

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

**IMPLANTE ÓSSEO CORTICAL ALÓGENO
CONSERVADO EM MEL NA RECONSTRUÇÃO DE
FALHA ÓSSEA DIAFISÁRIA EM FÊMUR DE CÃES**

TESE DE DOUTORADO

Marcelo Meller Alievi

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**IMPLANTE ÓSSEO CORTICAL ALÓGENO CONSERVADO
EM MEL NA RECONSTRUÇÃO DE FALHA ÓSSEA
DIAFISÁRIA EM FÊMUR DE CÃES**

por

Marcelo Meller Alievi

Tese apresentada ao 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 a obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária.**

Orientador: Prof. João Eduardo Wallau Schossler

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**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

**IMPLANTE ÓSSEO CORTICAL ALÓGENO CONSERVADO EM MEL
NA RECONSTRUÇÃO DE FALHA ÓSSEA DIAFISÁRIA EM FÊMUR
DE CÃES**

elaborada por
Marcelo Meller Alievi

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

João Eduardo Wallau Schossler, Dr.
(Presidente/Orientador)

Antônio de Pádua Ferreira da Silva Filho, Dr. (UFRGS)

Rosmari Hörner, Dra. (UFSM)

Alceu Gaspar Raiser, Dr. (UFSM)

Adriano Bonfim Carregaro, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 30 de janeiro de 2006.

Dedico esta tese a minha amada Patrícia,
que esteve comigo em cada etapa desta conquista,
e que carrega em seu ventre o fruto do nosso amor.

AGRADECIMENTOS

À Patrícia, que muito lutou para a conquista de meus objetivos e sonhos, dando-me incentivo, apoio, carinho e amor. Sem ela, esta conquista não teria o mesmo sabor.

Aos meus pais Valmor e Neiva, pelo constante estímulo, carinho e afeto. Sem eles, pessoas nas quais primeiro me espelhei, este caminho seria mais árduo e tortuoso.

Ao Robledo e ao Andreges, pela imensa amizade, companheirismo e alegria de tê-los como irmãos e acima de tudo como eternos amigos.

Aos meus sogros Luiz Fernando e Margô, pelo incentivo e carinho sempre me dedicados.

Ao amigo, professor e orientador João Eduardo, por ter me recebido no quinto semestre da graduação, dando-me oportunidade de conviver com a cirurgia por todos esses anos, mostrando os caminhos e servindo de exemplo. Muito do que aprendi devo a ti. Espero ter correspondido a todos os seus anseios. Obrigado por ter apostado em mim.

Às estagiárias Ana Néri, Carolina, Patrícia, Fabíola e Sheila, pela imensa colaboração em todas as etapas do projeto. Sem vocês tudo teria sido muito mais difícil.

À minha companheira de bloco cirúrgico Luciana Guimarães, sempre disposta e competente para a realização dos procedimentos anestésicos.

À grande amiga Luciene e à professora Rosmari, pela disponibilidade e pelo profissionalismo na realização das análises microbiológicas.

Aos colegas Josaine, Rosana e Polidoro, por terem proporcionado momentos agradáveis e imenso crescimento profissional.

Aos professores Alceu Raiser, Ney Pippi e Alexandre Mazzanti, pela oportunidade de tê-los como mestres e, acima de tudo, como grandes e inestimáveis amigos.

Aos colegas da UFRGS, Pádua, Afonso, Emerson, Pigatto e Vladimir, pela imensa força e incentivo para a conclusão desta tese.

Ao professor David Driemeier e à mestranda Milene, pela avaliação histológica do experimento.

Aos Professores Rudi Weiblen, Paulo Bayard e João Francisco pela seriedade, responsabilidade e organização na condução do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária.

Às funcionárias e amigas Nelci e Zilda (*in memorian*), pelos cafezinhos, conversas, brincadeiras e auxílio junto ao Bloco Cirúrgico.

Aos queridos César, Davis, Denise, Stella, Carmem e Pelegrini pela imensa ajuda na realização dos procedimentos radiográficos, e por tornarem os momentos no Setor de Radiologia sempre muito agradáveis e alegres.

À CAPES, pela bolsa de doutorado.

Àquelas almas que têm sofrido em benefício do conhecimento.

RESUMO

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

IMPLANTE ÓSSEO CORTICAL ALÓGENO CONSERVADO EM MEL NA RECONSTRUÇÃO DE FALHA ÓSSEA DIAFISÁRIA EM FÊMUR DE CÃES

AUTOR: MARCELO MELLER ALIEVI
ORIENTADOR: JOÃO EDUARDO WALLAU SCHOSSLER
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 30 de janeiro de 2006.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a utilização de implante ósseo cortical alógeno conservado em mel na reconstrução de falha óssea segmentar em fêmur de cães. Foi realizada uma falha óssea de 5cm na região diafisária do fêmur direito de 14 cães adultos, sendo utilizado um implante ósseo cortical alógeno conservado em mel para a sua reconstrução. O implante foi estabilizado no leito receptor por meio de uma placa de compressão dinâmica e oito parafusos corticais de 3,5mm. Os animais foram avaliados clinicamente, verificando-se o seu estado geral, o aspecto da ferida cirúrgica e o grau de deambulação. Radiografias do fêmur direito foram realizadas no pós-operatório imediato e quinzenalmente, até o 90º dia de pós-operatório. A partir desse período, as avaliações foram mensais até os 360 dias de pós-operatório. Dois animais foram submetidos à eutanásia aos 30, 60, 90, 120, 180, 270 e 360 dias de pós-operatório, sendo o fêmur direito retirado e encaminhado para exame histológico. A porcentagem de incorporação das interfaces foi de 79,17%, e o tempo médio necessário para a incorporação foi de 67,10 dias, variando entre 45 e 90 dias. Não foi verificada diferença significativa entre o tempo de incorporação das interfaces proximal e distal. Na análise bacteriológica, foi verificado *Bacillus* spp. em três amostras de mel, porém, não houve crescimento bacteriano nas amostras obtidas dos implantes ósseos. Histologicamente foi verificada adequada união entre as interfaces, com atividade osteoclástica na periferia do implante seguida por osteoblástica e formação de matriz óssea. As principais complicações verificadas foram não-união, fratura e reabsorção intensa do implante. Apesar das complicações, é possível concluir que o implante ósseo cortical alógeno conservado em mel é uma opção viável para a reconstrução óssea.

Palavras-chaves: implantes ósseos, cirurgia ortopédica, cães, mel.

ABSTRACT

Doctor Thesis
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

HONEY PRESERVED CORTICAL ALLOGRAFTS IN THE REPAIR OF DIAPHYSEAL FEMORAL DEFECT IN DOGS

AUTHOR: MARCELO MELLER ALIEVI
ADVISER: JOÃO EDUARDO WALLAU SCHOSSLER
Date and place: Santa Maria, january 30, 2006.

Fourteen adult mongrel dogs were used to evaluate the honey preserved cortical allografts in the repair of diaphyseal femoral defect. The allografts were inserted into a 5cm segmental defect created in the mid-diaphysis of the right femur in each dog. The bones were stabilized with a 3.5mm dynamic compression plate and eight 3.5mm bone screws. Each dog was examined daily to evaluate complications and weight-bearing of the operated limb. Radiographs of the right femur were taken postsurgically and once every 15 days for the next three months. Following this, radiographs were taken once per month until the end of the research. Each two animals were euthanized after 30, 60, 90, 120, 180, 270, and 360 days. The right femur was harvested and prepared for histological evaluation. Nineteen (79.17%) of the twenty-four host-graft interfaces were radiographically healing (union). The mean time to allograft incorporation was 67.10 days (range, 45-90 days). There was no statistical difference in the allograft incorporation time between proximal and distal host-graft interfaces. It was observed *Bacillus* contamination in three honey samples, however, in allografts it was not verified. Good incorporation of donor graft by bone was observed histologically. Initially, there were osteoclastic activity increases in graft surfaces, and after bone formation. Complications observed were nonunion, allograft fracture, and allograft resorption. We conclude that despite the complications, honey preserved cortical allografts are a viable options to bone reconstruction.

Key-words: bone implant, orthopedic surgery, dogs, honey.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Implante ósseo cortical alógeno em cão. a) Ostectomia de um segmento diafisário femoral de 5cm. b) Verificação do tamanho adequado do implante ósseo a ser utilizado. Note-se a perfeita coaptação do defeito.....	43
Figura 2 – Implante ósseo cortical alógeno em cão. a) Fixação do implante na placa de compressão dinâmica através de dois parafusos corticais. Nota-se a angulação da placa. b) Fixação definitiva do implante no sítio receptor. Observe-se a adequada coaptação do defeito.....	43
Figura 3 – Representação esquemática dos locais de secção óssea para posterior análise microscópica. A) interface proximal; B) região central do implante; e C) interface distal.....	45
Figura 4 – Gráfico demonstrando o grau de claudicação, segundo Braden & Brinker (1973), dos cães submetidos à implantação de segmento ósseo cortical alógeno conservado em mel nos diferentes tempos de avaliação.....	54
Figura 5 – Grau de absorção do implante ósseo verificado radiograficamente em cães submetidos à implantação de segmento ósseo cortical alógeno conservado em mel.....	54
Figura 6 – Grau de reação periosteal verificado radiograficamente nas interfaces proximal e distal em cães submetidos à implantação de segmento ósseo cortical alógeno conservado em mel.....	55
Figura 7 – Grau de remodelamento ósseo verificado radiograficamente nas interfaces proximal e distal em cães submetidos à implantação de segmento ósseo cortical alógeno conservado em mel.....	56

Figura 8 – Gráfico demonstrando o tempo de incorporação radiográfica das interfaces proximal e distal, bem como os casos de não-união, dos cães submetidos à implantação de segmento ósseo cortical alógeno conservado em mel.....	57
Figura 9 – Aspecto radiográfico da incorporação do implante ósseo cortical conservado em mel utilizado em cão. a) Pós-operatório imediato; b) 30 dias de pós-operatório; c) 45 dias de pós-operatório; d) 60 dias de pós-operatório; e) 75 dias de pós-operatório; f) 90 dias de pós-operatório; g) 150 dias de pós-operatório; h) 270 dias de pós-operatório; i) vista crânio-caudal do fêmur após a remoção da placa (270 dias); j) vista médio-lateral do fêmur após a remoção da placa (270 dias).....	58
Figura 10 – Avaliação radiográfica após implantação de segmento ósseo conservado em mel. a) Desvio do eixo axial do fêmur e a pequena área de contato entre o implante e o osso receptor; b) Incorporação adequada do implante e o remodelamento considerável do eixo femoral.....	59
Figura 11 – Aspecto radiográfico das complicações ocorridas após a implantação do segmento ósseo conservado em mel. a) Reabsorção intensa da região central do implante ósseo, envergamento e quebra da placa (seta preta). Notar a incorporação das interfaces proximal e distal; b) Migração e quebra dos parafusos, afrouxamento da placa e intensa reabsorção do implante ósseo; c) Migração dos parafusos, afrouxamento da placa e intensa reabsorção do implante ósseo; d) Fratura do implante ósseo (seta branca).....	60
Figura 12 – Aspecto radiográfico após 30 dias da implantação do segmento ósseo cortical. Verificar a reação periosteal, mas com a manutenção da linha entre o implante e o osso receptor.....	60
Figura 13 – Aspecto macroscópico após 30 e 60 dias da implantação do segmento ósseo conservado em mel. a) Presença das linhas (setas) demarcando o implante ósseo e o osso receptor; b) Perda da linha e o adequado alinhamento do implante e do fêmur. c) Completa união entre implante e o osso receptor. d) Intensa reação proliferativa e o deslocamento caudal do fragmento distal do fêmur.....	61
Figura 14 – Aspecto macroscópico após 90 e 120 dias da implantação do segmento ósseo conservado em mel. a) Reabsorção parcial do implante; b) Completa união entre o implante e o osso receptor; c) Intensa reação óssea envolvendo o implante; d) Desvio do eixo longitudinal do fêmur.....	61

Figura 15 – Aspecto macroscópico após 180, 270 e 360 dias da implantação do segmento ósseo conservado em mel. (a); (b); (c); (d) Integração entre o implante e o osso receptor, e a manutenção do alinhamento ósseo.....	62
Figura 16 – Avaliação macroscópica após 180 e 360 dias da implantação do segmento ósseo conservado em mel. a) Proliferação tecidual e a reabsorção do implante; b) Área de reabsorção na região central do implante.....	62
Figura 17 – Avaliação histológica após 30 dias da implantação do segmento ósseo conservado em mel. a) Implante ósseo circundado por tecido conjuntivo imaturo e sendo reabsorvido (quadro). Áreas de neoformação óssea e pequena quantidade de tecido cartilaginoso (tc) (coloração de Hematoxilina e Eosina. Objetiva 4x); b) Vista aproximada do quadro demarcado em a, observar o implante sendo reabsorvido e a presença de osteoblastos na periferia do implante (coloração de Hematoxilina e Eosina. Objetiva 10x); c) Observar na periferia do implante (círculo preto) a presença de osteoclastos (OC) e no interior do implante (círculo branco) a presença de osteócitos (OT) (coloração de Hematoxilina e Eosina. Objetiva 40x).....	63
Figura 18 – Avaliação histológica após 60 dias da implantação do segmento ósseo conservado em mel. a) União entre o implante e o osso receptor. No centro observa-se a presença de tecido ósseo desorganizado (coloração de Hematoxilina e Eosina. Objetiva 4x); b) Área de contato entre o implante e o osso receptor. Observar a neoformação óssea e a incorporação do implante (coloração de Hematoxilina e Eosina. Objetiva 10x); c) Área de contato entre o implante e o osso receptor. Observar a neoformação óssea (azul) e a incorporação do implante (vermelho) (coloração de Tricrômio de Masson. Objetiva 10x).....	64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Características da deambulação*, em graus correspondentes, utilizadas para avaliação clínica pós-operatória de cães submetidos a implante ósseo cortical alógeno conservado em mel.....	44
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média e desvio padrão do comprimento do fêmur direito e do implante ósseo conservado em mel, bem como da porcentagem entre eles. Valores obtidos através de exames radiográficos pós-operatórios imediatos.....	65
--	----

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE QUADROS	10
LISTA DE TABELAS	11
1 – INTRODUÇÃO	15
2 – REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 – Enxertos e implantes ósseos corticais	17
2.1.1 – Aspectos históricos	17
2.1.2 – Terminologia e classificação	18
2.1.3 – Funções	18
2.1.4 – Indicações e contra-indicações	19
2.1.5 – Obtenção e preparação	20
2.1.6 – Métodos de conservação	21
2.1.7 – Métodos de fixação	26
2.1.8 – Incorporação e rejeição	27
2.1.9 – Controle bacteriano	30
2.1.10 – Métodos de avaliação dos resultados	31
2.1.11 – Complicações	31
2.2 – Mel	34
2.2.1 – Aspectos históricos do uso medicinal	34
2.2.2 – Composição e propriedades físico-químicas	34
2.2.3 – Análise bacteriana	35

2.2.4 – Propriedades antimicrobianas	35
2.2.5 – Conservação de tecidos	37
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1 – Elaboração do banco de ossos	39
3.2 – Animais experimentais	40
3.3 – Pré-operatório	40
3.4 – Procedimento anestésico	40
3.5 – Procedimento cirúrgico	41
3.6 – Cuidados pós-operatórios	42
3.7 – Avaliação clínica	42
3.8 – Avaliação radiográfica	44
3.9 – Avaliação macroscópica	45
3.10 – Avaliação microscópica	45
3.11 – Avaliação bacteriológica	46
3.12 – Análise estatística	47
4 – RESULTADOS	48
4.1 – Procedimentos anestésico e cirúrgico	48
4.2 – Avaliação clínica e deambulatória	49
4.3 – Avaliação radiográfica	49
4.4 – Avaliação macroscópica	50
4.5 – Avaliação microscópica	52
4.6 – Avaliação bacteriológica	54
5 – DISCUSSÃO	66
6 – CONCLUSÕES	77
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

1 INTRODUÇÃO

As afecções ortopédicas em cães e gatos têm papel de destaque na rotina de um hospital ou clínica veterinária. Não é raro, portanto, que o ortopedista se depare com fraturas cominutivas de ossos longos, neoplasias ósseas, não-uniões ou uniões viciosas de fraturas. Uma das principais opções para o tratamento dessas alterações é a substituição de um segmento ou o preenchimento de uma falha óssea utilizando-se enxerto ou implante (WADSWORTH & HENRY, 1976; HENRY & WADSWORTH, 1981a; ALEXANDER, 1983; SCHENA & McCURNIN, 1983; BLOOMBERG et al., 1984; JOHNSON et al., 1985; DUELAND et al., 1989; LaRUE et al., 1989; SINIBALDI, 1989; HOFMANN et al., 1995; MORELLO et al., 2001). Biologicamente, a melhor fonte para a obtenção desse material seria sem dúvida o próprio animal, com a utilização do enxerto autógeno (GOLDBERG & STEVENSON, 1987). Tal opção, porém, acaba sendo muitas vezes preterida por aumentar a morbidade, a dor, os tempos cirúrgico e anestésico e, principalmente, por não fornecer volume suficiente para a reconstrução adequada de uma grande falha óssea (MILLIS & MARTINEZ, 2003).

Sendo assim, outras fontes de material ósseo têm sido pesquisadas. A principal são os ossos obtidos a partir de animais da mesma espécie, ou seja, os implantes alógenos. Apesar de imunologicamente inferiores aos enxertos autógenos (GOLDBERG & STEVENSON, 1987), tais implantes têm sido amplamente utilizados, com resultados bastante satisfatórios (HENRY & WADSWORTH, 1981a; DUELAND et al., 1989; SINIBALDI, 1989; PINTO JR., 1995). Uma grande vantagem dessa alternativa é possibilitar a formação de um banco de ossos, o que elimina a dificuldade de se encontrar um doador disponível e apropriado para o fornecimento emergencial de aloenxertos. Outra vantagem é o fato de um único doador fornecer vários segmentos ósseos (KERVIN et al., 1991).

São utilizados diversos métodos e meios para conservação desses ossos: congelamento (HENRY & WADSWORTH, 1981a; SINIBALDI, 1989; DUELAND et al., 1989; MORELLO et al., 2001), liofilização (SCHENA et al., 1984; SCHENA et al., 1985), glicerina (PINTO JR. et al., 1995; COSTA, 1996; MELO et al., 1998), tintura de iodo a 2% (PINTO JR., 1995), óxido de etileno (JOHNSON et al., 1985; JOHNSON et al., 1987) e mel (MSCHVIDOBADSE, 1978; AMENDOLA, 2001; GAIGA, 2002). Apesar dos bons resultados na preservação e na incorporação do implante, os métodos de congelamento e a liofilização requerem equipamentos sofisticados e de alto custo, o que dificulta sua utilização

em muitos hospitais e clínicas veterinárias. A glicerina tem baixo custo, mas não preserva as propriedades biomecânicas e a esterilidade do osso (MELO et al., 1998; DEL CARLO et al., 1999). Já a esterilização pelo óxido de etileno, apesar de eliminar a contaminação do osso conservado, altera suas propriedades biomecânicas e o predispõe a falhas (JOHNSON & STEIN, 1988; WAGNER et al., 1994). A última opção, a da conservação óssea em mel, tem baixíssimo custo e uma matéria prima de fácil obtenção, que não requer o emprego de material especializado (AMENDOLA, 2001) e possui, além disso, propriedades antimicrobianas tanto *in vitro* (EFEM et al., 1992; COOPER et al., 1999) como *in vivo* (EFEM, 1988; SUBRAHMANYAM, 1991; VARDI et al., 1998; SUBRAHMANYAM, 1993b). Alguns experimentos têm sido conduzidos para avaliar o mel como meio de conservação de tecidos - pele (GUPTA, 1977; SUBRAHMANYAM, 1993a), córnea (ABRAMOV & MARKICHEVA, 1983) e pequenos segmentos ósseos (AMENDOLA, 2001) têm sido implantados com resultados satisfatórios. Entretanto, há necessidade de testá-lo na reconstrução de grande falha óssea.

O presente experimento foi realizado com o objetivo de avaliar o uso de implante ósseo cortical alógeno conservado em mel no reparo de grande falha óssea segmentar em cães, verificando a taxa de incorporação e as complicações relacionadas com sua utilização, além de observar e comparar, através de análise microbiológica, a presença de bactérias no mel e no implante ósseo utilizado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Enxertos e implantes ósseos corticais

2.1.1 Aspectos históricos

O uso de aloenxertos vem da antiguidade e sua origem se reveste das características de lenda. Os patronos desses transplantes são os célebres gêmeos Cosme e Damião, nascidos no século III d.C. na Sicília. Cosme, clínico, e Damião, cirurgião, teriam realizado muitas curas e práticas médicas não usuais ao longo dos anos, desagradando o imperador romano Diocleciano, que acabou por sentenciá-los à morte no ano de 287 d.C. No século V, Cosme e Damião teriam patrocinado um milagre na basílica de Roma: o administrador de uma igreja sofria muito devido a um tumor na perna e, exausto, adormeceu durante suas orações. São Cosme e São Damião apareceram-lhe em sonho, removeram o membro doente e o substituíram pelo de um homem que morrera naquele mesmo dia. O administrador acordou totalmente curado! Essa operação milagrosa foi incorporada à tradição católica e retratada por numerosos pintores renascentistas; um dos quadros mais célebres foi pintado por Fra Angelico e pode ser visto no Museu de San Marco, em Florença (MANKIN et al., 1983).

Em 1668, o cirurgião holandês Job van Meekeren, descreveu procedimento em que transplantou com sucesso um fragmento de crânio canino para o crânio de um soldado russo. Curiosamente, o paciente solicitou que o enxerto fosse removido, pois levava à sua excomunhão pela igreja; na segunda intervenção, o piedoso soldado acabou falecendo (WEIGEL, 1993).

Lexer, em 1908, reportou o uso de aloenxertos osteocondrais obtidos de cadáveres para a reconstrução articular de 34 pacientes. Em 1925, o autor publicou artigo descrevendo a evolução em longo prazo desses casos. Ele obteve bons resultados em metade dos pacientes (MANKIN et al., 1976). Nas décadas subseqüentes, no entanto, apesar do sucesso reportado por Lexer, apenas casos ocasionais foram reportados. Mais tarde, entre 1960 e o início da década de 1970, o norte-americano Parrish (1966 e 1973), o argentino Ottolenghi (1972) e o russo Volkov (1970) relataram uma série de casos em que se utilizou aloenxerto ósseo para a reconstrução de falhas ósseas. Os resultados de tais experimentos variaram, em parte, de acordo com a técnica utilizada.

O primeiro relato da utilização de aloenxerto ósseo cortical em Medicina Veterinária foi o de Wadsworth & Henry (1976). Os autores realizaram o procedimento em dois felinos: o primeiro caso foi experimental, sendo utilizado enxerto fresco; o segundo envolveu um felino portador de fratura cominutiva de fêmur, que recebeu enxerto congelado. Ambas as intervenções foram bem-sucedidas, com incorporação completa do enxerto.

2.1.2 Terminologia e classificação

O termo “enxerto” implica a transferência de tecido vivo, enquanto “implante” refere-se a material sem vitalidade aplicado ao corpo. Os implantes, além de osso morto, como por exemplo, osso cortical congelado ou liofilizado, também podem ser constituídos de materiais não-biológicos, como metal ou cerâmica.

Os enxertos/implantes podem ser classificados de várias formas. Quanto à origem, podem ser autógenos (autólogos), quando o tecido transplantado é originário do próprio indivíduo; alógenos (homólogos), quando originário de outro indivíduo da mesma espécie, embora geneticamente diferente; e xenógenos (xenólogos), quando obtido de indivíduo de outra espécie (STEVENSON, 1998a). Transplantes entre indivíduos da mesma espécie e geneticamente idênticos são chamados de isógenos ou singênicos (MILLIS & MARTINEZ, 2003).

Quanto à composição, os enxertos/implantes podem ser esponjosos, corticais, cortico-esponjosos, osteocondrais ou de medula óssea. O esponjoso consiste de tecido ósseo trabecular altamente celular, removido da cavidade medular da região metafisária dos ossos longos; o cortical é composto por osso compacto, que promove principalmente suporte estrutural; o cortico-esponjoso é a associação dos dois; o osteocondral resulta da associação entre cartilagem articular e osso subcondral; e o de medula óssea constitui-se de células mesenquimais indiferenciadas (MILLIS & MARTINEZ, 2003).

2.1.3 Funções

As duas principais funções dos enxertos ósseos são a osteogênese e o suporte mecânico. A osteogênese refere-se à formação óssea, que pode ser de diferentes origens. Quando novo osso é formado a partir ou ao redor do enxerto, ele pode originar-se do próprio

enxerto (de células que sobreviveram à transferência e foram capazes de formar osso) ou de células do leito receptor. Outra maneira dos enxertos ósseos promoverem a osteogênese é a osteoindução, em que ocorre o recrutamento de células do tipo mesenquimal dos tecidos ao redor do enxerto, havendo sua diferenciação em cartilagem e células ósseas. A osteoindução é mediada por fatores derivados do enxerto (STEVENSON, 1998b).

O processo tridimensional de crescimento de capilares, tecidos perivasculares e células osteoprogenitoras do leito receptor para o interior do enxerto é chamado de osteocondução (GOLDBERG & STEVENSON, 1987; CORNELL & LANE, 1998). O enxerto serve de molde para o intracrescimento desses tecidos. Em adição a essa função biológica, o enxerto pode promover suporte estrutural para o tecido receptor (GOLDBERG & STEVENSON, 1987).

A propriedade osteocondutiva de um enxerto ou de um implante depende significativamente de sua arquitetura; a osteocondução é mais rápida em tecido esponjoso do que em cortical devido à maior porosidade do primeiro. A importância do ambiente químico do enxerto e sua influência na osteocondução é pouco entendida (CORNELL & LANE, 1998).

Aloenxertos ósseos são osteocondutivos, osteoindutivos e, dependendo do tipo de enxerto, promovem suporte mecânico (FITCH et al., 1997). O processo de conservação destrói os componentes celulares do aloenxerto ósseo cortical, impedindo que ele estimule a união óssea por osteogênese direta (KERWIN et al., 1991).

2.1.4 Indicações e contra-indicações

Aloenxertos ósseos corticais são uma alternativa efetiva para a reconstrução de grandes defeitos diafisários provocados por fraturas multifragmentares severas (WADSWORTH & HENRY, 1976; HENRY & WADSWORTH, 1981a; ALEXANDER, 1983; SCHENA & McCURNIN, 1983; BLOOMBERG et al., 1984; JOHNSON et al., 1985; DUELAND et al., 1989; SINIBALDI, 1989; HOFMANN et al., 1995) e em casos de não-união (ALEXANDER, 1983; HOFMANN et al., 1995; WANG & WENG, 2003). Além disso, são utilizados em protocolos de salvamento de membros que apresentam neoplasias ósseas primárias (LaRUE et al., 1989; ARO & AHO, 1993; HOFMANN et al., 1995; MORELLO et al., 2001) e para a ampliação de superfícies articulares, permitindo de tal modo uma adequada

fixação de próteses (ARO & AHO, 1993; HOFMANN et al., 1995; POOYA et al., 2003) ou melhor congruência articular, como no caso de acetabuloplastias (FERREIRA, 2003).

Os enxertos corticais alógenos são contra-indicados em casos de fraturas expostas, em áreas onde exista infecção e em situações onde não possa ser aplicada fixação interna rígida, quer ao enxerto quer ao osso doador (HOFMANN et al., 1995; MILLIS & MARTINEZ, 2003). Aro & Aho (1993) não indicaram a utilização imediata de enxertos corticais alógenos em locais previamente submetidos à radiação, pois a incorporação poderia ser negativamente afetada pela ação radiativa nos tecidos moles e no osso receptor. Ehrhart et al. (2005) justificaram tal fato pela diminuição dos níveis de proteína morfogenética óssea e da expressão de ácido ribonucléico mensageiro.

2.1.5 Obtenção e preparação

O doador ideal deve ser um animal jovem, mas esqueleticamente maturo, livre de doenças infecto-contagiosas e de neoplasias. Os ossos podem ser removidos com o doador em plano profundo de anestesia ou ter sido submetido à eutanásia havia poucos minutos (HENRY & WADSWORTH, 1981a).

Segundo Alexander (1983), o enxerto ideal é o obtido em condições cirúrgicas de assepsia, com facilidade de conservação, barato e que não provoque reação no local de implantação.

O autor relatou ainda que, em Medicina Veterinária, aloenxertos ósseos corticais frescos são facilmente obtidos e relativamente baratos, tornando desnecessária a manutenção de um banco de ossos, ainda mais diante do fato de existirem cães de diferentes tamanhos. Kerwin et al. (1991), no entanto, comentam que o banco de ossos eliminaria a dificuldade de se encontrar doador disponível e apropriado para o fornecimento emergencial de aloenxertos, além de um único doador de enxertos poder suprir vários receptores.

2.1.6 Métodos de conservação

a) Fresco

Alexander (1983) descreveu o uso de aloenxerto ósseo cortical fresco associado a autoenxerto ósseo esponjoso para o tratamento de duas fraturas cominutivas e de uma não-união, em cães. O autor relatou que houve incorporação do enxerto sem a ocorrência de complicações. Schena & McCurnin (1983), por sua vez, relataram o uso de aloenxerto ósseo cortical e esponjoso no reparo de fratura de fêmur em um cão. Apesar de exigir mais tempo de consolidação que o registrado em fraturas que não utilizam aloenxertos, a terapia obteve sucesso. Os autores reportaram, porém, a necessidade de maiores estudos para verificar a consolidação da fratura e a resposta imune quando da utilização de aloenxertos frescos.

Enxertos frescos têm se revelados clinicamente insatisfatórios devido à resposta imunogênica e à lenta incorporação decorrente. Métodos de preservação e modificações nos enxertos têm sido desenvolvidos para tentar reduzir a imunogenicidade do enxerto (GOLDBERG & STEVENSON, 1987).

b) Congelamento

Devido à capacidade de alguns raros agentes infecciosos de permanecerem viáveis a baixas temperaturas, todos os ossos congelados para utilização como aloenxertos devem ser removidos sob condições de rigorosa assepsia. Os tecidos moles, o perióstio e a medula óssea devem ser completamente removidos (KERWIN et al., 1991).

Henry & Wadsworth (1981a) relataram o uso de aloenxertos ósseos corticais obtidos em condições de assepsia, em sala cirúrgica, esterilizados em autoclave e mantidos em freezer doméstico (menos 15°C a menos 20°C) até sua utilização em cães e gatos. No caso de gatos, o percentual de sucesso das intervenções foi de 90%, devendo-se à fratura do enxerto os 10% de falha. Já no caso dos cães, a taxa de sucesso foi de apenas 36%, atribuindo-se as falhas à não-união do enxerto por formação de seqüestro ósseo, infecção e fixação inadequada do aloenxerto.

Sinibaldi (1989) utilizou aloenxertos ósseos corticais autoclavados e mantidos em freezer doméstico (menos 10°C a menos 20°C) no tratamento de fraturas cominutivas e na

correção de união viciosa, união retardada e não-união em 25 cães. Os aloenxertos foram obtidos de cães adultos saudáveis com 18 meses de vida, no mínimo, e a colheita foi realizada sob condições de assepsia rigorosa. Na grande maioria dos casos, associado ao aloenxerto, foi utilizado autoenxerto ósseo esponjoso ao redor das interfaces enxerto/receptor. O autor observou exostose, migração de parafusos, desvio rotacional, quebra de placa e de parafusos, refratura ou doença articular degenerativa em mais da metade dos casos. Apesar disso, 22 cães apresentaram excelentes resultados do ponto de vista clínico, utilizando normalmente o membro, sem qualquer sinal de dor. Em dois cães os resultados foram bons, já que revelaram apenas leve claudicação, enquanto num cão o resultado foi considerado ruim, ocorrendo não-união associada à quebra da placa.

Dueland et al. (1989) descreveram o uso de aloenxertos ósseos corticais criopreservados (menos 70°C) para o tratamento de oito fraturas cominutivas severas em cães. O tamanho do enxerto variou de 3cm a 8,6cm, com comprimento médio de 6,6cm - o que representava cerca de 40% do comprimento ósseo. Todos os enxertos foram fixados com placas compressivas. Do total de cães submetidos ao procedimento, cinco tiveram acompanhamento em longo prazo (5,7 anos), quatro deles com resultados excelentes e um com resultado bom. Um dos cães foi submetido à amputação 18 meses após a enxertia devido a osteomielite não responsiva ao tratamento.

c) Liofilização

A liofilização é realizada por meio do congelamento de ossos a menos 70°C e sua posterior exposição ao vácuo, até que a umidade residual seja inferior a 5% (BURCHARDT et al., 1978).

Schena et al. (1984) e Schena et al. (1985) realizaram estudo radiográfico e histológico comparando autoenxerto fresco, aloenxerto fresco e aloenxerto liofilizado mantido a menos 70°C, na reconstrução de falha segmentar diafisária em fêmur de cães. Os enxertos foram fixados com placa e parafusos. Os resultados permitiram concluir que o autoenxerto fresco é superior aos demais quanto ao tempo para consolidação, embora o aloenxerto fresco também promova união consistente. Verificou-se que o processo de liofilização fragiliza o enxerto, sujeitando-o mais facilmente a fraturas por compressão, além da desvantagem representada pelo elevado custo do equipamento e o longo tempo para o processamento do material.

Burchardt et al. (1978), ao realizarem estudo utilizando aloenxertos ósseos corticais liofilizados em cães, observaram que a liofilização não inibe o processo de reparo, mas não evita a rejeição dos aloenxertos.

d) Glicerina

Pinto Jr. et al. (1995) comentaram que a glicerina 98% mostrou-se eficiente meio de preservação óssea em temperatura ambiente, sendo de baixo custo e de fácil obtenção, além de dispensar equipamentos especiais para colheita e estocagem.

Costa (1996) realizou estudo utilizando aloenxerto ósseo cortical conservado em glicerina 98% e fixado com placas e parafusos de aço inoxidável 304, para a reconstrução de falha óssea (4cm) experimental em cães. O autor concluiu que os ossos não precisam ser colhidos sob cuidados assépticos, uma vez que a glicerina tem ação bactericida e fungicida. Além disso, mostrou-se eficiente como meio de conservação de ossos em temperatura ambiente, mantendo o material livre de contaminação durante a estocagem. Embora menos resistentes que o osso fresco, os ossos conservados em glicerina não produziram fenômenos compatíveis com rejeição e mantiveram as funções de osteoindução e osteocondução. Foi observado ainda que as interfaces proximais consolidaram-se e se remodelaram mais rapidamente que as distais, provavelmente atingidas por fenômenos de instabilidade freqüente.

Melo et al. (1998) avaliaram a atuação da glicerina 95% como meio conservante de aloenxerto ósseo cortical, bem como sua capacidade de preservar as características biológicas e impedir a contaminação do osso estocado. Os autores observaram as características biomecânicas do enxerto, após a conservação, constatando que o osso se tornara mais esbranquiçado e quebradiço à manipulação. Tais características se acentuavam nos enxertos conservados por maiores períodos de tempo. Para evitar que os aloenxertos quebrassem, foi indicada a reidratação, tornando-se menos quebradiço o enxerto na razão direta do tempo de reidratação. Quanto ao exame bacteriológico, observou-se crescimento bacteriano em 21,4% das amostras de fragmentos ósseos, resultado negativo em todas as amostras do meio conservante. *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus* spp. foram as bactérias isoladas. O resultado sugere que a glicerina 95% não permitiu o crescimento, mas também não eliminou as bactérias presentes nos fragmentos.

Del Carlo et al. (1999), utilizando glicerina 98% na conservação de fragmentos ósseos, verificaram que o meio não é efetivo na esterilização de enxertos ósseos, além de alterar suas propriedades biomecânicas.

e) Tintura de iodo a 2%

Pinto Jr. (1995) conservou aloenxertos ósseos corticais em tintura de iodo a 2%, mantendo-os em temperatura ambiente. Esses segmentos foram utilizados para o tratamento de animais que apresentavam fraturas cominutivas de ossos longos. O aloenxerto foi inserido no canal medular do osso receptor, utilizando manobras de angulação. Para a fixação foi utilizado um pino intramedular de Steinmann, inserido de maneira normógrada. Os animais foram avaliados por até 12 meses, observando-se retorno à função do membro aos 35 dias de pós-operatório e formação de calo ósseo a partir do 66º dia, em média. Não foram observadas reações de incompatibilidade, eliminação ou rejeição dos implantes. Com isso, o autor concluiu que o método é viável, de fácil utilização e de baixo custo, sendo indicado para o tratamento de fraturas cominutivas ou em grandes perdas diafisárias em ossos longos de cães.

f) Óxido de etileno

Segundo Johnson et al. (1985), a esterilização de aloenxertos ósseos corticais de cães por meio de óxido de etileno tem várias vantagens, entre elas a possibilidade de utilizar animais com doenças transmissíveis como doadores, já que o óxido de etileno é letal para os agentes patogênicos. Outras vantagens são o fato da colheita não exigir assepsia, tornando o procedimento mais rápido e simples, e a manutenção de um banco de ossos sem equipamento especializado.

Johnson et al. (1987) registraram que a esterilização óssea com óxido de etileno é uma técnica excelente e simples para formar um banco de ossos estéreis. São necessários, porém, cuidados na preparação e na estocagem, caso contrário pode ocorrer descarte de segmentos ósseos. Os autores concluíram que a concentração ideal do óxido de etileno é de 84%, sob temperatura e pressão atmosférica ambientes; os enxertos devem ser mantidos em recipiente plástico e à temperatura de menos 20°C.

Johnson et al. (1985) compararam a incorporação de aloenxertos ósseos esterilizados em óxido de etileno com autoenxertos corticais em cães, verificando não haver diferença entre eles: seu aspecto era idêntico ao exame radiográfico quanto macro e microscopicamente.

Johnson & Stein (1988) relataram que aloenxertos ósseos corticais esterilizados com óxido de etileno (12%) e mantidos em temperatura de 22°C tornam-se bastante quebradiços, ocorrendo pequenas fissuras ou lascas durante a preparação para a fixação dos parafusos, o que exige um número maior de enxertos para substituir os danificados.

Wagner et al. (1994) reportaram a ocorrência de dois casos de fratura de aloenxerto ósseo cortical esterilizado em óxido de etileno, bem como das placas que os estabilizavam. Apesar dos autores não terem justificado a falha no método de esterilização, não ocorreu infecção ou instabilidade.

g) Mel

Mschvidobadse (1978) utilizou, em humanos, implantes ósseos alogênicos esterilizados em formaldeído e conservados em solução contendo 50% de mel. Os resultados foram satisfatórios, levando o autor a concluir que essa é uma forma de obter-se um banco de ossos de alta qualidade.

Amendola (2001) preencheu pequenos defeitos ósseos retangulares em região diafisária de fêmur de cães com implante ósseo alógeno conservado em mel. Ao final de 60 dias, a taxa de incorporação do implante foi de 66,6%. O autor justificou que a alta taxa de reabsorção dos implantes deveu-se à falha no método de fixação e à idade avançada dos animais.

Gaiga (2002) confeccionou a partir de fíbula e tíbia caninas, pinos absorvíveis que foram conservados em mel e posteriormente utilizados para osteossíntese de úmero em pombos domésticos. Não foram observados sinais clínicos de rejeição, ocorrendo rápida reabsorção e pequena resposta inflamatória. Com isso, o autor concluiu que o mel pode ser um meio de conservação de implantes ósseos corticais.

2.1.7 Métodos de fixação

Os principais fatores determinantes para a união entre o enxerto e o osso receptor são a estabilidade e o contato (SINIBALDI, 1989; STEVENSON et al., 1991). Henry & Wadsworth (1981a) estabelecem como ideal que a superfície de contato entre o enxerto e o osso receptor seja de 360°, embora ressalvem o fato de que tal angulação é mais difícil de obter em cães do que em gatos, devido à maior curvatura dos ossos longos dos caninos.

Sinibaldi (1989) indicou o uso de placas e parafusos para fixação rígida. Dois ou mais parafusos devem ser utilizados para fixar o enxerto à placa, e cinco ou mais para fixá-la aos fragmentos proximal e distal do osso receptor. Em casos selecionados, dois parafusos proximais e dois distais ao enxerto são suficientes, mas Henry & Wadsworth (1981a) recomendaram três parafusos em cada segmento, no mínimo.

Dueland et al. (1989) utilizaram, em média, 3,6 parafusos para fixação de aloenxerto ósseo cortical, com a quantidade oscilando entre dois e cinco. Já a média no osso receptor foi de 5,8, numa variação de quatro a nove parafusos. Não foram constatados casos de não-união ou de seqüestro ósseo provocado por instabilidade.

Kerwin et al. (1991) indicaram que os parafusos imediatamente adjacentes ao enxerto devem ser inseridos de forma compressiva, incorporando no mínimo seis corticais de cada segmento ósseo receptor.

Sinibaldi (1989), avaliou 25 cães que receberam enxerto ósseo cortical alógeno fixado por placas metálicas, concluindo que o momento para a remoção da placa depende da aparência radiográfica da consolidação óssea e do comprimento do enxerto que, baseado na avaliação de biópsias, ainda pode ser encontrado três anos após a cirurgia. Há, porém, proliferação periosteal e endosteal no novo osso. Com isso, o autor concluiu que a placa poderá ser removida, em estágios, durante o segundo ou terceiro ano após a cirurgia. Porém, segundo Dueland et al. (1989), a remoção da placa deve ser opcional, com preferência por não removê-la.

Straw et al. (1992) preencheram a cavidade medular do enxerto cortical alógeno com polimetilmetacrilato e fixaram o implante com placa de compressão dinâmica, não sendo verificada interferência na sua incorporação e propriedades biomecânicas. Segundo os autores, o polimetilmetacrilato poderia ajudar na fixação precoce do enxerto, prevenindo o afrouxamento dos implantes metálicos, aumentando a resistência durante a revascularização e reabsorção do enxerto, e atuando como um reservatório de antimicrobianos, por exemplo.

Bloomberg et al. (1984) relataram o uso da fixação esquelética externa associada a um pino intramedular para fixar enxerto ósseo cortical alógeno em dois cães. Ambos os casos foram bem-sucedidos, com incorporação e remodelamento do enxerto. Apesar disso, os autores destacaram que este método deve ser utilizado apenas quando não puder ser aplicada placa metálica.

Muir & Johnson (1995) realizaram estudo utilizando ovelhas como modelos experimentais e compararam a incorporação de aloimplantes corticais congelados a menos 20°C por meio de haste intramedular bloqueada ou placa de compressão dinâmica, para sua fixação. A conclusão foi no sentido de que não há diferença significativa na área do calo e na qualidade da incorporação. Hastes intramedulares, bloqueadas ou não, têm sido utilizadas na medicina humana para a fixação de enxertos ósseos, sem diferenças significativas quanto ao tempo para incorporação do enxerto, se comparadas com placas metálicas. Quando a haste intramedular é utilizada, todavia, registra-se um índice significativamente menor de fraturas do enxerto, já que o mesmo não é perfurado. Por outro lado, as perfurações para a passagem dos parafusos no enxerto, quando placas são utilizadas, acabam por torná-lo mais frágil e sujeito a fraturas (VANDER GRIEND, 1994).

Pinto Jr. (1995) utilizou um pino intramedular associado à bandagem esparadrapada como forma de fixação de implante ósseo conservado em tintura de iodo para o tratamento de fraturas cominutivas em cães. A forma de preenchimento da falha óssea com o implante diferiu dos dados encontrados na literatura, pois o mesmo foi inserido no canal medular dos fragmentos proximal e distal da fratura. O autor relata que a técnica determinou boa estabilização do foco de fratura, com sucesso na incorporação do implante.

2.1.8 Incorporação e rejeição

A incorporação é definida como o processo de envelopamento do tecido ósseo necrótico por osso novo viável. Este processo desenvolve-se a partir da reabsorção do tecido morto e do intracrescimento de tecido novo, sendo uma manifestação fisiológica do remodelamento do tecido esquelético (BURCHARDT, 1983).

Do ponto de vista clínico, um enxerto ósseo pode ser considerado incorporado com sucesso quando, além da união das interfaces receptor/enxerto, essa união é capaz de suportar as forças fisiológicas de apoio do peso sem fratura ou dor. Já do ponto de vista da ciência básica, pode-se definir a incorporação completa de um enxerto ósseo cortical como a rápida

revascularização e substituição do osso original do enxerto por novo osso do receptor (STEVENSON & HOROWITZ, 1992).

Os eventos biológicos que ocorrem no enxerto e no local de enxertia durante o processo de incorporação incluem: a) formação de hematoma com liberação de citocinas e fatores de crescimento; b) inflamação, migração e proliferação de células mesenquimais, e o desenvolvimento de tecido fibrovascular dentro e ao redor do enxerto; c) invasão de vasos no enxerto, geralmente pelos canais de Havers e de Volkmann; d) reabsorção osteoclástica focal das superfícies do enxerto; e e) formação óssea intramembranosa e/ou endocondral nas superfícies do enxerto (BAUER & MUSCHLER, 2000).

A incorporação de um enxerto ósseo não-vascularizado é um processo complexo, que depende não apenas das propriedades biológicas do enxerto e da resposta do leito receptor, mas também da estabilidade da fixação e da resistência mecânica do enxerto (STEVENSON & HOROWITZ, 1992; BAUER & MUSCHLER, 2000). Stevenson et al. (1997) comentaram que não existe um exclusivo e adequado parâmetro capaz de prever o sucesso da incorporação, como o tamanho do enxerto e sua resistência, por exemplo. Em adição, nenhuma variável independente determina isoladamente a incorporação. Em certas circunstâncias, como nos enxertos frescos, o papel da histocompatibilidade pode predominar, enquanto em outras circunstâncias, como em enxertos singênicos congelados, o tratamento do enxerto pode influenciar fortemente o resultado.

Em condições laboratoriais, todos os aloenxertos ósseos evocam uma resposta imunológica que pode retardar sua incorporação (BROWN & CRUESS, 1982). A reação ao aloenxerto resulta em um ambiente inflamatório capaz de interferir potencialmente com as células osteogênicas que eventualmente irão se unir ao local do enxerto (ALEXANDER, 1983). O mecanismo que faz a modulação da resposta inflamatória e imune é desconhecido. Stevenson & Horowitz (1992) acreditam que antígenos carregados pelo enxerto estimulam uma resposta imune específica que ativa os macrófagos e as células T do receptor. Essas células, por sua vez, secretam citocinas (interleucina-1, fator de necrose tumoral alfa e linfotóxina), que ativam osteoblastos e induzem a reabsorção osteoclástica do osso. A reabsorção deve ocorrer antes, para que novo osso possa ser formado. É fundamental a manutenção desse delicado balanço entre reabsorção e formação para que o enxerto seja revascularizado e substituído sem perda considerável de resistência.

Segundo Sinibaldi (1989), o tamanho do enxerto é histologicamente importante no processo de consolidação: enxertos pequenos podem ser reabsorvidos por gradual substituição, enquanto enxertos maiores necessitam de um tempo igualmente maior para a

completa reabsorção – que pode, inclusive, nunca ocorrer. O mesmo autor, todavia, conclui que o contato entre o enxerto e o osso receptor, além de fixação rígida, é mais importante do que o comprimento do enxerto.

Os dados indicam que a incorporação de enxertos ósseos é um processo complexo e multifacetado, cuja velocidade, padrão e perfeita incorporação sofrem a influência de múltiplas variáveis. Apesar do enxerto e do ambiente adjacente contribuírem isoladamente para o processo, é a interação desses fatores que determina o sucesso ou o fracasso do enxerto (STEVENSON et al., 1996).

Diversos aspectos contribuem para o sucesso da implantação de aloenxertos ósseos corticais. Fitch et al. (1997) registraram que o tamanho e a forma do aloenxerto deve proporcionar de 75% a 100% de contato do mesmo com o osso receptor. Já conforme Schena & McCurnin (1983), a disparidade de tamanho entre o enxerto e o osso receptor não afeta a aplicação da placa nem retarda o processo de consolidação.

Desde que exista fixação estável, a distância de 2mm ou menos entre o aloenxerto e o osso receptor não afeta a evolução da consolidação. Intervalos maiores implicam tempo maior para a consolidação e, por via de conseqüência, contribuem para o desenvolvimento de não-união quando há problemas de fixação (VANDER GRIEND, 1994).

O ambiente mecânico do sítio do enxerto também afetará profundamente a revascularização e a diferenciação celular. Se o enxerto ósseo não estiver adequadamente estabilizado, tecido de granulação e fibrose irão desenvolver-se na interface receptor/enxerto, impedindo sua incorporação (BAUER & MUSCHLER, 2000).

Aloenxertos músculos-esqueléticos estão sujeitos aos mesmos problemas dos transplantes de outros órgãos, mas a rejeição de tecidos músculos-esqueléticos é mais difícil de identificar e qualificar que a de órgãos parenquimatosos. Biópsias podem não ser representativas, pois geralmente o infiltrado celular não é uniforme. Historicamente, rejeição tem sido inferida quando ocorre reabsorção do enxerto ósseo ou ele apresenta falha mecânica prematura (STEVENSON & HOROWITZ, 1992).

A rejeição de um aloenxerto ósseo é histologicamente expressa por ruptura de vasos, processo inflamatório com presença de linfócitos, encapsulação fibrosa, reabsorção da periferia do enxerto, não-união e fratura por fadiga (BURCHARDT, 1983).

A imunidade celular é considerada o fator mais importante para a destruição dos aloenxertos, o primeiro dos quais provoca resposta imune humoral geralmente insignificante, quando rejeitado. O maior componente imunogênico parece ser a medula. As células e o soro transplantados são presumivelmente antigênicos, enquanto a matriz, composta por

glicoproteínas, colágeno e mucopolissacarídeos, pode ser antigênica ou não (BURCHARDT, 1983).

Burchardt (1983), em estudo com aloenxertos fibulares em cães, descreveu três tipos de reparo:

1) reparo normal, evolução clínica aceitável, sem fraturas do enxerto por fadiga e união com o leito receptor em 16 semanas. Este tipo de resposta ocorreu em 20% dos animais e sugeriu mínima ou insignificante diferença imunológica entre o doador e o receptor;

2) reparo lento, sugerindo grande diferença genética entre o doador e o receptor. Estes enxertos foram caracterizados por grande incidência de não-união ou união retardada, reabsorção periférica com perda de tamanho do enxerto, reabsorção interna exagerada e extensa, e diminuição significativa na resistência mecânica do enxerto. Este tipo de situação ocorreu em 60% dos animais, sugerindo diferença imunológica significativa precedendo a incorporação, sem provocar a reabsorção completa; e

3) aloenxerto rápida, completa e irreversivelmente reabsorvido, de acordo com evidências radiográficas e histomorfométricas. Este tipo de reparo reflete grande diferença genética entre o doador e o receptor, e aconteceu em 20% dos casos de aloenxertos frescos.

2.1.9 Controle bacteriano

Para garantir a esterilidade do procedimento, várias amostras devem ser submetidas à cultura bacteriana aeróbia imediatamente antes dos ossos serem armazenados (KERWIN et al., 1991). Caso o osso seja longo, devem ser realizadas culturas de três locais: a superfície, a medula e a articulação (BUCK & MALININ, 1994).

Cuidadosa atenção deve ser dedicada à assepsia. No momento da implantação, deve-se coletar amostra com *swab* do aloenxerto e submetê-lo à cultura bacteriana. Antimicrobianos devem ser administrados no trans-operatório, pois uma infecção pode resultar em perda do enxerto (KERWIN et al., 1991).

Chapman & Villar (1992) realizaram análise bacteriológica em 35 aloenxertos ósseos humanos, sendo 27 cabeças de fêmur e oito segmentos diafisários corticais. A colheita dos enxertos foi realizada obedecendo a todos os princípios de assepsia, em sala cirúrgica e com os doadores sob cobertura antimicrobiana. O material para a realização de cultura bacteriana foi coletado imediatamente antes da armazenagem dos espécimes no banco de ossos. Do total das cabeças de fêmur, cinco (18,51%) foram positivas na cultura, sendo os agentes envolvidos

Streptococcus do grupo F, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium* spp. e *Staphylococcus epidermidis*. Dos segmentos diafisários, três (37,5%) foram positivos para *Staphylococcus epidermidis*.

2.1.10 Métodos de avaliação dos resultados

Mankin et al. (1983) desenvolveram um sistema de escores para avaliar pacientes humanos submetidos à implantação de aloenxertos ósseos após remoção de neoplasias. O resultado foi considerado *excelente* quando os pacientes não apresentaram recidiva da doença, com função normal do membro operado, sendo capazes de retornar à atividade normal com nenhuma ou mínima limitação; *bom*, quando o paciente não apresentou recidiva ou dor, mas houve redução na função do membro; e *favorável*, quando, apesar de não haver evidência de recidivas da doença, ocorreu déficit funcional significativo, com necessidade de suporte do membro. Essas limitações eram suficientes para impedir muitas atividades realizadas pré-operatoriamente. Considerou-se *falha* quando necessária a ressecção do enxerto ou a amputação do membro por recorrência da neoplasia, fratura ou infecção, ou diante de óbito resultante de metástases à distância.

Dueland et al. (1989) adaptaram para a Medicina Veterinária o sistema de avaliação idealizado por Mankin et al. (1983). Eles consideraram o resultado *excelente* quando o membro retornou ao uso funcional e o animal voltou à atividade com nenhuma ou mínima limitação; *bom*, quando não ocorreu evidência da doença ou de dor, mas a função do osso, membro ou articulações adjacentes foi reduzida; *ruim*, quando registrado déficit significativo na função do membro, com severa anormalidade, sinais de dor e/ou da doença; e *falha* quando fez-se necessária a ressecção do enxerto ou a amputação do membro.

2.1.11 Complicações

Muitos fatores contribuem para o retardo ou a não-união dos enxertos ósseos. Stevenson (1998b) dividiu-os em três grandes categorias: deficiência na vascularização e angiogênese, deficiência na resposta óssea e cartilaginosa, e deficiência na estabilidade, força e continuidade física. Frequentemente mais de um fator ocorre ao mesmo tempo, o que complica o estabelecimento de terapia.

Henry & Wadsworth (1981b) realizaram uma análise retrospectiva das falhas no tratamento de fraturas severamente cominutivas em ossos longos de cães, reparadas com aloenxerto cortical, dividindo em três categorias, com seus respectivos subitens, os possíveis fatores das falhas:

- 1) provavelmente não-significantes:
 - a- idade;
 - b- sexo;
 - c- raça;
 - d- peso;
 - e- osso afetado;
- 2) possivelmente significantes:
 - a- envolvimento da artéria nutrícia;
 - b- lesões coexistentes;
 - c- espécie;
- 3) definitivamente significantes:
 - a- comprimento do aloenxerto;
 - b- grau de cominuição;
 - c- grau de estabilização;
 - d- grau de contato do local da osteotomia;
 - e- reconstrução parcial ao longo da fratura com o aloenxerto;
 - f- tempo entre a ocorrência da fratura e a implantação do aloenxerto;
 - g- procedimentos cirúrgicos prévios à implantação do enxerto;
 - h- complicações pós-operatórias.

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 foram o *Staphylococcus epidermidis* e o *Staphylococcus aureus*.

Mankin et al. (1983) descreveram alta taxa de complicações tardias (mais de dois anos) em pacientes humanos que receberam aloenxertos ósseos para a reconstrução de falhas provocadas por ressecção de neoplasias. Dentre tais complicações, algumas relacionaram-se diretamente com o procedimento de enxertia: infecção (13,2%), união retardada e não-união (11%), e fratura do enxerto (16,5%). Os autores sugeriram que, para reduzir tais

complicações, os pacientes deveriam ser cuidadosamente selecionados, bem como intensificados os cuidados pré e pós-operatórios em relação à cobertura cutânea, estabelecido um controle enérgico sobre aos riscos de infecção, aumentado o número de espécimes no banco de ossos para eliminar problemas relacionados ao tamanho do enxerto, e testados novos métodos de reconstrução articular.

Thompson Jr. et al. (2000) avaliaram a presença de fraturas em 74 aloenxertos de pacientes humanos submetidos à reconstrução de grandes falhas ósseas, observando que em 31 pacientes (42%) houve fratura no enxerto. O tempo médio para a ocorrência da fratura foi de 26 meses, com variação de seis a 60 meses. A análise estatística revelou alta correlação ($p < 0,00005$) entre a presença de fratura e a penetração cortical no enxerto. Com isso, os autores recomendaram a utilização preferencial de haste intramedular associada ao cimento ósseo, na comparação com o uso de placa e parafusos transcorticais. Se a fixação intramedular, porém, reduz os riscos de fratura do aloenxerto, o uso isolado do método limita-se a certos locais anatômicos e a necessidade de ressecção deve ser estabelecida pela lesão (THOMPSON JR. et al., 1993).

Ortiz-Cruz et al. (1997) realizaram estudo em longo prazo com 100 pacientes humanos submetidos a 104 transplantes de aloenxerto ósseo intercalar por ressecção de neoplasia. Dezesseis dos aloenxertos tinham menos de 10cm, 59 oscilavam entre 10cm e 18cm, e 29 mediam mais que 18cm. Em 49% dos casos o resultado foi excelente, em 35% foi bom, em 2% foi ruim e em 14% houve falha. Dentre as complicações relatadas, ocorreram 31 casos de não-união, sendo 10 na interface proximal, 10 na distal e 11 em ambas; 18 casos de fratura do enxerto, sendo 14 antes do terceiro ano e as quatro restantes após quatro anos, seis anos e meio, oito anos e 12 anos, respectivamente; e 12 casos de infecção, todos anteriores ao terceiro ano de pós-operatório.

Berrey et al. (1990), avaliando 274 pacientes humanos submetidos a implante de aloenxertos ósseos congelados, relataram uma taxa média de fraturas nos enxertos de 16%. Os autores classificaram as fraturas em três categorias: tipo I, onde ocorreu rápida reabsorção do implante ósseo, com completa dissolução do mesmo, sem sinais de infecção ou recorrência da neoplasia; tipo II, onde a fratura envolvia o eixo do implante; e tipo III, abrangendo a superfície articular.

2.2 Mel

2.2.1 Aspectos históricos do uso medicinal

O mel tem sido utilizado no tratamento de enfermidades em seres vivos desde 2000 a.C., como relatam evidências encontradas no Egito (GREENWOOD, 1993). Nessa época já eram conhecidos os benefícios desse substrato no processo de reparação de feridas, promovendo absorção de edema, limpeza de contaminação, crescimento de tecido e redução de odores desagradáveis (POSTMES et al., 1993).

A utilização do mel para limpeza e cicatrização mais rápida de feridas foi registrada havia muitos séculos, embora apenas no século XX é que se descobriu o embasamento científico para tal uso. Utilizado costumeiramente nas guerras para tratar pacientes com feridas contaminadas e cavidades corporais infectadas, o mel vem sendo lentamente aceito no tratamento de feridas em animais (MATHEWS & BINNINGTON, 2002). Segundo Efem (1988) e Vardi et al. (1998), entre as propriedades do mel para o tratamento de feridas estão o debridamento por ação química ou enzimática, a diminuição do edema, a inativação bacteriana, a deodorização da ferida, a promoção do tecido de granulação e a epitelização.

2.2.2 Composição e propriedades físico-químicas

O mel é composto por aproximadamente 40% de glicose, 40% de frutose e 20% de água. Contém ainda ácidos orgânicos, vitaminas, enzimas e minerais, tendo peso específico de 1,4 e pH de 3,6 (VARDI et al., 1998).

O mel utilizado para o tratamento de feridas deve ser o não-pasteurizado e sua temperatura não deve, em tese, ultrapassar os 37°C. Eventualmente, contudo, o mel pode se solidificar, sendo necessário aquecê-lo a uma temperatura em torno de 39°C para que retorne ao estado líquido; apesar de não ser o ideal, tal elevação da temperatura parece não afetar suas propriedades medicinais (MATHEWS & BINNINGTON, 2002).

2.2.3 Análise bacteriana

Postmes et al. (1993) verificaram a presença de *Clostridium perfringens* e *Bacillus* spp. em duas amostras de mel originárias da árvore de laranja-lima. As amostras foram esterilizadas com irradiação de $1,8 \times 10^4$ Gy e, segundo os autores, tal procedimento não afetou a atividade antibacteriana do mel. Molan & Allen (1996) verificaram que radiação gama nas doses de 25 e 50 kGy não afeta as propriedades antibacterianas do mel, sendo eficiente para esterilizar vários tipos de méis experimentalmente inoculados com *Clostridium perfringens* ou *Clostridium tetani*.

Tysset et al. *apud* Molan & Allen (1996) reportaram que a bactéria mais freqüentemente encontrada no mel é o *Bacillus* spp. do tipo não-patogênico para humanos. Amendola (2001), ao realizar exames bacteriológicos do mel em que segmentos ósseos haviam sido preservados, observou o desenvolvimento de *Bacillus* spp., mas nenhum sinal de infecção foi detectado quando da utilização do implante.

2.2.4 Propriedades antimicrobianas

O mel tem revelado potente atividade antimicrobiana, efetiva frente a um amplo espectro de bactérias, além de possuir propriedades antifúngicas. A atividade constatada em soluções diluídas de mel indica claramente que a ação antibacteriana não se deve apenas à alta concentração de açúcar contida no mel (MOLAN, 1992).

Cooper et al. (1999) verificaram que a concentração de mel para alcançar a atividade de água (a_w) necessária à inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* é de 22%. Em seu experimento, porém, verificaram que concentrações de mel variáveis entre 2 e 4% já inibiam o crescimento dessa bactéria, confirmando não ser a osmolaridade o modo de ação exclusivo do mel.

Esta atividade antibacteriana adicional deve-se à produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) devido à ação das enzimas do mel e também a substâncias antibacterianas derivadas das plantas que o originaram (MOLAN, 1992). O baixo pH do mel pode inibir o crescimento bacteriano (BERGAM *et al.*, 1983). Além disso, a barreira por ele também previne a penetração e a colonização da ferida por bactérias (BERGAM *et al.*, 1983; SUBRAHMANYAM, 1991).

Efem et al. (1992) realizaram um estudo *in vitro* avaliando os espectros antibacteriano e antifúngico do mel. Para isso, bactérias foram coletadas de abscessos mamários, feridas cirúrgicas infectadas, gangrena e celulite, sendo isoladas e incubadas em meios apropriados. Já as amostras de fungos foram obtidas de um laboratório de micologia da Universidade da Nigéria. As bactérias que foram mais sensíveis ao mel foram *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Também mostraram-se sensíveis *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus spp.*, *Clostridium welchii* e *Clostridium tetani*. O mel, porém, não inibiu o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Clostridium oedematiens*.

Para comprovar que a ação antibacteriana do mel não se deve exclusivamente à propriedade hiperosmótica, Efem et al. (1992) fizeram o mesmo procedimento, mas substituíram o mel pelo melado, que possui a mesma osmolaridade, verificando que houve inibição parcial do crescimento de *Streptococcus pyogenes*, apenas.

Para avaliar a ação antifúngica do mel, Efem et al. (1992) incorporaram no meio de cultura diferentes proporções de mel: 1:1, 1:2 e 1:5. No grupo com maior quantidade de mel (1:1) não ocorreu crescimento fúngico, enquanto no grupo 1:2 houve crescimento esparso e no grupo 1:5, crescimento considerável. Da mesma forma que no experimento com bactérias, foi utilizado o melado e igualmente observou-se crescimento fúngico. Os fungos testados foram *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium citricum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans* e *Candida albicans*.

Cooper et al. (1999) realizaram um estudo buscando avaliar a atividade antibacteriana, através da concentração inibitória mínima (CIM), de dois tipos de mel, um produzido a partir das flores de “manuka” (*Leptospermum scoparium*) e outro originário de flores do campo. A bactéria utilizada foi o *Staphylococcus aureus*, obtido de feridas infectadas de pacientes humanos atendidos em um hospital universitário. Para testar apenas a atividade antibacteriana advinda dos componentes fitoquímicos, os autores submeteram o mel à ação da catalase, removendo qualquer vestígio de peróxido de hidrogênio. A CIM de cada tipo de mel foi determinada pela técnica de incorporação em ágar e a quantidade de *Staphylococcus aureus* inoculada foi de $1,25 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias por mL. Houve, segundo os autores, uma surpreendente similaridade entre os valores encontrados, com a CIM do mel de “manuka” variando entre 2% e 3% e a do mel de flores do campo, entre 3% e 4%. Esses valores são muito menores do que os 29% obtidos pelo açúcar para inibir o crescimento do *Staphylococcus aureus*, o que demonstra que a ação do mel não se dá exclusivamente por sua osmolaridade.

Postmes et al. (1993) comentaram que a adição de 5% de sangue de ovelha pode afetar a atividade antibacteriana do mel pela ação da catalase. Porém, o que se sabe é que a catalase atua apenas sobre o peróxido de hidrogênio, tornando-o inativo (COOPER et al., 1999).

2.2.5 Conservação de tecidos

Gupta (1977) avaliou histologicamente a preservação de pele de porquinhos-da-índia (*Cavia porcellus*) em mel, autoclavado ou não, à temperatura ambiente ou de 4°C. Ao final de seis semanas, tanto no mel esterilizado quanto no não-esterilizado mantidos ambos a 4°C, 90% das amostras estavam adequadamente preservadas. Já nas amostras mantidas à temperatura ambiente, o índice alcançou 100%. Não foram verificados sinais de autólise em nenhuma das amostras, mas as mesmas apresentavam aparência compacta e densa, o que foi justificado pela ação higroscópica do mel. Apesar de não ter utilizado tal técnica na prática, o autor comentou que o implante, mesmo não sendo material viável, poderia ser comparado a um implante liofilizado, proporcionando cobertura temporária a feridas, prevenindo perdas de fluidos, diminuindo a dor e prevenindo infecções.

Subrahmanyam (1993a) preservou fragmentos de pele em mel não-processado, não-diluído e estéril, em diferentes temperaturas. Um grupo foi mantido à temperatura ambiente e outro, em 4°C. O autor verificou que, quando da remoção dos fragmentos de pele do meio conservante, os mesmos encontravam-se firmes e com uma coloração amarelo-escura, voltando à cor e à textura normais após permanência em solução salina. Os fragmentos não apresentavam sinais de autólise mostraram-se normais na avaliação histológica.

Esses enxertos foram utilizados para o tratamento de pessoas queimadas ou que apresentavam úlceras de pele. É importante salientar que foram efetuados enxertos autógenos. Subrahmanyam (1993a) verificou que houve “pega” em 100% dos enxertos preservados por até seis semanas. Já naqueles mantidos no mel de sete a 12 semanas, a taxa foi de 80%. Nos casos de “não-pega” dos enxertos, foi realizada, com sucesso, nova enxertia. Não houve diferença estatisticamente significativa em relação à temperatura em que foram mantidos os enxertos.

Abramov & Markicheva (1983) realizaram ceratoplastia lamelar em 43 pacientes humanos, utilizando córnea conservada em mel. As indicações para a intervenção eram queimaduras oculares, úlceras corneanas e ceratites. Os resultados obtidos foram satisfatórios e na maioria dos casos a córnea tornou-se transparente.

Mschvidobadse (1978) utilizou, em humanos, implantes ósseos alogênicos esterilizados em formaldeído e conservados em solução contendo 50% de mel. Os resultados foram satisfatórios, concluindo o autor ser essa uma forma de obter um banco de ossos de alta qualidade.

Amendola (2001) avaliou a utilização de osso canino conservado em mel como implante em defeitos ósseos experimentais de cães. Foram utilizados 12 cães adultos submetidos à remoção de um segmento ósseo retangular, na dimensão de um terço do diâmetro do osso por 2cm de comprimento. Ao final de 60 dias foi possível verificar incorporação do implante em oito animais, enquanto em quatro ocorreu reabsorção. O autor justificou que a alta taxa de reabsorção dos implantes deveu-se à falha no método de fixação e à idade avançada dos animais.

Os segmentos ósseos conservados em mel apresentavam coloração amarelada, percebendo-se mel impregnado em todos os pequenos orifícios e não sendo observadas fissuras nem antes nem depois da secção dos fragmentos (AMENDOLA, 2001).

Gaiga (2002) avaliou clínica, histológica e radiograficamente o emprego de pinos absorvíveis confeccionados a partir de fíbula e tíbia caninas, e conservados em glicerina 98% ou mel, no tratamento de fraturas transversas diafisárias de úmero em pombos domésticos. O autor verificou que o pino conservado em mel apresentava mais fácil manuseio do que o mantido em glicerina, já que este era mais quebradiço e de mais difícil confecção. Não foram observados sinais clínicos de rejeição, quer nos xenoenxertos mantidos em mel, quer nos conservados em glicerina; ocorreu, porém, reabsorção mais rápida e menor resposta inflamatória no grupo do mel. Com isso, o autor concluiu que o mel é superior à glicerina 98% na conservação de pinos ósseos corticais absorvíveis (xenoenxerto).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos cirúrgicos do presente estudo foram desenvolvidos no Laboratório de Cirurgia Experimental (LACE) do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Os exames radiográficos foram realizados no Setor de Radiologia do mesmo hospital. As análises microbiológicas foram desenvolvidas no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas do Centro de Ciências da Saúde da UFSM, enquanto as análises macroscópicas e microscópicas foram efetuadas no Setor de Patologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

3.1 Elaboração do banco de ossos

Foram utilizados dois cães, fêmeas, sem raça definida, com idade estimada entre um e dois anos, peso de 15kg e 16kg, provenientes do LACE, livres de doenças infecto-contagiosas, metabólicas e neoplásicas, bem como de alterações músculo-esqueléticas ou outras alterações que afetassem as propriedades físico-químicas dos ossos. Além desses animais doadores, os próprios segmentos ósseos removidos para a confecção da falha óssea cortical foram preparados e posteriormente utilizados nos outros animais.

A colheita do implante ósseo foi efetuada em sala cirúrgica sob todos os princípios de assepsia, imediatamente após a eutanásia dos animais, realizada por meio da administração intravenosa de tiopental sódico, na dose aproximada de 25mg.kg^{-1} , e de cloreto de potássio até a parada cardiorrespiratória.

Após tricotomia do membro pélvico direito, os animais foram levados à sala cirúrgica, onde foi realizada a remoção do segmento ósseo do fêmur direito. Feitas a anti-sepsia da face lateral da coxa, utilizando o método álcool-iodo-álcool, e a colocação de panos de campo estéreis, a região diafisária do fêmur foi exposta conforme descrição de Piermattei & Johnson (2004) e, com o auxílio de uma serra oscilatória, efetuada a remoção de um segmento ósseo tubular de 5cm desta região. Tendo sido removidos o perióstio, os restos musculares, o endóstio e a medula óssea utilizando lâmina de bisturi e pino rosqueado, o segmento foi lavado com solução salina estéril morna e acondicionado em frasco plástico, opaco, estéril e com capacidade para 100mL.

Imediatamente após a colocação do segmento ósseo, o frasco foi preenchido com mel de abelha não-processado e produzido a partir de flores do campo. Os frascos foram identificados com a data de colheita, a idade, o peso, o sexo e a história do doador, sendo fechados e armazenados em local escuro, à temperatura ambiente, por um período não inferior a 28 dias.

3.2 Animais experimentais

Foram utilizados 14 cães, machos e fêmeas, com idade estimada entre um e dois anos, com peso variando entre 13kg e 18kg, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria. Todos foram submetidos a exame clínico geral e os considerados aptos a participarem do experimento receberam vermífugo e vacinas, sendo submetidos a um período de adaptação de no mínimo 15 dias em canil coletivo (máximo de cinco animais), com área aproximada de 20m² e alimentados com ração comercial e água *ad libitum*. Durante o período de adaptação, os animais foram cuidadosamente observados e distribuídos conforme suas afinidades. Tais grupos foram mantidos durante todas as etapas do experimento, estabelecendo-se com isso uma hierarquia bem definida entre os animais.

3.3 Pré-operatório

No dia anterior ao procedimento cirúrgico, os cães foram submetidos à tricotomia das faces lateral e medial da coxa direita, ampliada dorsalmente até a região sacro-ilíaca esquerda e ventralmente até imediatamente abaixo ao joelho. Em seguida, receberam um banho e foram mantidos em canis individuais, permanecendo em jejum sólido e líquido de 12 e quatro horas, respectivamente.

3.4 Procedimento anestésico

Como medicação pré-anestésica, foi administrado 0,1mg.kg⁻¹ de maleato de acepromazina por via intramuscular. Cerca de 15 minutos depois, obteve-se acesso vascular (veia cefálica) e foram administrados 30mg.kg⁻¹ de cefalotina sódica. A indução anestésica foi realizada com propofol (2-4mg.kg⁻¹), via intravenosa, e, após intubação orotraqueal, a

anestesia foi mantida com halotano em oxigênio a 100%, através de sistema reinalatório. Associado à anestesia geral inalatória foi realizado bloqueio epidural com lidocaína 2% e bupivacaína 0,5%, na proporção de 1:1 e dose de $1\text{mL}.4,5\text{kg}^{-1}$. Durante a intervenção cirúrgica foi administrada solução de ringer com lactato de sódio, em gotejamento venoso de $15\text{mL.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$. A monitoração das funções vitais foi mantida durante todo o período anestésico, utilizando oxímetro de pulso e eletrocardiógrafo.

3.5 Procedimento cirúrgico

Após 15 minutos do bloqueio epidural e com o cão em decúbito lateral esquerdo, foi realizada a anti-sepsia da área cirúrgica, utilizando o método álcool-iodo-álcool. A abordagem cirúrgica da porção diafisária do fêmur foi realizada através de incisão cutânea desde a altura do trocanter maior até o epicôndilo lateral do fêmur, seguida de divulsão do tecido subcutâneo e incisão da fáscia lata imediatamente cranial ao músculo bíceps femoral. Após, este foi afastado caudalmente e o músculo vasto lateral cranialmente, expondo assim a diáfise femoral.

Realizada a exposição da diáfise femoral, o músculo adutor magno, inserido na face caudal do fêmur, foi afastado com um elevador de periósteo e, a seguir, realizada a ostectomia de um segmento diafisário tubular de 5cm de comprimento (Figura 1a), com a ajuda de uma serra oscilatória. Durante a secção óssea, a área foi constantemente irrigada com solução salina estéril. Após a ostectomia, efetuou-se a seleção do implante ósseo, com medidas semelhantes às do segmento removido (Figura 1b). O selecionado foi mantido submerso em um frasco estéril contendo solução salina morna por 15 minutos e submetido a diversas lavagens com a mesma solução. Enquanto isto, o segmento removido foi preparado, conforme técnica descrita previamente, para servir de implante em outro procedimento.

Para a fixação do implante ósseo foi utilizada uma placa de compressão dinâmica de 10 furos, com 120mm de comprimento, 10mm de largura e 3mm de espessura. Os parafusos utilizados foram do tipo cortical com 3,5mm de diâmetro. Após 15 minutos de reidratação, o implante foi fixado temporariamente à placa, previamente encurvada, com duas pinças de Verbrugge e, utilizando furadeira à bateria e broca de 3,0mm de diâmetro, foi feito um orifício em ambas as corticais do implante, seguida de confecção da rosca com macho e inserção do parafuso. Este procedimento foi repetido, resultando na fixação definitiva do enxerto à placa com dois parafusos (Figura 2a).

Em seguida o implante foi inserido na falha óssea e a placa fixada temporariamente aos segmentos proximal e distal do fêmur, com pinças de Verbrugge. Para a fixação definitiva foram utilizados seis parafusos, três no fragmento proximal e três no distal (Figura 2b). Os dois parafusos imediatamente adjacentes ao implante foram inseridos primeiramente, com efeito compressivo, por meio do guia de broca excêntrico. A seguir os demais parafusos foram inseridos de maneira aleatória, mas intercalando-se os segmentos e sem efeito compressivo, utilizando-se o guia de broca neutro.

Efetuada a fixação da placa, a área foi copiosamente lavada com solução salina estéril morna. Após a fásia lata e o tecido subcutâneo serem suturados utilizando-se fio sintético absorvível (poliglactina 910) e padrão contínuo simples, a pele foi suturada com fio sintético inabsorvível (mononáilon) e padrão isolado simples.

3.6 Cuidados pós-operatórios

Após a completa recuperação anestésica, os animais receberam flunixin meglumine como terapia antiinflamatória e analgésica, na dose de $1,0\text{mg.kg}^{-1}$, pela via intramuscular, o que foi repetido mais duas vezes, a cada 24 horas. Além disso, receberam tramadol, na dose de 2mg.kg^{-1} IM, a cada oito horas, nas primeiras 24 horas de pós-operatório. Como profilaxia antimicrobiana, foi administrada cefalexina na dose de 30mg.kg^{-1} , pela via oral, a cada 12 horas, por sete dias.

A ferida cirúrgica foi limpa diariamente com solução salina até a remoção dos pontos de pele, aos sete dias de pós-operatório. Durante este período, os animais permaneceram em canis individuais, realizando caminhadas assistidas três vezes ao dia. Após a remoção dos pontos, os animais foram transferidos para os canis coletivos.

3.7 Avaliação clínica

Todos os animais foram examinados diariamente, avaliando-se o estado geral e o aspecto da ferida cirúrgica. O grau de deambulação foi estimado clinicamente, a cada dois dias, utilizando-se como referência o Quadro 1.

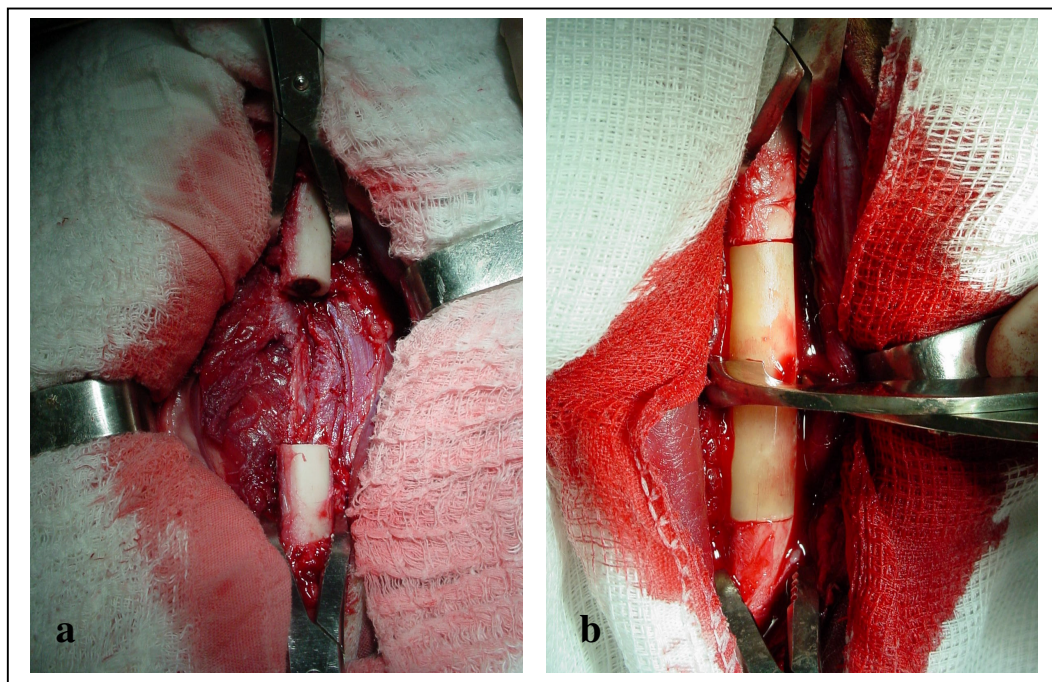


Figura 1 – Implante ósseo cortical alógeno em cão. a) Osteotomia de um segmento diafisário femoral de 5cm. b) Verificação do tamanho adequado do implante ósseo a ser utilizado. Note-se a perfeita coaptação do defeito.

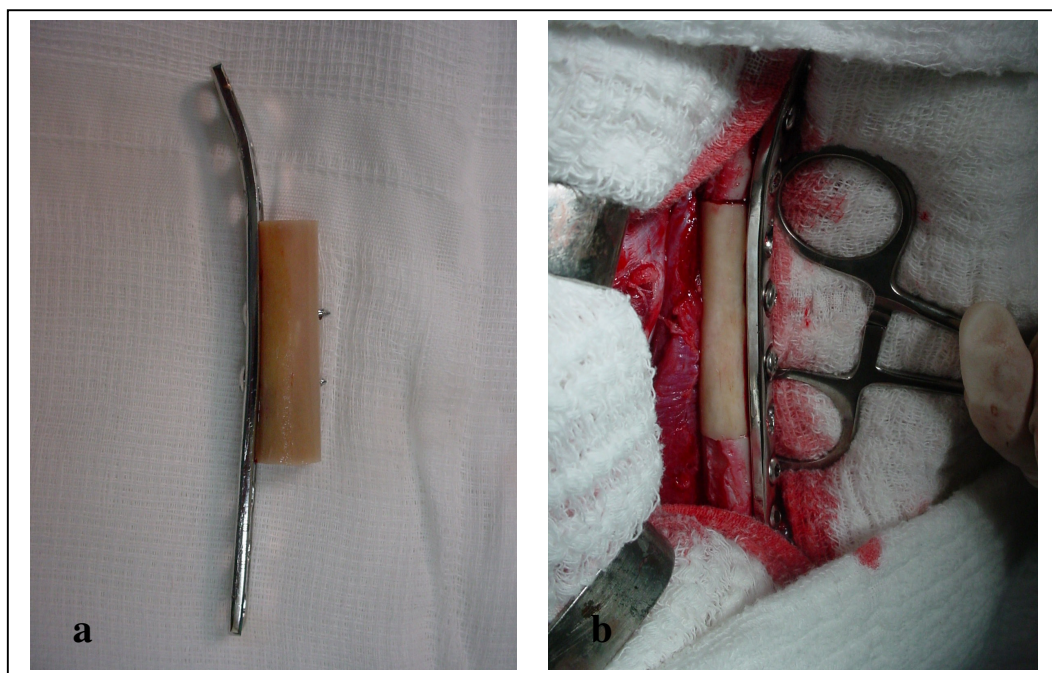


Figura 2 – Implante ósseo cortical alógeno em cão. a) Fixação do implante na placa de compressão dinâmica através de dois parafusos corticais. Nota-se a angulação da placa. b) Fixação definitiva do implante no sítio receptor. Observe-se a adequada coaptação do defeito.

Quadro 1 – Características da deambulação*, em graus correspondentes, utilizadas para avaliação clínica pós-operatória de cães submetidos a implante ósseo cortical alógeno conservado em mel.

GRAU	DESCRIÇÃO
I	Não usa nem apóia o membro.
II	Uso e apoio infrequente do membro durante a estação e ao caminhar. Não sustenta o peso, elevando-o ao correr.
III	Uso funcional do membro. Sustentação parcial do peso.
IV	Uso funcional do membro em estação, ao caminhar e ao correr. Sustentação completa do peso.

* Fonte: Braden & Brinker (1973).

3.8 Avaliação radiográfica

Radiografias simples, em incidências médio-lateral e crânio-caudal, foram realizadas no pós-operatório imediato e depois quinzenalmente, até os 90 dias. A partir desse período, as avaliações foram mensais, até os 360 dias de pós-operatório.

Por meio do exame radiográfico foi avaliado o alinhamento do implante ósseo em relação aos segmentos proximal e distal do fêmur, a estabilidade do implante ósseo e da placa, a migração dos parafusos, os sinais de consolidação das interfaces osso/implante, a formação de calo ósseo e o aspecto do implante.

A união radiográfica foi considerada presente quando verificados a continuidade cortical completa na interface osso/implante e o remodelamento ativo do calo ósseo. Para fins estatísticos, os dois animais avaliados por apenas 30 dias não foram incluídos no cálculo da porcentagem de incorporação e de complicações, como fratura ou reabsorção do implante. As interfaces foram consideradas isoladamente.

3.9 Avaliação macroscópica

Dois animais foram submetidos à eutanásia aos 30, 60, 90, 120, 180, 270 e 360 dias de pós-operatório, sendo utilizado tiopental sódico, na dose de 25mg.kg^{-1} IV, seguido de solução de cloreto de potássio, até a parada cardiorrespiratória.

Ao se remover o fêmur direito foi observada a existência de reação dos tecidos moles, a formação de calo ósseo, a presença de infecção, o aspecto e a estabilidade da placa, dos parafusos e do implante ósseo. Após a placa e os parafusos serem removidos, o fêmur foi seccionado transversalmente em quatro pontos: 1cm acima e 1cm abaixo das interfaces proximal e distal, restando três segmentos, então submetidos à avaliação histológica, conforme a Figura 3.

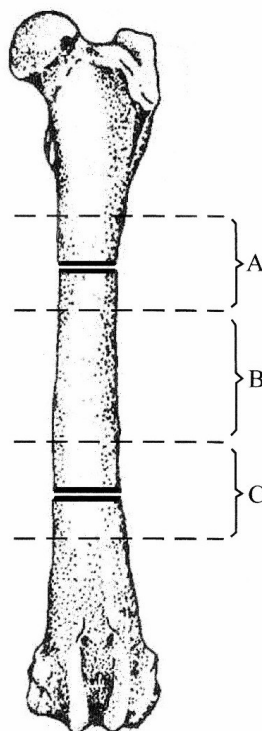


Figura 3 – Representação esquemática dos locais de secção óssea para posterior análise microscópica. A) interface proximal; B) região central do implante; e C) interface distal.

3.10 Avaliação microscópica

Após a identificação, os segmentos foram fixados em formol tamponado a 10% e, passadas no mínimo 72 horas, descalcificados em solução de ácido nítrico a 10%. Os

segmentos foram processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Os cortes histológicos tinham espessura de 5 micras e foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) e, em alguns cortes, com Tricrômio de Masson. O material foi examinado em microscópio óptico.

Nesta análise foi verificada a presença de união óssea em cada interface, o grau de reação periosteal, endosteal, inflamatória, a taxa de reabsorção e a revascularização do implante.

3.11 Avaliação bacteriológica

Nos últimos oito cães submetidos ao procedimento cirúrgico foi realizada avaliação bacteriológica para análise do mel em que o implante ósseo seria conservado, do próprio implante ósseo antes da conservação, do mel onde o implante permaneceu submerso por no mínimo 28 dias e do implante após o período de conservação.

Para a análise dos implantes ósseos foram realizadas coletas através de *swab* estéril de uma área de aproximadamente 1cm^2 das faces externa e interna do implante. As amostras, para análise qualitativa, foram semeadas com *swab* no meio de cultura Ágar sangue (AS), para posterior isolamento e identificação bacteriana. Após, este mesmo *swab* foi colocado em Tioglicolato (THIO) para teste de inibição de crescimento bacteriano em meio líquido e, em caso positivo, semeadas em AS para posterior isolamento e identificação bacteriana.

Paralelamente foi realizada a análise quantitativa, através da diluição do conteúdo aderido ao *swab* em tubos do tipo *Eppendorf*, contendo 1mL de solução salina estéril, e realizadas diluições até 10^{-4} unidades formadoras de colônias por mL (UFC.mL⁻¹). Após, as amostras foram semeadas em meio Ágar padrão de contagem (PCA) pela técnica de semeadura em superfície, para posterior contagem de UFC.mL⁻¹.

Para a análise bacteriológica qualitativa do mel, os *swabs* obtidos foram semeados no meio de cultura AS, para posterior isolamento e identificação bacteriana. Para a análise quantitativa foram retiradas alíquotas de 10 μ L do mel, com auxílio de alça calibrada e semeadas pela técnica de semeadura em superfície no meio PCA, para posterior contagem das UFC.mL⁻¹.

Todas as amostras foram incubadas a 37°C por 48 horas.

3.12 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa estatístico SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*), versão 8.0. Foi realizada análise comparativa do tempo de consolidação das interfaces proximal e distal. Para isso, foi utilizado o teste “t” para amostras pareadas, sendo considerado significativo um $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Procedimentos anestésico e cirúrgico

A associação do bloqueio epidural com a anestesia geral inalatória mostrou ser protocolo anestésico adequado para a realização do procedimento cirúrgico. O consumo de anestésico geral inalatório variou entre 10 e 20mL, para um tempo cirúrgico variável entre 1h45min e 3 horas. O bloqueio epidural facilitou a realização do exame radiográfico logo após o término da cirurgia, pois permitiu um adequado posicionamento do membro a ser radiografado, sem qualquer sinal de sensibilidade dolorosa.

O acesso ao fêmur foi adequado para a maioria dos animais - exceto em dois, em que foi necessária a ampliação distal do mesmo – e permitiu a manipulação adequada do fêmur, sem qualquer sangramento. Quando da liberação do músculo adutor magno, inserido na região caudal do fêmur, porém, houve hemorragia moderada. A liberação deste músculo foi realizada somente na região a ser removida do fêmur, e cerca de 2cm proximal e distalmente a mesma, permitindo a aplicação adequada das pinças de redução óssea.

A colheita e a preparação do implante ósseo foram realizadas rápida e facilmente. O uso de lâmina de bisturi e do pino metálico, respectivamente para a remoção do perióstio e das inserções musculares, e da medula óssea e do osso esponjoso localizado nas extremidades do implante, foi fundamental para agilizar esses procedimentos.

A permanência dos implantes na solução conservante variou entre 28 e 40 dias. Verificou-se, independentemente do tempo de conservação, aspecto macroscópico adequado dos implantes, sem fissuras ou sinais de deterioração. Observou-se, porém, que possuíam coloração amarelada, com impregnação do meio conservante em seus pequenos orifícios. A cor se perdeu em grande parte após a permanência do implante na solução salina e as diversas lavagens com essa solução. Quando da perfuração dos implantes para a inserção dos parafusos, observou-se maior resistência em comparação aos segmentos ósseos do leito receptor, demandando mais tempo e maior força para a perfuração. Apesar disso, não foram verificadas fissuras ou fraturas no implante, quer durante as perfurações, quer na aplicação dos parafusos.

A fixação do implante no leito receptor foi o procedimento com maior grau de dificuldade, ocupando a maior parte do tempo total de cirurgia.

4.2 Avaliação clínica e deambulatória

Não foi registrado nenhum caso de infecção ou deiscência da ferida cirúrgica. Durante a primeira semana de pós-operatório ocorreu aumento de volume do linfonodo poplíteo ipsilateral em todos os animais. A alteração regrediu sem afetar a deambulação.

A utilização do membro nos diferentes tempos de avaliação está registrada na Figura 4. Verificou-se aumento gradual do uso funcional do membro, diretamente proporcional ao período de avaliação. Nos animais em que houve falha no método de fixação ou reabsorção do implante, porém, o uso do membro foi inadequado independentemente do período de avaliação.

A manutenção de até cinco animais num mesmo canil facilitou a higiene, a nutrição e a observação clínica, não sendo verificando maiores problemas com tal medida de manejo.

4.3 Avaliação radiográfica

Os animais foram apenas contidos fisicamente para a realização dos exames radiográficos, não demonstrando qualquer sinal de desconforto ao serem posicionados, com exceção daqueles em que houve falha no método de fixação que relutaram quando da extensão do membro para a radiografia crânio-caudal.

Os resultados da avaliação radiográfica dos parâmetros de absorção do implante ósseo, de reação periosteal e de remodelamento ósseo estão descritos nas Figuras 5, 6 e 7, respectivamente. A porcentagem de incorporação das interfaces foi de 79,17%; o de reabsorção intensa do implante ósseo, de 25%; e de fratura do implante, de 16,67%. O tempo para a incorporação radiográfica de cada interface dos implantes e os casos de não-união constam da Figura 8. Em média, a incorporação do implante aconteceu aos 66 dias na interface proximal e aos 68,33 dias na interface distal, variando de 45 a 90 dias em ambas. Não houve diferença significativa no tempo médio para a incorporação entre as interfaces proximal e distal. Para fins estatísticos, o animal em que foi consolidada apenas a interface distal não foi incluído na análise. A Figura 9 demonstra a evolução da incorporação do implante ósseo em um dos cães.

Verificou-se desvio acentuado no eixo axial do fêmur no pós-operatório imediato de um dos cães, associado à pequena área de contato entre o implante e o leito receptor (Figura 10a), provavelmente devido à movimentação da placa no momento de sua fixação nos