

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**Aloenxerto Ósseo Cortical Desvitalizado com Nitrogênio Líquido –
Estudo Experimental em Ovelhas**

Paulo Barros de Albuquerque

PORTO ALEGRE

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**Aloenxerto Ósseo Cortical Desvitalizado com Nitrogênio Líquido –
Estudo Experimental em Ovelhas**

Autor: Paulo Barros de Albuquerque

Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre
em Ciências Veterinárias na área de
Morfologia, Cirurgia e Patologia
Animal

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Meller
Alievi

PORTO ALEGRE

2012

Paulo Barros de Albuquerque

**Aloenxerto Ósseo Cortical Desvitalizado com Nitrogênio Líquido –
Estudo Experimental em Ovelhas**

Aprovada em 26 de Março de 2012

APROVADO POR:

Prof. Dr. Marcelo Meller Alievi
Orientador e Presidente da Comissão

Profa. Dra. Ana Cristina Pacheco de Araújo (UFRGS)
Membro da Comissão

Prof. Dr. Carlos Afonso de Castro Beck (UFRGS)
Membro da Comissão

Prof. Dr. Geraldo Pereira Jotz (UFRGS)
Membro da Comissão

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Fernando Antônio Marins de Albuquerque e Paula Barros de Albuquerque, por todo apoio, confiança e amor.

À minha avó Helena Valle Barros, por sempre me incentivar a estudar, fazer parte do meu crescimento profissional e pelo carinho.

Ao meu irmão Gabriel Barros de Albuquerque, pelo companheirismo e proteção que sempre me ofereceu.

À minha namorada Brunna de Souza Barni, pela parceria desde o primeiro dia que estive ao meu lado, e por toda ajuda e motivação na conquista dessa etapa.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar saúde, disposição, capacidade, sabedoria e inteligência para encarar mais essa etapa da minha vida.

Aos meus pais, Fernando Antônio Marins de Albuquerque e Paula Barros de Albuquerque, pela educação, apoio e amor que sempre me deram.

À minha avó Helena Valle Barros, pelo carinho e por sempre incentivar meus estudos e meu aprendizado.

Ao meu irmão Gabriel Barros de Albuquerque, por ajudar no meu crescimento, pelos cuidados e proteção, sempre demonstrando todo o seu companheirismo ao longo da minha vida.

À minha namorada Brunna de Souza Barni, pela parceria desde o primeiro dia ao meu lado, ajuda e motivação na realização desse trabalho e principalmente pelo amor dedicado a mim. Com você ao meu lado, esta conquista foi muito mais gostosa.

Aos meus sogros, Nídio Antonio Barni e Iára Regina de Souza Barni, por terem me recebido sempre bem em seu lar e pela ajuda na parte escrita dessa dissertação.

Ao amigo, mestre e orientador de graduação, Prof. Gustavo Cancian Baiotto, por possibilitar o convívio com a cirurgia, servir de exemplo e incentivar na escolha do meu caminho.

Ao amigo e atual orientador, Prof. Dr. Marcelo Meller Alievi, por ter me recebido de braços abertos desde o estágio curricular como meu tutor, por oportunizar o mestrado, pela confiança e seus ensinamentos, permitindo o meu aprimoramento na cirurgia, mais especificamente na ortopedia.

Ao amigo Prof. Dr. Carlos Afonso de Castro Beck, pela amizade e por propiciar novos conhecimentos na área de videocirurgia.

À amiga Profa. Dra. Ana Cristina Pacheco Araújo, pela amizade e ajuda no envio do projeto ao CEUA.

Ao amigo Prof. Dr. Emerson Antonio Contesini, pelo convívio de amizade e por sempre me ajudar quando precisei.

Ao irmão de mestrado Renato Barbosa Silva, pelas ajudas nos procedimentos cirúrgicos e principalmente na confecção desse projeto.

Ao amigo de mestrado Thadeu Mourão Pinto, por sempre se disponibilizar a me ajudar na rotina hospitalar, favorecendo o meu aprendizado e crescimento profissional

como cirurgião. Não foram poucas às vezes em que me auxiliou nos procedimentos cirúrgicos. E principalmente pela ajuda na execução desse trabalho.

Às amigas, Aline Silva Gouvêa e Lenise Nascimento Flôres, pela amizade e ajuda nos procedimentos cirúrgicos desse projeto.

Aos amigos, Giordano Cabral Gianotti e Lanucha Fidelis da Luz Moura, pela amizade e por anestésiar os animais do experimento com tanta competência.

Ao amigo Claudio Leonardo Montassieur de Menezes, pela amizade, por oportunizar as fotos e as filmagens de todos os procedimentos realizados nesse estudo.

À amiga Monalyza Cadori Gonçalves, pela amizade, pela tradução desse e de outros resumos.

Aos estagiários, Mariana Zacouteguy Boos, Leticia Gutierrez de Gutierrez, Luciana Zang, Pedro Henrique Reinhardt da Rosa e Luciana Machado da Silva, pela amizade e por ajudar nos procedimentos pré, trans e pós-operatórios desse projeto. Sem vocês seria impossível realizá-lo.

À amiga Marília Corrêa Borba, por realizar os exames radiográficos mensalmente das ovelhas.

À irmã de mestrado Michelli Westphal de Ataíde, pelo carinho e por possibilitar novos conhecimentos sobre os animais silvestres.

Aos amigos do LACVET, pelas análises hematológicas e bioquímicas das ovelhas.

Aos funcionários do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS, por manter organizado e limpo o nosso ambiente de trabalho.

Ao Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS, por disponibilizar a estrutura suficiente para a realização de todos os processos desse projeto.

A todos, que por negligência eu me esqueci de mencionar.

À CAPES, pela bolsa de mestrado.

Aos animais utilizados nesse estudo, por doarem suas vidas, tornando possível a realização desse trabalho e acrescentarem no meu aprendizado em Medicina Veterinária.

RESUMO

Na ortopedia veterinária, o enxerto ósseo é comumente utilizado em uma variedade de procedimentos ou afecções ortopédicas como artrodeses, fusões espinhais, reparo de fraturas, tratamentos de união atrasada e não-união de fraturas, preenchimento de falhas ósseas, osteotomias corretivas e reconstruções após a ressecção de neoplasia óssea. O uso de enxerto ósseo alógeno, comparado com o enxerto autógeno, tem como vantagens menor morbidez e dor pós-cirúrgica, diminuição do tempo cirúrgico e, principalmente, fornecimento de maior volume ósseo para a reconstrução adequada de uma grande falha óssea. As desvantagens do seu uso são os riscos de reação imunológica e transmissão de doenças, além da necessidade da formação de um banco de ossos, o que aumenta os custos e necessita de espaço apropriado. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a taxa e a forma de incorporação do aloenxerto ósseo cortical submetido ao congelamento em nitrogênio líquido e inserido em tíbias de ovelhas, visando à preservação do membro locomotor. Seis ovelhas clinicamente saudáveis, da raça Corriedale, com idade estimada entre dois e três anos, foram submetidas à avaliação radiográfica pré-operatória das tíbias para que fosse descartada qualquer alteração óssea. Simultaneamente, realizou-se a osteotomia da diáfise tibial de duas ovelhas para a retirada de um segmento de 7 cm que, após a remoção do periósteo e da medula óssea, foi imerso em nitrogênio líquido, tendo como finalidade a desvitalização óssea, e implantado imediatamente no outro paciente. A estabilização entre os fragmentos e o implante ósseo foi realizada com placa cirúrgica de compressão dinâmica (PCD). Após os procedimentos cirúrgicos, foram realizadas avaliações clínicas e radiográficas a cada 30 dias até o 180º dia de pós-operatório. Aos 60 dias de pós-operatório já se observava o completo uso funcional do membro operado. A união radiográfica das interfaces proximal e distal e a consolidação óssea ocorreram em tempo médio de 95 dias em todos os animais. Conclui-se que o aloenxerto ósseo cortical submetido ao congelamento em nitrogênio líquido é um método apropriado para a preservação do membro locomotor, tendo em vista que a incorporação do mesmo ocorreu gradualmente e a taxa foi de 100%.

Palavras-chave: enxerto ósseo alógeno, incorporação, placa de compressão dinâmica, ortopedia, ovino.

ABSTRACT

Bone grafting is employed in veterinary orthopedics with a variety of purposes as for arthrodesis, spinal fusions, fracture repairs, treatment of delayed or non-unions, filling bone defects, supporting corrective osteotomy, and as replacement in limb sparing techniques for tumor resection. The allograft bone, in contrast to the autologous bone graft, is associated with less site-donor morbidity and pain, reduced surgical time, and adequate bone supply to fill greater defects. Still, the allogeneic bone, besides requiring the establishment of a bone bank, can be a source of diseases and may induce immunogenic response. This study evaluated the allogeneic cortical bone graft incorporation after submission of the harvested fragment to a bout freezing in liquid nitrogen. Six adult clinically healthy sheep were submitted to a 7cm ostectomy of the tibial diaphysis. After removal of periosteum and bone marrow, the fragment was submersed in liquid nitrogen and implanted in another sheep missing a same-sized segment at the corresponding bone. Stabilization of the allograft in the host bone was accomplished by a dynamic compressive plate (DCP). Clinical and radiographic evaluations were performed in the immediate post-operative period and in every 30 days for six months after surgery. The proximal and distal host-graft interfaces showed radiographic union at a mean postoperative time of 95 days in all the animals. The cortical bone allograft submitted to liquid nitrogen freezing provided adequate bone healing in the sheep model, representing a feasible alternative for limb preservation techniques.

Keywords: *Allogeneic bone graft, incorporation, dynamic compressive plate, orthopedics, ovine.*

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------|--|----|
| Figura 1 - | Exposição da diáfise tibial, acesso cirúrgico à tibia em ovelha..... | 22 |
| Figura 2 - | Osteotomia com serra oscilatória da região diafisária tibial em ovelha..... | 22 |
| Figura 3 - | Sequência do processo de congelamento e descongelamento do fragmento ósseo. A) Submersão em nitrogênio líquido. B) Temperatura ambiente. C) Submersão em solução salina 0,9% estéril..... | 23 |
| Figura 4 - | Sequência da fixação do aloimplante tibial em ovelha. A) Fixação do aloimplante ao leito receptor com pinças espanholas. B) Perfuração para inserção do primeiro parafuso. C) Fixação do aloimplante com dois parafusos. D) Vista lateral da fixação definitiva do aloimplante ao leito receptor..... | 24 |
| Figura 5 - | Representação gráfica da pontuação atribuída por um avaliador utilizando o escore radiográfico alvitre por Ehrhart <i>et al.</i> (2005), adaptado para avaliação de aloenxertos ósseos corticais desvitalizados em nitrogênio líquido e aplicados em diáfise tibial de ovelhas no item incorporação/união do aloimplante na interface proximal e interface distal..... | 31 |
| Figura 6 - | Representação gráfica da pontuação atribuída por um avaliador utilizando o escore radiográfico alvitre por Ehrhart <i>et al.</i> (2005), adaptado para avaliação de aloenxertos ósseos corticais desvitalizados em nitrogênio líquido e aplicados em diáfise tibial de ovelhas no item qualidade óssea do aloimplante..... | 31 |
| Figura 7 - | Representação gráfica da pontuação atribuída por um avaliador utilizando o escore radiográfico alvitre por Ehrhart <i>et al.</i> (2005), adaptado para avaliação de aloenxertos ósseos corticais desvitalizados em nitrogênio líquido e aplicados em diáfise tibial de ovelhas no item qualidade do osso receptor..... | 32 |
| Figura 8 - | Representação gráfica da pontuação atribuída por um avaliador utilizando o escore radiográfico alvitre por Ehrhart <i>et al.</i> (2005), adaptado para avaliação de aloenxertos ósseos corticais desvitalizados em nitrogênio líquido e aplicados em diáfise tibial de ovelhas no item aspecto e fixação da placa e parafusos..... | 32 |
| Figura 9 - | Representação gráfica da pontuação atribuída por um avaliador utilizando o escore radiográfico alvitre por Ehrhart <i>et al.</i> (2005), adaptado para avaliação de aloenxertos ósseos corticais desvitalizados em nitrogênio líquido e aplicados em diáfise tibial de ovelhas no item impressão global da consolidação..... | 33 |
| Figura 10 - | Representação gráfica do tempo de incorporação radiográfica das interfaces proximal e distal em diáfise tibial de ovelhas submetidas à implantação de segmento ósseo cortical alógeno desvitalizado em nitrogênio líquido. A ovelha seis foi quem sofreu a fratura do implante..... | 33 |

| | | |
|-------------|--|----|
| Figura 11 - | Representação gráfica do tempo médio e do desvio padrão da incorporação radiográfica das interfaces proximal e distal, individualmente, e do tempo médio e do desvio padrão geral da incorporação das interfaces proximal e distal em diáfise tibial de ovelhas submetidas à implantação de segmento ósseo cortical alógeno desvitalizado em nitrogênio líquido..... | 34 |
| Figura 12 - | Imagem radiográfica crânio-caudal da incorporação do aloenxerto ósseo desvitalizado com nitrogênio líquido, implantado em tibia de ovelha, em diferentes períodos de pós-operatório. A) Pós-operatório imediato; B) 30 dias; C) 60 dias; D) 90 dias; E) 120 dias; F) 150 dias; G) 180 dias. Observar a fratura do implante aos 60 dias e a posterior calcificação e remodelamento aos 180 dias..... | 35 |
| Figura 13 - | Imagem radiográfica médio-lateral da incorporação do aloenxerto ósseo desvitalizado com nitrogênio líquido, implantado em tibia de ovelha, em diferentes períodos de pós-operatório. A) Pós-operatório imediato; B) 30 dias; C) 60 dias; D) 90 dias; E) 120 dias; F) 150 dias; G) 180 dias. Observar o desnível entre o implante e a porção proximal e distal da tibia receptora no pós-operatório imediato e a posterior incorporação aos 90 dias..... | 36 |
| Figura 14 - | Imagem radiográfica crânio-caudal da incorporação do aloenxerto ósseo desvitalizado com nitrogênio líquido, implantado em tibia de ovelha, em diferentes períodos de pós-operatório. A) Pós-operatório imediato; B) 30 dias; C) 60 dias; D) 90 dias; E) 120 dias; F) 150 dias; G) 180 dias. Observar o afastamento na face medial da interface distal e na face lateral da interface proximal no pós-operatório imediato. Aos 30 dias o afastamento da placa na região proximal. Incorporação do implante aos 90 dias..... | 37 |
| Figura 15 - | Imagem radiográfica crânio-caudal da incorporação do aloenxerto ósseo desvitalizado com nitrogênio líquido, implantado em tibia de ovelha, em diferentes períodos de pós-operatório. A) Pós-operatório imediato; B) 30 dias; C) 60 dias; D) 90 dias; E) 120 dias; F) 150 dias; G) 180 dias. Observar a reabsorção na cortical lateral, ao redor do 4º parafuso aos 60 dias e a posterior incorporação aos 90 dias..... | 38 |
| Figura 16 - | Sequência das avaliações macroscópicas das tíbias. A e B) Presença de tecidos moles aderidos ao osso e envolvendo parcialmente a placa e os parafusos. C e D) Regiões das osteotomias (retângulos), com a presença de tecido ósseo envolvendo parcialmente a placa e os parafusos. E) Presença de pequena porção de união incompleta (seta) na interface implante/osso hospedeiro..... | 40 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|--|----|
| Tabela 1 - | Escore para avaliação radiográfica alvitre por Ehrhart <i>et al.</i> (2005) e adaptado para avaliação dos aloenxertos corticais desvitalizados e implantados em diáfise tibial de ovelhas..... | 26 |
|------------|--|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------------|---|
| CEUA | - Comitê de Ética no Uso de Animais |
| °C | - Graus Celsius |
| Cm | - Centímetros |
| PCD | - Placa de compressão dinâmica |
| HE | - Hematoxilina e Eosina |
| IM | - Intramuscular |
| IV | - Intravenoso |
| Kg | - Quilogramas |
| kV | - Quilovolts |
| LACVET-UFRGS | - Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias |
| mA | - Miliampere |
| mL | - Mililitros |
| Mm | - Milímetros |
| MPA | - Medicação pré-anestésica |
| PMO | - Proteínas morfogenéticas ósseas |
| RS | - Rio Grande do Sul |
| UFRGS | - Universidade Federal do Rio Grande do Sul |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 14 |
| 2.1 | Enxertos e implantes ósseos | 14 |
| 2.2 | Osso cortical desvitalizado extracorporeamente com nitrogênio líquido ... | 17 |
| 2.3 | Preservação do membro (<i>Limb-sparing</i>) | 18 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 19 |
| 3.1 | Procedimento pré-operatório | 19 |
| 3.2 | Procedimento anestésico | 20 |
| 3.3 | Procedimento cirúrgico | 20 |
| 3.4 | Cuidados pós-operatórios | 25 |
| 3.5 | Avaliação clínica | 25 |
| 3.6 | Avaliação radiográfica | 25 |
| 3.7 | Avaliação macroscópica | 27 |
| 3.8 | Avaliação microscópica | 27 |
| 4 | RESULTADOS | 28 |
| 4.1 | Procedimento pré-operatório | 28 |
| 4.2 | Procedimento anestésico | 28 |
| 4.3 | Procedimento cirúrgico | 28 |
| 4.4 | Avaliação clínica | 29 |
| 4.5 | Avaliação radiográfica | 29 |
| 4.6 | Avaliação macroscópica | 39 |
| 4.7 | Avaliação microscópica | 41 |
| 5 | DISCUSSÃO | 42 |
| 6 | CONCLUSÃO | 46 |
| | REFERÊNCIAS | 47 |
| | ANEXO A - Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais | 52 |

1 INTRODUÇÃO

Na Medicina Veterinária, em casos de fraturas cominutivas de ossos longos, neoplasias ósseas, não-uniões e uniões viciosas em cães e gatos, a utilização de enxerto ósseo possui importância desde 1976, especialmente nas funções de osteocondução, osteoindução e suporte mecânico.

Nesse contexto, o tratamento de neoplasias ósseas e de tecidos moles, visando à manutenção funcional e duradoura do membro afetado sem a necessidade de amputação, tem sido facilitado pelo avanço do diagnóstico por imagem, da quimioterapia adjuvante e das técnicas operatórias. Em diversos casos, a amputação cirúrgica do membro não é a opção adequada devido a doenças concomitantes, problemas neurológicos ou pelo simples fato do proprietário não aceitar tal procedimento.

O enxerto ósseo autógeno é considerado como padrão-ouro na reparação óssea, porém esta opção pode ser preterida, pois aumenta a morbidez, a dor, o tempo cirúrgico e, principalmente, não fornece volume suficiente para a reconstrução adequada de uma grande falha óssea. Logo, o enxerto alógeno surge como uma boa opção. Entretanto, existe o risco de reação imunológica ou transmissão de doenças, além da necessidade de formação de um banco de ossos, o que aumenta os custos e necessita de espaço apropriado. A maneira de minimizar esses riscos é submeter o enxerto ósseo alógeno a um método de desvitalização.

Tsuchiya *et al.* (2005) relataram o sucesso de um novo método de desvitalização extracorpórea de autoenxertos ósseos humanos, os quais continham células neoplásicas, utilizando a hipotermia. Especificamente, os autores utilizaram o nitrogênio líquido a -196 °C como agente criogênico para esterilizar as células do tumor ósseo.

Na Medicina Veterinária, o nitrogênio líquido já foi utilizado em um experimento, como método de desvitalização extracorpórea de enxerto autógeno, obtendo resultados satisfatórios (SILVA, 2011). Assim, infere-se que o nitrogênio líquido também se torna uma opção válida para a desvitalização de enxertos alógenos, sendo possível dar continuidade a esta inovadora linha de pesquisa.

O presente projeto avaliou a taxa e a forma de incorporação de enxertos ósseos corticais alógenos, desvitalizados com nitrogênio líquido e inseridos em tíbias de ovelhas, visando à preservação do membro locomotor.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Enxertos e implantes ósseos

Historicamente, o primeiro transplante ósseo foi registrado em 1668, onde se utilizou enxerto ósseo xenógeno transplantado de um crânio canino para o crânio de um soldado russo. Foi realizado pelo cirurgião holandês Job Van Meekeren, obtendo completa integração do enxerto (WEIGEL, 1993). O cirurgião Josef Horak, em 1914, publicou o primeiro uso de enxerto ósseo proveniente de um cadáver para a ressecção de um sarcoma, onde destacou que o doador deveria ser recém morto e sem afecções infecciosas (JULIÁN; VALENTÍ, 2006).

Os precursores na utilização de enxertia óssea na Medicina Veterinária foram Wadsworth e Henry, em 1976, onde descreveram a utilização de aloenxerto ósseo cortical em dois felinos. Em um dos animais foi utilizado enxerto ósseo cortical alógeno à fresco e autógeno nos fêmures esquerdo e direito respectivamente, fixados com placa e parafusos, sendo este um estudo experimental. No outro caso foi implantado enxerto ósseo congelado, com quatro centímetros, em uma falha óssea provocada por fratura cominutiva de fêmur. Em ambos os casos foi obtida consolidação óssea satisfatória.

Quanto à nomenclatura, enxerto ou implante ósseo é o tecido transplantado para outra região no mesmo indivíduo, ou entre indivíduos da mesma espécie ou entre indivíduos de espécies diferentes, tendo como objetivo reconstruir perdas do esqueleto causadas por traumas, infecções ou ressecções de tumores (GOLDBERG; STEVENSON, 1987). O termo enxerto ósseo refere-se àqueles tecidos que, quando transplantados, ainda preservam células viáveis. Diferentemente do termo implante ósseo, que se refere ao transplante de tecido sem células viáveis ou a implantes não biológicos, como o metal, cerâmica, entre outros (STEVENSON, 1998a).

Em relação à origem, os enxertos ou implantes ósseos podem ser classificados de diferentes formas. O termo autógeno é utilizado quando o tecido é transplantado de uma região para outra no mesmo indivíduo (WEIGEL, 1993). Este tipo de enxertia é compatível histologicamente com o sistema imunológico do hospedeiro e não causam rejeição (HULSE; JOHNSON, 2002). O enxerto ou implante ósseo proveniente de outro indivíduo da mesma espécie, porém geneticamente diferente, é classificado como alógenos (PIERMATEI; FLO, 1999). Este tipo de enxertia geralmente é submetido a

algum método de conservação anteriormente à implantação (JOHNSON, 2007). Xenógeno é o enxerto ou implante ósseo transportado entre indivíduos de diferentes espécies, onde a distância genética e o potencial para rejeição são maiores (WEIGEL, 1993). Há ainda o isógeno, o qual é o enxerto ou implante ósseo entre indivíduos diferentes, porém geneticamente idênticos (MILLIS; MARTINEZ, 2003). Na prática cirúrgica, os enxertos/implantes autógenos e alógenos são os que têm sido mais utilizados, pelo simples fato dos xenógenos apresentarem resposta antigênica exacerbada (ARO; AHO, 1993).

Entre as opções de substitutos ósseos, destacam-se as proteínas morfogenéticas ósseas (PMO). Estas pertencem a uma superfamília de proteínas denominada de fatores beta de indução de crescimento, sendo responsáveis pela regulação de diversos processos biológicos, incluindo o crescimento celular, a diferenciação e a formação embrionária, além de atuarem na regeneração do tecido esquelético e na atividade osteogênica (REDDI; CUNNINGHAM, 1993).

Os enxertos/implantes também podem ser classificados conforme a sua composição. Quando composto principalmente por osso trabecular, é classificado como esponjoso, o qual geralmente é coletado da metáfise de ossos longos. O enxerto/implante córtico-esponjoso é composto por osso cortical e osso trabecular, e o enxerto/implante cortical por osso cortical, sendo coletado da diáfise de ossos longos, podendo ser utilizado à fresco ou conservado (SINIBALDI, 2001). Ainda assim, os enxertos/implantes osteocondrais são compostos por osso subcondral e cartilagem articular e os de medula óssea são compostos por células mesenquimais indiferenciadas (MILLIS; MARTINEZ, 2003).

Os enxertos/implantes ósseos podem atuar através de três mecanismos biológicos: osteogênese, osteoindução e osteocondução, e através de um mecanismo físico, sendo este o suporte mecânico. As principais funções dos enxertos/implantes ósseos são a osteocondução, a osteoindução e o suporte mecânico (RAPPETI *et al.*, 2007).

A osteogênese é a formação de osso pelas células que sobreviveram à enxertia. O enxerto esponjoso, por conter células quiescentes, células mesenquimais indiferenciadas e osteoblastos ativos, tem grande potencial osteogênico. Santos e Rahal (2004) estimam que apenas 10% das células desse tipo de enxerto sobrevivam à transferência.

A osteoindução ocorre quando substâncias originárias da enxertia óssea têm a capacidade de induzir células mesenquimais do hospedeiro a se transformarem em osteoblastos (SILVA *et al.*, 2000).

O processo tridimensional de intracrescimento dos capilares em processo de brotamento, do tecido perivascular e das células osteoprogenitoras do leito recipiente, dentro das estruturas do implante ou enxerto, é denominado osteocondução (STEVENSON, 1998a).

Quanto à incorporação do enxerto ósseo, esta é determinada por cinco fases. A inflamatória, onde há um aumento da atividade osteoblástica e posteriormente a revascularização do enxerto. A osteocondução, com a função de arcabouço para o crescimento de vasos e de osso. A osteoindução, na qual as células mesenquimais do hospedeiro são induzidas a se transformarem em osteoblastos. E ainda a remodelação óssea, caracterizada pela formação e reabsorção contínua de osso (SILVA *et al.*, 2000).

Na rotina de clínicas e hospitais veterinários a ocorrência de fraturas cominutivas de ossos longos, neoplasias ósseas, não-uniões e uniões viciosas são comuns tanto em cães quanto em gatos. O uso de enxerto ou implantes, como forma de substituição de um segmento ou preenchimento de uma falha óssea, é opção de tratamento dessas afecções ortopédicas (BLOOMBERG *et al.*, 1984; MORELLO *et al.*, 2001; ALIEVI, 2006).

Os implantes ósseos alógenos são uma das opções para o tratamento dessas afecções, podendo ser conservados de diversas formas, motivo pelo qual têm sido amplamente utilizados, obtendo resultados satisfatórios (PINTO JÚNIOR, 1995; MORELLO *et al.*, 2001). Há vantagens nesse tipo de implante quando comparado com o enxerto autógeno como, por exemplo, diminuição da morbidez, da dor, do tempo cirúrgico e do gasto com anestésicos (MILLIS; MARTINEZ, 2003), além de também poder ser utilizado para aumentar ou melhorar a congruência articular, como na displasia coxofemoral tratada com acetabuloplastia extracapsular (FERREIRA, 2003; FERREIRA *et al.*, 2007).

Os implantes ósseos corticais alógenos são usados com maior frequência em defeitos corticais grandes na diáfise de ossos longos, sendo em veterinária a principal indicação no tratamento de fraturas cominutivas diafisárias (KERWIN *et al.*, 1991). Também são empregados para alongamento ósseo, no tratamento de união viciosa e não-união de fraturas e no salvamento de membros com tumores ósseos (LaRUE *et al.*, 1989; SINIBALDI, 1989).

Em relação à contraindicação da utilização de implantes ósseos corticais alógenos, a mesma ocorre nos casos de fraturas expostas, áreas com infecção presente e situações em que a fixação interna rígida não pode ser aplicada ao implante e ao osso hospedeiro (MILLIS; MARTINEZ, 2003).

2.2 Osso cortical desvitalizado extracorporeamente com nitrogênio líquido

Os principais métodos de desvitalização extracorpórea de ossos corticais já descritos são a autoclavagem, a pasteurização, a irradiação e o congelamento com nitrogênio líquido (TSUCHIYA *et al.*, 2010). Na autoclavagem a temperatura recomendada é de 132 °C por uma hora, podendo afetar biomecanicamente os implantes ósseos diminuindo a sua resistência à compressão (VICECONTI *et al.*, 1996). A irradiação diminui a capacidade osteoindutora do implante (ZHANG *et al.*, 1997).

As vantagens descritas do nitrogênio líquido, comparado aos outros métodos de desvitalização óssea, são o baixo custo, a pequena quantidade de equipamento especializado necessário, a simplicidade da técnica e a dispensa do controle rigoroso da temperatura durante a desvitalização (BURACCO *et al.*, 2002; YAMAMOTO *et al.*, 2003; JEON *et al.*, 2007a; TSUCHIYA *et al.*, 2010). Outra vantagem também descrita por Yamamoto *et al.* (2003) é a manutenção da resistência dos ossos corticais submetidos à desvitalização com nitrogênio líquido.

Em Medicina Veterinária ainda são raros os relatos da utilização de desvitalização extracorpórea de osso cortical com nitrogênio líquido. Porém, na Medicina Humana, essa substância está sendo cada vez mais utilizado, pois diminui as chances de reações imunogênicas e a transmissão de doenças, além de evitar a necessidade de formação de um banco de ossos (BURACCO *et al.*, 2002; BOSTON *et al.*, 2007).

Kawano *et al.* (2010) trazem ainda, como vantagem da utilização do nitrogênio líquido na desvitalização extracorpórea óssea cortical, a crioinmunologia, na qual em casos tumorais desencadeia uma resposta imunológica diretamente contra o tumor durante o processo de congelamento, minimizando as chances de recorrência local e de metástases para outros órgãos.

2.3 Preservação do membro (*Limb-sparing*)

A cirurgia reconstrutiva que envolve a ressecção tumoral em bloco e a reconstrução da coluna óssea, associada ou não à artrodese da articulação adjacente, é denominada *limb-sparing* (LIPTAK *et al.*, 2006a; LIPTAK *et al.*, 2006b). Nesta, a fixação do enxerto ósseo é feita através de uma placa (WATSON; LUCROY, 2002), haste intramedular bloqueada ou prótese (TSUCHIYA *et al.*, 2005).

Esta técnica tem sido indicada para cães que não são passíveis à amputação do membro, como os de porte gigante, aqueles que desenvolveram afecções neurológicas ou osteoartrite severa e os animais obesos, ou ainda simplesmente pelo fato de o proprietário discordar do método radical (WATSON; LUCROY, 2002; LIPTAK *et al.*, 2004).

Em cães com osteossarcoma, essa técnica é descrita para o terço distal do rádio, proximal do úmero, distal da tibia e proximal do fêmur. Os casos em que se tem conseguido os melhores resultados são os de tumores do rádio e da ulna, sendo justificado pelo fato dos cães tolerarem bem a artrodese pancarpal, enquanto a artrodese nas articulações do ombro, joelho e tarso estão frequentemente associadas a altas taxas de complicações e a uma pobre função locomotora do membro (LIPTAK *et al.*, 2004; LIPTAK *et al.*, 2006a; LIPTAK *et al.*, 2006b).

Alguns critérios devem ser levados em consideração para aqueles animais com osteossarcoma serem passíveis de submissão à técnica de *limb-sparing*. O osteossarcoma deve estar restrito ao osso (LIPTAK *et al.*, 2004), onde o tumor envolve radiograficamente menos de 50% da extensão óssea, não havendo sinais de metástase e que o animal tenha boas condições de saúde (WATSON; LUCROY, 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas seis ovelhas adultas clinicamente sadias, da raça Corriedale, com idade estimada entre dois e três anos, pesando entre 40 e 50 quilogramas (kg), procedentes de uma fazenda criadora de ovinos, no município de Canoas – Rio Grande do Sul (RS). Os animais foram mantidos em baias coletivas de 12 metros quadrados, com três animais em cada baia, localizadas no Setor de Internação de Grandes Animais do Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV), onde permaneceram até o término das avaliações. Os animais receberam água *ad libitum*, ração comercial para ovinos e feno de alfafa na quantidade e proporção recomendadas para a espécie. Antes de serem operadas respeitou-se um período de adaptação de pelo menos 14 dias, quando passaram por exame clínico geral, como avaliação da coloração de mucosa, tempo de preenchimento capilar, temperatura, ausculta cardiorrespiratória, deambulação, e vermifugação. Foram realizados também exames pré-anestésicos, constando de hemograma completo e testes bioquímicos, como a dosagem de aspartato-aminotransferase (AST) e creatinina, no Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias (LACVET-UFRGS), além do exame radiográfico da tíbia direita nas projeções craniocaudal e mediolateral de todos os animais.

As cirurgias foram realizadas no Bloco Cirúrgico de Ensino da Faculdade de Veterinária da UFRGS. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em três dias, sendo que em cada dia foram operadas duas ovelhas simultaneamente. As ovelhas foram operadas por equipes anestésicas e cirúrgicas distintas, com equipamentos e instrumentais independentes.

O projeto foi analisado e validado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (Anexo A).

3.1 Procedimento pré-operatório

No dia anterior a cada cirurgia, os animais foram submetidos à tricotomia de toda a circunferência da tíbia direita, ampliada até a região média da coxa (limite proximal) e até abaixo do tarso (limite distal). Também foi realizada tricotomia da região cervical lateral, para coleta sanguínea pela veia jugular externa. Os animais ficaram em jejum hídrico de 12 horas e sólido de 24 horas.

No pré-operatório imediato foi administrado enrofloxacina 5mg.kg^{-1} intramuscular (IM), como terapia antimicrobiana.

3.2 Procedimento anestésico

Como medicação pré-anestésica (MPA), os animais receberam maleato de acepromazina na dose de $0,1\text{mg.kg}^{-1}$, e meperidina na dose de 3mg.kg^{-1} , ambos pela via intramuscular (IM). Após 15 minutos da MPA, foi utilizado propofol na dose de 5mg.kg^{-1} para indução anestésica, pela via intravenosa (IV), seguida de intubação orotraqueal. A manutenção anestésica foi realizada com isoflurano em oxigênio 100%, utilizando aparelho de anestesia inalatória em circuito anestésico semiaberto. Durante o procedimento cirúrgico os animais foram mantidos em fluidoterapia com solução de ringer lactato, em gotejamento venoso de 15mL.kg^{-1} por hora pela veia cefálica, e recebiam citrato de fentanila por essa via ($2\mu\text{g.kg}^{-1}$ IV) em caso de superficialização do plano anestésico ou qualquer sinal de dor.

3.3 Procedimento cirúrgico

Após a indução anestésica, os animais foram posicionados na mesa cirúrgica em decúbito lateral direito, tendo o membro a ser operado apoiado lateralmente à mesa. A antisepsia foi feita utilizando o método com álcool e povidine, sendo duas aplicações de álcool com 30 segundos de contato cada, intercaladas por uma aplicação de povidine durante dois minutos. A região distal do membro foi envolvida com gaze tubular previamente esterilizada, sendo feita a delimitação do campo cirúrgico utilizando panos esterilizados. Foi efetuado acesso medial à diáfise tibial direita com incisão de pele e afastamento dos tecidos moles adjacentes utilizando dois afastadores de Farabeuf. A região da diáfise foi exposta e osteotomizada, sendo protegida com afastadores flexíveis de Haberer (Figura 1). As osteotomias proximal e distal foram realizadas com serra oscilatória pneumática, retirando-se um fragmento ósseo de 7 cm de comprimento. Durante a osteotomia, a área foi constantemente irrigada com solução salina 0,9% estéril em temperatura ambiente (Figura 2). Realizada a osteotomia, removeu-se o periósteo, o endósteo e a medula óssea do segmento ósseo, com elevador periosteal e macho de rosca, respectivamente, e novamente lavou-se com solução salina 0,9%

estéril. Este segmento foi implantado no outro animal da mesma espécie, promovendo a troca dos implantes entre os dois indivíduos após passar pelo processo de desvitalização extracorpórea através da imersão em nitrogênio líquido por 20 minutos (Figura 3A), seguido de descongelamento em temperatura ambiente por 15 minutos (Figura 3B) e imersão em solução salina 0,9% estéril por mais 15 minutos (Figura 3C).

Para a fixação do aloimplante ósseo foi utilizada uma placa de compressão dinâmica (PCD – Ortosintese, São Paulo, SP) de dez furos, com 170 mm de comprimento, 12 mm de largura e 4 mm de espessura, e oito parafusos corticais com 4,5 mm de diâmetro. O aloimplante foi inserido na falha óssea e fixado temporariamente à placa, previamente curvada para adaptar-se perfeitamente ao leito receptor, com pinças espanholas (Figura 4A). Utilizando um motor pneumático ortopédico e broca de 3,2 mm de diâmetro, fez-se um orifício em cada cortical do implante, seguido da confecção da rosca com macho e inserção do parafuso. Este procedimento foi repetido, resultando na fixação definitiva do implante à placa com dois parafusos (Figura 4C).

Em seguida, realizou-se a fixação da placa temporariamente aos segmentos proximal e distal da face medial da tíbia com pinças de espanholas. Para a fixação definitiva, foram utilizados seis parafusos, três no fragmento proximal e três no distal. Os dois parafusos imediatamente adjacentes ao implante foram inseridos primeiramente e com efeito compressivo, utilizando-se o guia de broca compressivo. A seguir, os demais parafusos foram inseridos de maneira aleatória, porém intercalando-se os segmentos e sem efeito compressivo, utilizando-se o guia de broca neutro (Figura 4D).

Realizada a fixação da placa, a área foi abundantemente lavada com solução salina 0,9% estéril morna. Em seguida, fez-se a rafia do periósteo e do tecido subcutâneo utilizando-se fio sintético absorvível poliglactina 910 2-0, em padrão contínuo simples, e a pele foi suturada com mononáilon 3-0 em padrão isolado simples.

Figura 1 – Exposição da diáfise tibial, acesso cirúrgico à tibia em ovelha.

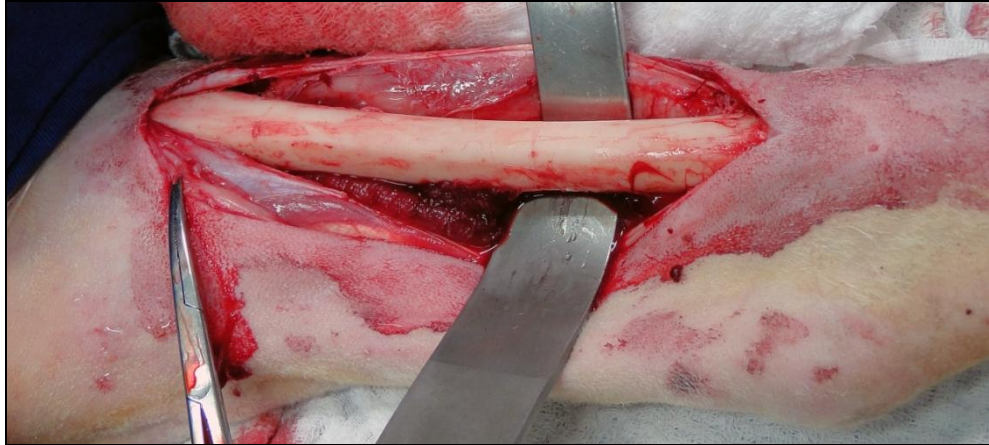


Figura 2 – Osteotomia com serra oscilatória da região diafisária tibial em ovelha.

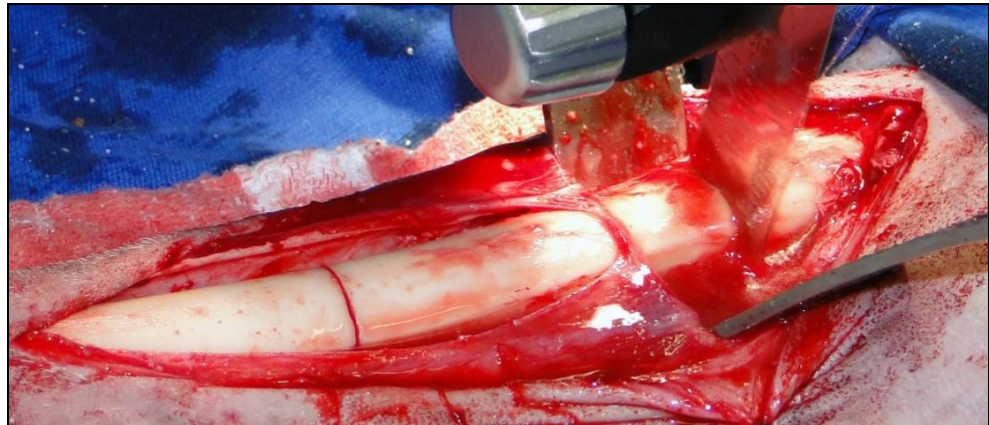
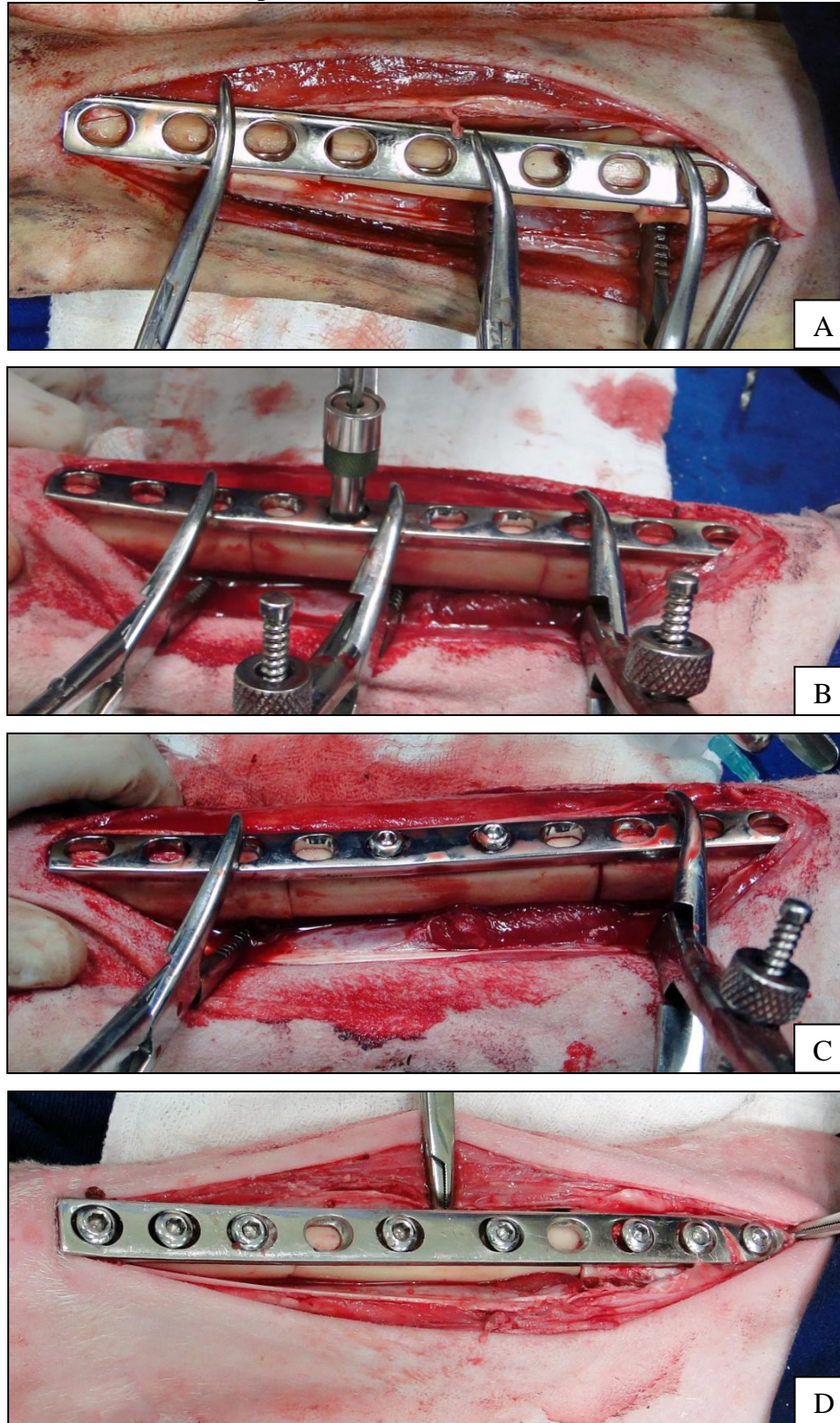


Figura 3 – Sequência do processo de congelamento e descongelamento do aloenxerto ósseo. A) Submersão em nitrogênio líquido. B) Temperatura ambiente. C) Submersão em solução salina 0,9% estéril.



Figura 4 – Sequência da fixação do aloimplante tibial em ovelha. A) Fixação do aloimplante ao leito receptor com pinças espanholas. B) Perfuração para inserção do primeiro parafuso. C) Fixação do aloimplante com dois parafusos. D) Vista lateral da fixação definitiva do aloimplante ao leito receptor.



3.4 Cuidados pós-operatórios

No pós-operatório imediato foi realizada terapia analgésica com cloridrato de tramadol, 2 mg.kg^{-1} intramuscular (IM). Como anti-inflamatório foi administrado meloxicam, $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ IM, repetido a cada 24 horas, durante 5 dias. A terapia antimicrobiana empregada foi enrofloxacin, 5 mg.kg^{-1} IM, sendo repetida a cada 12 horas, durante 7 dias. A analgesia nos dois dias consecutivos à cirurgia foi realizada com sulfato de morfina, na dose de $0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ IM, a cada 12 horas. A ferida cirúrgica foi higienizada diariamente com solução salina 0,9% estéril e mantida com curativo composto por gaze e atadura, até a remoção dos pontos de pele aos 10 dias.

3.5 Avaliação clínica

Durante os primeiros dez dias de pós-cirúrgico, os animais permaneceram em baias individuais, favorecendo o repouso, facilitando a observação da ingestão hídrica e de sólidos, os cuidados com a ferida cirúrgica e a administração das medicações.

Foram realizadas avaliações quanto à deambulação, através de observação clínica, e caso fossem percebidas alterações como claudicação, déficit de propriocepção e/ou atrofia muscular, as mesmas eram anotadas em planilha.

3.6 Avaliação radiográfica

Para diagnosticar qualquer alteração óssea, todos os animais foram expostos ao exame radiográfico do membro pélvico direito antecipadamente à cirurgia. Logo após o procedimento cirúrgico, com os animais recuperados da anestesia, realizou-se uma nova radiografia do membro operado. Posteriormente, para o controle radiográfico, foram repetidas tais avaliações a cada 30 dias até aos 180 dias, somando sete exames radiográficos pós-operatórios por animal.

Para a realização dos exames radiográficos, foi necessária apenas a contenção física dos animais. As execuções dos exames radiográficos foram sempre com o mesmo aparelho radiográfico e carga padrão de 54 quilovolts (kV) e 1.4 miliampere (mA),

numa distância de aproximadamente 80 cm, nas projeções crânio-caudal e médio-lateral. A revelação era realizada utilizando processadora digital.

Estimou-se a união radiográfica no momento em que se observou a continuidade cortical completa na interface osso/aloimplante e remodelamento ativo dos calos periosteal e endosteal.

Os exames radiográficos foram avaliados através da Tabela 1, sugerido por Ehrhart *et al.* (2005) e adaptada para este trabalho, onde um ortopedista determinou o escore de pontuação para cada radiografia.

Tabela 1 – Escore para avaliação radiográfica alvitre por Ehrhart *et al.* (2005) e adaptado para avaliação dos aloenxertos corticais desvitalizados e implantados em diáfise tibial de ovelhas.

| Critérios para o escore | Pontos |
|---|--------|
| INCORPORAÇÃO/UNIÃO DO ALOIMPLANTE | |
| Interface Proximal | |
| Perda do detalhe da linha de osteotomia. | 2 |
| Linha de osteotomia ainda visível. | 1 |
| Linha de osteotomia larga. | 0 |
| Interface Distal | |
| Perda do detalhe da linha de osteotomia. | 2 |
| Linha de osteotomia ainda visível. | 1 |
| Linha de osteotomia larga. | 0 |
| QUALIDADE ÓSSEA DO ALOIMPLANTE | |
| Contorno do aloimplante inalterado. | 2 |
| Presença de leve reabsorção da cortical, sem deformação e/ou fratura. | 1 |
| Marcante reabsorção da cortical, deformação e/ou fratura. | 0 |
| QUALIDADE DO OSSO RECEPTOR | |
| Marcante formação de novo osso, com calo formando ponte óssea. | 2 |
| Formação de novo osso receptor, mas com ponte óssea pobre. | 1 |
| Sem produção de novo osso. | 0 |
| ASPECTO E FIXAÇÃO DA PLACA E PARAFUSOS | |
| Implantes metálicos com aparência normal. | 2 |
| Lise ao redor dos parafusos. | 1 |
| Afrouxamento, migração ou quebra da placa e/ou parafusos | 0 |
| IMPRESSÃO GLOBAL DA CONSOLIDAÇÃO | |
| União radiográfica. | 2 |
| Evidência radiográfica de calo, mas com união incompleta. | 1 |
| Mínima ou sem evidência radiográfica de união. | 0 |

3.7 Avaliação macroscópica

Terminada a avaliação radiográfica aos 180 dias, os animais foram submetidos à eutanásia. A mesma foi executada com cloreto de potássio intravenoso (IV), após anestesia geral com tiopental sódico IV, conforme determina o Conselho Federal de Medicina Veterinária na resolução nº 714 de junho de 2002.

Dois dos animais foram escolhidos de forma aleatória para que fossem observadas as tíbias direitas quanto às possíveis alterações como a reação dos tecidos moles, a formação de calo ósseo e a presença de infecção, além do aspecto e a estabilidade da placa, dos parafusos e do aloimplante ósseo. A placa e os parafusos foram retirados, e as tíbias foram armazenadas em formol tamponado a 10%, por um período mínimo de 72 horas, para posteriormente realizar a avaliação microscópica.

3.8 Avaliação microscópica

As tíbias que permaneceram no formol tamponado a 10% foram seccionadas transversalmente em seis locais para confecção de três fragmentos. Uma secção foi realizada no fragmento proximal, a cerca de 1 cm da linha de interface osso/aloimplante proximal; outra no centro do aloimplante; e a última no fragmento distal, a cerca de 1 cm da linha de interface osso/aloimplante distal.

Os fragmentos foram conservados em ácido nítrico a 10% para a descalcificação do tecido e posterior processamento pela técnica de inclusão em parafina. Os cortes histológicos foram realizados com a espessura de 5 micras e corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE). As lâminas foram examinadas em microscópio óptico para análise descritiva dos achados.

4 RESULTADOS

4.1 Procedimentos pré-operatórios

O período de adaptação pré-operatória ambientou os animais as suas novas instalações e a dieta. O período de jejum sólido e líquido foi adequado, já que não houve complicações como regurgitação, falsa via e timpanismo trans-operatório.

4.2 Procedimento anestésico

O protocolo anestésico realizado se mostrou eficiente para a execução do procedimento cirúrgico, fornecendo analgesia, relaxamento muscular apropriado, manutenção adequada do plano anestésico e um retorno anestésico sem intercorrências.

4.3 Procedimento cirúrgico

O acesso cirúrgico realizado foi adequado na exposição óssea, nas osteotomias e na fixação do implante. Durante a realização da osteotomia ocorreu sangramento medular em todos os animais, o qual facilmente pôde ser controlado através de compressão com gaze na região da medula óssea.

A remoção da medula óssea e do restante do periósteo, o que corresponde à preparação inicial do enxerto, foi realizada fácil e rapidamente.

Ao longo do processo de desvitalização do enxerto, ocorreu a evaporação de parte do nitrogênio líquido, havendo a necessidade de reposição do mesmo no recipiente, para que se fosse mantida a total submersão do fragmento ósseo. Um litro de nitrogênio líquido para cada fragmento foi a quantidade suficiente para a realização de tal procedimento.

Não ocorreram complicações durante a perfuração dos implantes e durante a confecção da rosca para o parafuso. Porém, em um dos animais, no momento de inserção de um dos parafusos no implante, houve a formação de uma fissura na região cortical lateral do mesmo (medindo aproximadamente 4,5 mm de comprimento). Essa

falha não causou afrouxamento do parafuso, tanto logo após a sua colocação, quanto até o término das avaliações radiográficas aos 180 dias. Também não comprometeu o apoio do membro no pós-operatório, a deambulação e a evolução satisfatória do processo de incorporação do implante.

4.4 Avaliação clínica

A utilização de medicação antimicrobiana no pré e no pós-operatório, juntamente com os cuidados de limpeza e proteção do ferimento cirúrgico com gaze e atadura, foi suficiente na prevenção de processos infecciosos, não sendo observados sinais de infecção. A sutura de pele foi removida aos dez dias, quando constatada a completa cicatrização da pele.

Após a recuperação anestésica, os animais já eram capazes de se manter em estação e logo se alimentavam. Os cuidados no pós-operatório foram facilitados, já que os animais eram mantidos em baias individuais durante os dez primeiros dias, bem como o monitoramento da ingestão alimentar e a avaliação do estado geral de cada animal.

Durante os primeiros 14 dias de pós-operatório, os animais apoiavam o membro operado de forma discreta no solo, não havendo sustentação completa do seu peso. O uso funcional do membro operado ocorreu de forma gradual até próximo aos 60 dias de pós-operatório, onde havia completa sustentação do peso, não sendo mais observado claudicação.

Em um dos animais ocorreu fratura do implante, não sendo esse, porém, o que sofreu a fissura na região cortical lateral. Apesar da fratura, não houve diferença quanto ao tempo da recuperação e ao uso funcional do membro, quando comparado com os outros animais.

4.5 Avaliação radiográfica

A contenção física foi suficiente para a realização dos exames radiográficos, não gerando o risco de causar qualquer tipo de lesão ao animal.

Os resultados das avaliações radiográficas relacionados aos parâmetros de incorporação/união das interfaces proximal e distal, qualidade óssea do aloimplante, qualidade do osso receptor, aspecto e fixação da placa e parafusos e impressão global da consolidação estão ilustradas nas Figuras 5 a 10.

O resultado porcentual da incorporação/união e da consolidação das 12 interfaces, já que eram seis animais e cada animal com uma interface proximal e uma distal, foi de 100%. O tempo médio e o desvio padrão para obtenção desse resultado foi de $95 \pm 21,53$ dias (mínimo 60 dias e máximo 150 dias). O tempo médio e o desvio padrão para a incorporação da interface proximal foi de $95 \pm 12,24$ dias e da distal foi de $95 \pm 29,49$ dias (Figura 11). O animal que levou mais tempo para que ocorresse a consolidação sofreu uma fratura na região central do implante aos 60 dias, o que causou envergamento da placa na altura do 5º parafuso e exuberante calo ósseo na região. Apesar disso, ao longo do período de avaliação radiográfica, constatou-se remodelamento e total consolidação da fratura e incorporação do implante (Figura 12C).

Em um dos animais, na radiografia realizada no pós-operatório imediato, observou-se um desnível entre o implante e a porção proximal e distal da tibia receptora, não interferindo no processo de união das interfaces (Figura 13A).

Já em outro animal, também no período de pós-operatório imediato, constatou-se um pequeno afastamento na face medial da interface distal (Figura 14A). Neste mesmo animal, aos 30 dias de pós-operatório, diagnosticou-se o afrouxamento do primeiro parafuso, localizado no fragmento proximal, resultando em um afastamento da placa nesta porção (Figura 14B). Essas complicações não afetaram o processo de incorporação implante/osso receptor.

Foi observado aos 60 dias de pós-operatório, em um único animal, reabsorção na cortical lateral, ao redor do 4º parafuso. Este fato não interferiu na fixação do parafuso, e conseqüentemente da placa, nem no resultado de união do osso hospedeiro ao implante (Figura 15C).

Figura 5 – Representação gráfica da pontuação atribuída por um avaliador utilizando o escore radiográfico alvitre por Ehrhart *et al.* (2005), adaptado para avaliação de aloenxertos ósseos corticais desvitalizados em nitrogênio líquido e aplicados em diáfise tibial de ovelhas no item incorporação/união do aloimplante na interface proximal e interface distal.

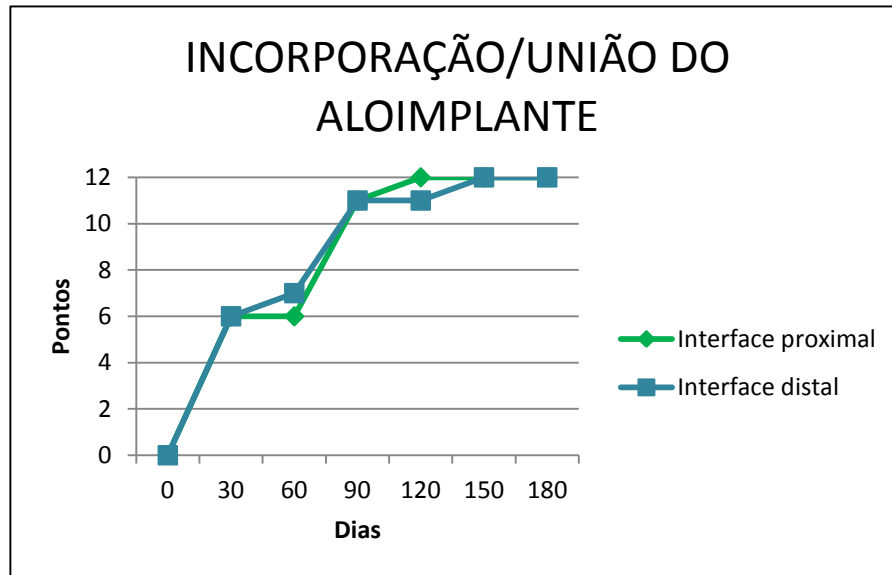


Figura 6 – Representação gráfica da pontuação atribuída por um avaliador utilizando o escore radiográfico alvitre por Ehrhart *et al.* (2005), adaptado para avaliação de aloenxertos ósseos corticais desvitalizados em nitrogênio líquido e aplicados em diáfise tibial de ovelhas no item qualidade óssea do aloimplante.

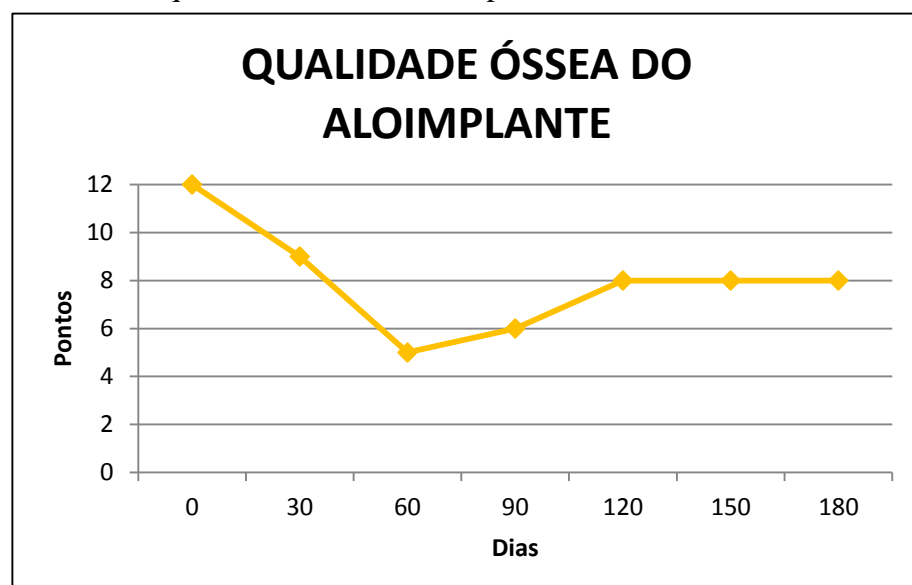


Figura 7 – Representação gráfica da pontuação atribuída por um avaliador utilizando o escore radiográfico alvitre por Ehrhart *et al.* (2005), adaptado para avaliação de aloenxertos ósseos corticais desvitalizados em nitrogênio líquido e aplicados em diáfise tibial de ovelhas no item qualidade do osso receptor.

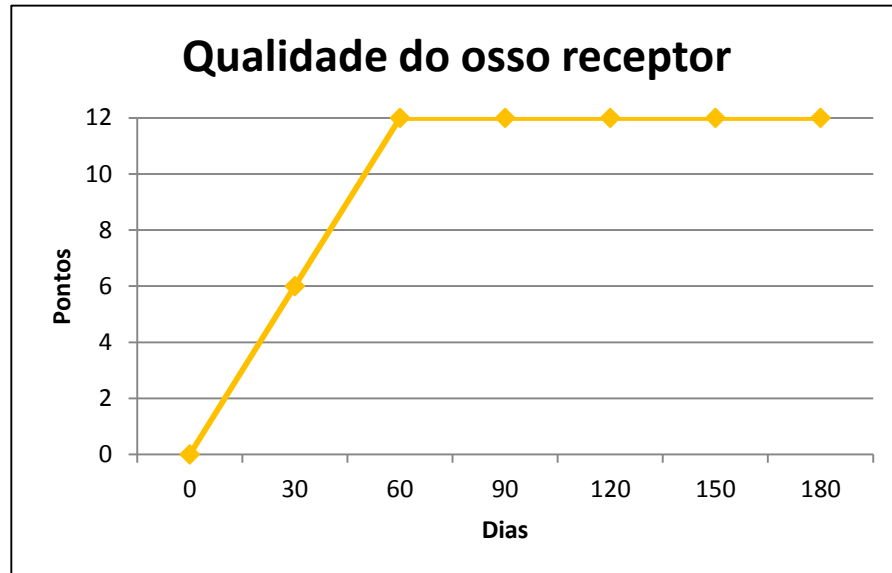


Figura 8 – Representação gráfica da pontuação atribuída por um avaliador utilizando o escore radiográfico alvitre por Ehrhart *et al.* (2005), adaptado para avaliação de aloenxertos ósseos corticais desvitalizados em nitrogênio líquido e aplicados em diáfise tibial de ovelhas no item aspecto e fixação da placa e parafusos.

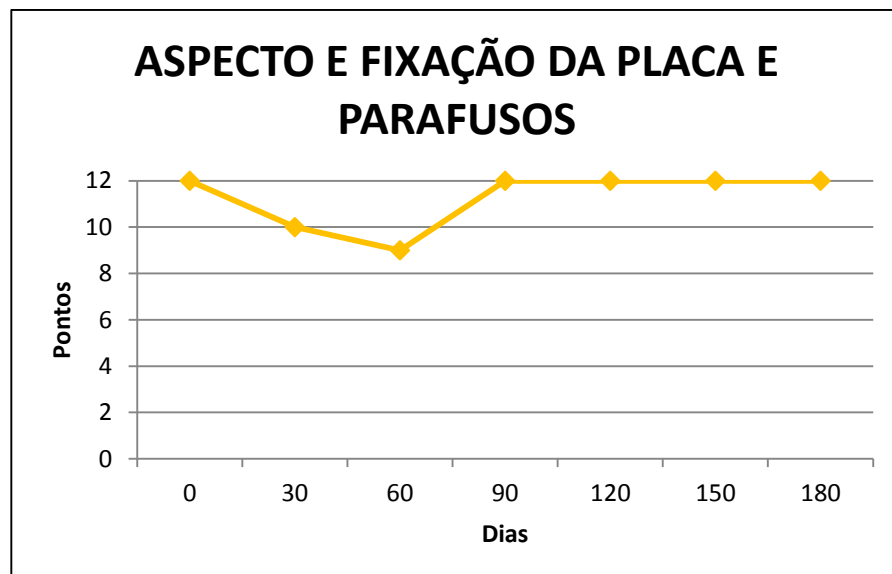


Figura 9 – Representação gráfica da pontuação atribuída por um avaliador utilizando o escore radiográfico alvitre por Ehrhart *et al.* (2005), adaptado para avaliação de aloenxertos ósseos corticais desvitalizados em nitrogênio líquido e aplicados em diáfise tibial de ovelhas no item impressão global da consolidação.

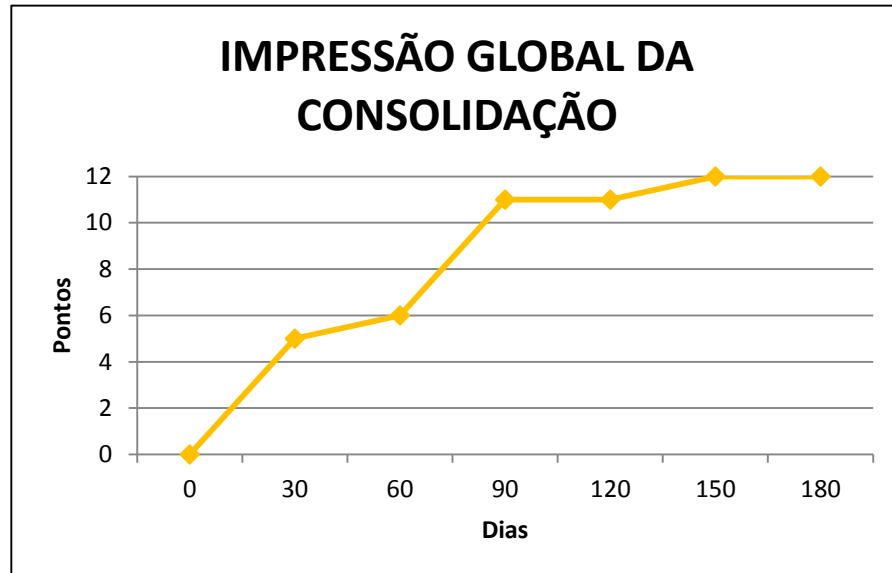


Figura 10 – Representação gráfica do tempo de incorporação radiográfica das interfaces proximal e distal em diáfise tibial de ovelhas submetidas à implantação de segmento ósseo cortical alógeno desvitalizado em nitrogênio líquido. A ovelha seis foi quem sofreu a fratura do implante.

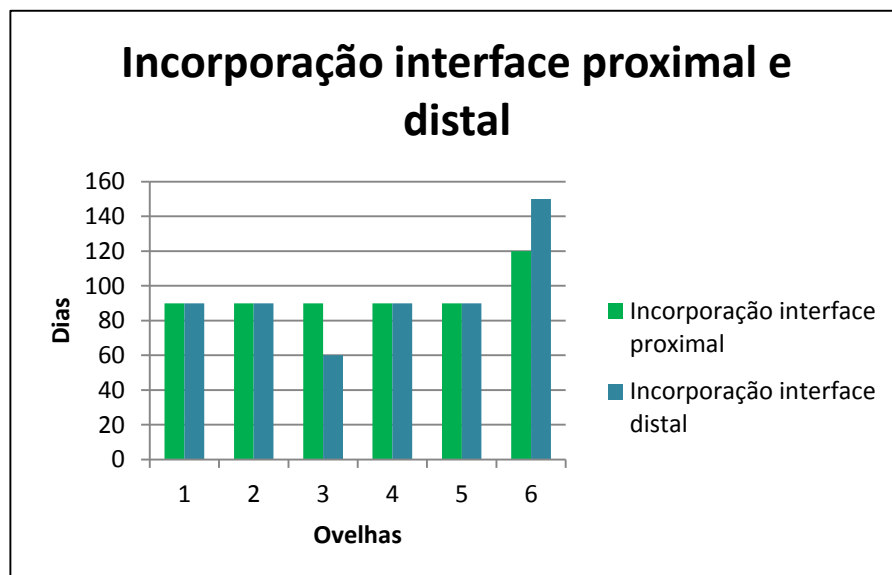


Figura 11 – Representação gráfica do tempo médio e do desvio padrão da incorporação radiográfica das interfaces proximal e distal, individualmente, e do tempo médio e do desvio padrão geral da incorporação das interfaces proximal e distal em diáfise tibial de ovelhas submetidas à implantação de segmento ósseo cortical alógeno desvitalizado em nitrogênio líquido.

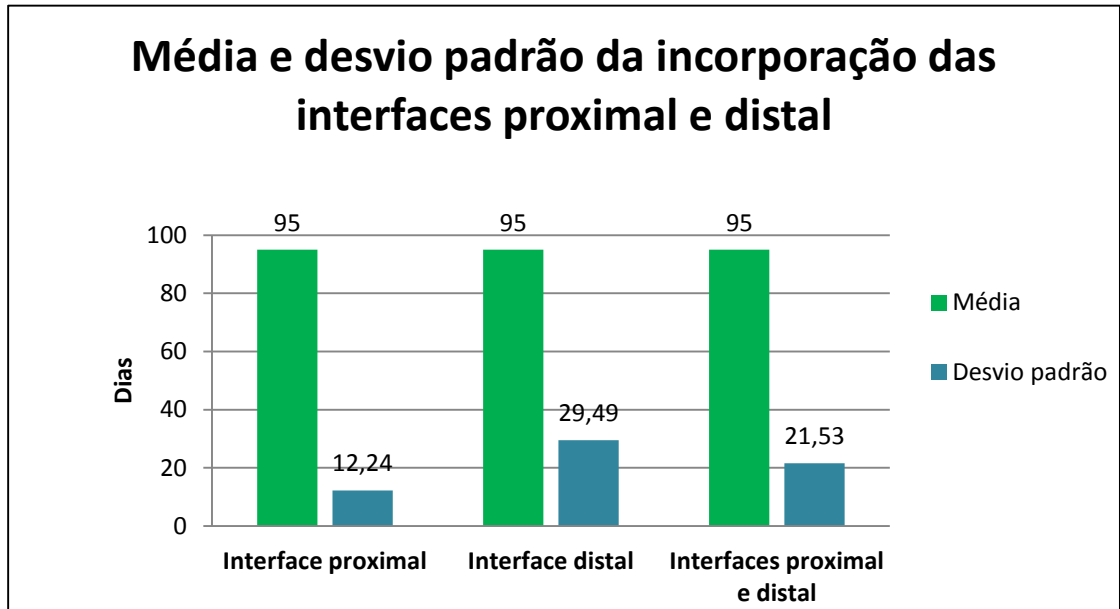


Figura 12 - Imagem radiográfica crânio-caudal da incorporação do aloenxerto ósseo desvitalizado com nitrogênio líquido, implantado em tíbia de ovelha, em diferentes períodos de pós-operatório. A) Pós-operatório imediato; B) 30 dias; C) 60 dias; D) 90 dias; E) 120 dias; F) 150 dias; G) 180 dias. Observar a fratura do implante aos 60 dias e a posterior calcificação e remodelamento aos 180 dias.

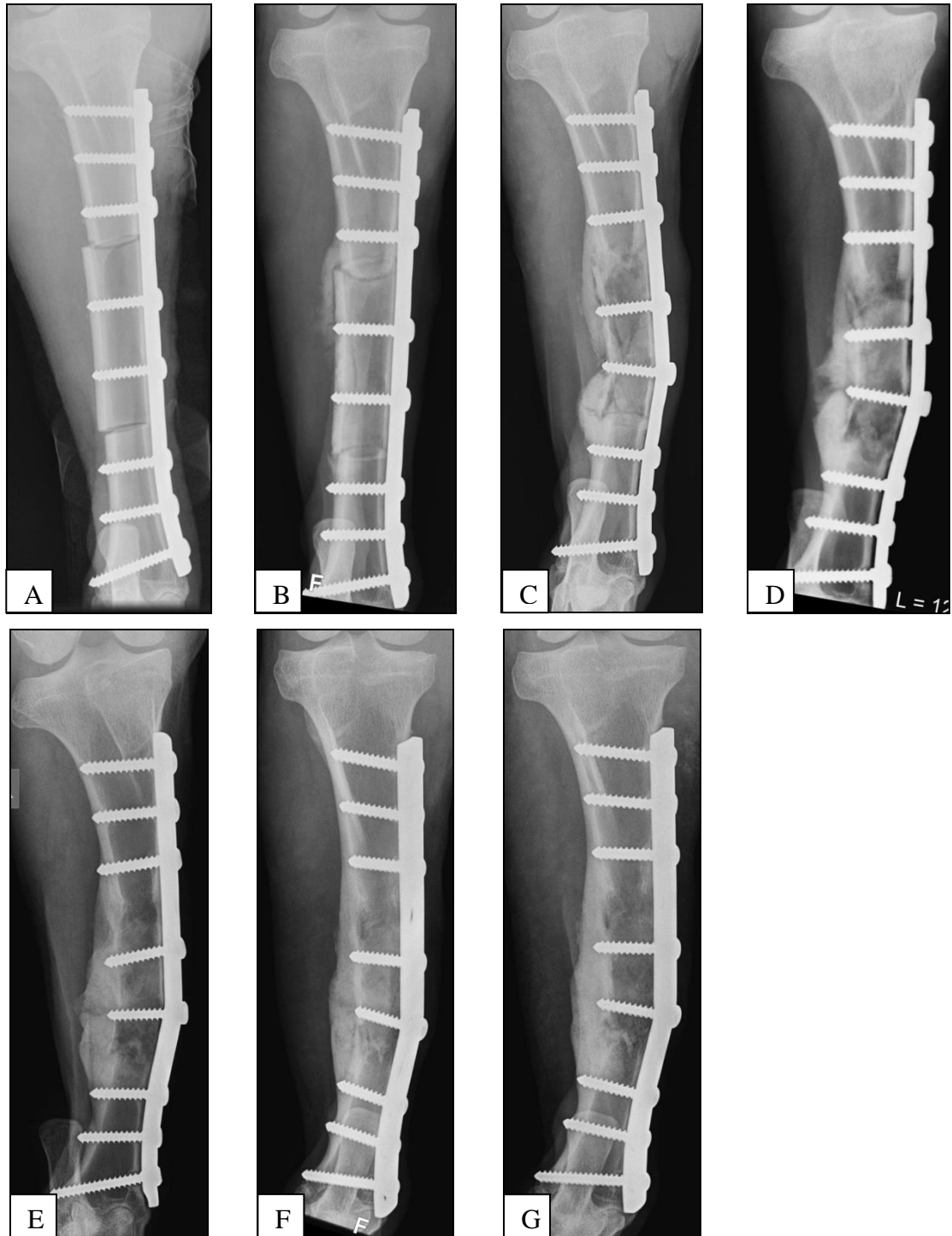


Figura 13 - Imagem radiográfica médio-lateral da incorporação do aloenxerto ósseo desvitalizado com nitrogênio líquido, implantado em tíbia de ovelha, em diferentes períodos de pós-operatório. A) Pós-operatório imediato; B) 30 dias; C) 60 dias; D) 90 dias; E) 120 dias; F) 150 dias; G) 180 dias. Observar o desnível entre o implante e a porção proximal e distal da tíbia receptora no pós-operatório imediato e a posterior incorporação aos 90 dias.

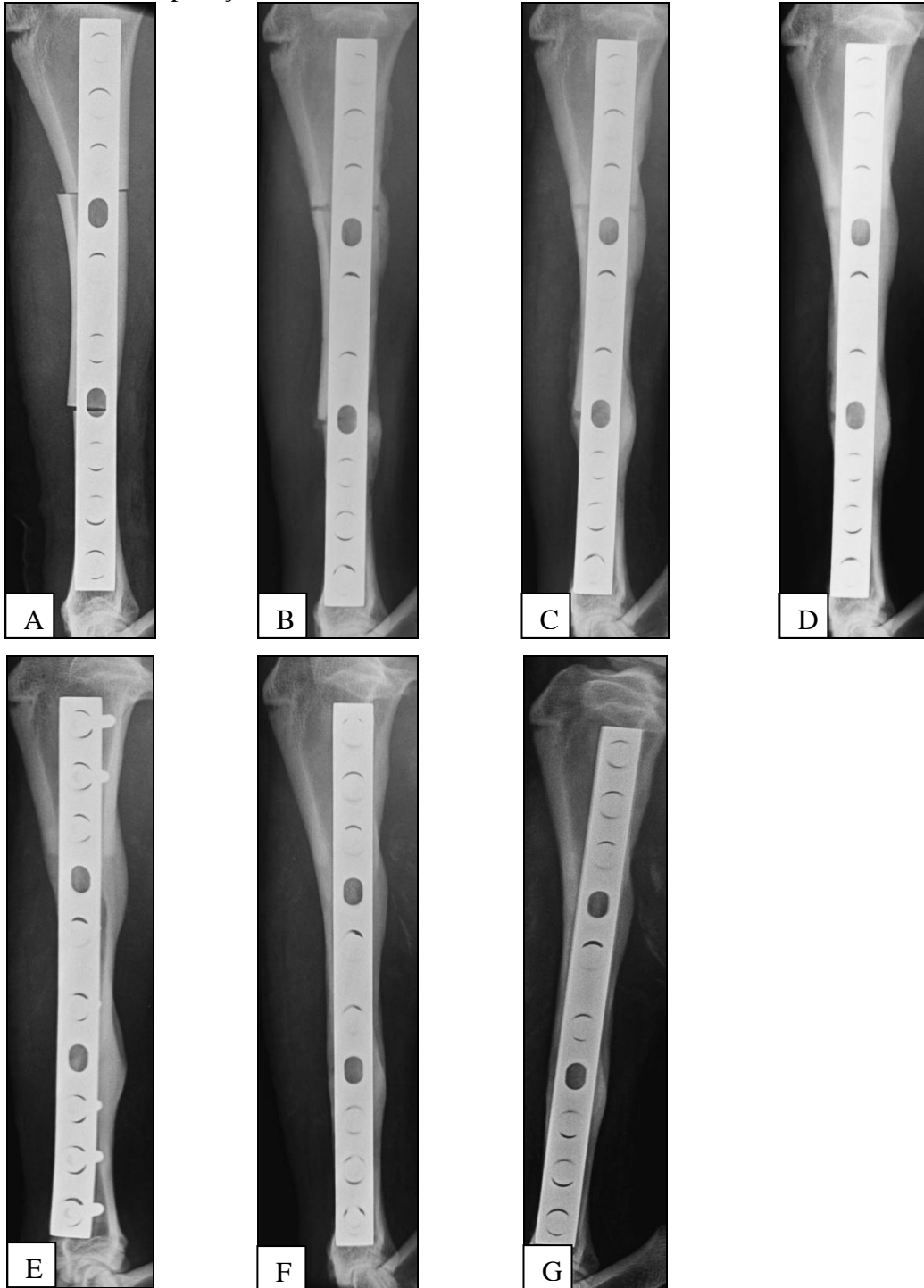


Figura 14 - Imagem radiográfica crânio-caudal da incorporação do aloenxerto ósseo desvitalizado com nitrogênio líquido, implantado em tíbia de ovelha, em diferentes períodos de pós-operatório. A) Pós-operatório imediato; B) 30 dias; C) 60 dias; D) 90 dias; E) 120 dias; F) 150 dias; G) 180 dias. Observar o afastamento na face medial da interface distal e na face lateral da interface proximal no pós-operatório imediato. Aos 30 dias o afastamento da placa na região proximal. Incorporação do implante aos 90 dias.

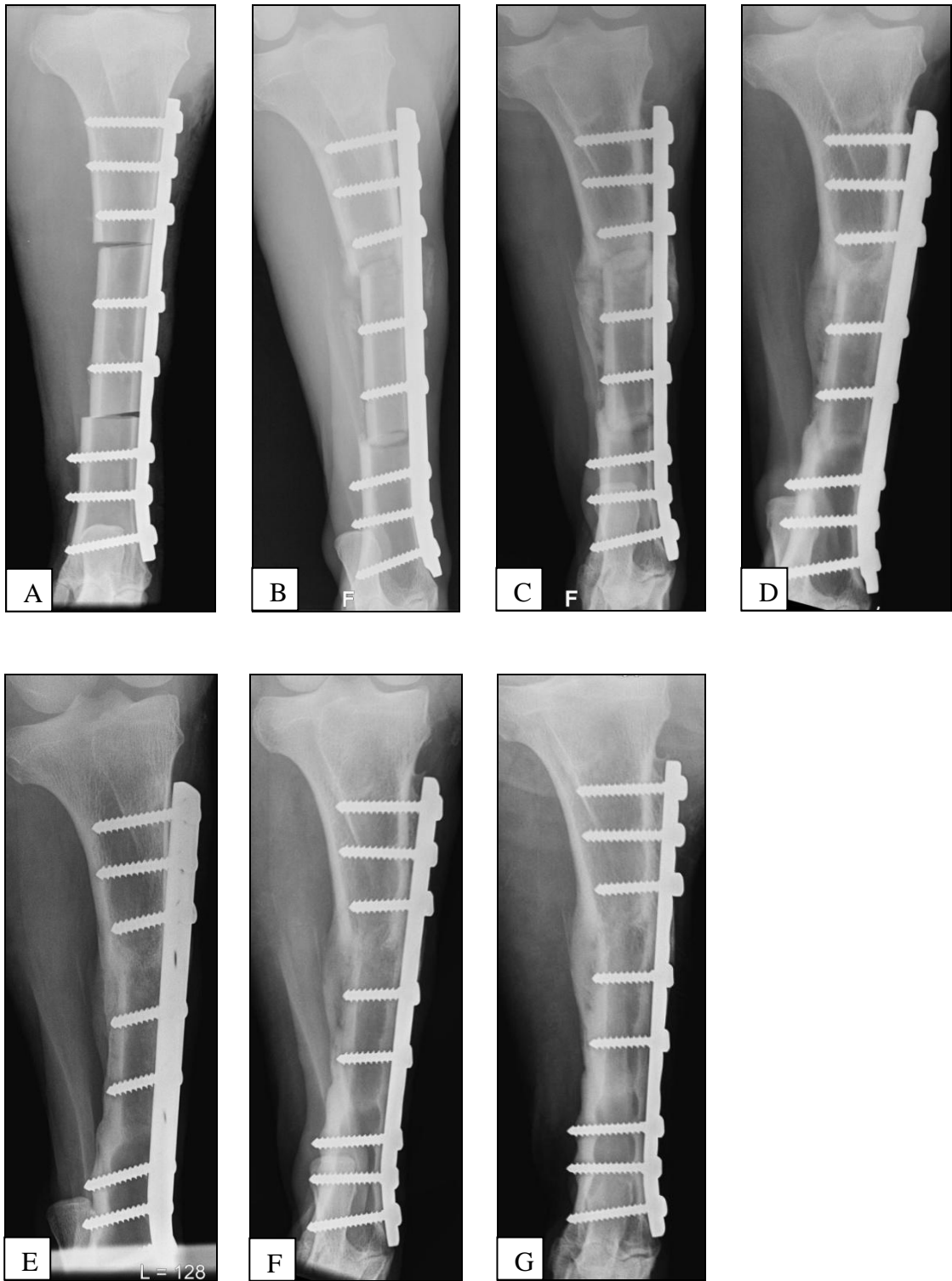
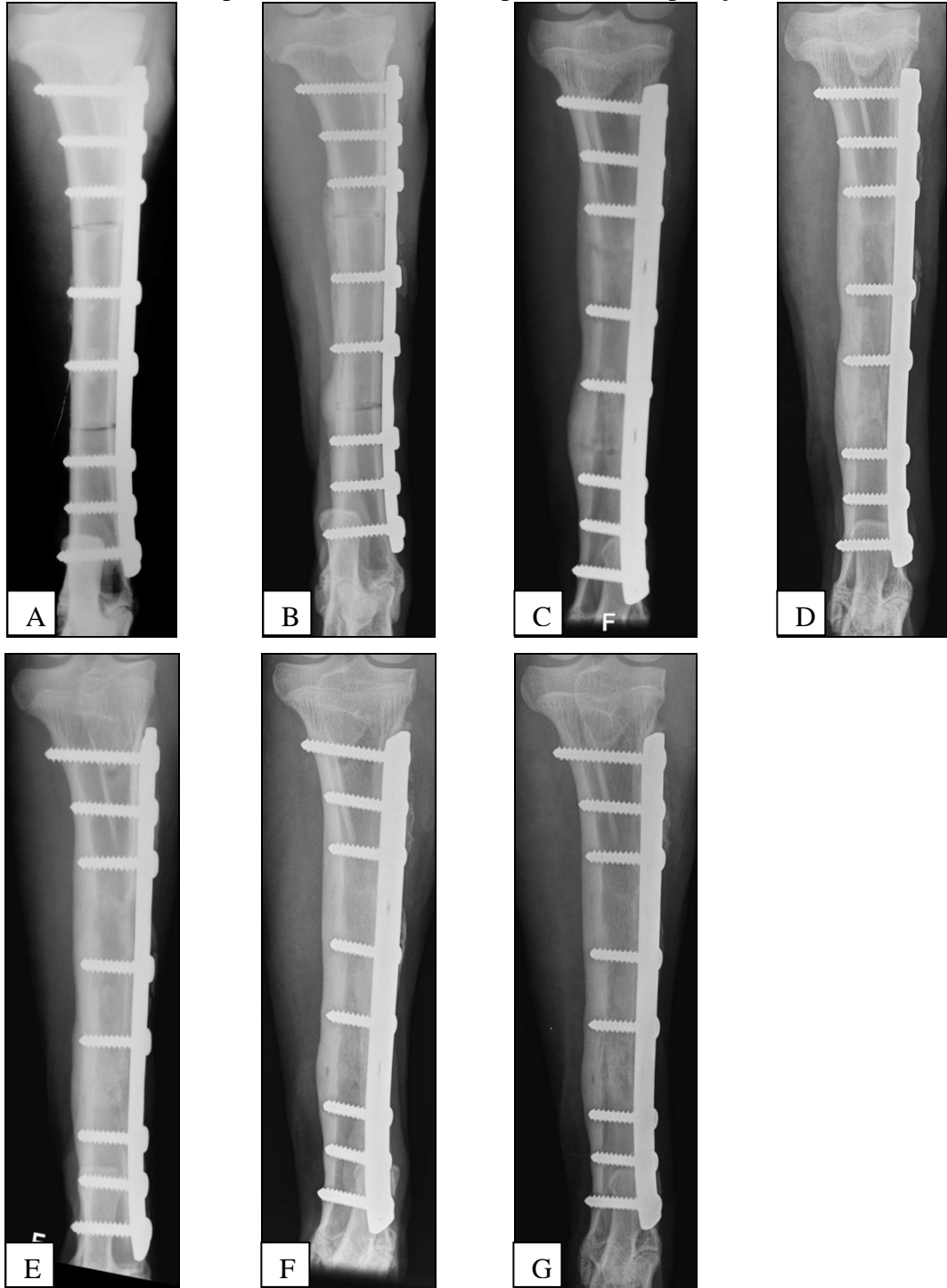


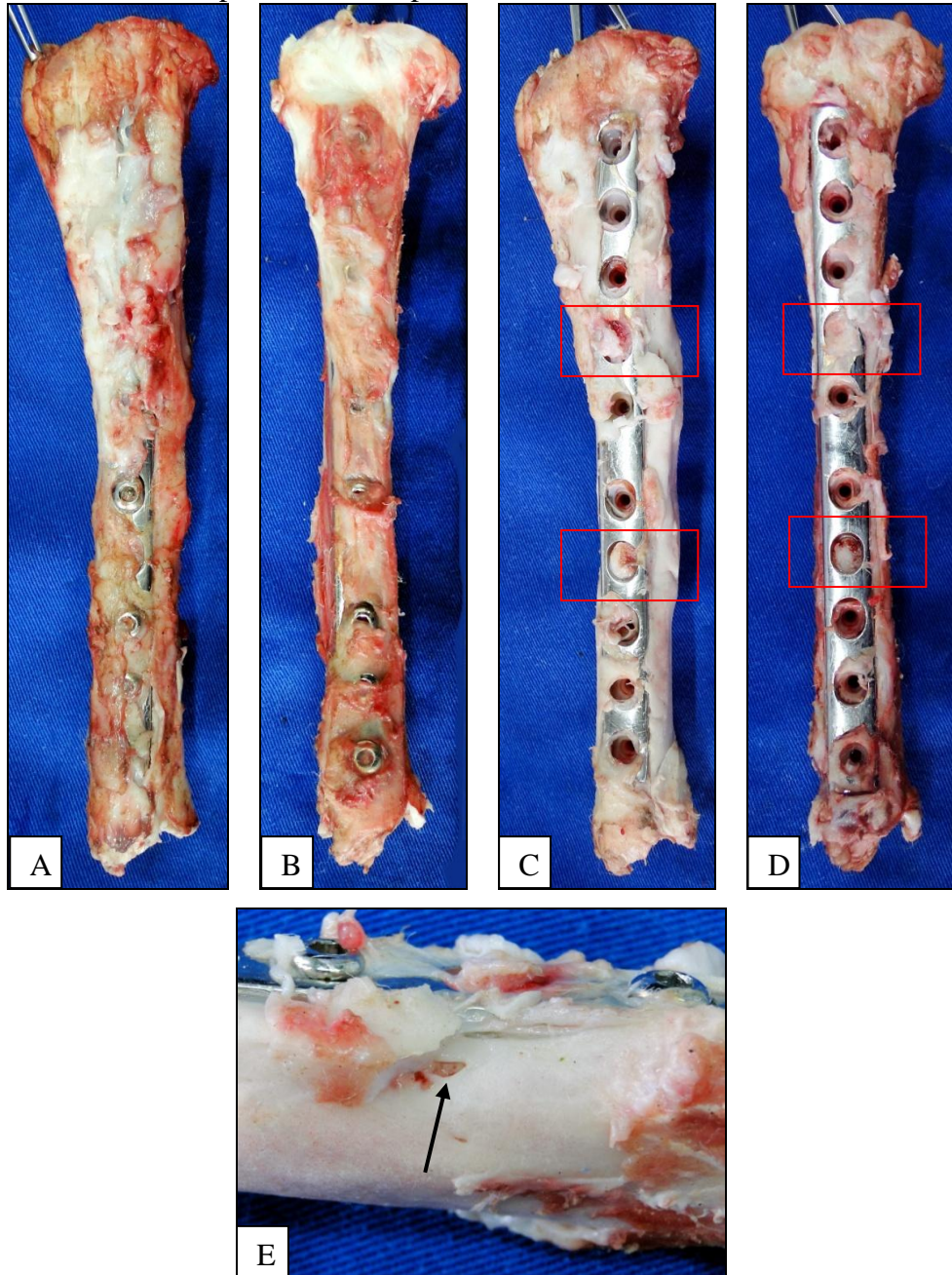
Figura 15 - Imagem radiográfica crânio-caudal da incorporação do aloenxerto ósseo desvitalizado com nitrogênio líquido, implantado em tíbia de ovelha, em diferentes períodos de pós-operatório. A) Pós-operatório imediato; B) 30 dias; C) 60 dias; D) 90 dias; E) 120 dias; F) 150 dias; G) 180 dias. Observar a reabsorção na cortical lateral, ao redor do 4º parafuso aos 60 dias e a posterior incorporação aos 90 dias.



4.6 Avaliação macroscópica

Foi observada, nas tíbias avaliadas *post mortem*, a presença de tecidos moles aderidos ao osso e envolvendo parcialmente a placa e os parafusos. Estas aderências não dificultaram a remoção dos implantes metálicos (Figuras 16A e 16B). Principalmente na região das osteotomias, havia a presença de tecido ósseo envolvendo parcialmente a placa e os parafusos, tendo que ser retirado com a utilização de formão para possibilitar a remoção dos implantes metálicos (Figuras 16C e 16D). Em uma das tíbias observou-se uma pequena área de união incompleta na linha de inserção proximal (Figuras 16E).

Figura 16 – Sequência das avaliações macroscópicas das tíbias. A e B) Presença de tecidos moles aderidos ao osso e envolvendo parcialmente a placa e os parafusos. C e D) Regiões das osteotomias (retângulos), com a presença de tecido ósseo envolvendo parcialmente a placa e os parafusos. E) Presença de pequena porção de união incompleta (seta) na interface implante/osso hospedeiro.



4.7 Avaliação microscópica

Foi verificada a presença de osso viável com osteoblastos e osteoclastos nos fragmentos do centro dos aloimplantes. Em um dos fragmentos nesta porção foram observados, em parte do canal medular, focos de fibrose e proliferação de trabéculas ósseas, sendo algumas com partes amorfas de tecido ósseo. No outro fragmento da mesma porção verificou-se a presença de tecido conjuntivo fibroso organizado na área próxima à inserção de parafuso.

Nos fragmentos proximais das tíbias não se evidenciaram alterações histopatológicas.

Em um dos fragmentos distais observou-se a presença de focos de fibrose em parte do canal medular. No outro fragmento da mesma porção não houve alteração histopatológica.

A ausência de alterações significativas no tecido ósseo de ambas as tíbias foi o diagnóstico microscópico final.

5 DISCUSSÃO

A ovelha se mostrou um bom modelo experimental para a técnica proposta nesse estudo. Esta observação também foi verificada por Van der Pol *et al.* (2010), que expuseram as vantagens do osso ovino por sua estrutura e remodelamento ósseo.

O período de jejum utilizado no pré-operatório foi satisfatório, concordando com o tempo previsto para procedimentos anestésicos segundo Riebold (2007) com o objetivo de evitar complicações como regurgitação, falsa via e timpanismo.

Quanto ao protocolo anestésico empregado, a acepromazina é considerada o derivado fenotiazínico mais comumente administrado como medicação pré-operatória em Medicina Veterinária, porém não tanto em ruminantes. O propofol, para a indução anestésica, foi utilizado por ser um agente hipnótico não barbitúrico e não esteroideal recomendado para este fim em ruminantes domésticos. Realizou-se a intubação orotraqueal, a manutenção do plano cirúrgico com isoflurano e a administração de fluidoterapia com solução de ringer lactato (15mL.kg^{-1}) como recomendado na literatura (RIEBOLD, 2007).

As vantagens do nitrogênio líquido como método de desvitalização extracorpórea foram comprovadas. Pôde-se evidenciar o baixo custo, a pequena quantidade de equipamento especializado necessário, a simplicidade da técnica e a dispensa de controle rigoroso da temperatura durante a desvitalização, como já relatado anteriormente (TSUCHIYA *et al.*, 2005; TANZAWA *et al.*, 2008; NISHIDA *et al.* 2008; TSUCHIYA *et al.*, 2010). Outra vantagem confirmada é que apesar da remoção do endóstio, perióstio e medula óssea diminuir as reações imunogênicas, o processo de desvitalização com o nitrogênio líquido tem grande participação nesta função (GUITIERRES *et al.*, 2006). Sendo sugerida a inibição da reação imunogênica utilizando-se a técnica de desvitalização extracorpórea com nitrogênio líquido, a utilização de enxertos/implantes alógenos, ou até mesmo xenógenos, não terá desvantagens em relação ao risco de rejeição quando comparada à utilização de enxertos/implantes autógenos.

Nesse estudo não pôde ser comprovado o efeito da crioimunologia pelo nitrogênio líquido, porém Kawano *et al.* (2010) a consideram uma importante vantagem de sua utilização.

Porgel (1993) relata a capacidade de desvitalização óssea do nitrogênio líquido. Mesmo essa não sendo tecnicamente testada nesse experimento, sabe-se que o

nitrogênio líquido tem a capacidade de eliminar agentes infecciosos, como os vírus, diminuindo as chances de transmissão de doenças e também as lesões tumorais benignas e malignas (MORAES *et al.*, 2008). Isso possivelmente acabaria por diminuir a necessidade de formação de um banco de ossos, pela perspectiva de utilizar fragmentos ósseos de indivíduos que já tenham ido a óbito, por exemplo.

Yamamoto *et al.* (2003) verificaram a manutenção da resistência dos ossos submetidos à desvitalização pelo nitrogênio líquido por meio de ensaios biomecânicos. O presente trabalho não submeteu os ossos a tal processo de comprovação de resistência, porém percebeu-se similaridade na resistência durante a perfuração dos implantes e das extremidades tibiais.

No experimento o processo de descongelamento foi executado lentamente em temperatura ambiente e só posteriormente realizou-se a submersão em solução salina 0,9%. Acredita-se que devido a este fato não foram observadas as complicações durante o descongelamento relatadas por Yamamoto *et al.* (2003), que verificaram a ocorrência de fraturas ou fissuras durante este processo nos implantes submetidos a desvitalização extracorpórea em nitrogênio líquido em diferentes protocolos. Neste trabalho somente ocorreu a formação de fissura em um dos implantes durante a colocação de um dos parafusos, podendo este fato estar relacionado às complicações observadas por Yamamoto *et al.* (2003).

Também ocorreu a fratura de outro implante, diagnosticada no exame radiográfico aos 60 dias de pós-operatório. Este fato provavelmente deveu-se à fragilidade óssea do implante neste período, pela absorção óssea e formação de novo osso, verificadas radiograficamente. Como descrito por Ferreira (2008), quando o osso implantado vai sendo substituído por novo osso é importante que o implante ósseo suporte as cargas compressivas provenientes da movimentação do animal, o que não aconteceu no animal fraturado.

Em um terceiro animal, no exame radiográfico aos 30 dias de pós-operatório, foi verificado o afrouxamento do primeiro parafuso do fragmento proximal, levando ao afastamento da placa nesta região, sem alterar a incorporação desse implante. A complicação citada pode estar associada ao fato do parafuso estar mal fixado à cortical lateral, devido ao formato triangular da tíbia em sua porção proximal, gerando uma fixação monocortical (SILVA, 2011).

O método de fixação do aloimplante com placa de compressão dinâmica (PCD) e parafusos foi o escolhido por ter apresentado boa resposta em um trabalho semelhante

realizado por Silva (2011) e também por ser amplamente utilizado em Medicina Veterinária nas cirurgias de preservação do membro (LaRUE *et al.*, 1989; MORELLO *et al.*, 2001; BURACCO *et al.*, 2002; LIPTAK *et al.*, 2004; LIPTAK *et al.*, 2006a; DAWE, 2007; BOSTON *et al.*, 2007) e nas de fixação de implantes ósseos (HENRY JR.; WADSWORTH, 1981; ALEXANDER, 1983; SINIBALDI, 1989; DUELAND *et al.*, 1989; ALIEVI *et al.*, 2007; FERREIRA, 2008), fornecendo adequada estabilidade biomecânica ao membro, associada à compressão das interfaces implante/osso receptor, situações fundamentais para que a incorporação ocorra (HENRY JR.; WADSWORTH, 1981; STEVENSON *et al.*, 1991; ALIEVI *et al.*, 2007). Como observado por Braden e Brink (1973), tal técnica permitiu que os animais retornassem ao uso funcional do membro precocemente, sem a ocorrência de complicações provenientes de sua utilização.

Não se observou complicações infecciosas, possivelmente pelos cuidados de assepsia, profilaxia antimicrobiana e adequada síntese dos tecidos moles, levando em consideração as observações feitas por Porgel (1993) que afirma serem necessárias tais providências.

O emprego de uma adaptação da tabela de Ehrhart *et al.* (2005), para a avaliação radiográfica dos resultados, justifica-se pela mesma ter sido elaborada em seu experimento também para a avaliação da incorporação de implantes corticais alógenos.

O tempo de incorporação observado radiograficamente, em média, não teve grande variação quando comparado com o resultado encontrado por Silva (2011), que foi de 84,54 dias (mínimo 60 e máximo 120 dias) em tíbias de ovelhas que foram tratadas com autoenxerto desvitalizado por nitrogênio líquido. Desta forma, evidenciou-se que a técnica de desvitalização utilizada não afeta o tempo de incorporação quando empregada para aloenxertos.

Radiograficamente verificou-se incorporação em todas as interfaces implante/osso receptor, resultado que confere com o estudo de Silva (2011), no qual a taxa de não-união foi de 8,3%, valor este considerado baixo pelo autor.

A incorporação do implante ocorreu mais cedo na interface proximal do que na distal, corroborando com os resultados encontrados na literatura para a incorporação de implantes/enxertos (ALIEVI, 2006; FERREIRA, 2008).

Quanto à avaliação macroscópica, os resultados obtidos, como tecidos moles aderidos ao osso e à placa e tecido ósseo envolvendo placa e parafusos, estão de acordo com os resultados obtidos por outro estudo (SILVA, 2011). No mesmo estudo de Silva

(2011) ocorreu a não-união do implante submetido ao nitrogênio líquido em um dos animais, sendo que no presente trabalho apenas observou-se, em um único animal, uma pequena área de união incompleta em uma das interfaces.

Na avaliação microscópica foram evidenciados osteoblastos e osteoclastos, além de fibrose periosteal, na região dos implantes. Também se diagnosticou em um dos fragmentos distais focos de fibrose em parte do canal medular. Algumas comparações com os resultados de Silva (2011), o qual utilizou autoimplantes, puderam ser realizadas. Osteoblastos, osteoclastos e fibrose periosteal estavam presentes em seus implantes, porém foram identificados restos necróticos no centro destes. Além disso, em um fragmento da interface proximal do experimento de Silva (2011) foi encontrada reação periosteal com abundante presença de osteoclastos, não sendo verificadas alterações nos fragmentos distais.

Com base nas informações aqui expostas, sugere-se que o nitrogênio líquido não interfere negativamente na incorporação do implante.

6 CONCLUSÕES

Os resultados do presente experimento permitem as seguintes conclusões:

- O aloenxerto ósseo cortical submetido a congelamento trans-operatório em nitrogênio líquido, como método de desvitalização extracorpórea, é um método apropriado para a reconstrução óssea, podendo ser utilizado para a manutenção dos membros locomotores em situações clínicas já citadas;
- A técnica incentiva experimentos que a extrapolem para outras espécies e, em longo prazo, até para pacientes humanos.

Apesar dos resultados alcançados terem sido promissores, ainda assim há a necessidade de maiores pesquisas que envolvam:

- Ensaios biomecânicos de aloenxertos desvitalizados com nitrogênio líquido, além de uma avaliação em longo prazo sobre o comportamento biológico desses implantes;
- Estudos mais específicos que evidenciem a inibição da reação imunogênica de aloenxerto desvitalizado com nitrogênio líquido;
- Estudos complementares relacionados a diferentes tempos de desvitalização de aloenxerto ósseo com nitrogênio líquido.

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 reconstrução de falha óssea diafisária em fêmur de cães**. 2006. 85f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- ALIEVI, M.M.; SCHOSSLER, J.E.W.; GUIMARÃES, L.D. *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.2, p.450-457, 2007.
- ARO, H.T.; AHO, A.J. Clinical use of allografts. **Annals of Medicine**. v.25, n.4, p.403-412, 1993.
- BOSTON, S.E.; DUERR, F.; BACON, N. *et al.* Intraoperative radiation for limb-sparing of the distal aspect of the radius without transcarpal plating in five dogs. **Veterinary Surgery**, n.36, p.314-323, 2007.
- BLOOMBERG, M.S.; GORING, R.L.; BORN, F. Frozen diaphyseal bone allografts combined with external and internal pin splintage in small orthopedic surgery. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.20, n.3, p.393-402, 1984.
- BRADEN, T.D.; BRINKER, W.O. Effect of certain internal fixation devices on functional limb usage in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.162, n.8, p.642-646, 1973.
- BURACCO, P.; MORELLO, E.; MARTANO, M. *et al.* Pasteurized tumoral autograft as a novel procedure for limb sparing in the dog: a clinical report. **Veterinary Surgery**, v.31, p.525-532, 2002.
- DAWE, J. Osteosarcoma in a 6-year-old Newfoundland dog: limb-sparing surgery and cisplatin chemotherapy. **Canadian Veterinary Journal**, v.48, p.1169-1171, 2007.
- DUELAND, R.T.; TROTTER, E.J.; ARON, D.N. *et al.* Cryopreserved intercalary bone allografts: early experience (1975-1980) in eight cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.25, n.3, p.305-315, 1989.
- EHRHART, N.P.; EURELL, J.A.; CONSTABLE, P.D. *et al.* The effect of host tissue irradiation on large-segment allograft incorporation. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n.435, p.43-51, 2005.
- FERREIRA, M.P. **Acetabuloplastia extracapsular para o tratamento da displasia coxofemoral em cães**. 2003. 37f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

FERREIRA, M.P.; ALIEVI, M.M.; GOMES, C. *et al.* Acetabuloplastia extracapsular para o tratamento de displasia coxofemural em cão – relato de caso. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, n. 1, p.101-104, 2007.

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. 139f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

GOLDBERG, V.M; STEVENSON, S. Natural history of autografts and allografts. **Clinical Orthopaedics an Related Research**, v.255, p.7-16, 1987.

GOLDBERG, V.M.; AKHAVAN, S. Biology of bone grafts. In: LIEBERMAN, J.R.; FRIEDLAENDER, M.D. **Bone Regeneration and Repair**. cap.4, p.57-65. Totawa: Humana Press, 2005.

GUITIERRES, M.; LOPES, M.A.; HUSSAIN, N.S. *et al.* Substitutos ósseos: Conceitos gerais e estado actual. **Arquivos de Medicina**, v.19, n.4, p.153-162, 2006.

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

HULSE, D.A.; JOHNSON, A.L. Fundamentos de cirurgia ortopédica e tratamento de fraturas. In: FOSSUM, T.W. **Cirurgia de Pequenos Animais**. Roca: São Paulo, 1 ed., 2002.

JEON, D.; KIM, M.S.; CHO, W.H. *et al.* Pasteurized autograft for intercalary reconstruction: an alternative to allograft. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n.456, p.203-210, 2007a.

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

JOHNSON, A.L. Fundamentals of orthopedic surgery and fracture management. In: FOSSUM, T.W. **Small animal surgery**. 3 ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007, cap.31, p.930-1014.

KAWANO, M.; NISHIDA, H.; NAKAMOTO, Y. *et al.* Cryoimmunologic Antitumor Effects Enhanced by Dendritic Cells in Osteosarcoma. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.468, p.1373–1383, 2010.

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.1558-1566, 1991.

LaRUE, S.M.; STEPHEN, J.W.; POWERS, B. E. *et al.* Limb-sparing treatment for osteosarcoma in dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.12, n.195, p.1734-1744, 1989.

LIPTAK, J.M.; DERNELL, W.S.; STRAW, R.C. *et al.* Intercalary bone grafts for joint and limb preservation in 17 dogs with high-grade malignant tumors of the diaphysis. **Veterinary Surgery**, v.33, p.457-467, 2004.

LIPTAK, J.M.; DERNELL, W.S.; EHRHART, N. *et al.* Cortical allograft and endoprosthesis for limb-sparing surgery in dogs with distal radial osteosarcoma: a prospective clinical comparison of two different limb-sparing techniques. **Veterinary Surgery**, v.35, p.518-533, 2006a.

LIPTAK J.M.; EHRHART N.; SANTONI B.G. *et al.* Cortical bone graft and endoprosthesis in the distal radius of dogs: a biomechanical comparison of two different limb-sparing techniques. **Veterinary Surgery**, v.35, p.150–160, 2006b.

MILLIS, D.L.; MARTINEZ, S.A. Bone grafts. In: SLATTER, D. **Textbook of small animal surgery**. 3 ed. Saunders: Philadelphia, 2003, v.2, cap.133, p.1875-1891.

MORAES, A.M.; VELHO, P.E.N.F.; MAGALHAES, R.F. Criocirurgia com nitrogênio líquido e as dermatoses infecciosas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.83, n.4, p.285-298, 2008.

MORELLO, E.; BURACCO, P.; MARTANO, M. *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.61-66, 2001.

NISHIDA, H.; TSUCHIYA, H.; TOMITA, K. Re-implantation of destructive tumour tissue treated by liquid nitrogen cryotreatment induces anti-tumour activity against murine osteosarcoma. **Journal of Bone and Joint Surgery (Br)**, v.90, p.1249–1255, 2008.

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

PORGEL, M.A. The use of liquid nitrogen cryotherapy in the management of locally aggressive bone lesions. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v.51, p.269-273, 1993.

RAPPETI, J.C.S.; PIPPI, N.L.; BRAGA, F.V.A. *et al.* Homoimplante de costela conservada em solução supersaturada de açúcar a 300% ou em açúcar *in natura* na reconstituição experimental de costelas em gatos. **Ciência Rural**, v.37, n.6, p.1712-1718, 2007.

REDDI, A.H.; CUNNINGHAM, N.S. Initiation and promotion of bone differentiation by bone morphogenetic proteins (abstract). **Journal of bone and Mineral Research**, v.8, s.2, p.S499-502, 1993.

RIEBOLD, T.W. Anesthesia, analgesia, and immobilization of selected species and classes of animals. In: TRANQUILLI, W.J.; THURMON, J.C.; GRIMM, K.A. **Lumb & Jones' Veterinary Anesthesia and Analgesia**. 4 ed. cap.6, p.731-746. Iowa: Blackwell Publishing, 2007.

SANTOS, F.C.; RAHAL, S.C. Enxerto ósseo esponjoso autólogo em pequenos animais. **Ciência Rural**, v.34, n.6, p.1969-1975, 2004.

SILVA, A.B.D.; RODRIGUES, L.; JORGETTI, W. *et al.* Alterações histológicas em enxerto de osso homogêneo preparado e armazenado com duas técnicas diferentes. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.15, n.3, p.74-77, 2000.

SILVA, R.B. **Desvitalização extracorporeal de autoenxerto ósseo cortical com nitrogênio líquido – estudo experimental em tibia de ovelhas**. 2011. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Dissertação em processo de homologação.

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.

SINIBALDI, K.R. Princípios y técnicas de injertacion osea. In: BOJRAB, M.J. **Técnicas actuales en cirugía de pequeños animales**. 4 ed. Buenos Aires: Inter-médica, 2001, cap.49, p.837-850.

STEVENSON, S.; 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, p.1143-1156, 1991.

STEVENSON, S. Enxertos ósseos. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1998a, v.2, cap.127, p.2006-2017.

TANZAWA, Y.; TSUCHIYA, H.; YAMAMOTO, N. *et al.* Histological examination of frozen autograft treated by liquid nitrogen removed 6 years after implantation. **Journal of Orthopaedic Science**, v.13, p.259–264, 2008.

TSUCHIYA, H.; WAN, S.L.; SAKAYAMA, K. *et al.* Reconstruction using an autograft containing tumour treated by liquid nitrogen. **Journal of Bone and Joint Surgery (Br)**, v.87 - B, p.218-225, 2005.

TSUCHIYA, H.; NISHIDA, H.; SRISAWAT, P. *et al.* Pedicle frozen autograft reconstruction in malignant bone tumors. **Journal of Orthopaedic Science**, v.15, p.340-349, 2010.

VAN DER POL, U.; MATHIEU, L.; ZEITER, S. *et al.* Augmentation of bone defect healing using a new biocomposite scaffold: An in vivo study in sheep. **Acta Biomaterialia**, v.6, p.3755-3762, 2010.

VICECONTI, M.; TONI, A.; BRIZIO, L. *et al.* The effect of autoclaving on the mechanical properties of bank bovine bone. **Chirurgia degli Organi di Movimento**, v.81, n.1, p.63-68, 1996.

YAMAMOTO, N.; TSUCHIYA, H.; TOMITA, K. Effects of liquid nitrogen treatment on the proliferation of osteosarcoma and the biomechanical properties of normal bone. **Journal of Orthopaedic Science**, v.8, p.374-380, 2003.

WADSWORTH, P.L.; HENRY JR, W.B. Entire segment cortical bone transplant. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.12, n.6, p.742-745, 1976.

WATSON, C. L.; LUCROY, M. D. Primary appendicular bone tumors in dogs. **Compendium Continuous Education Practice Veterinary**, v.24, p.128-138, 2002.

WEIGEL, P.J. Bone grafting. In: BOJRAB, J.M. **Disease mechanisms in small animal surgery**. 2 ed. Philadelphia: Lea & Febiger. 1993, cap.98, p.678-685.

ZHANG, Q.; CORNU, O.; DELLOYE, C. Ethylene oxide does not extinguish the osteoinductive capacity of demineralized bone. A reappraisal in rats. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v.68, n.2, p.104-108, 1997.

ANEXO A – Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais

U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais

**CARTA DE APROVAÇÃO**

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 20708

Título: Aloenxerto ósseo cortical desvitalizado extracorporeamente com nitrogênio líquido – estudo experimental em tibia de ovelhas

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

MARCELO MELLER ALIEVI - coordenador desde 01/01/2011
Paulo Barros de Albuquerque - pesquisador desde 01/01/2011
CARLOS AFONSO DE CASTRO BECK - Colaborador desde 01/01/2011
DAVID DRIEMEIER - Colaborador desde 01/01/2011
LANUCHA FIDELIS DA LUZ MOURA - Colaborador desde 01/01/2011
LUCIANA MACHADO DA SILVA - Aluno de Graduação desde 01/01/2011
LETICIA GUTIERREZ DE GUTIERREZ - Aluno de Graduação desde 01/01/2011
THADEU MOURÃO PINTO - Colaborador desde 01/01/2011
Veronica Noriega Torres - Colaborador desde 01/01/2011

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 27/06/2011 - Sala de reuniões do 2º andar da Reitoria, Campus Central da UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 8 de Julho de 2011

FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO
Coordenador da comissão de ética