98% sejam derivadas de sua ação como agente fixador e desidratante de atuação rápida, tornando-se assim um poderoso anti-séptico (PIGOSSI et al., 1971; ALVARENGA, 1992; PAULO, 1997; CORONADO et al., 2000), sabe-se que este meio não destrói todas as formas de microorganismos (MELO et al., 1998; DEL CARLO et al., 1999; KRAUSPENHAR, 2003). Por este motivo, os implantes utilizados neste experimento foram submetidos à imersão em solução anti-séptica antes da sua implantação. A utilização de antimicrobiano na solução hidratante, como realizado por Costa (1996) em seu estudo com osso cortical, não foi empregada neste trabalho, pois Deijkers et al. (1997) comentam que a imersão e o enxágüe do implante em solução acrescida antimicrobiano não é método eficaz de descontaminação.

A utilização de iodo como agente anti-séptico foi baseada nos resultados obtidos por Raiser et. al. (2000), Salbego et al. (2007) e Mazzanti et al. (2004) quanto ao controle de infecção em implantes conservados em glicerina. A prova de que os resultados para o controle de infecção obtidos na pesquisa foram satisfatórios, reside no fato de que as culturas amostrais da glicerina 98% do banco de ossos foram negativas para crescimento fúngico e bacteriano, além de não ter sido registrado nenhuma

ocorrência de infecção pós-operatória. Exceto no cão VII, foram constatadas alterações radiográficas nos tecidos moles no pós-operatório imediato (Figura 28-C-D) que poderiam sugerir processo infeccioso. No entanto essas alterações foram resolvidas espontaneamente em 48 horas após a cirurgia e sem o emprego terapêutico de antibiótico.

O acesso a região diafisária femoral no presente trabalho foi considerado adequado à manipulação local e implantação cirúrgica, seguindo técnica descrita por Piermattei e Johnson (2004), o que permitiu ampla exposição da área operatória.

A dissecação dos tecidos adjacentes ao fêmur foi realizada apenas o suficiente para permitir o posicionamento das pinças autocentrantes para fixação da placa, pois segundo Roe (2007), a lesão cirúrgica dos tecidos ao redor da fratura deve ser minimizada para preservar a irrigação sanguínea. O suprimento vascular inicial necessário para a consolidação da fratura é de origem extra-óssea, proveniente dos tecidos adjacentes, por isso a manipulação extensa e o retalhamento destes tecidos durante a reconstrução cirúrgica da fratura, pode resultar em desvascularização dos fragmentos e consolidação tardia (MILLIS e JACKSON, 2007), ou ainda não-união.

O acesso cirúrgico à diáfise femoral nos cães desta pesquisa foi padronizado para todos os animais, no entanto, alguns deles apresentavam maior grau de sangramento quando comparados aos demais (Tabela 07), como os cães de número III, V, VIII, IX, XV, XIX e XX. A aferição do volume sanguíneo perdido durante a cirurgia teve como objetivo principal estimar o grau de lesão vascular junto ao foco de fratura, do que propriamente monitorar alterações da volemia do paciente, pois deve ser levado em conta, que alguns animais podem ter sofrido dano vascular maior que outros durante a reconstrução cirúrgica da fratura. Hulse e Hyman (2007), enfatizam que a preservação do suprimento nutricional inicial é vital para as células pluripotentes próximas ao local da fratura, o que é obtido com o rebatimento delicado dos tecidos moles durante a redução aberta da mesma. Por este motivo procurou-se ao longo da pesquisa minimizar ao máximo o trauma decorrente da intervenção operatória.

Nos cães VIII, XV, XIX e XX, que tiveram grau de sangramento mais significativo, foi detectada diferença no grau de consolidação óssea entre as interfaces enxerto-hospedeiro proximal e distal durante o período de avaliação. Segundo Millis e

Jackson (2007), a lesão vascular decorrente da manipulação cirúrgica, pode comprometer o suprimento vascular inicial no foco de fratura, e com isso resultar em consolidação óssea tardia, o que poderia justificar o atraso da consolidação óssea nestes animais. No entanto, haveria necessidade de um estudo vascular contrastado para efetivamente se comprovar porque e se isso ocorreu apenas na interface distal.

O defeito segmentar femoral diafisário de 3,5cm criado nos animais desta pesquisa foi similar aos estudos de Costa (1996), Alievi (2006) e Ferreira (2008), que produziram em suas pesquisas, situações realistas e que requeriam o uso de enxertia para a reconstrução do osso acometido. No entanto, as dimensões do defeito ósseo empregado no presente trabalho, embora menor que a empregada nos estudos acima mencionados, foi considerada satisfatória do ponto de vista da pesquisa, pois conforme Key (1934), um defeito cortical segmentar no cão com dimensões de 1,5 vezes o diâmetro da diáfise óssea, ultrapassa a capacidade regenerativa do osso. Com uma lesão destas dimensões, a enxertia autóloga torna-se bastante improvável e inviável, o que não inviabiliza a avaliação deste experimento. Como descreve Roe (2007), nos casos de perda de grandes segmentos, o implante aplicado na redução da fratura tem função de apoio, e age suportando todo o peso e resistindo a todas as forças aplicadas ao osso.

Millis e Martinez (2007), comentam que a placa de compressão dinâmica, é um dos métodos de fixação rígida que garante a estabilidade na interface enxerto-hospedeiro, fator este, segundo Stevenson et al. (1991) fundamental para incorporação do implante. Para Costa (1996), a fixação por placa e parafusos, fornece adequada proteção mecânica ao implante durante o processo de incorporação. Por este motivo, a fixação do enxerto ao leito receptor, no atual estudo, foi realizada por placa de compressão dinâmica e baseou-se em dados da literatura (HENRY e WADSWORTH, 1981; DUELAND et al., 1989; SINIBALDI, 1989; KERWIN et al., 1991; STRAW et al., 1992; CASCIO et al., 2003; ALIEVI et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2007; FERREIRA, 2008) que afirmam que em detrimento dos demais métodos de estabilização, o uso de placas e parafusos para a fixação rígida de enxertos ósseos corticais é a mais amplamente utilizada. No entanto, vários outros métodos de estabilização estão disponíveis para serem empregados na fixação do enxerto ao leito receptor, como pinos intramedulares (PINTO JR., 1995; BENEVENIA et al., 2000; VAN BOERUM et al., 2003; NATHER, 2001), pinos intramedulares associados a

fixação esquelética externa (BLOOMBERG et al., 1984) e haste intramedular bloqueada (MUIR e JOHNSON, 1995; JULIÁN e VALENTÍ, 2006), podendo serem empregadas com sucesso em situações específicas.

Assim como descrito por Alievi (2006), no presente trabalho a imobilização por placa de compressão dinâmica proporcionou aos animais, o uso do membro operado já no pós-operatório imediato, salvo as devidas restrições decorrentes do trauma. O adequado protocolo de analgesia pós-operatória associado à caminhada em piso antiderrapante permitiu aos mesmos, o apoio do membro operado ao solo com certo grau de segurança.

O procedimento mais demorado durante a intervenção cirúrgica nesta pesquisa foi a modelagem, posicionamento e fixação da placa, corroborando com os resultados de Ziliotto et al. (2003), Alievi et al. (2007) e Ferreira (2008) que descrevem situação similar. A aferição do tempo de duração dos procedimentos e do intervalo entre estes, teve como objetivo o acompanhamento da curva de aprendizagem ao longo da pesquisa, do tempo de exposição dos tecidos e da viabilidade do botão celular. Pode-se observar na análise destes dados (Tabela 06), que alguns dos animais com maior retardo no tempo de consolidação, cursaram com maior tempo total transcorrido entre o início da implantação cirúrgica e a inoculação da fração de células mononucleares. O prolongamento no tempo da intervenção cirúrgica pode ter potencializado outros fatores que exercem influência direta ou indireta sobre a consolidação óssea, como a viabilidade celular ou ainda o volume de sangue perdido. Por outro lado, a curva de aprendizagem permitiu que o tempo de execução do procedimento cirúrgico em si, fosse reduzido significativamente em 40 a 50%, do meio para a fase final da pesquisa.

O número de parafusos e a forma com que são empregados na fixação da placa ao enxerto e ao osso receptor é um fator importante no sucesso do procedimento. Neste estudo foram utilizados oito parafusos corticais, tendo sido empregados dois parafusos no enxerto e três nas extremidades do osso receptor (Figura 11), de acordo com recomendações descritas por Johnson (1988), Sinibaldi (1989) e Kerwin et al. (1991), os quais comentam que geralmente são utilizados ao menos dois e preferencialmente três parafusos no osso hospedeiro proximal e distal, assim como no implante. Os parafusos imediatamente proximais e distais ao enxerto são colocados excêntrica para produzir compressão na junção enxerto-hospedeiro (JOHNSON, 1988; SINIBALDI,

1989; KERWIN et al., 1991), tal como foi realizado neste trabalho. Para Sinibaldi (1989), em raras situações, o emprego de dois parafusos proximais e dois distais, poderá prover boa estabilidade à fixação.

No presente estudo, o implante foi inicialmente fixado à placa de compressão e posteriormente ao osso hospedeiro como descreve Sinibaldi (1989). Adotou-se como padrão, a fixação inicial na extremidade femoral proximal, deixando por último a extremidade femoral distal. Adotou-se esta conduta, devido à vasta cobertura muscular e a tensão produzida por ela durante o alinhamento do eixo axial do fêmur, no momento da fixação, o que tornava a aplicação das pinças autocentrantes mais complicada na região próxima ao trocanter maior, quando comparada a região distal do fêmur. De acordo com Roe (2007), em muitas situações os parafusos podem não ser viáveis para serem colocados em todos os orifícios da placa.

Durante a aplicação dos parafusos, os implantes apresentavam-se ressecados, mesmo com o período prévio de hidratação e irrigação durante o procedimento, apresentando rigidez a perfuração, assim como descrito por Amendola (2001), Gaiga (2002) e Alievi et al. (2007). Ao contrário do que descrevem estes autores, os segmentos ósseos apresentavam-se quebradiços, sendo necessária a substituição de três implantes durante as intervenções nos animais IX, XVII, e XX, devido à fratura do mesmo no momento da aplicação dos parafusos corticais. Estes dados corroboram com as observações de Ziliotto et al. (2003), que citam que os implantes ósseos conservados em glicerina podem sofrer fraturas no momento da colocação de parafusos, por apresentarem menor resistência que o osso colhido a fresco, o que pode comprometer o sucesso do procedimento de enxertia produzindo instabilidade em sua fixação. De acordo com Muller et al. (2006), as microfissuras produzem importante efeito deletério sobre a qualidade óssea, aumentando de forma significativa o risco de fraturas.

Considerando o importante papel destas microfissuras na perda de resistência óssea, Reilly e Currey (2000) estudaram o seu efeito sobre a resistência ao impacto em tíbias e úmero bovinos. Um grupo de implantes ósseos foram inicialmente submetidos a força de arqueamento para a indução de microfraturas. Mais tarde, a resistência destes foi analisada por teste de impacto destrutivo, comparando-os com o grupo controle, que não foi fragilizado. Como conclusão, observou-se que os ossos fragilizados apresentaram severa redução em sua resistência na superfície onde houve compressão.

Embora na literatura várias pesquisas (GAIGA, 2002; NATHER et al., 2004, ALIEVI, 2006, TEIXEIRA et al., 2007; FERREIRA, 2008) descrevam o uso de serra oscilatória para confecção do defeito ósseo, neste estudo, foi utilizado um fio serra de Gigli (Figura 08-A). A confecção deste defeito ósseo segmentar na diáfise femoral teve maior dificuldade na execução da segunda linha de secção no fragmento ósseo, pois uma vez realizada a primeira, a instabilidade provocada dificultava a contenção apropriada do fragmento para a manipulação do fio serra.

O processo de irrigação com solução fisiológica durante a confecção do defeito, assim como na perfuração para inserção dos parafusos, tanto no implante como no osso hospedeiro, foi considerada apropriada, pois não foi verificada a ocorrência de lesão térmica em nenhum dos cães operados, assim como descrito por Teixeira et al. (2007).

Em todos os animais, durante o procedimento de enxertia, procurou-se promover a melhor aposição possível entre a interface enxerto-hospedeiro, como indicado por Fitch et al. (1997), que consideram esta aposição como um importante fator para o sucesso da enxertia. Segundo Stevenson (2005), é desejado que ocorra o máximo possível de contato na interface enxerto-hospedeiro, sendo o contato em uma área correspondente a 360°, considerado ideal por Henry e Wadsworth (1981) para o sucesso do procedimento. Em todos os cães da pesquisa, a distância entre o implante e o osso receptor na interface enxerto-hospedeiro foi igual ou inferior a 2mm (Tabela 09), conforme recomenda Vander Griend (1994), pois intervalos maiores estariam associados com o aumento do tempo de consolidação. A adequada aplicação dos parafusos de compressão na extremidade do enxerto com o osso receptor favorece o adequado contato das interfaces. Nos animais do presente estudo, não foi constatada diferença clínica ou radiográfica na consolidação das interfaces enxerto-hospedeiro proximal e distal, quando comparadas as lacunas existentes entre estas interfaces. No entanto, acredita-se que este não tenha sido um fator de interferência por que o espaço existente entre as interfaces não foi superior a 2mm em nenhum dos animais.

A presença das lacunas não foi completamente abolida com o uso de placas de compressão dinâmica, porque na secção dos segmentos ósseos receptor e doador, principalmente associado ao emprego do fio serra, não se consegue obter simetria que permita contato de 360 graus. Evitou-se, no entanto que elas ultrapassassem 2mm.

Embora os implantes dos cães VIII, IX, XVII, XVIII e XIX tenham apresentado maior diâmetro, enquanto os implantes dos cães X e XVI tenham diâmetro menor que o osso receptor, isto não foi considerado como fator negativo para a estabilidade do mesmo, já que Schena e Mccurnin (1983) comentam que a diferença de tamanho entre o enxerto e o osso receptor não afeta a fixação da placa nem retarda a consolidação, embora é claro, devam ser guardadas as devidas proporções.

Neste estudo optou-se aquisição de animais de porte e peso similares, evitando grandes discrepâncias, devido à padronização na dimensão do defeito ósseo produzido, pois, segundo Sinibaldi (1989) o tamanho do implante em relação ao leito receptor influencia no processo de incorporação. Grandes segmentos ósseos requerem maior tempo para serem incorporados em detrimento dos menores (MILLIS e MARTINEZ, 2007).

5.6 Suporte celular

A utilização de um material com função de suporte é imprescindível quando se deseja reconstituir defeitos em tecido ósseo adulto. Este arcabouço atuará na reposição do volume ósseo perdido, além de evitar a projeção de tecido muscular das adjacências para o interior do defeito ósseo, função esta atribuída ao implante ósseo conservado empregado neste estudo. Macroscopicamente este material atuará como guia e suporte do novo tecido ósseo em formação, enquanto em nível microscópico servirá de abrigo para a adesão, proliferação e diferenciação das células-tronco (POTIER e PETIT, 2005). No entanto, esta proteção estrutural por si só não fornece meios apropriados para absorver e sustentar a fração de células inoculadas na lesão, devido a fluidez deste composto, que facilmente se perderia entre os orifícios do implante. Por este motivo, além do suporte estrutural, representado pelo implante ósseo, neste estudo utilizou-se uma esponja de colágeno aplicada no interior do mesmo (Figura 08-D), com função de absorver e manter a fração de células mononucleares aplicadas no local. Conforme Bruder (1998), o emprego de matrizes bioativas fornece uma superfície para a migração e aderência das células locais e células osteoprogenitoras, atuando como um abrigo onde o novo tecido em formação pode se distribuir na região que requer preenchimento. Neste estudo, optou-se pelo uso da esponja de colágeno, pois esta tem sido empregada com sucesso no suporte celular para a reparação de diversos tecidos, como o tendão

(JUNCOSA-MELVIN et al, 2006; OLSSON, 2008) e o osso (MANKANI et al., 2001; OLIVEIRA, 2008). Além disto, o fabricante do produto afirma que este material não interfere no processo cicatricial, pois o mesmo já é empregado como agente hemostático em diversos tecidos a longo tempo. Mesmo não apresentando todas as características desejadas para um carreador celular, como descrito por Potier e Petit, (2005), outros fatores influenciaram na escolha desta esponja de colágeno para uso nesta pesquisa, como sua facilidade de aquisição, a biocompatibilidade e a maleabilidade, que permitiram facilmente a moldagem deste material ao formato do implante ósseo.

Para a inoculação da suspensão de células mononucleares no foco da fratura, padronizou-se a injeção na porção central do implante, em um orifício previamente confeccionado (Figura 08 F), além das duas interfaces enxerto-hospedeiro proximal e distal, visando manter a distribuição das células o mais uniforme possível. No entanto, após a saturação da capacidade de absorção da esponja, o volume remanescente escorria para fora do implante através do orifício central e por entre as interfaces enxerto-hospedeiro. Assim, antes da aplicação da suspensão celular procurou-se realizar adequada hemostasia no local, e após a inoculação da mesma, evitou-se o uso de compressas ou gaze na região periférica ao implante, visando prevenir a adesão das células extravasadas neste material, e sua remoção da ferida cirúrgica durante a síntese da fásia lata. Para o volume médio do botão celular obtido, pode-se averiguar que a esponja de colágeno cumpriu os requisitos esperados neste estudo, para suporte das células aplicadas no local de interesse, com base na presença de fluorescência das amostras teciduais colhidas aos sete dias após a cirurgia.

5.7 Avaliação clínica pós-operatória

Embora não se tenha avaliado objetivamente a dor nos animais após as primeiras 24 horas no período pós-operatório, acredita-se que o protocolo analgésico instituído tenha surtido efeito apropriado, pois nenhum animal manifestou sinais clínicos compatíveis com dor, exceto pelo desconforto da manipulação no local operado. Também não foi observado em nenhum deles, problemas relacionados ao trato digestivo associados ao uso prolongado do antiinflamatório uma vez que se utilizou fármaco COX seletivo e por período reduzido.

5.8 Avaliação do processo cicatricial ósseo

Ao longo desta pesquisa, a permanência dos cães durante o período de avaliação pós-operatória (90 dias) em baias individuais foi considerada satisfatória, facilitando o manejo dos mesmos e evitando complicações da ferida cirúrgica, tanto na primeira quanto na segunda intervenção cirúrgica (implantação e biópsia), pois de acordo com Millis e Martinez (2007), até que a consolidação adequada tenha ocorrido, a atividade física deve ser restrita. No entanto, a restrição ao exercício, uma vez prolongada pode interferir com a consolidação da fratura. Os efeitos que afetam de forma positiva a consolidação óssea, refletem alterações sobre a manutenção do tônus e massa muscular, amplitude articular e principalmente sobre a deposição de carga no local da fratura, influenciando diretamente a consolidação.

No presente estudo, o restrito período de exercício, resumido a duas seções diárias de 15 minutos em piso antiderrapante, pode ter surtido efeito negativo sobre o processo de consolidação óssea, ao contrário do adotado por Alievi (2006), que adotou canis comunitários para os animais após a primeira semana de pós-operatório, favorecendo assim o uso funcional do membro, embora expusesse mais os animais a risco de acidentes. Epari et al. (2006), comentam que durante as primeiras fases da consolidação óssea, as fraturas são bastante sensíveis aos diferentes movimentos as quais são submetidas, e o efeito de compressão axial atua como importante adjuvante na união dos segmentos ósseos. Por este motivo, deve-se considerar que todo tecido biológico necessita de estímulos mecânicos para sobreviver e em especial o osso, que é remodelado ao longo de toda a vida. Moritz (2001) cita que a remodelação óssea é um processo fisiológico constante, no qual o balanço entre a formação e a reabsorção é regulado por complexos sistemas de fatores locais e sistêmicos, agindo nas células ósseas e mantendo a homeostasia. De acordo com Martin (2007), esta remodelação é determinada pela solicitação a que os ossos são impostos, fazendo com que aqueles que sofrem maiores deformações, seja por impacto ou compressão, tenham uma maior capacidade de adaptação, adquirindo assim aumento da massa óssea tornando-se mais resistentes às fraturas.

Considerando-se que a maioria dos cães deste estudo não apresentaram o grau de consolidação esperada em ambas as interfaces enxerto-hospedeiro (Figuras 16 a 19) até os 90 dias de pós-operatório, ao contrário do observado por Alievi et al. (2007) ao realizar procedimento semelhante em cães, considera-se que o desuso, tenha sido um dos fatores contribuintes para este resultado. Como explica a lei de Wolf, o crescimento ósseo responde ao estresse e estiramento impostos ao osso; ou seja, a capacidade adaptativa do osso às mudanças de tamanho, forma e estrutura, dependem do estresse mecânico ao qual este tecido é submetido (GOULD, 1993). Segundo Millis e Martinez (2007), a resistência óssea é voltada para o equilíbrio entre formação de osso e sua reabsorção, fazendo com que o estresse mecânico elevado altere este equilíbrio enquanto o estado de desuso produza reabsorção. Isto pode explicar o fato da maioria dos animais deste estudo não terem apresentado apropriada consolidação dentro do período avaliado.

Outro fator a ser considerado neste estudo, é o temperamento dos animais. Os cães que apresentaram maior grau de consolidação das interfaces enxerto-hospedeiro dentro do período de avaliação nos diferentes grupos tratados e não tratados, apresentavam temperamento sanguíneo. No entanto, os animais com temperamento linfático, foram os que manifestaram maior índice de reabsorção e menor grau de consolidação dentro deste período em ambos os grupos. Conforme comentam Chamay e Tschantz (1972), a remodelação óssea ocorre de forma construtiva ou destrutiva de acordo com o estresse mecânico, onde o osso submetido a forças que causam deformações plásticas reage a essa sobrecarga com uma rápida e massiva hipertrofia.

No presente trabalho, acredita-se que o temperamento individual pode ter surtido efeito sobre a consolidação óssea, haja vista que os cães mais agitados permaneciam em constante movimento no interior das gaiolas, além de se mostrarem mais ativos durante a manipulação diária, assim como nos curtos períodos de exercício. Ryan et al. (2004) comentam que o exercício aumenta a força muscular, e alguns estudos associam este incremento de força à maior densidade mineral óssea. No entanto, este não deve ser excessivo, pois em altos volumes, o exercício acaba exercendo efeito contrário no que diz respeito ao aumento do tecido ósseo (SHIPP, 2006), além de aumentar o risco de fraturas. Frost (1994) cita que o impacto e compressão decorrentes das contrações musculares, atuam como a sinalização bioquímica para os osteoblastos e

osteócitos aumentarem a síntese protéica e a massa óssea durante a fase de crescimento. Isto também é responsável por manter o balanço ósseo próximo a zero na idade adulta.

A utilização de gaiola de aço inoxidável para a manutenção dos animais de pesquisa, mesmo que revestida de tapete emborrachado, pode ser considerada como uma das causas de retardo no tempo de consolidação deste estudo, pois a entrada e saída dos animais das gaiolas, mesmo que monitorada, invariavelmente predispõe a ocorrência de acidentes, como o trauma junto ao piso escorregadio do canil (muitas vezes úmido) e o trauma contundente nos membros, junto às bordos da gaiola. Ao término deste estudo, concluiu-se que este tipo de instalação é inadequada para o pós-operatório prolongado de animais submetidos a procedimentos de enxertia ou de estabilização de fraturas do esqueleto apendicular.

Em um trabalho avaliando a cicatrização óssea com implantes conservados em mel, Amendola (2001) sugere que o período de 60 dias após a cirurgia seria suficiente para avaliar o processo de consolidação de osso cortical, tempo este que geralmente é empregado para acompanhamento radiográfico da evolução da maioria das fraturas de ossos longos em animais adultos e hípidos (JOHNSON e HULSE, 2005). Já Alievi (2006), utilizando também enxertos em mel na diáfise femoral de cães, comenta que há necessidade de avaliação do implante por período mais prolongado para avaliação do processo de incorporação. A decisão pelo tempo de avaliação clínica e radiográfica dos implantes nos animais deste experimento, durante um período de 90 dias baseou-se no estudo de Alievi (2006), que constatou a consolidação do implante aos 66 dias na interface proximal e aos 68,33 dias na interface distal, variando de 45 a 90 dias em ambas.

O progresso da consolidação pode ser avaliado clinicamente (STEVENSON e HOROWITZ, 1992) e por meio de imagem radiográfica (JOHNSON e HULSE, 2005; MILLIS e MARTINEZ, 2007). Durante o período pós-operatório desta pesquisa, o exame radiográfico demonstrou-se essencial para o acompanhamento do processo de consolidação das interfaces do implante ósseo, assim como descreve Pinto Jr. (1995). Além ser uma técnica não-invasiva, o exame radiográfico permite a avaliação da consolidação da fratura. Millis e Martinez (2007) recomendam que as radiografias sejam realizadas em intervalos regulares para certificar que a consolidação esta progredindo de forma apropriada.

A quantificação radiográfica (Figuras 16 e 17) do grau de consolidação óssea das interfaces enxerto-hospedeiro proximal e distal nesta pesquisa, foi realizada com base na modificação dos parâmetros utilizados por Cook et al. (2004) (Tabela 01), em um trabalho realizado por estes autores comparando diferentes métodos de avaliar a presença e a extensão da fusão de corpos vertebrais.

Segundo Johnson e Hulse (2005), a realização do exame radiográfico no pós-operatório imediato (Figura 11), é indicado para avaliar o alinhamento da fratura e a posição do implante, devendo ser repetido a cada quatro semanas durante a cicatrização. No entanto, por se tratar de um enxerto ósseo segmentar do qual se desejava acompanhamento detalhado do seu comportamento na interface implante-osso receptor, no presente trabalho os exames foram repetidos quinzenalmente (Figuras 20 a 27), a semelhança da metodologia nas pesquisas de Schena et al. (1984) e Alievi et al. (2007). De acordo com Costa (1996), a frequência de realização dos exames radiográficos poderia ser semanal, no entanto, o acompanhamento quinzenal realizado neste experimento foi considerado satisfatório para avaliação das alterações sofridas pelo implante ao longo do período de avaliação de 90 dias.

Deve-se salientar que o exame radiográfico seja realizado em duas incidências para permitir ampla visualização do foco de fratura, principalmente quando se trata de implantes fixados por placa de compressão dinâmica, em que a sobreposição desta pode dificultar a interpretação radiográfica. Para o fêmur, as incidências antero-posterior e médio-lateral (Figura 11) demonstraram-se apropriadas para fins de avaliação do implante neste trabalho, exceto para o cão de número XV (Figura 28 E-F) que apresentou posicionamento crânio-lateral da placa de compressão, tornando mais dificultosa a avaliação deste indivíduo.

Corroborando com os dados encontrados por Amendola (2001) e Alievi (2006) em suas pesquisas, o início da diminuição da densidade óssea dos implantes foi observada radiograficamente aos 30 dias de pós-operatório. No auge do período de reabsorção, os implantes apresentavam diferentes graus de intensidade, porém com maior saliência sempre nas bordas do mesmo. Contudo, diferindo dos resultados obtidos por Alievi (2006), nos cães XVII e XX a diminuição da densidade óssea do implante persistiu até os 90 dias após a cirurgia. Esta reabsorção pode ser explicada pela atividade celular no leito da fratura, onde a ação dos osteoclastos precede a dos osteoblastos (BAUER e MUSCHLER, 2000; STEVENSON, 2005), a qual tem início na

periferia do mesmo e progride para a região central (WEIGEL, 1993).

A fissura observada no enxerto do cão I (figura 28-A-B) aos 30 e 60 dias de pós-operatório pode ter sido decorrente das perfurações para inserção dos parafusos corticais, pois de acordo com Vander Griend (1994), este processo pode resultar em fragilização do implante. Para Thompson Jr. et al. (1993), este tipo de fratura nos implantes ósseos, tende a ser oriundo de fragilização provocada por danos ocorridos durante a implantação. Com o emprego de outras técnicas de fixação em que o enxerto não é perfurado, este problema pode ser minimizado. Outro fator que pode justificar este tipo de complicação é o temperamento sanguíneo do animal, impondo grande esforço mecânico ao implante e enxerto no período pós-operatório precoce.

5.9 Avaliação Deambulatória

A avaliação da deambulação dos animais deste estudo (Figura 15) foi considerada apropriada e realizada seguindo os parâmetros adaptados de Tudury e Raiser (1985) (Apêndice 04). A padronização do local de avaliação com piso antiderrapante, associado aos animais livres da guia, facilitou a interpretação dos graus de claudicação.

Já nas primeiras 24 horas de pós-operatório, todos os animais apresentaram apoio do membro operado ao solo, o que permite concluir que a estabilização da fratura tenha sido adequada em todos eles. Até os 90 dias de avaliação, 80% dos cães dos grupos I e II e 40% dos cães dos grupos III e IV atingiram o grau V na avaliação deambulatória, o que poderia sugerir resposta clínica favorável aos grupos tratados pela terapia celular. No entanto, sete cães que apresentaram regressão no grau de deambulação, três deles faziam parte dos grupos controle, III e IV, os quais tiveram histórico associado a traumatismo contundente, fazendo com que a média geral destes grupos ficasse reduzida perante os demais. A suspeita de trauma contundente foi confirmada pela avaliação clínica e posteriormente pelo exame radiográfico.

5.10 Marcação celular

Dentre as novas alternativas para a marcação celular estão disponíveis os pontos

quânticos (WU e BRUCHEZ, 2004), que são nanocristais semicondutores que apresentam características de excitação e fotoestabilidade, podendo ser estimulados por um único comprimento de onda (HASSAN et al., 2006). Os marcadores fluorescentes são largamente empregados na área médica, como na decodificação do DNA, diagnóstico de infecções entre outras circunstâncias (MARSH et al., 2007). No presente trabalho optou-se pela utilização do marcador nanocristal Qtracker-665 (Figura 10-B), pois de acordo com Parak et al. (2005), este marcador possui a capacidade de marcar quase todo tipo de material de interesse biológico.

A fluorescência do marcador foi aferida no botão celular momentos após sua marcação, e após uma semana da inoculação do mesmo no foco de fratura, mediante a colheita de micro-fragmentos ósseos. Considerando-se que a fluorescência do nanocristal pode ser detectada por pelo menos quatro gerações celulares, podendo ainda permanecer marcadas por até duas semanas em algumas células (DONALDSON et al., 2007; GARON et al., 2007), definiu-se a análise da fluorescência do marcador celular no atual estudo baseando-se no comportamento do marcador, que perde sua fluorescência com o passar do tempo. Seguindo as recomendações de Oliveira, (2008), a qual obteve sucesso na detecção da fluorescência do nanocristal estudando a influência da fração de células mononucleares da medula óssea no reparo de lesões tibiais agudas em cães, adotou-se como parâmetro, o tempo de avaliação de sete dias após a marcação celular.

O procedimento de biópsia para obtenção dos micro-fragmentos (Figura 09) foi realizado sem maiores dificuldades e sem a ocorrência de complicações. O volume de material colhido entre as ranhuras da broca ortopédica foi considerado suficiente para a confecção da lâmina para a análise laboratorial. O emprego de papel alumínio como isolante ambiental para a proteção da luminosidade e conservação da integridade da lâmina durante o transporte, foi considerado satisfatório, pois permitiu a apropriada análise do material no microscópio de fluorescência. Conforme descrevem Jares-Erijiman e Jovin (2003), a microscopia de fluorescência capta as diversas manifestações da emissão de luz, e aquela produzida pelos nanocristais pode ser detectada através desta técnica, comprovando os resultados deste trabalho (Tabela 18). Todas as amostras foram analisadas quanto à presença e ao grau de fluorescência, em média quatro horas após a sua colheita, pois Donaldson et al. (2007) e Garon et al. (2007) citam que a fluorescência do nanocristal pode ser detectada por até duas semanas em algumas

células.

A realização da colheita de micro-fragmentos ósseos também nos animais do grupo controle foi realizada baseando-se no fato de que as lesões impostas ao foco de fratura deveriam ser padronizadas para todos os animais do experimento.

A análise dos botões celulares e dos micro-fragmentos ósseos (Figura 10 D-E) dos dez animais tratados com a fração de células mononucleares, marcadas com o nanocristal Qtracker-665, detectou fluorescência em 100% das análises, porém com diferentes graus de intensidade (Tabela 18). Estes resultados foram similares aqueles obtidos por Oliveira (2008) e Olsson (2008), na marcação da fração de células mononucleares com o mesmo marcador, empregadas no reparo de lesões ósseas em tibia e tendão calcâneo de cães, respectivamente. Neste estudo, foi possível verificar, que o nanocristal Qtracker-655 é realmente eficiente na marcação celular, corroborando com os achados de Oliveira (2008), embora seu tempo de viabilidade como marcador seja relativamente curto, não permitindo o acompanhamento da atividade celular por períodos mais prolongados. No entanto, contrapondo-se aos resultados obtidos por Olsson (2008), não se pode afirmar que estas células marcadas e que emitem fluorescência após uma semana de sua inoculação no foco da fratura, estejam realmente viáveis. É possível, que a fluorescência detectada à microscopia, seja proveniente de células mortas localizadas no interior de fagócitos em atividade no foco de fratura.

5.11 Análise histopatológica

Sabe-se que o ideal para análise da evolução do processo de consolidação do calo ósseo, é a análise do calo em sua íntegra conforme realizado nos estudos Cavassani et al. (2001), Barros et al. (2001), Del Carlo et al. (2003), Leotte et al. (2004), Alievi et al. (2007), Dalmolin et al. (2007), Ferreira, (2008) e Bolsson et al. (2008) com cicatrização óssea. No entanto, no presente estudo este procedimento não foi realizado, pois a colheita do calo ósseo em sua totalidade acarretaria em extenso dano impedindo a reconstrução cirúrgica posterior, resultando na amputação do membro acometido. Por este motivo, visando à reabilitação dos animais da pesquisa e também, atendendo aos requerimentos do comitê de ética da instituição e as normas do COBEA, optou-se pela análise do calo ósseo mediante a colheita de um segmento ósseo representativo (Figura

30). Conforme a literatura comenta, o progresso da consolidação pode também ser avaliado pela análise histológica do calo ósseo (STEVENSON e HOROWITZ, 1992) por meio de fragmentos colhidos por biópsia (LaRUE et al, 2005).

A colheita de fragmento ósseo pode ser realizada com o uso de instrumental específico. Em teoria, o trépano de Michelle, dispositivo bastante empregado em medicina veterinária para a realização de biópsias ósseas, poderia provocar fratura do osso, devido ao tamanho do orifício produzido no procedimento. Segundo LaRue et al. (2005), as biópsias ósseas quando realizadas com um planejamento inadequado, podem resultar em amostras insuficientes para avaliação ou sérias complicações decorrentes do procedimento. Por este motivo e pela necessidade da colheita de um fragmento ósseo retangular, nesta pesquisa optou-se pela realização da colheita do fragmento ósseo com o auxílio de uma broca ortopédica para corte de osso compacto. Neste trabalho, a colheita do fragmento ósseo retangular foi realizada sem maiores dificuldades com o auxílio de uma broca de corte acoplada a um motor de alta rotação. O processo de irrigação concomitante à secção do segmento ósseo cortical, auxiliou na prevenção de lesão por necrose térmica local. Durante a confecção da janela óssea, é importante salientar que mesmo associado à irrigação ocorre aquecimento excessivo no local de desgaste ósseo com a broca, e por este motivo, procurou-se evitar o corte ininterrupto da janela óssea, realizando-se pausas para permitir o resfriamento no local de corte (desgaste).

Em um estudo com cães, Camargo et al. (2002) avaliaram o enfraquecimento causado pela confecção de uma janela óssea cortical na diáfise femoral. Estes autores avaliaram dois grupos, onde em um, foi confeccionado um janela circular e no outro uma janela quadrada, com a diagonal semelhante ao diâmetro da janela circular. Ao submeterem os ossos ao teste de tensão torcional, observaram que não havia diferença significativa entre a resistência nos dois grupos de ossos. Baseado nestes dados, optou-se pela confecção da janela retangular como padrão para a colheita do fragmento ósseo opondo-se à lesão produzida pelo trépano de Michelle que produziria um defeito circular.

Para realização deste procedimento necessitou-se realizar a remoção da placa de compressão dinâmica, o que associada a janela óssea produzida pela biópsia,

potencializou a fragilização do membro. Contudo, após a remoção da placa (Figura 29), foi possível verificar a estabilidade das interfaces enxerto-hospedeiro proximal e distal (Tabela 10) por resistência mecânica direta.

No presente estudo, a maioria dos cães submetidos à confecção da janela óssea retangular apresentou complicações após a colheita do fragmento ósseo cortical. Aqueles animais que não apresentaram instabilidade da linha de fratura imediatamente após a colheita do fragmento desenvolveram fratura nas primeiras 48-72 horas de pós-operatório. A padronização da confecção da janela óssea na interface enxerto-hospedeiro proximal foi adotada devido ao grau de lesão provocada por esta intervenção. Considerando-se que o fragmento colhido deveria abranger o implante, a linha de fratura e ainda o osso receptor, se realizado em ambas as interfaces, resultaria em grave encurtamento do membro após a nova osteossíntese, dificultando o processo de reabilitação dos animais.

A hemorragia produzida pela biópsia óssea pode ser facilmente contida com o emprego de cera óssea ou esponja hemostática (LaRUE et al, 2005). No presente experimento, aqueles animais que não manifestaram instabilidade do foco de biópsia após o procedimento, a hemorragia foi controlada mediante a compressão digital durante sete minutos, tempo este necessário para que ocorra a formação do coágulo (RAISER, 1995), ou pela aplicação tópica de segmento de músculo autólogo.

De acordo com LaRue et al (2005), uma vez colhido o material, este deve ser acondicionado tão logo quando possível em solução de formaldeído neutro tamponado a 10%, para evitar o ressecamento do tecido. Nesta pesquisa, os fragmentos ósseos permaneceram envoltos por uma compressa de gaze umedecida com solução de cloreto de sódio a 0,9% em média 20 minutos após a colheita, sendo posteriormente transferidos para frascos individuais contendo formol líquido tamponado. Não foram observados problemas referentes à conservação dos fragmentos durante o período que antecedeu o envio para análise histológica, sendo que o tempo mínimo de permanência dos fragmentos teciduais nesta solução foi 30 dias.

A análise da densidade mineral óssea dos fragmentos ósseos colhidos na biópsia óssea foi realizada sem complicações, mediante o emprego de tomografia computadorizada (Figura 31), sob os mesmos moldes em que os implantes ósseos foram

analisados. Como a tomografia computadorizada é uma técnica que permite a realização de imagens com precisão em pequenos intervalos, além de ser apta para averiguar a densidade óssea (IBÁÑEZ, 2003), buscou-se no presente estudo averiguar se haveria diferença na deposição mineral do calo ósseo entre os grupos avaliados (figura 32), no entanto, a densidade na região da interface osso implante, não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos estudados (Apêndice 09). Estes dados demonstram (Tabela 11) que a deposição mineral no calo ósseo em formação, não ocorreu de forma mais proeminente em nenhum dos grupos avaliados. Supõe-se que fatores relacionados prioritariamente a deposição de carga no foco de fratura, tenham exercido influência direta sobre estes resultados, visto que a influência do exercício sobre a formação do calo ósseo (EPARI et al., 2006) pode ter interferido nestes resultados.

As características histológicas encontradas aos 90 dias (Tabela 12 e 13) de pós-operatório representam o processo normal de cicatrização óssea. Em todas as amostras examinadas, o espaço entre as trabéculas ósseas contém variável quantidade de material amorfo acelular. Não foi observada diferença histológica entre a extremidade marcada (leito receptor) e extremidade não marcada (implante). Quando reconhecível histopatologicamente, a interface (Figura 36-A) entre a extremidade marcada e não marcada (área de transição enxerto-hospedeiro) é composta basicamente por proliferação de tecido conjuntivo fibroso com áreas de metaplasia cartilaginosa e óssea bem ordenada, o que caracteriza o processo de evolução do calo ósseo como grau I (fase fibroblástica), onde ocorre união cartilaginosa incompleta. De acordo com Junqueira e Carneiro (1999), este processo caracteriza cicatrização óssea por primeira intenção. Segundo parâmetros definidos por Allen et al. (1980), na análise da evolução do calo ósseo (Tabela 14), o grau I de consolidação foi apresentado em 60% dos cães do grupo II e III e em 80% dos cães do grupo IV, sendo que nos demais cães integrantes destes grupos não foi possível realizar a classificação do estágio de evolução do calo ósseo. Já no grupo I, 40% dos cães apresentaram evolução do calo em grau I e 40% em grau II, permanecendo os 20% restantes sem classificação. Na análise histológica padrão (figuras 33 a 36), não houve diferença no padrão cicatricial entre os grupos tratado e controle.

5.12 Reabilitação dos animais da pesquisa

O emprego de diferentes protocolos terapêuticos para os animais desta pesquisa, após o procedimento de biópsia óssea, procurou restabelecer a função do membro pélvico acometido com o emprego de diferentes métodos de estabilização (Figura 37), com apoio ou não de procedimento fisioterápico. No entanto, nem todos os animais apresentaram resultados satisfatórios, sendo que em um, dos vinte cães da pesquisa, foi necessária a amputação do membro após diversas intervenções corretivas fracassadas. A reabilitação dos animais (Tabela 15) após as intervenções, mesmo para aqueles, vítimas de amputação, foi considerada satisfatória do ponto de vista do bem estar animal. Até o presente momento, com o apoio da ONG SOS bichos de rua, sediada em Santa Maria-RS, de diversos colaboradores e da própria instituição, mais de 70% dos cães foram encaminhados para adoção, enquanto os demais continuam sob tratamento, aguardando posterior doação.

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, é pertinente concluir que:

A hidratação de implantes ósseos conservados em glicerina 98%, não produz alteração estatisticamente significativa a resistência biomecânica do osso cortical para os diferentes tempos testados.

O protocolo de colheita de medula óssea no volume de 5ml kg^{-1} de peso corporal, obtidos de diferentes ossos longos, é adequado para isolamento da fração de células mononucleares e obtenção de um botão celular com concentração e viabilidade celular consideradas satisfatórias para uso terapêutico.

A consolidação das interfaces enxerto-hospedeiro proximal e distal aos 90 dias após a cirurgia não apresentou diferença clínica e radiográfica com significância estatística entre os grupos avaliados. Porém, não se pode afirmar que a terapia celular empregada neste estudo, não seja bom adjuvante da cicatrização óssea, pois se acredita, que a restrição na carga sobre o foco de fratura, proveniente do reduzido exercício pós-operatório, tenha influenciado diretamente no resultado da consolidação.

6. REFERÊNCIAS

ALEXANDER, J. W. Use of a combination of cortical bone allografts and cancellous bone autografts to replace massive bone loss in fresh fractures and selected nonunions. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 19, n. 5, p. 671-678, 1983.

ALIEVI, M. M. **Implante ósseo cortical alógeno conservado em mel na reconstituição de falha óssea diafisária em fêmur de cães**. 2006. 88 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

_____. et al. Implante ósseo cortical alógeno conservado em mel na reconstrução de falha óssea diafisária em fêmur de cães: avaliação clínica e radiográfica. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 450-457, 2007.

ALVARENGA, J. Possibilidades e limitações da utilização de membranas biológicas preservadas em cirurgia. In: DALECK, C. R. **Tópicos em cirurgia de cães e gatos**. Jaboticabal, SP: Fundação de Estudos e Pesquisas em Agronomia - Universidade Estadual Paulista de Botucatu, 1992. p. 33-39.

AMENDOLA, G. F. et al. Aspectos biomecânicos compressivos de diáfises femorais caninas conservadas em glicerina a 98% ou em mel. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1341-1345, 2008.

_____. **Aspectos biomecânicos, bacteriológicos e micológicos de diáfises femorais caninas conservadas em glicerina a 98% ou mel**. 2007. 100 f. Tese (Doutorado em Cirurgia) - Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa, Santa Maria, RS, 2007.

_____. **Correção de defeito ósseo femoral em cães utilizando implante ósseo cortical homólogo conservado em mel**. 2001. 46 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2001.

_____. Correção de defeito ósseo femoral em cães utilizando implante cortical homólogo conservado em mel. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, n. 4, p. 302-307, 2003.

AQUINO, L. P. C. T. et al. Hematological, biochemical and anatomopathological aspects of the experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 1, p. 8-18, 2002.

ARINZEH, T. L. et al. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 85, n. 10, p. 1927-1935, 2003.

ARO, H. T.; AHO, A. J. Clinical use of bone allografts. **Annals of Medicine**, v. 25, n.

4, p. 403-412, 1993.

ASAHARA, T. et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. **Science**, v. 275, p. 964-967, 1997.

ATALAR, A. C. et al. Treatment of neer type 4 impacted valgus fractures of the proximal humerus with open reduction, elevation, and grafting. **Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica**, v. 41, n. 2, p. 113-119, 2007.

BACIPALUGO, A. et al. Bone marrow harvest for marrow transplantation: effect of multiple small (2ml) or large (20) ml aspirates. **Bone marrow Transplantation**, v. 9, n. 1, p. 467-470, 1992

BALL, S. T. et al. The effects of storage on fresh human osteochondral allografts. **Clinical Orthopaedics**, v. 418, p. 246-52, 2004.

BARRIOS, R.H. et al. Bacterial contamination of allografts. **Acta Orthopaedica Belgica**, v. 60, n. 2, p. 152-154, 1994.

BARROS, S. V. S. G. et al. Auto-enxerto percutâneo de medula óssea em coelhos: coleta, preparo e aplicação. **Ciência Rural**, v. 31, n. 6, p. 1013-1018, 2001.

BAUER, T. W.; MUSCHLER, G. F. Bone grafts materials: an overview of the basic science. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 371, p. 10-27, 2000.

BENEVENIA, J. et al. Mechanical environment affects allograft incorporation. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 53, n. 1, p. 67-72, 2000.

BERESFORD, J. N. Osteogenic stem cells and the stromal system of bone marrow. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 18, p. 240-270, 1989.

BIANCO, P. et al. Bone marrow stem cells: nature, biology, and potential applications. **Stem Cells**, v. 19, p. 180-192, 2001.

BLOOMBERG, M. S.; CRING, R. L.; BORN, F. Bone and cartilage transplantation in orthopaedic surgery. **Journal of the America Animal Hospital Association**, v. 20, p. 393-402, 1984.

BOLSON, J. et al. Pino ósseo homólogo conservado em glicerina a 98% e hemicerclagem com fio poliglactina 910 na osteossíntese umeral de pombos domésticos. **Ciência Rural**, v. 38, n. 7, p. 1925-1931, 2008.

BONNET, D. Hematopoietic stem cells. **Birth Defects Research. Part C Embryo Today**, v. 69, p. 219-229, 2003.

BORM, P. J . A. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 3, n. 11, p. 1-35, 2006.

BOYUM, A. Separation of leukocytes rom blood and bone marrow. Introduction. Scand. **Journal Clinical Laboratory Investigation Supplement**, v. 97, p .7, 1968.

BRUDER, S. P. et al. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. **The Journal of bone and Joint Surgery**, v. 80, p. 985-996, 1998.

BRUGGER, W. et al. *Ex vivo* manipulation of hematopoietic stem and progenitor cells. **Seminars in Hematology**, v. 37, n. 2, p. 42-49, 2000.

BRUN, M. V. et al. Solução hipersaturada de sal ou glicerina a 98% como conservantes de centros frênicos caninos utilizados utilizados na reparação de defeitos musculares em ratos wistar. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 147-153, 2004.

BUBENIK, L. J.; SMITH, M. M. Infecções ortopédicas. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 3. ed. Manole: São Paulo, 2007. v. 2, cap. 129, p. 1862 – 1874.

BURCHARDT, H. et al. Freeze-dried allogeneic segmental cortical-bone graft in dogs. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 60A, n. 8, p. 1082-1090, 1978.

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

BURT, R. et al. Hematopoietic stem cells transplantaion for cardiac and peripheral vascular disease. **Bone Marrow Transplantation**, v. 32, p. 29-31, 2003.

CALLAN, M. B. Red blood cell transfusions in the dog and cat. In: FELDMAN, B. F. et al. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. cap. 123, p. 833-837.

CAMARGO, O. P. et al. Análise comparativa da resistência de fêmures de cães após a confecção de janelas ósseas circular e quadrada. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 41-47, 2002.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal Orthopaedic Research**, v. 9, n. 5, p. 641-650, 1991.

CARVALHO, D. C. L. et al. Tratamento não farmacológico na estimulação da osteogênese. **Revista da Saúde Pública**, v. 36, n. 5, p. 647-654, 2004.

CASCIO, B. M. et al. A mechanical comparison and review of transverse, step-cut, and sigmoid osteotomies. **Clinical Orthopaedics**, n. 411, p. 296-304, 2003.

CASTANIA, V. A. **Enxerto córtico-esponjoso homogêneo processado quimicamente**

e esterilizado em óxido de etileno, em cães - análise mecânica e estudo da integração por meio de radiografias. 2002. 72 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2007.

CAVASSANI, M. M.; MORAES, J. R. E.; PADILHA FILHO, J. G. Função osteoindutora de fragmentos ósseos conservados em glicerina 98%. Estudo experimental em ratos. **Ciência Rural**, v. 31, n. 3, p. 445-448, 2001.

CHAMAY A; TSCHANTZ P., Mechanical influences in bone remodeling: experimental research on Wolff's law. **Journal of Biomechanics**, v. 5, p. 173-180, 1972.

CONTESINI, E. A. et al. Reparação traqueal em cães: transplante autógeno vs implante homogêneo conservado em glicerina a 98% de cartilagem da pina. **Ciência Rural**, v. 31, n. 4, p. 633-637, 2001.

_____. Aspectos clínicos e macroscópicos da palatoplastia imediata com implante de cartilagem da pina auricular, conservada em glicerina a 98%, após indução experimental de fenda palatina em cães. **Ciência Rural**, v. 33, n. 1, p. 103-106, 2003.

COOK, S. D. et al. Comparison of methods for determining the presence and extent of anterior lumbar interbody fusion. **Spine**, v. 29, n. 10, p. 1118-1123, 2004.

CORNELL, C. N.; LANE, J. M. Current understanding of osteoconduction in bone regeneration. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 355, p. 267-273, 1998.

CORNU, O. et al. Impaction bone grafting with freeze-dried irradiated bone: changes in stiffness and compactness of morselized grafts: experiments in cadavers. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 74, n. 5, p. 553-558, 2003.

CORONADO, G. S. et al. Effects of a 98% solution of glycerol or sterilization with ethylene oxide on FeLV in bone allografts and effects on bone incorporation of allografts in cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 6, n. 61, p. 665-671, 2000.

COSTA, J. L. O. **Reconstrução de grande falha óssea com enxerto cortical alógeno conservado em glicerina, fixado com placa e parafusos de aço inoxidável da série 304. Estudo experimental em cães (*Canis familiaris*).** 1996. 100 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 1996.

COSTA, J. M. C. et al. Tenoplastia experimental do calcâneo em cães com peritônio bovino conservado em glicerina. **Ciência Rural**, v. 29, n. 4, p. 697-703, 1999.

CURYLO, L. J. et al. Autogenous bone marrow augmentation of spinal fusion in a rabbit posterolateral fusion model. **Transactions Orthopaedic Research Society**, v. 22, p. 356, 1997.

MEIRELLES, L. et al. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, v. 119, n. 11, p. 2204-2213, 2006.

DALECK, C. R. et al. Reparação de hérnia perineal em cães com peritônio de bovino conservado em glicerina. **Ciência Rural**, v. 22, n. 2, p. 179-183, 1992.

DALMOLIN, F. et al. Modificações do fixador externo para osteossíntese umeral em pombos domésticos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 2, p. 443-449, 2007.

DE KOK, I. J. et al. Investigation of allogeneic mesenchymal stem cell-based alveolar bone formation: preliminary findings. **Clinical Oral Implants Research**, v. 14, n. 4, p. 481-489, 2003.

DEIJKERS, R. L. et al. Contamination of bone allografts: analysis of incidence and predisposing factors. **Journal Bone and Joint Surgery**, v. 79, n. 1, p. 161-166, 1997.

DEL CARLO, R. J. et al. Aloenxertos ósseos caninos diferentemente preservados. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 6, n. 3, p. 121-125, 1999.

DENNY, H. R.; BUTTERWORTH, S. J. Enxerto ósseo. In: ____ **Cirurgia ortopédica em cães e gatos**. 4. ed. São Paulo: Roca, 2006. v. 1, cap. 26, p. 232-241.

DIELBOLD, J. M. et al. Bone marrow manifestations of infections and systemic diseases observed in bone marrow trephine biopsy. **Histopathology**, v. 37, p. 199-211. 2000.

DONALDSON, K., et al. Nanotoxicology. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 61, n. 9, p. 727-728, 2004.

DOUAT, E. S. V. **Estudo comparativo do efeito do ultra-som terapêutico de 1MHz com frequência de repetição de pulso de 100MHz e 16 Hz no reparo de osteotomia por escareação em tibia de rato**. 2004. 74 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2004.

DUELAND, R. T. et al. Cryopreserved intercalary bone allografts: early experience (1975-1980) in eight canine cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 25, n. 3, p. 305-316, 1989.

EHRHART, N. P. et al. The effect of host tissue irradiation on large-segment allograft incorporation. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 435, p.

43-51, 2005.

EINHORN T. The cell and molecular biology of fracture healing. **Clinical Orthopaedic and Related Research**, v. 355, p. 7-21, 1998. Suplemento.

EPARI, D.R. et al. Mechanical conditions in the initial phase of bone healing. **Clinical Biomechanics**, v. 21, p. 646-55, 2006.

FALDYNA, M. et al. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs – a flow cytometric study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 82, n. 1-2, p. 23-37, 2001.

FERREIRA, M. P. **Comparação de enxerto ósseo cortical autógeno e implante ósseo cortical alógeno liofilizado, congelado a -70°C ou conservado no mel na substituição de segmento diafisário do fêmur de gatos domésticos.** 2008. 139 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2008.

FILIP, S. et al. Issues in stem cell plasticity. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 8, n. 4, p. 572-577, 2004.

FITCH, R. et al. Bone autografts and allografts in dogs. **Compendium Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 19, n. 5, p. 558-575, 1997.

FROST, H. M. Wolff's Law and bone's structural adaptations to mechanical usage: an overview for clinicians. **Angle Orthodontists**, n. 64, v. 3, p. 175-188, 1994.

FUJIKI, E. N. et al. Enxerto liofilizado homólogo em artroplastia de revisão em quadril. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 40, n. 5, p. 280-287, 2005.

GAIGA, L. H. **Osteossíntese de úmero por xenoenxerto ósseo preservado em glicerina a 98% ou mel em pombos domésticos (*Columba livia*).** 2002. 45 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2002.

GALIA, C. R. **Enxertos ósseos liofilizados impactados humanos e bovinos em revisão de artroplastia total de quadril.** 2004. 107 f. Tese (Doutorado em Medicina). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2004.

GARDERET, L. et al. Patients with acute lymphoblastic leukaemia allografted with a matched unrelated donor may have a lower survival with a peripheral blood stem cell graft compared to bone marrow. **Bone Marrow Transplant**, v. 31, p. 23-29, 2003.

GARG, N.; GAUR, S.; SHARMA, S. Percutaneous autogenous bone marrow grafting in 20 cases of ununited fracture. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 64, p. 671-672, 1993.

GARON, E. B. et al. Quantum dot labeling and tracking of human leukemic, bone marrow and cord blood cells. **Leukemia Research**, v. 31, p. 643-651, 2007.

GENGOZIAN, N. Identification and isolation of hemopoietic progenitors. In: FELDMAN, B. F. et al. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. cap. 16, p. 91-96.

GIOSSO, M. A. et al. Análise microbiológica de ossos de cães conservados por longo período de tempo na glicerina a 98% à temperatura ambiente, objetivando a enxertia óssea. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, n. 4, p. 242-246, 2002.

GOLDBERG, V.; STEVENSON, S. Natural history of autografts and allografts. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 225, p. 07-16, 1987.

GOLFIER, F. et al. Fetal bone marrow as a source of stem cells for in utero or postnatal transplantation. **British Journal of Haematology**, v. 109, n. 1, p. 173-181, 2000.

GOSSET, K. A. Anemias associated with drugs and chemicals. In: FELDMAN, B. F. et al. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 185.

GOULD, J. A. **Fisioterapia em ortopedia e medicina do esporte**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1993. p. 704.

GREENBAUM, M. A.; KANAT, I. O. Current concepts in bone healing: review of the literature. **Journal of the American Podiatric Medical Association**, v. 1, p. 123-129, 1993.

GRONTHOS, S. et al. Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. **Journal Cell Science**, v. 116, p. 1827-1835, 2003.

GRUNDEL, R. E. et al. Autogenic bone marrow and porous biphasic calcium phosphate ceramic for segmental bone defects in the canine ulna. **Clinical Orthopaedics**, v. 266, p. 244-258, 1991.

HARREL, K. et al. Canine transfusion reactions: prevention and treatment. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 19, n. 2, p. 193-200, 1997.

HARTNETT, B. J. et al. Transplantation of X-linked severe combined immunodeficient dogs with CD34⁺ bone marrow cells. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 8, n. 4, p. 188-197, 2002.

HASSAN, M. E. et al. Nanodiagnosics: a new frontier for clinical laboratory medicine. **Clinical Chemistry**, v. 52, p. 1238-1246, 2006.

HENRY Jr., W. B.; WADSWORTH, P. L. Diaphyseal allografts in the repair of long bones fractures. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 17, n. 4, p. 525-534, 1981.

HERNDON, D. N. et al. Growth hormones and factors in surgical patients. **Advantage in Surgery**, v. 25, p. 124-127, 1992.

HOFMANN, G. O. et al. Infections and immunological hazards of allogeneic bone transplantation. **Archives of Orthopaedic and Traumatic Surgery**, v. 114, n. 3, p. 159-166, 1995.

HOLMBERG, C. A. Classification of hematopoietic system neoplasia in the dog, **Veterinary Clinical North American Small Animal Practice**, v. 4, p. 697-707, 1985.

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

HULSE, D. A.; JOHNSON, A. L. Fundamentos da cirurgia ortopédica e tratamento de fraturas. In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2005. cap. 28, p. 787-853.

HUSS, R. et al. Evidence of peripheral blood-derived, plasticadherent CD34 (-/low) hematopoietic stem cell clones with mesenchymal stem cell characteristics. **Stem Cells**, v. 18, n. 4, p. 252-260, 2000.

IBÁÑEZ, R. Bone mineral density measurement techniques. **Anales del Sistema Sanitario de Navarra**, v. 26, n. 3, p. 19-27, 2003. Suplemento.

IBRAHIM, T. et al. Cadaveric allograft microbiology. **International Orthopaedics**, v. 28, n. 5, p. 315-318, 2004.

JARES-ERIJIMAN, E. A.; JOVIN, T. M. Imaging molecular interactions in living cells by FRET microscopy. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, p. 409-416, 2006.

JIANG, Y. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, v. 418, p. 41-49, 2002.

JOHNSON, A. L. et al. Preliminary study of ethylene oxide sterilization of full-thickness cortical allografts used in segmental femoral fracture repair. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, n. 5, p. 1050-1056, 1985.

_____; STEIN, L. E. Morphologic comparison of healing patterns in ethylene oxide-sterilized cortical allografts and untreated cortical allografts in the dog. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 1, p. 101-105, 1988.

JULIÁN, M. S.; VALENTÍ, A. Trasplante óseo. **Anales del Sistema Sanitario de Navarra**, v. 29, n. 2, p. 125-136, 2006.

JUNCOSA-MELVIN, N. et al. The effect of autologous mesenchymal stem cells on the biomechanics and histology of gelcollagen sponge constructs used for rabbit patellar tendon repair. **Tissue Engineering**, v. 12, p. 365-369, 2006.

F. JUNIOR, I. et al. **Punção e infusão intra-óssea**. Disponível em:< www.uff.br/ph/artigos/intraossea.pdf >. Acesso em: 29 julho 2008.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. S. F. **Histologia básica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. 468 p.

KADIYALA, S. et al. Culture-expanded, bone marrow-derived mesenchymal stem cells can regenerate a critical-sized segmental bone defect. **Tissue Engineering**, v. 3, n. 2, p. 173-185, 1997.

KERWIN, S. C.; LEWIS, D. D.; ELKINS, A. D. Bone grafting and banking. **Compendium Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 13, n. 10, p. 1558-1563, 1991.

KEY, J. A. The effects of a local calcium depot on osteogenesis and healing of fractures, **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 16A, p. 176-184, 1934.

KIRSCHSTEIN, R. Stem cells: scientific progress and future research directions. [S.l.]: **Department of Health and Human Services**, 2001. Disponível em: <<http://stemcells.nih.gov/info/scireport/2001report>>. Acesso em: 11 junho 2008.

KITOH, H. et al. Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis: a preliminary result of three cases. **Bone**, v. 35, p. 892-898, 2004.

KOGLER, G. et al. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. **Journal Experience Medicine**, v. 200, p. 123-135, 2004.

KON E, et al. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 3, p. 327-337. 2000.

KOVACIC, J. C. et al. Stem-cell therapy for myocardial diseases. **The Lancet Medical Journal**, v. 363, n. 9422, p. 1735-1736, 2004.

KRAUS, K. H.; KIRKER-HEAD, C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. **Veterinary Surgery**, v. 35, p. 232-242, 2006.

KRAUSPENHAR, L. C. **Viabilidade bacteriana no meio de conservação glicerina 98% do tendão calcâneo comum**. 2003. 62 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2003.

LaRUE, S. M. et al. Limb-sparing treatment for osteosarcoma in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 195, n. 12, p. 1734-1744, 1989.

_____. Biópsia óssea. In: BOJRAB, M. J. **Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2005. cap. 48, p. 794-797.

LEOTTE, A. M. et al. Fixação esquelética externa tipo Ia (unilateral-uniplanar) para osteossíntese diafisária de úmero em pombos domésticos (*Columba livia*). **Ciência Rural**, v. 34, n. 6, p. 1865-1870, 2004.

_____. **Fixação esquelética tipo I para osteossíntese diafisária de úmero e resposta inflamatória em pombos domésticos (*Columba livia*)**. 2003. 42 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2003.

LEWIECKI, E. M.; BORGES, J. L. Bone density testing in clinical practice. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, n. 4, p. 586-595, 2006.

LI, Y. et al. The experimental study of histomorphology and biomechanical of cortical strut allograft in proximal femoral. **Zhonghua Wai Ke Za Zhi**, v. 2, n. 42, p. 107-109, jan. 2004.

LINDHOLM, T. S.; RAGNI, P.; LINDHOLM, T. C. Response of bone marrow stroma cells to demineralized cortical bone matrix in experimental spinal fusion in rabbits. **Clinical Orthopaedics**, v. 230, p. 296-302, 1988.

LUCARELLI, E. et al. Bone reconstruction of large defects using bone marrow derived autologous stem cells. **Transfusion and apheresis science**, v. 30, p. 169-174, 2004.

MACEDO, C. A. S. et al. Comparação da resistência à compressão do osso bovino congelado e liofilizado. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 34, n. 9/10, p. 529-534, 1999.

MANKANI, M. H. et al. Pedicled bone flap formation using transplanted bone marrow stromal cells. **Archives of Surgery**, v. 136, p. 263-270, 2001.

MANKIN, H. J.; DOPPELT, S.; TOMFORD, W. Clinical experience with allograft implantation: the first ten years. **Clinical Orthopaedics and related Research**, v. 174, p. 69-86, 1983.

MARSH, J. N. et al. Molecular imaging with targeted perfluorocarbon nanoparticles: quantification of the concentration dependence of contrast enhancement for binding to sparse cellular epitopes. **Ultrasound Medicine Biological**, v. 33, n. 6, p. 950–958, 2007.

MARSH, J. N. et al. Molecular imaging with targeted perfluorocarbon nanoparticles: targeted bone remodeling involves BMU steering as well as activation. **Bone**, v. 40, n. 6, p. 1574-1580, 2007.

MASSUMOTO, C.; MIZUKAMI, S. Autologous bone marrow transplantation and posttransplant immunotherapy. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 33, p. 405-414, 2000.

MAZZANTI, A. et al. Homoimplante ortotópico conservado, associado a terapia “soft laser” na reparação tenopatelar em cão. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 429-437, 2004.

_____. Restauração da traquéia de cães com membrana do cordão umbilical de bovinos conservada em glicerina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 4, p. 316-320, 2000.

_____. Restauração do diafragma de cão com centro tendinoso de ovino conservado em glicerina a 98%. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 38, n. 2, p. 117-120, 2001.

MCKIBBIN, B. The biology of fracture healing in long bones. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 60B, p. 150-162, 1978.

MEARS, D. C. The tissues of the musculoskeletal system; In: **Materials and orthopaedic surgery**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1979. p. 762.

MELO, E. G. et al. Aloenxerto ósseo cortical: avaliação do seu emprego em tibia de cão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, n. 4, p. 385-394, 1998.

MELO, E. G. **Glicerol como meio preservante de aloenxerto ósseo. Estudo experimental em cães (Canis familiaris)**. 1997. 65 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1997.

MENDEZ-OTERO, R. et al. Potential roles of bone marrow stem cells in stroke therapy. **Regenerative Medicine**, v. 2, p. 417-423, 2007.

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.

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.; PROBST, C. W. Moléstias que afetam a consolidação óssea. In: BOJRAB, M. J. **Mecanismos de moléstias na cirurgia de pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1996. cap. 103, p. 816-821.

MORELLO, E. et al. Bone allografts and adjuvant cisplatin for the treatment of canine appendicular osteosarcoma in 18 dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 42, n. 2, p. 6166, 2001.

MORITZ, A. et al. Flow cytometric detection of activated platelets in the dog. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 32, n. 1, p. 6-12, 2003.

MSCHVIDOBADSE, V. M. Allotransplantation sterilisierter Knochen und Halbgelenke bei Knochendefekten. **Zentralblatt für Chirurgie**, v. 103, n. 17, p. 1138-1148, 1978.

MUIR, P.; JOHNSON, K. A. Tibial intercalary allograft incorporation: comparison of fixation with locked intramedullary nail and dynamic compression plate. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 13, n. 1, p. 132-137, 1995.

MULLER, M. et al. Fatigue damage in cortical bone detected using nonlinear ultrasound. **Journal of Biomechanics**, v. 39, p. 9, 2006.

MÜLLER, D. C. M. et al. Técnicas e sítios de coleta de medula óssea em cães e gatos. **Ciência Rural**, v. 39, n. 7, p. 2243-2251, 2009.

MUSCHLER, G.; NAKAMOTO, C.; GRIFFITH, L. G. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 86, n. 7, p. 1541-1557, 2004.

MUSCHLER, G. F. et al. Spine fusion using cell matrix composites enriched in bone marrow-derived cells. **Clinical Orthopaedics**, v. 407, p. 102-118, 2003.

_____, BOEHM, C.; EASLEY, K. Aspiration to obtain osteoblast progenitors cells from human bone marrow: The influence of aspiration volume. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 79A, p. 1699-709, 1997.

_____, MIDURA, R. J. Connective tissue progenitors: Practical concepts for clinical applications. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 395, p. 66-80, 2002.

NAKAGE, A. P. M.; SANTANA, A. E. Células-tronco hematopoiéticas em cães. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 325-329, 2006.

_____ et al. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 966-973, 2005.

NAM, E. K. et al. Biomechanical and histological evaluation of osteochondral transplantation in a rabbit model. **The American Journal and Sports Medicine**, v. 32, n. 2, p. 308-316, 2004.

NATHER, A. Biological healing of large diaphyseal deep-frozen allograft transplants. **Cell and Tissue Banking**, v. 2, n. 1, p. 3-7, 2001.

NATHER, A.; GOH, J. C. H. Biomechanical strength of large diaphyseal deep-frozen allografts: an experimental study. **Cell and Tissue Banking**, v. 1, n. 3, p. 201-206, 2000.

NATHER, A.; THAMBYAH, A.; GOH, J. C. H. Biomechanical strength of deep-frozen versus lyophilized large cortical allografts. **Clinical Biomechanics**, v. 19, n. 5, p. 526-533, 2004.

OKAMOTO, T. et al. Homogeneous implant in rat tibias of matrix preserved in 98% glycerin: histomorphologic study. **Brazilian Dental Journal**, v. 11, n. 2, p. 79-87, 2000.

OLIVEIRA, G. K. **Células-tronco mononucleares autólogas na cicatrização de defeitos tibiais agudos experimentais de cão**. 2008. 50 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2008.

OLIVEIRA, S. T. et al. Implante em aorta abdominal de suíno de artéria pulmonar heteróloga conservada em glicerina. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1263-1264, 2004.

_____ et al. Reparação do ligamento cruzado cranial de cães por tendão homólogo conservado em glicerina e associada a fio de náilon. **Ciência Rural**, v. 33, n. 4, p. 717-723, 2003.

OLSSON, D. C. et al. Colheita de medula óssea em cães: modelo para obtenção da fração total de células mononucleares. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 141-147, 2009.

_____. **Transplante de células-tronco com a fração total de células mononucleares autógenas da medula óssea na reparação aguda primária de tendão calcâneo de cães**. 2008. 175 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2008.

ORTIZ-CRUZ, E. et al. The results of transplantation of intercalary allografts after resection of tumors. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 79A, n. 1, p. 97-106, 1997.

OVERTURF, K. et al. Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative

potential of adult mouse hepatocytes. **American Journal Pathology**, v. 151, p. 1273-1280, 1997.

PALEY, D. Percutaneous bone marrow grafting on fractures and bone defects and experimental study in rabbits. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 208, p. 300-312, 1988.

PANEPUCCI, R. A. et al., Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 22, n. 7, p. 1263-1278, 2004.

PARAK, W. J. et al. Labelling of cells with quantum dots. **Nanotechnology**, v. 16, p. 9-25, 2005.

PARKKALI, T. et al. Collection of autologous blood for bone marrow donation: how useful is it? **Bone Marrow Transplantation**, v. 35, p. 1035-1039, 2005.

PAULO, N. M. **Estudo comparativo entre membrana amniótica de equino preservada em glicerina a 98% e em ácido acético glacial a 0,25% no tratamento de feridas cutâneas experimentais no cão**. 1997. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 1997.

PIERMATEI, D. L.; FLO, G. L. Enxertos ósseos. In: **Manual de ortopedia e tratamento das fraturas dos pequenos animais**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1999. cap. 3, p. 139-145, 1999.

_____; JOHNSON, K. A. The hindlimb. In: _____. **An atlas of surgical approaches to the bones and joints of the dog and cat**. 4. ed. Philadelphia: Saunders, 2004. section 7, p. 329-391.

PIGOSSI, N. et al. Estudo experimental e clínico sobre o emprego como implante de dura-máter homóloga conservada em glicerina a temperatura ambiente. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 17, n. 8, p. 263-78, 1971.

PINTO JÚNIOR, H. S. **Utilização de enxerto ósseo homólogo preservado em tintura de iodo a 2% na reparação de fraturas cominutivas de ossos longos de cães**. 1995. 75 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 1995.

_____. **Utilização de enxertos ósseos homólogos preservados na reparação de fraturas cominutivas de ossos longos de cães**. 1990. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 1990.

PIZZO, P. A.; POPLACK, D. G. **Principles and practice of pediatric oncology**. Filadelfia: Lippincott Williams & Wilkins. 2005. 1780 p.

POTIER, E.; PETITE, H. Utilisation thérapeutique des cellules souches en orthopédie.

Pathologie Biologie, v. 53, p. 142-148, 2005.

PRANKE, P. et al. Hematologic and immunophenotypic characterization of human umbilical cord blood. **Acta Haematologica**, v. 105, p. 71-76, 2001.

QUANTIFICATION of the concentration dependence of contrast enhancement for binding to sparse cellular epitopes. **Ultrasound Medicine Biological**, v. 33, n. 6, p. 950-958, 2007.

RAISER, A. G. et al. Homoimplante ortotópico de tendão calcâneo em cães: conservação, assepsia e implantação. **Ciência Rural**, v. 31, n. 1, p. 89-94, 2001.

_____. **Homoimplante ortotópico de tendão calcâneo comum, conservado em glicerina a 98%, e tratado com radiação laser Arseneto de Gálio, sob dois métodos de imobilização, em cães**. 2000. 88 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2000.

_____. Infecções Cirúrgicas. In: _____ Patologia cirúrgica veterinária. 2. ed. Santa Maria. Ed. UFSM, 1995. v. 1, cap. 4, p. 101-113.

RAMASAMY, J. G.; AKKUS, O. Local variations in the micromechanical properties of mouse femur: the involvement of collagen fiber orientation and mineralization. **Journal of Biomechanics**, v. 39, p. 1-9, 2006.

RANDALL, R. L. et al. Sequential dependence of freeze-drying and irradiation on biomechanical properties of rat bone. **The American Journal of Orthopedics**, v. 31, n. 3, p. 129-34, 2002.

RANZANI, J. J. T. et al. Implante de pericárdio de equino preservado em glicerina em solução de continuidade do diafragma de cão. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 27, n. 1, p. 65-73, 1990.

RAPPETI, J. C. S. et al. Reconstituição experimental da parede torácica de gatos com implante heterógeno de cartilagem auricular conservada em glicerina a 98%. **Ciência Rural**, v. 33, n. 6, p. 1089-1094, 2003.

RASKIN, R. Medula óssea. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Manole, 1998. cap. 64, p. 1135-1142.

REILLY, G. C.; CURREY, J. D. The effects of damage and microcracking on the impact strength of bone. **Journal of Biomechanics**, v. 33, p. 337-343, 2000.

REMIGER, A. R. et al. The torsional strength of bones with residual screw holes from plates with unicortical and bicortical purchase. **Clinical Biomechanics**, v. 12, n. 1, p. 71-77, 1997.

REYES, M. et al. Origin endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. **Journal of Clinical Investigation**, v. 109, p. 227-346, 2002.

REYNOLDS, F. C. et al. Clinical evaluation of the merthiolate bone bank and homogenous bone graft. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 33, p. 873-877, 1951.

ROCO M. C. Environmentally responsible development of nanotechnology. **Environment Science Technology**, v. 39, n. 5, p. 106–112, 2005.

ROE, S. Fixação interna das fraturas. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 3. ed. Manole: São Paulo, 2007. v. 2, cap. 124, p. 1798 – 1817.

ROE, S. C.; PIJANOWSKI, G. J.; JOHNSON, A. L. Biomechanical properties of canine cortical bone allografts: effects of preparation and storage. **American Journal Veterinary Research**, v. 49, n. 6, p. 873-877, 1988.

RYAN, A. S. et al. Regional bone mineral density after resistive training in young and older men and women. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 14, n. 1, p. 16-23, 2004.

SALBEGO, F. Z. et al. Substituição do ligamento cruzado cranial por segmento teno-ósseo homólogo conservado em glicerina a 98%: estudo experimental em cães. **Ciência Rural**, v. 37, n. 2, p. 438-442, 2007.

_____. Teste de resistência biomecânica de implantes ósseos corticais conservados em glicerina a 98% e submetidos a diferentes tempos de reidratação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 1, p. 77-78, 2006.

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

SANTIAGO, R. C.; VITRAL, R. W. F. Métodos de avaliação da densidade mineral óssea e seu emprego na odontologia. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria Clínica Integrada**, v. 6, n. 3, p. 289-294, 2006.

SCHENA, C. J.; McCURNIN, D. M. The use of Fresh cortical and cancellous allografts in the repair of a fractured femur in a dog: a case report. **Journal of the American Hospital Association**, v. 19, n. 3, p. 352-358, 1983.

_____; MITTEN, R. W.; HOEFLE, W. D. Segmental freeze-dried and fresh cortical allografts in the canine femur. I-a sequential radiographic comparison over a one-year time interval. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 20, n. 6, p. 911-922, 1984.

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

SCHIMIDT, S. S. et al. **Biomechanical evaluation of fracture fixation methods**. Disponível em: <<http://www.guide.stanford.edu/publication/dev7.html-7k>>. Acesso em: 16 set. 2008.

SCHWINDT, T. T. et al. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células tronco. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 16, n. 1, p. 13-19, 2005.

SEGUR, J. M. et al. The procurement team as a factor of bone allograft contamination. **Cell and Tissue Banking**, v. 1, n. 2, p. 117-119, 2000.

SHARMA, S. et al. Percutaneous bone marrow grafting of osteotomies and bony defects in rabbits. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 63, n. 2, p. 166-169, 1992.

SHIPP, K. M. Exercise for people with osteoporosis: translating the science into clinical practice. **Current Osteoporosis Report**, v. 4, n. 4, p. 129-133, 2006.

SIENA, S. et al. Circulation of CD34+ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **Blood**, v. 74, n. 6, p. 1905-1914, 1989.

SILVA, A. V.; VOLPON, J. B. Modelo de suspensão pela cauda e seu efeito em algumas propriedades mecânicas do osso do rato. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 12, n. 1, p. 22-31, 2004.

SILVEIRA, C. D. et al. Stem cell therapy for cardiology: a new path to humanity and a new care for nurses - a case report. **Brazilian Journal of Nursing**, v. 4 n. 1, np, 2006.

SINIBALDI, K. R. Evaluation of full cortical allografts in 25 dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 194, n. 11, p. 1570-1577, 1989.

SOUZA, L. C. G. et al. A comparação entre o transplante de células tronco mononucleares e mesenquimais no infarto do miocárdio. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 20, n. 3, p. 270-278, 2005.

SOUZA, S. A. **Ensaios mecânicos de materiais metálicos**. São Paulo: E. Blücher, 1974. 235p.

STEVENSON, A. Enxertos ósseos. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1998. v. 2, cap. 127, p. 2006-2017.

STEVENSON, S. Biology of bone grafts. **Orthopedic clinics of north america**, v. 30, p. 543, 1999.

_____. Enhancement of fracture healing with autogenous and allogeneic bone grafts. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 355, p. 239-246, 1998.

_____. Enxertadura óssea. In: BOJRAB, M. J. **Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2005. v. 1, p. 786-793.

_____, LI, X. Q., DAVY, D. T. Critical biological determinants of incorporation of non-vascularized cortical bone grafts. Quantification of a complex process and structure. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 79A, n. 1, p. 1-16, 1997.

_____; EMERY, S. E.; GOLDBERG, V. M. Factors affecting bone graft incorporation. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 323, p. 66-74, 1996.

_____; HOROWITZ, M. Current concepts review the response to bone allografts. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 74A, n. 6, p. 939-950, 1992.

_____; LI, X. Q.; MARTIN, B. The fate of cancellous and cortical bone after transplantation of fresh and frozen tissue-antigen-matched and mismatched osteochondral allografts in dogs. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 73A, n. 8, p. 1143-1156, 1991.

STRAW, R. C. et al. The effect of intramedullary polymethylmethacrylate on healing of intercalary cortical allografts in a canine model. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 10, n. 3, p. 434-439, 1992.

SUTER, S. E. et al. Isolation and characterization of pediatric canine bone marrow CD34+ cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 101, p. 31-47, 2004.

TAJBAKSHI, S. Stem cells to tissue: molecular, cellular and anatomical heterogeneity in skeletal muscle. **Current Opinion General Development**, v. 13, p. 413-422, 2003.

TAKAHASHI, M. et al. The degree of osteoporosis in patients with vertebral fracture and patients with hip fracture: relationship to incidence of vertebral fracture. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**. v. 17, n. 3, p. 187-194, 1999.

TAY, B. K. et al. Use of collagenhydroxyapatite matrix in spinal fusion. A rabbit model. **Spine**, v. 23, p. 2276-2281, 1998.

TEIXEIRA, C. R. et al. Tibial segmental bone defect treated with bone plate and cage filled with either xenogenic composite or autologous cortical bone graft. An experimental study in sheep. **Veterinary and Comparative Orthopaedics Traumatology**, v. 20, n. 4, p. 269-276, 2007.

THOMPSON Jr, R. C. et al. Fractures in large segment allografts. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 370, p. 227-235, 2000.

TIEDMAN, J. et al. Treatment of nonunion by percutaneous injection of bone marrow

and desmineralized bone matrix: An experimental study in canines. **Clinical Orthopaedics**, v. 268, p. 294-302, 1991.

TOGNOLI, G. K. et al. Transplante autólogo de células mononucleares da medula óssea em úlcera de córnea experimental em cães. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 148-155, 2009.

_____. Autotransfusão sangüínea na colheita de medula óssea em cães. In: SIMPÓSIO MULTIDISCIPLINAR SOBRE CÉLULAS-TRONCO, 2007, São Paulo, SP. **Anais...** São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, 2007. n. 2. v. 60, p. 31-32.

_____. Transplante autólogo de células mononucleares da medula óssea em úlcera de córnea experimental em cães. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 148-155, 2009.

TOMFORD, W. W.; STARKWEATHER, R. J.; GOLDMAN, M. H. A study of the clinical incidence of infection in the use of banked allograft bone. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 63A, n. 2, p. 244-248, 1981.

TOOMBS, J. P.; WALLACE, L. J. Evaluation of autogenic and allogenic cortical chip grafting in a feline tibial nonunion model. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, n. 2, p. 519-528, 1985.

TUDURY, E. A.; RAISER, A. G. Redução de fraturas distais de fêmur de cães, empregando dois pinos de Steinmann em substituição aos de Rush. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, v. 15, n. 2, p. 141-155, 1985.

VAN BOERUM, D. H. et al. Rotational stability of a modified step-cut for use in intercalary allografts. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 85, n. 6, p. 1073-1078, 2003.

VANDER GRIEND, R. A. The effect of internal fixation on the healing of large allografts. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 76A, n. 5, p. 657-663, 1994.

VEHMEYER, S. et al. Bacterial contamination in postmortem bone donors. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 73, n. 6, p. 678-683, 2002.

VERFAILLIE, C. M. et al. Stem cells: hype and reality. **Hematology**, v. 1, p. 369-391, 2002.

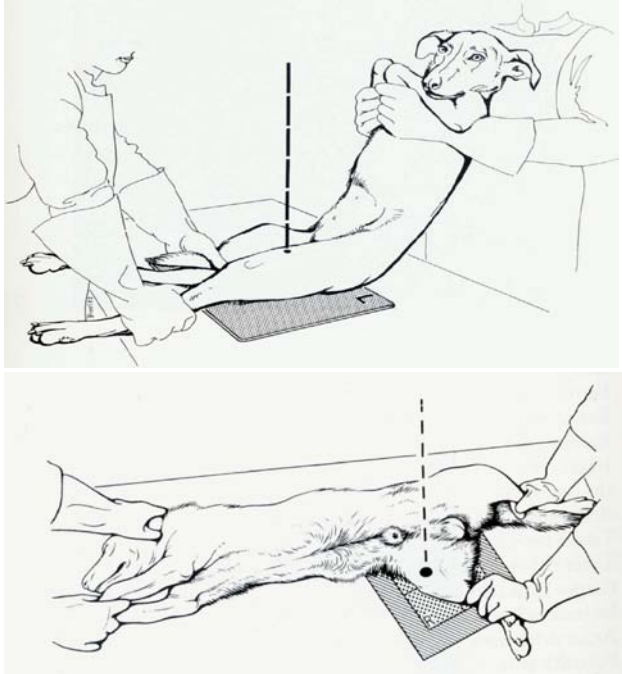
VOLLWEILER, J. L. et al. Hematopoietic stem cell gene therapy: progress toward therapeutic targets. **Bone Marrow Transplantation**. v. 32, p. 1-7, 2003.

WACHTER, N. J. et al. Prediction of strenght of cortical bone *in vitro* by microcomputed tomography. **Clinical Biomechanics**, v. 16, p. 252-256, 2001.

WADSWORTH, P. L.; HENRY Jr., W. B. Entire segment cortical bone transplant. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 12, n. 6, p. 741-745, 1976.

- WAGNER, S. D. et al. Failure of ethylene oxide-sterilized cortical allografts in two dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 30, n. 2, p. 181-189, 1994.
- WANG, J. W.; WENG, L. H. Treatment of distal femoral nonunion with internal fixation, cortical allograft struts, and autogenous bone-grafting. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 85A, n. 3, p. 436-440, 2003.
- WEIGEL, J. P. Enxerto ósseo. In: BOJRAB, M. J. **Mecanismos da moléstia na cirurgia dos pequenos animais**. São Paulo: Manole, 1996. cap. 98, p. 791-798.
- WEINSTEIN, S.; BUCKWALTER, J. A. Musculoskeletal tissue healing. In: TUREK, J. C. **Orthopaedics: principles and their application**. 6. ed. Philadelphia: Williams and Wilkins, 2003. p. 31-112.
- WERNTZ J. R. et al. Qualitative and quantitative analysis of orthotopic bone regeneration by marrow. **Journal Orthopaedic Research**, n. 14, p. 85-93, 1996.
- WHEELER, D. L. et al. Biomechanical evaluation of retrieved massive allografts: preliminary results. **Biomedical Sciences Instrumentation**, n. 37, p. 251-256, 2001.
- WIJewardana, V. et al. Isolation and characterization of hematopoietic progenitor cells in canine bone marrow. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 115, p. 3-4, 2007.
- WU, X.; BRUCHEZ, M. P. Labeling cellular targets with semiconductor quantum dot conjugates. **Methods in cell biology**, v. 75, p. 171-183, 2004.
- YAMAMOTO, N. et al. Effects of liquid nitrogen treatment on the proliferation of osteosarcoma and the biomechanical properties of normal bone. **Journal of Orthopaedic Science**, v. 8, n. 3, p. 374-380, 2003.
- YOO, J. U.; JOHNSTONE, B. The role of osteochondral progenitor cells in fracture repair. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 1, p. 73-81, 1998. Suplemento.
- YUAN, J. et al. Repair of mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and porous β -tricalcium phosphate. **Biomaterials**, v. 28, p. 1005-1013, 2007.
- ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. **Células-tronco: a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006. 245 p.
- ZILIOTTO, L. et al. Utilização de implante ósseo cortical alógeno conservado em glicerina para preservação de membro torácico: estudo experimental em cães. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, n. 2, p. 107-115, 2003.

APÊNDICE 01

FICHA DE EXAME RADIOGRÁFICO			
Numero do Cão:		Posicionamento	
Nome:			
Grupo Cirurgia:			
Posicionamento			
Antero- Posterior	Médio-Lateral		
Ambos os Membros	Ambos os Membros		
Membro Operado:			
Protocolo Radiológico (Normal)			
Ma:			
Kv:			
Tempo:			
Protocolo Radiológico (Pós-Imediato)			
Ma:			
Kv:			
Tempo:			
Controle de Exame Radiográfico			
Período	Data	Código RX	Responsável (Rubrica)
Pré-Operatório			
Pós-Imediato			
Pós - 15 dias			
Pós - 30 dias			
Pós - 45 dias			
Pós - 60 dias			
Pós - 75 dias			
Pós - 90 dias			
OBSERVAÇÕES			

APÊNDICE 02

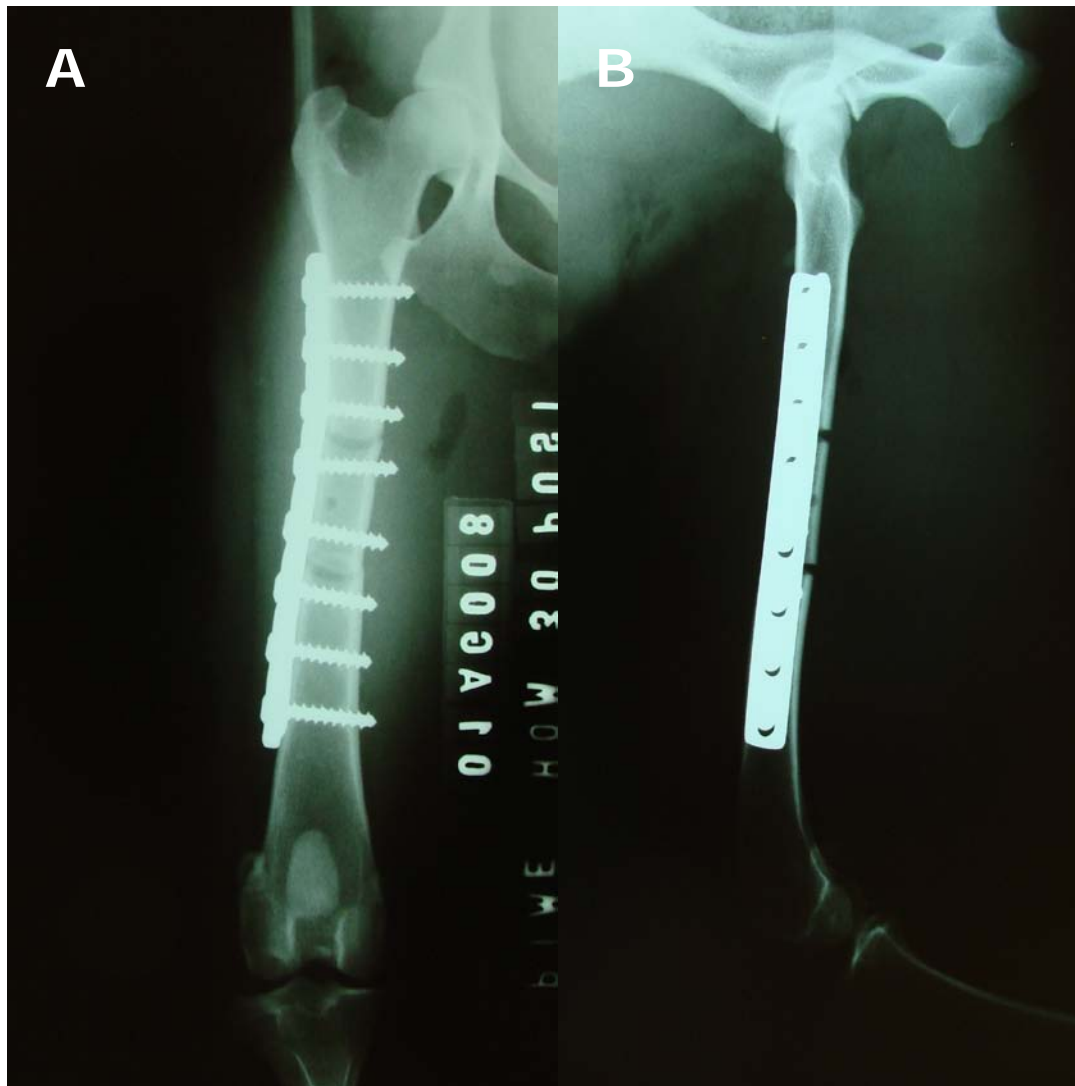
ENXERTO OU IMPLANTE HOMÓLOGO NA CORREÇÃO DE DEFEITO ÓSSEO SEGMENTAR FEMORAL EM CÃES ASSOCIADO A INOCULAÇÃO DA FRAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA

ANÁLISE RADIOGRÁFICA QUANTITATIVA E CEGA.

INSTRUÇÕES PARA AVALIAÇÃO

- A metodologia do trabalho inclui a colocação de enxerto autólogo ou implante homólogo na diáfise femoral esquerda de cães, associado ou não a fração de células mononucleares da medula óssea;
- As radiografias do fêmur esquerdo de todos os animais foram realizadas sob condição de anestesia geral, tanto na incidência crânio-caudal como médio-lateral, como consta na figura 01;
- As radiografias com incidência médio-lateral foram realizadas com os animais em decúbito lateral esquerdo;
- As radiografias foram posicionadas em um negatoscópio e digitalizadas com auxílio de uma câmera fotográfica Sony h-5, em resolução de 5.0 megapixel e a uma distância focal de 50cm. Posteriormente, as fotos foram editadas em um software de imagem para conferir o correto posicionamento das imagens, visando facilitar a análise das mesmas. No entanto, não foram realizadas quaisquer alterações nos padrões de cor, brilho ou contraste das imagens;
- O cd em anexo consta de 20 pastas, cada qual referente a um animal. Cada pasta contém subpastas que indicam os diferentes períodos de avaliação;
- A avaliação do grau de consolidação óssea será realizada de forma independente para as interfaces osso-implante proximal e distal;
- Segue abaixo a Tabela 01, graduada de 1 – 5, a qual pedimos que os Senhores se baseiem para dar a cada interface estudada uma pontuação (modificada de COOK et al., 2004).
- A tabela 02, consta de uma ficha de avaliação seguida com espaço para observações pertinentes;
- Pedimos que, se possível, ao usar o espaço destinado às observações, o façam de maneira distinta, referindo-se separadamente às interfaces proximal e distal, ou ambas.

FIGURA 01 – A – Incidência Cranio-caudal. B – Incidência médio-lateral.



APÊNDICE 04

AVALIAÇÃO DEAMBULATÓRIA

GRAU	DESCRIÇÃO
I	não usa e nem apóia o membro;
II	uso e apoio infreqüentes dos membros durante estação e ao caminhar, deitando-se com freqüência. Não sustenta o peso no membro afetado elevando-os ao correr (carrinho anterior);
III	uso claudicante do membro na estação e ao caminhar. Sustentação parcial do peso, elevando o membro ao correr;
IV	caminha sem claudicar e posiciona-se normal em estação. Claudica ao correr sem elevar o membro;
V	uso funcional do membro.

Modificado de TUDURY e RAISER (1985).

APÊNDICE 05

FICHA AVALIAÇÃO DEAMBULATORIA		
Numero Cão:	Nome:	Peso:
Data Cirurgia:		
Grupo Enxerto:		
Grupo CT:		
Parâmetro de Avaliação		
Graus de Claudicação	Avaliação	
Grau I	Não usa e nem apóia o membro	
Grau II	Uso e apoio infrequente dos membros durante estação e ao caminhar, deitando-se com frequência. Não sustenta o peso no membro afetado elevando-os ao correr (carrinho anterior);	
Grau III	Uso claudicante do membro na estação e ao caminhar. Sustentação parcial do peso, elevando o membro ao correr	
Grau IV	Caminha sem claudicar e posiciona-se normalmente em estação. Claudica ao correr sem elevar o membro	
Grau V	Uso funcional do membro	
Modificado de TUDURY e RAISER (1985).		
Avaliação Deambulatoria		
Semana	Grau	
	Avaliação 01	Avaliação 02
1°		
2°		
3°		
4°		
5°		
6°		
7°		
8°		
9°		
10°		
11°		
12°		
OBSERVAÇÕES PERTINENTES:		

APÊNDICE 06

GRUPO I				
Fragmento Ósseo	Volume Osso (mm³)	Resistência (Kgf)	Densidade	Desvio Padrão
01	756	485,90	1810,2	232,5
02	616	499,63	1621,2	319,3
03	1035	643,79	1925,8	67,6
04	945	451,57	1534,5	50,5
05	700	691,85	1795,0	277,5
06	759	499,63	1800,5	257,9
07	784	733,04	1663,0	115,3
08	252	485,90	1439,8	89,6
09	225	863,47	1464,7	138,6
10	133	355,46	1439,6	452,6
11	700	836,01	1626,8	68,1
12	693	540,82	1891,6	129,1
13	948	884,07	1156,6	697,9
14	630	849,74	2086,2	177,0
15	616	993,91	1541,8	374,0
16	280	540,82	1359,2	73,2
17	200	362,33	1484,9	623,2
18	400	575,14	1359,7	667,4

APÊNDICE 06 - continuação

GRUPO II				
Fragmento Ósseo	Volume Osso (mm³)	Resistência (Kgf)	Densidade	Desvio Padrão
01	225	602,60	1864,2	208,7
02	500	760,50	1570,6	107,0
03	560	877,20	1694,0	197,6
04	450	623,20	1667,0	532,9
05	200	733,04	1857,6	159,9
06	819	945,85	1634,5	270,3
07	133	506,49	1687,5	212,8
08	500	575,14	1546,8	154,8
09	396	568,28	1800,9	159,9
10	324	540,82	1641,0	160,6
11	270	485,90	1559,0	521,1
12	560	760,50	1507,2	351,3
13	333	650,66	1534,2	546,3
14	450	582,01	1268,2	442,9
15	396	753,63	1505,3	369,3
16	600	849,74	1896,2	97,6
17	259	348,60	1596,9	542,2
18	352	829,15	1837,4	204,2

APÊNDICE 06 - continuação

GRUPO III				
Fragmento Ósseo	Volume Osso (mm³)	Resistência (Kgf)	Densidade	Desvio Padrão
01	440	698,71	1233,0	707,5
02	500	582,01	1582,2	411,6
03	450	470,35	1642,0	150,2
04	600	726,17	1713,6	338,4
05	400	719,31	1520,2	443,4
06	440	636,93	1444,4	259,7
07	200	389,79	1382,2	282,6
08	333	643,79	1483,3	341,1
09	198	485,90	1322,3	467,0
10	693	980,18	1789,2	125,8
11	296	698,71	1414,8	131,0
12	396	554,55	1299,0	580,9
13	440	588,87	1371,0	170,3
14	396	712,44	1727,5	132,2
15	500	849,74	1364,6	162,3
16	360	382,92	1779,3	196,0
17	296	307,41	1134,0	344,2
18	396	513,36	1471,3	293,2

APÊNDICE 06 - continuação

GRUPO IV				
Fragmento Ósseo	Volume Osso (mm³)	Resistência (Kgf)	Densidade	Desvio Padrão
01	804	1021,37	1596,7	122,8
02	440	657,52	1526,7	217,9
03	300	424,11	1538,0	459,0
04	280	492,76	1773,3	45,1
05	2204	472,17	1431,8	502,3
06	176	444,71	1609,0	232,0
07	176	444,71	1601,5	148,7
08	200	444,71	1878,4	387,8
09	200	479,03	1323,2	470,2
10	500	475,14	1931,0	256,7
11	182	321,14	1605,0	554,8
12	152	492,76	1471,3	135,8
13	400	376,06	1520,2	158,5
14	192	437,84	1534,0	61,8
15	913	1261,64	1577,4	209,7
16	300	520,22	1191,8	228,4
17	152	506,49	1856,7	640,6
18	450	678,12	1765,2	104,4

APÊNDICE 06 - continuação

GRUPO V				
Fragmento Ósseo	Volume Osso (mm³)	Resistência (Kgf)	Densidade	Desvio Padrão
01	400	925,26	1769,3	227,7
02	897	836,01	1753,5	495,7
03	324	623,20	1799,0	658,8
04	448	1035,10	1798,3	225,4
05	390	664,39	1868,2	627,5
06	351	568,28	1684,0	887,1
07	360	767,36	1659,3	116,0
08	670	1062,56	1629,3	92,4
09	312	458,44	1566,8	514,6
10	996	1268,51	1721,7	148,8
11	484	712,44	1343,5	51,5
12	234	582,01	1524,2	239,1
13	828	787,96	1915,4	259,3
14	225	602,60	1437,3	110,1
15	504	938,99	1554,7	451,3
16	152	485,90	1186,8	188,5
17	225	485,90	1325,0	161,6
18	966	1254,78	1596,0	506,7

APÊNDICE 06 - continuação

GRUPO VI				
Fragmento Ósseo	Volume Osso (mm³)	Resistência (Kgf)	Densidade	Desvio Padrão
01	450	678,12	1397,0	421,2
02	630	870,34	1905,3	123,6
03	400	877,20	1959,7	430,9
04	400	1021,73	1498,6	124,7
05	288	506,49	1510,8	288,5
06	564	904,66	1643,9	619,6
07	270	856,61	1522,8	99,6
08	1162	815,42	1434,0	40,1
09	580	856,61	1762,0	205,7
10	440	540,82	1739,9	55,0
11	500	877,20	1584,7	51,7
12	250	362,33	1759,0	197,5
13	296	417,25	1568,5	101,8
14	250	444,71	2095,3	234,2
15	351	630,06	1985,7	177,2
16	252	595,74	2022,8	179,5
17	390	664,39	1509,7	536,0
18	913	1604,89	1745,0	85,6

APÊNDICE 07

Volume do Osso			Comparação Múltipla:					
Teste Kruskal Wallis: $H(5, N=108) = 8,638$ $p = 0,1244$ – Aceita-se H_0 Ou seja, não existe diferença significativa entre os grupos			observa-se que não existe diferença significativa entre os grupos analisados					
Grupo	N	Soma dos Rank	1	2	3	4	5	6
			R:70,028	R:51,167	R:52,528	R:40,167	R:56,972	R:56,139
1	18	1260,50		1,000	1,000	0,064	1,000	1,000
2	18	921,00	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000
3	18	945,50	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000
4	18	723,00	0,064	1,000	1,000		1,000	1,000
5	18	1025,50	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000
6	18	1010,5	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	

Resistência Kgf			Comparação Múltipla:					
Teste Kruskal Wallis: $H(5, N=108) = 15,5276$ $p = 0,0832$ – Aceita-se-se H_0 Ou seja, não existe diferença significativa entre os grupos			observa-se que não existe diferença significativa entre os grupos analisados					
Grupo	N	Soma dos Rank	1	2	3	4	5	6
			R:50,750	R:59,083	R:49,194	R:33,389	R:69,500	R:65,083
1	18	913,50		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
2	18	1063,50	1,000		1,000	0,208	1,000	1,000
3	18	885,50	1,000	1,000		1,000	0,777	1,000
4	18	601,00	1,000	0,208	1,000		0,088	0,063
5	18	1251,00	1,000	1,000	0,777	0,088		1,000
6	18	1171,50	1,000	1,000	1,000	0,063	1,000	

Densidade			Comparação Múltipla:					
Teste Kruskal Wallis: $H(5, N=108) = 10,27329$ $p = 0,0679$ – Rejeita-se H_0 Ou seja, existe diferença significativa entre os grupos			observa-se que não existe diferença significativa entre os grupos analisados					
Grupo	N	Soma dos Rank	1	2	3	4	5	6
			R:54,111	R:62,056	R:35,111	R:52,944	R:57,556	R:65,222
1	18	974,00		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
2	18	1117,00	1,000		0,148	1,000	1,000	1,000
3	18	632,00	1,000	0,148		1,000	0,474	0,059
4	18	953,00	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000
5	18	1036,00	1,000	1,000	0,474	1,000		1,000
6	18	1174,00	1,000	1,000	0,059	1,000	1,000	

APÊNDICE 08

IP- 0 dias			Comparação Múltipla:			
Teste Kruskal Wallis: $H(3, N=60) = 0,000$ $p = 1,0000$ – Aceita-se H_0 Ou seja, não existe diferença significativa entre os grupos			observa-se que não existe diferença significativa entre os grupos analisados			
Grupo	N	Soma dos Rank	TA	TH	CA	CH
			30,50	30,50	30,50	30,50
Tratado Autólogo	15	457,50		1,000	1,000	1,000
Tratado Homólogo	15	457,50	1,000		1,000	1,000
Controle Autólogo	15	457,50	1,000	1,000		1,000
Controle Homólogo	15	457,50	1,000	1,000	1,000	
ID- 0 dias			Comparação Múltipla:			
Teste Kruskal Wallis: $H(3, N=60) = 0,000$ $p = 1,0000$ – Aceita-se H_0 Ou seja, não existe diferença significativa entre os grupos			observa-se que não existe diferença significativa entre os grupos analisados			
Grupo	N	Soma dos Rank	TA	TH	CA	CH
			30,50	30,50	30,50	30,50
Tratado Autólogo	15	457,50		1,000	1,000	1,000
Tratado Homólogo	15	457,50	1,000		1,000	1,000
Controle Autólogo	15	457,50	1,000	1,000		1,000
Controle Homólogo	15	457,50	1,000	1,000	1,000	
IP- 15 dias			Comparação Múltipla:			
Teste Kruskal Wallis: $H(3, N=60) = 4,076364$ $p = 0,2533$ – Aceita-se H_0 Ou seja, não existe diferença significativa entre os grupos			observa-se que não existe diferença significativa entre os grupos analisados			
Grupo	N	Soma dos Rank	TA	TH	CA	CH
			R:34,00	R:30,00	R:28,00	R:30,00
Tratado Autólogo	15	510,00		1,000	1,000	1,000
Tratado Homólogo	15	450,00	1,000		1,000	1,000
Controle Autólogo	15	420,00	1,000	1,000		1,000
Controle Homólogo	15	450,00	1,000	1,000	1,000	
ID- 15 dias			Comparação Múltipla:			
Teste Kruskal Wallis: $H(3, N=60) = 3,7953$ $p = 0,2844$ – Aceita-se H_0 Ou seja, não existe diferença significativa entre os grupos			observa-se que não existe diferença significativa entre os grupos analisados			
Grupo	N	Soma dos Rank	TA	TH	CA	CH
			R:29,00	R:31,00	R:33,00	R:29,00
Tratado Autólogo	15	435,00		1,000	1,000	1,000
Tratado Homólogo	15	465,00	1,000		1,000	1,000
Controle Autólogo	15	495,00	1,000	1,000		1,000
Controle Homólogo	15	435,00	1,000	1,000	1,000	

APÊNDICE 08 - continuação

IP- 30 dias			Comparação Múltipla:			
Teste Kruskal Wallis: $H(3, N=60) = 1,1545$ $p = 0,7639$ – Aceita-se H_0 Ou seja, não existe diferença significativa entre os grupos			observa-se que não existe diferença significativa entre os grupos analisados			
Grupo	N	Soma dos Rank	TA	TH	CA	CH
			R:31,97	R:33,10	R:27,60	R:29,33
Tratado Autólogo	15	479,50		1,000	1,000	1,000
Tratado Homólogo	15	496,50	1,000		1,000	1,000
Controle Autólogo	15	414,00	1,000	1,000		1,000
Controle Homólogo	15	440,00	1,000	1,000	1,000	
ID- 30 dias			Comparação Múltipla:			
Teste Kruskal Wallis: $H(3, N=60) = 1,731955$ $p = 0,6299$ – Aceita-se H_0 Ou seja, não existe diferença significativa entre os grupos			observa-se que não existe diferença significativa entre os grupos analisados			
Grupo	N	Soma dos Rank	TA	TH	CA	CH
			R:26,00	R:32,20	R:32,80	R:31,00
Tratado Autólogo	15	390,00		1,000	1,000	1,000
Tratado Homólogo	15	483,00	1,000		1,000	1,000
Controle Autólogo	15	492,00	1,000	1,000		1,000
Controle Homólogo	15	465,00	1,000	1,000	1,000	
IP- 45 dias			Comparação Múltipla:			
Teste Kruskal Wallis: $H(3, N=60) = 2,365751$ $p = 0,500$ – Aceita-se H_0 Ou seja, não existe diferença significativa entre os grupos			observa-se que não existe diferença significativa entre os grupos analisados			
Grupo	N	Soma dos Rank	TA	TH	CA	CH
			R:30,00	R:32,17	R:34,20	R:25,63
Tratado Autólogo	15	450,00		1,000	1,000	1,000
Tratado Homólogo	15	482,50	1,000		1,000	1,000
Controle Autólogo	15	513,00	1,000	1,000		1,000
Controle Homólogo	15	384,50	1,000	1,000	1,000	
ID- 45 dias			Comparação Múltipla:			
Teste Kruskal Wallis: $H(3, N=60) = 3,802242$ $p = 0,2836$ – Aceita-se H_0 Ou seja, não existe diferença significativa entre os grupos			observa-se que não existe diferença significativa entre os grupos analisados			
Grupo	N	Soma dos Rank	TA	TH	CA	CH
			R:27,30	R:34,70	R:34,53	R:25,47
Tratado Autólogo	15	409,50		1,000	1,000	1,000
Tratado Homólogo	15	520,50	1,000		1,000	0,886
Controle Autólogo	15	518,00	1,000	1,000		0,931
Controle Homólogo	15	382,00	1,000	0,886	0,931	

APÊNDICE 08 - continuação

IP- 60 dias Teste Kruskal Wallis: $H(3, N=60) = 5,551487$ $p = 0,1356$ – Aceita-se H_0 Ou seja, não existe diferença significativa entre os grupos			Comparação Múltipla: observa-se que não existe diferença significativa entre os grupos analisados			
Grupo	N	Soma dos Rank	TA	TH	CA	CH
			R:35,93	R:28,90	R:34,23	R:22,93
Tratado Autólogo	15	539,00		1,000	1,000	0,249
Tratado Homólogo	15	433,50	1,000		1,000	1,000
Controle Autólogo	15	513,50	1,000	1,000		0,458
Controle Homólogo	15	344,00	0,249	1,000	0,458	
ID- 60 dias Teste Kruskal Wallis: $H(3, N=60) = 5,099656$ $p = 0,1646$ – Aceita-se H_0 Ou seja, não existe diferença significativa entre os grupos			Comparação Múltipla: observa-se que não existe diferença significativa entre os grupos analisados			
Grupo	N	Soma dos Rank	TA	TH	CA	CH
			R:28,53	R:29,73	R:38,50	R:25,23
Tratado Autólogo	15	428,00		1,000	0,708	1,000
Tratado Homólogo	15	446,00	1,000		1,000	1,000
Controle Autólogo	15	577,50	0,708	1,000		0,225
Controle Homólogo	15	378,50	1,000	1,000	0,225	
IP- 75 dias Teste Kruskal Wallis: $H(3, N=60) = 11,44910$ $p = 0,0895$ – Aceita-se H_0 Ou seja, não existe diferença significativa entre os grupos			Comparação Múltipla: observa-se que não existe diferença significativa entre os grupos analisados			
Grupo	N	Soma dos Rank	TA	TH	CA	CH
			R:41,00	R:29,10	R:31,43	R:20,47
Tratado Autólogo	15	615,00		0,372	0,801	0,088
Tratado Homólogo	15	436,50	0,372		1,000	1,000
Controle Autólogo	15	471,50	0,801	1,000		0,513
Controle Homólogo	15	307,00	0,088	1,000	0,513	
ID- 75 dias Teste Kruskal Wallis: $H(3, N=60) = 7,011469$ $p = 0,0715$ – Aceita-se H_0 Ou seja, não existe diferença significativa entre os grupos			Comparação Múltipla: observa-se que não existe diferença significativa entre os grupos analisados			
Grupo	N	Soma dos Rank	TA	TH	CA	CH
			R:30,63	R:30,07	R:38,87	R:22,43
Tratado Autólogo	15	459,50		1,000	1,000	1,000
Tratado Homólogo	15	451,00	1,000		1,000	1,000
Controle Autólogo	15	583,00	1,000	1,000		0,060
Controle Homólogo	15	336,50	1,000	1,000	0,060	

APÊNDICE 08 - continuação

IP- 90 dias			Comparação Múltipla:			
Teste Kruskal Wallis: $H(3, N=60) = 8,180234$ $p = 0,0642$ – Aceita-se H_0 Ou seja, não existe diferença significativa entre os grupos			observa-se que não existe diferença significativa entre os grupos analisados			
Grupo	N	Soma dos Rank	TA	TH	CA	CH
			R:39,67	R:29,37	R:30,83	R:22,13
Tratado Autólogo	15	595,00		0,638	0,996	0,063
Tratado Homólogo	15	440,50	0,638		1,000	1,000
Controle Autólogo	15	462,50	0,996	1,000		1,000
Controle Homólogo	15	332,00	0,063	1,000	1,000	
ID- 90 dias			Comparação Múltipla:			
Teste Kruskal Wallis: $H(3, N=60) = 3,844735$ $p = 0,2787$ – Aceita-se H_0 Ou seja, não existe diferença significativa entre os grupos			observa-se que não existe diferença significativa entre os grupos analisados			
Grupo	N	Soma dos Rank	TA	TH	CA	CH
			R:31,17	R:29,37	R:36,77	R:24,70
Tratado Autólogo	15	467,50		1,000	1,000	1,000
Tratado Homólogo	15	440,50	1,000		1,000	1,000
Controle Autólogo	15	551,50	1,000	1,000		0,351
Controle Homólogo	15	370,50	1,000	1,000	0,351	

APÊNDICE 09

Densidade Óssea Proximal

Teste Kruskal Wallis: $H(3, N=16) = 5,23$

$p = 0,1558$ – Aceita-se H_0

Ou seja, não existe diferença significativa entre os grupos na densidade proximal

Grupo	N	Soma dos Rank
Grupo 1	4	38
Grupo 2	4	17
Grupo 3	4	34
Grupo 4	4	47

Densidade Óssea Transição

Teste Kruskal Wallis: $H(3, N=16) = 6,22$

$p = 0,1014$ – Aceita-se H_0

Ou seja, não existe diferença significativa entre os grupos na densidade Transição

Grupo	N	Soma dos Rank
Grupo 1	4	29
Grupo 2	4	17
Grupo 3	4	43
Grupo 4	4	47

Densidade Óssea Distal

Teste Kruskal Wallis: $H(3, N=16) = 1,92$

$p = 0,5894$ – Aceita-se H_0

Ou seja, não existe diferença significativa entre os grupos na densidade distal

Grupo	N	Soma dos Rank
Grupo 1	4	38
Grupo 2	4	23
Grupo 3	4	40
Grupo 4	4	35