

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

DESVITALIZAÇÃO EXTRACORPÓREA DE AUTOENXERTO ÓSSEO
CORTICAL COM NITROGÊNIO LÍQUIDO – ESTUDO
EXPERIMENTAL EM TÍBIA DE OVELHAS

RENATO BARBOSA SILVA

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Meller Alievi

Porto Alegre, 2011

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

DESVITALIZAÇÃO EXTRACORPÓREA DE AUTOENXERTO ÓSSEO
CORTICAL COM NITROGÊNIO LÍQUIDO – ESTUDO
EXPERIMENTAL EM TÍBIA DE OVELHAS

Autor: Renato Barbosa Silva

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, 2011

Renato Barbosa Silva

DESVITALIZAÇÃO EXTRACORPÓREA DE AUTOENXERTO ÓSSEO
CORTICAL COM NITROGÊNIO LÍQUIDO – ESTUDO
EXPERIMENTAL EM TÍBIA DE OVELHAS

Aprovada em 28 MAR 2011

APROVADO POR:

Prof. Dr. Marcelo Meller Alievi

Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Alexandre Mazzanti (UFSM)

Prof. Dr. Carlos Afonso de Castro Beck (UFRGS)

Prof. Dr. João Guilherme Padilha Filho (UNESP)

DEDICATÓRIA

Aos meus Pais,
Pelo exemplo que são, em tudo.
Amo vocês!!!

AGRADECIMENTOS

A Deus, nossa senhora Aparecida e São Pio de Pietrelcina, pelo dom da vida, pela família e amigos que tenho!!!

Aos meus Pais, Mauricio e Conceição, por todo amor, carinho, dedicação, incentivo, educação, apoio incondicional em tudo...

Aos meus irmãos, Ricardo e Denise, por me aturarem na infância e adolescência...hehehe. Amo vocês, viu!?

À minha família (Avó Terezinha, Dora&Cia, Nilson&Cia, Alice e Mariane, tia Sandra, Alain e Marcelo...Pata&Cia,Zinha&cia, Luiz&cia, Zeza, Ana Luiza, Mariinha, Gui...), pelo amor e amizade de sempre.

À minha namorada Aline, por seu amor e carinho, pelas alegrias, por tudo que temos passado até aqui...

À Ana, minha prima, irmã e “cumadi”, obrigado pela amizade e carinho e pelas correções de português.

Ao meu orientador professor Marcelo Alievi, pela oportunidade, orientação, ensinamentos, paciência, confiança, amizade e pelo exemplo que és.

Ao professor João Guilherme, pela orientação, confiança, ensinamentos e amizade desde a residência em Jaboticabal. Obrigado também pela oportunidade de compor essa banca.

Aos professores Daleck, Valadão e Canola, pelos ensinamentos e amizade em Jaboticabal.

Aos professores da graduação, em especial à Rita de Cássia, Delcione Silveira, Ernö Tury, Laszlo Beckesi, Hélio Blume e Flávio Silveira, por todo ensinamento e amizade.

Aos professores da pós-graduação, em especial ao professor Afonso Beck, pelo aprendizado e por fazer parte dessa banca.

Aos meus amigos/irmãos de Brasília Ademir, Chico Bento, Cristiano, Daniel Baiano, Daniel “Cumpadi”, Dudan, Marco Bocão, Rubens e Zeca pela amizade, aprendizado, lealdade...

Aos amigos de Jaboticabal Nicole, Thiago Aladim, Fabiano, Carol Nery, Paulinha, Janica, Vanessa, Camila, Priscila, Rosana, Simone, Sabryna, Betão, André Lingüiça,

Daniel Mermão, Virginia, Everton, Sandro, Gustavo, Andriago, Sabrina, Thaigo Cuaiada, Franco...e a todos os outros, pela amizade e aprendizado que vivenciamos.

Ao amigo Fábio e sua família, que se tornaram minha família também, por todo carinho e amizade.

À minhas amigas Amanda, Lisângela, Fernanda, Paula, Lia, Thaís, Kátia, Cris Alberton e Ana Paula, pelo carinho e amizade.

Aos amigos de Floripa Alexandre, Leila e família, por me acolherem durante o tempo em que morei naquela cidade.

Às estagiárias/amigas Letícia Titi e Lu Matrix e aos amigos Aline, Paulo, Thadeu e Verônica, pela ajuda na execução do projeto e na rotina do HCV.

À amiga Lanucha, pela amizade e por anestésias das ovelhas.

Às amigas do LACVET, Anelise e Viviane, pela análise hematológica das ovelhas.

Ao professor Alexandre Mazzanti, por compor essa banca e por suas correções.

Aos amigos que fiz em Porto Alegre, residentes e pós-graduandos da UFRGS, e veterinários das clínicas da cidade, obrigado pela amizade e confiança no meu trabalho.

À professora Maria Inês, seus orientados e ao funcionário seu Santinho, por disponibilizarem o nitrogênio líquido usado no trabalho.

Ao professor David Driemeier, ao pós-graduando Luiz e aos demais colegas da Patologia, pela análise histopatológica.

Aos técnicos do HCV, em especial à Daiene e ao Luciano, pelo auxílio na avaliação clínica das ovelhas.

Aos funcionários e estagiários do HCV, que me ajudaram em algum momento com as ovelhas ou com meus pacientes da rotina.

A todos que por descuido eu tenha esquecido de mencionar, obrigado.

À CAPES pela bolsa de mestrado.

Aos animais utilizados em prol do nosso aprendizado.

RESUMO

A cirurgia para preservação do membro ou *Limb-sparing* é uma técnica reconstrutiva que envolve ressecção da neoplasia óssea em bloco, associada ou não à artrodese da articulação adjacente, com a fixação do enxerto ósseo com placa ou haste intramedular bloqueada. A utilização de autoenxerto desvitalizado tem muitas vantagens quando comparado aos aloimplantes, entre elas a diminuição da reação imunológica, ausência dos riscos de transmissão de doenças, adequada conformação anatômica e menor custo. Dentre os meios utilizados para desvitalização extracorpórea de autoenxerto cortical ósseo, destaca-se o nitrogênio líquido, por manter as propriedades biomecânicas do osso e promover a morte das células neoplásicas com apenas um ciclo de submersão. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o nitrogênio líquido como método de desvitalização extracorpórea de autoenxerto ósseo cortical diafisário de tíbia em ovelhas. Foram utilizados 12 animais, divididos em dois grupos com seis cada, submetidos à osteotomia de um segmento ósseo de 7 cm, remoção do periósteo e medula óssea e fixação do enxerto com placa de compressão dinâmica estreita e 8 parafusos corticais de 4,5 mm. No grupo controle (GC), o enxerto foi reimplantado logo após sua remoção. No grupo nitrogênio líquido (GNL), o enxerto foi desvitalizado em nitrogênio líquido. Foram realizadas avaliações clínicas e radiográficas até o 180º dia de pós-operatório. A taxa global de incorporação das interfaces enxerto/osso receptor foi de 100% no GC, com um tempo médio de 75 dias, e de 91,67% no GNL, com tempo médio de 84,54 dias, não havendo diferença estatística entre os grupos. Com isso, é possível concluir que o nitrogênio líquido é um método adequado de desvitalização extracorpórea de autoenxertos ósseos corticais, já que não interfere na taxa e no tempo de incorporação das interfaces.

Palavras-chave: enxerto ósseo, desvitalização extracorpórea, nitrogênio líquido, tíbia, ovelha.

ABSTRACT

The Limb-sparing surgery is a reconstructive technique that involves the bone malignant tumor wide en bloc resection, associated or not with the adjacent articulation arthrodesis, having the bone graft fixation performed by a plate or interlocking nail. The use of devitalized autografts has many advantages when compared to allografts, as the decrease of the immunological reaction, the lack of spreading diseases risks, adequate anatomical conformation and lower costs. Within the utilized means to devitalize cortical bone autograft, the liquid nitrogen stands out for maintaining the biomechanical properties of the bone and to promote death of the tumor cells with just one submersion cycle. The purpose of this study was to evaluate the liquid nitrogen as an extracorporeal devitalization method of cortical diaphysis tibial sheep bone autograft. Twelve animals were used, divided into two groups of six each, submitted to osteotomy of a bone fragment of seven cm, removal of periosteum and bone marrow, with posterior autograft fixation using a narrow dynamic compression plate with eight cortical screws of 4,5 mm. On the control group (CG), the graft was reimplanted soon after removal. On the liquid nitrogen group (LNG), the graft was devitalized on liquid nitrogen. Clinical and radiographic evaluations were made until the 180th post-operative day. The global incorporation rate of the graft / host bone interfaces was a 100% at the CG, with an average time of 75 days, and 91.67% at the LNG with an average time of 84.54 days, having no statistical difference between the groups. It is possible to conclude that the liquid nitrogen is an adequate extracorporeal devitalization method of cortical bone autografts, since it has no interference on the rate and time of the incorporation surfaces.

Keywords: bone graft, extracorporeal devitalization, liquid nitrogen, tibia, sheep.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Sequência da osteotomia tibial em ovelha. A) Acesso cirúrgico à tibia. B) Osteotomia utilizando serra oscilatória. C) Área após a remoção do segmento ósseo.....	22
Figura 2 -	Imagem do processo de desvitalização extracorpórea de autoenxerto ósseo cortical. A) autoenxerto submerso em nitrogênio líquido. B) autoenxerto descongelando em temperatura ambiente. C) autoenxerto descongelando em solução salina 0,9%.....	23
Figura 3 -	Sequência da fixação do autoenxerto tibial em ovelha. A) Fixação do autoenxerto com dois parafusos. B) Vista lateral da fixação do autoenxerto ao leito receptor. C) Vista oblíqua da fixação do autoenxerto ao leito receptor.....	24
Figura 4 -	Representação gráfica da pontuação atribuída por avaliador imparcial utilizando o escore radiográfico proposto por Ehrhart <i>et al.</i> (2005), adaptado para avaliação de autoenxertos ósseos corticais desvitalizados em nitrogênio líquido (GNL) ou não (GC) e aplicados em diáfise tibial de ovelhas no item incorporação/união do autoenxerto na interface proximal.....	31
Figura 5 -	Representação gráfica da pontuação atribuída por avaliador imparcial utilizando o escore radiográfico proposto por Ehrhart <i>et al.</i> (2005), adaptado para avaliação de autoenxertos ósseos corticais desvitalizados em nitrogênio líquido (GNL) ou não (GC) e aplicados em diáfise tibial de ovelhas no item incorporação/união do autoenxerto na interface distal.....	32
Figura 6 -	Representação gráfica da pontuação atribuída por avaliador imparcial utilizando o escore radiográfico proposto por Ehrhart <i>et al.</i> (2005), adaptado para avaliação de autoenxertos ósseos corticais desvitalizados em nitrogênio líquido (GNL) ou não (GC) e aplicados em diáfise tibial de ovelhas no item qualidade óssea do autoenxerto.....	32
Figura 7 -	Representação gráfica da pontuação atribuída por avaliador imparcial utilizando o escore radiográfico proposto por Ehrhart <i>et al.</i> (2005), adaptado para avaliação de autoenxertos ósseos corticais desvitalizados em nitrogênio líquido (GNL) ou não (GC) e aplicados em diáfise tibial de ovelhas no item qualidade do osso receptor.....	33
Figura 8 -	Representação gráfica da pontuação atribuída por avaliador imparcial utilizando o escore radiográfico proposto por Ehrhart <i>et al.</i> (2005) e adaptado para avaliação de autoenxertos ósseos corticais desvitalizados em nitrogênio líquido (GNL) ou não (GC) e aplicados em diáfise tibial de ovelhas no item aspecto e fixação da placa e parafusos.....	33

Figura 9 -	Representação gráfica da pontuação atribuída por avaliador imparcial utilizando o escore radiográfico proposto por Ehrhart <i>et al.</i> (2005), adaptado para avaliação de autoenxertos ósseos corticais desvitalizados em nitrogênio líquido (GNL) ou não (GC) e aplicados em diáfise tibial de ovelhas no item impressão global da consolidação.....	34
Figura 10 -	Representação gráfica do tempo de incorporação radiográfica das interfaces proximal e distal de ovelhas submetidas à implantação de segmento ósseo cortical autógeno, grupo controle (GC).....	34
Figura 11 -	Representação gráfica do tempo de incorporação radiográfica das interfaces proximal e distal do grupo de ovelhas submetidas à implantação de segmento ósseo cortical autógeno desvitalizado em nitrogênio líquido (GNL).....	35
Figura 12 -	Imagem radiográfica médio-lateral da incorporação do autoenxerto ósseo desvitalizado com nitrogênio líquido (GNL), 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; H) 180 dias, após a remoção da placa e parafusos.....	36
Figura 13 -	Imagem radiográfica médio-lateral da incorporação do autoenxerto ósseo não desvitalizado (GC) 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; H) 180 dias, após a remoção da placa e parafusos.....	37
Figura 14 -	Imagem radiográfica médio-lateral da incorporação do autoenxerto ósseo desvitalizado com nitrogênio líquido (GNL), 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; H) 180 dias, após a remoção da placa e parafusos. Notar a não-união na interface proximal.....	38
Figura 15 -	Imagem radiográfica médio-lateral da incorporação do autoenxerto ósseo não desvitalizado (GC), implantado em tibia de ovelha, em diferentes períodos de pós-operatório. A) Pós-operatório imediato; B) 30 dias; C) 90 dias; D) 180 dias. Observar o deslocamento do fragmento proximal aos 30 dias e a posterior incorporação do autoenxerto.....	39
Figura 16 -	Avaliação histológica de autoenxerto cortical ósseo desvitalizado em nitrogênio líquido, com presença de osteoclastos entre o enxerto e o perióstio.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Escore para avaliação radiográfica proposto por Ehrhart <i>et al.</i> (2005), adaptado para avaliação dos autoenxertos corticais desvitalizados extracorporeamente e reimplantados em diáfise tibial de ovelhas.....	26
------------	--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Função dos enxertos e implantes ósseos	14
2.2 Preservação do membro (<i>Limb-sparing</i>)	15
2.3 Autoenxerto desvitalizado extracorporeamente	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Procedimento anestésico	20
3.2 Procedimento cirúrgico	20
3.3 Cuidados pós-operatórios	25
3.4 Avaliação clínica	25
3.5 Avaliação radiográfica	25
3.6 Avaliação macroscópica	27
3.7 Avaliação microscópica	27
3.8 Análise estatística	27
4 RESULTADOS	28
4.1 Procedimento anestésico	28
4.2 Procedimento cirúrgico	28
4.3 Avaliação clínica	29
4.4 Avaliação radiográfica	30
4.5 Avaliação macroscópica	40
4.6 Avaliação microscópica	40
5 DISCUSSÃO	42
6 CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS	47
ANEXO A - Carta de aprovação da Comissão de Ética no uso de animais	51

1 INTRODUÇÃO

Com avanço do diagnóstico por imagem, da quimioterapia adjuvante e das técnicas operatórias, tem sido possível o tratamento de neoplasias ósseas e de tecidos moles visando à manutenção funcional e duradoura do membro afetado (*limb-sparing*) sem a necessidade de amputação. Normalmente, para a preservação do membro, são utilizadas próteses metálicas, aloimplantes, combinação de ambos, ou a substituição por cimento ósseo. A reconstrução biológica pode utilizar osso viável ou não.

Biologicamente, a melhor fonte para a obtenção desse material seria o próprio animal, com a utilização de enxerto autógeno, porém essa manobra muitas vezes acaba sendo preterida, pois aumenta a morbidade, a dor, os tempos cirúrgico e anestésico e, principalmente, não fornece volume suficiente para a reconstrução adequada de uma grande falha óssea. Com isso, normalmente acaba sendo necessária a utilização de aloimplantes preservados. Entretanto, existe o risco de reação imune ou transmissão de doenças, além da necessidade da formação de um banco de ossos, o que aumenta os custos e necessita de espaço apropriado.

Uma opção seria submeter o segmento ósseo removido devido à presença de neoplasia a métodos físicos de desvitalização, eliminando definitivamente todas as células neoplásicas, e mantendo apenas o arcabouço ósseo, visando à reconstrução adequada do eixo ósseo, sem a necessidade de manutenção de banco de ossos ou a utilização de próteses. Entre os métodos físicos, cita-se a irradiação, a autoclavagem e a pasteurização, todos requerendo equipamentos especiais e/ou estrito controle de temperatura, pois o calor pode causar o enfraquecimento e a perda da capacidade indutora do osso.

Recentemente foi publicado um artigo no conceituado periódico *The Journal of Bone and Joint Surgery (British)* descrevendo a utilização, em 28 pacientes humanos, do nitrogênio líquido como meio de desvitalização extracorpórea do segmento ósseo neoplásico com posterior reinserção deste. Os resultados foram promissores, com taxa de sucesso de aproximadamente 90%, e os autores sugeriram ser este um método bastante simples e efetivo para a reconstrução biológica, sem chances de permanência de células neoplásicas no segmento reinserido.

Na medicina veterinária, a autoclavagem já foi utilizada, em um relato de caso, como método de desvitalização extracorpórea de segmento ósseo neoplásico. A pasteurização foi utilizada em alguns trabalhos veterinários com resultados satisfatórios, entretanto, não existem experimentos avaliando e comparando o nitrogênio líquido para esse fim. O presente projeto foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o nitrogênio líquido como método de desvitalização extracorpórea de autoenxerto ósseo cortical diafisário de tíbia. Para isso, foram utilizadas ovelhas como modelo experimental, pois além de ser uma espécie de fácil manejo e criação, têm sido frequentemente utilizadas para estudos de consolidação e incorporação óssea.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A amputação do membro em medicina veterinária nem sempre é uma opção terapêutica em neoplasias ósseas devido a doenças concomitantes, problemas neurológicos ou pelo simples fato do proprietário não aceitar tal tratamento (BURACCO *et al.*, 2002).

Com o avanço do diagnóstico por imagem, da quimioterapia adjuvante e das técnicas operatórias tem sido possível o tratamento de neoplasias ósseas e de tecidos moles visando à manutenção funcional e duradoura do membro afetado sem a necessidade de amputação (MORELLO *et al.*, 2003). Normalmente, para a manutenção do membro são utilizadas próteses metálicas (LIPTAK *et al.*, 2006a; DAWE *et al.*, 2007), aloimplantes (MORELLO *et al.*, 2001; LIPTAK *et al.*, 2004), combinação de ambos, ou a substituição por cimento ósseo.

Em geral, todas as técnicas de preservação do membro são procedimentos cirúrgicos delicados que requerem treinamento e habilidade, conhecimento das potenciais complicações, dedicação do proprietário, animais cooperativos e dóceis, e boa relação entre o cirurgião, o oncologista e o proprietário (BURACCO *et al.*, 2002).

Enxerto ósseo, técnica de transplante de osso cortical ou esponjoso (HULSE & JOHNSON, 2002), é um procedimento bem sedimentado na cirurgia ortopédica veterinária. É classificado pelo tipo de osso utilizado, sendo enxerto esponjoso, cortical e córtico-esponjoso, e também de acordo com sua origem, havendo três definições: autoenxerto, aloenxerto e xenoenxerto (DENNY & BUTTERWORTH, 2006).

Enxertos e implantes ósseos são amplamente utilizados em humanos e animais para corrigir falhas ósseas que não seriam passíveis de síntese mediante simples aproximação dos segmentos afetados (AMENDOLA, 2007). A diferença entre os dois termos está no fato de que enxertos são praticados com material viável ou vivo, enquanto que implante está relacionado com tecido não vivo ou ainda com material não biológico (STEVENSON, 1998; AMENDOLA, 2007).

Quanto à estrutura morfológica, o enxerto é dividido em: esponjoso, formado por osso trabecular, poroso e de alta celularidade; cortical, osso compacto, denso e relativamente acelular; e córtico-esponjoso, composto por ambos os tipos (SANTOS & RAHAL, 2004).

Ossos transplantados de um local a outro no mesmo animal são denominados autógenos ou autoenxerto. Esses enxertos são histocompatíveis com o sistema imunológico do hospedeiro e não causam rejeição (HULSE & JOHNSON, 2002). Ao transplantar tecidos removidos de um animal a um indivíduo da mesma espécie, denomina-se aloenxerto ou homoenxerto. Já o nome xenoenxerto é utilizado quando tecidos retirados de um paciente são transplantados a outro de espécie diferente (DENNY & BUTTERWORTH, 2006).

O uso de banco de ossos corticais requer manutenção periódica quanto à esterilidade do implante conservado, coleta respeitando os princípios de assepsia e uso de animais livres de doenças contagiosas e neoplásicas (BURACCO *et al.*, 2002; ALIEVI *et al.*, 2007), além de não ser ético e moralmente aceito em alguns países (BURACCO *et al.*, 2002).

2.1 Função dos enxertos e implantes ósseos

Os materiais utilizados na enxertia óssea podem atuar através de três mecanismos: osteogênese, osteoindução e osteocondução. Os enxertos não contribuem para a osteogênese, mas promovem osteoindução e originam uma estrutura de suporte e osteocondução (RAPPETI *et al.*, 2007).

A osteogênese consiste na formação de osso pelas células que sobreviveram à enxertia e inicia-se por volta de cinco dias após a implantação. O enxerto esponjoso tem grande potencial osteogênico por conter células quiescentes, células mesenquimais indiferenciadas e osteoblastos ativos. Estima-se que apenas 10% das células desse tipo de enxerto sobrevivam à transferência (SANTOS & RAHAL, 2004).

Osteoindução ocorre quando substâncias originárias do tecido ósseo transplantado em forma de enxerto têm a capacidade de induzir células mesenquimais do hospedeiro a se transformar em osteoblastos (SILVA *et al.*, 2000).

A osteocondução é o processo tridimensional de intracrescimento dos capilares em processo de brotamento, do tecido perivascular e das células osteoprogenitoras do leito recipiente dentro da estrutura do implante ou enxerto (STEVENSON, 1998). Enxertos corticais proporcionam suporte estrutural para osteocondução, pois possuem rigidez e resistência adequadas, permitindo sua utilização como uma placa de osso no restabelecimento da continuidade óssea (DENNY & BUTTERWORTH, 2006).

SILVA *et al.*(2000) citam que a incorporação do enxerto ósseo compreende cinco fases, sendo a primeira inflamatória, com aumento de atividade osteoblástica. A seguir, há revascularização do enxerto. Depois vem a osteocondução, que desempenha a função de arcabouço para o crescimento de vasos e de osso. Na sequência, a osteoindução, em que células mesenquimais do hospedeiro são induzidas a se transformar em osteoblastos. E, por fim, remodelação óssea, caracterizada pela formação e reabsorção contínua de osso.

Os enxertos e implantes ósseos funcionam como estrutura de sustentação de peso quando estabilizados por meio de fixação interna, aplicados em grandes defeitos, sejam eles resultantes de traumatismo ou da ressecção em bloco de osso neoplásico (STEVENSON 1998).

2.2 Preservação do membro (*Limb-sparing*)

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

É uma técnica indicada para cães que não são candidatos à amputação do membro, como os de porte gigante, aqueles que desenvolveram afecções neurológicas, osteoartrite severa, animais obesos ou simplesmente pelo fato de o proprietário discordar de um método mais radical (WATSON & LUCROY, 2002; LIPTAK *et al.*, 2004).

Esse procedimento é descrito para o terço distal do rádio, proximal do úmero, distal da tíbia e proximal do fêmur em cães com osteossarcoma, mas os casos em que se tem conseguido os melhores resultados são os de tumores do rádio e da ulna. Isso se deve em grande parte porque a artrodese pancarpal é bem tolerada nos cães, enquanto a artrodese nas articulações do ombro, joelho e tarso está frequentemente associada 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).

Devem-se escolher cuidadosamente os cães a serem submetidos à técnica de *limb-sparing*. O critério usado inclui animais com osteossarcoma restrito ao osso

(LIPTAK *et al.*, 2004), em que o tumor envolve radiograficamente menos de 50% da extensão óssea, pacientes onde não há sinais de metástase e que tenham boas condições de saúde (WATSON & LUCROY, 2002).

2.3 Autoenxerto desvitalizado extracorporeamente

As técnicas de aloenxerto têm sido associadas a altas taxas de complicações, como infecção, fratura, falha no implante e recorrência do tumor. Isso ocorre tanto na medicina, quanto na veterinária. Como resultado, os cirurgiões estão buscando métodos alternativos para reconstrução dos defeitos ósseos, na tentativa de diminuir essas complicações, dentre eles a osteogênese por distração utilizando fixador circular externo e as técnicas de autoenxerto vascularizado, pasteurizado e esterilizado por irradiação (LIPTAK *et al.*, 2006a; LIPTAK *et al.*, 2006b).

O uso de autoenxerto desvitalizado extracorporeamente ou osso autógeno reciclado, envolve a reimplantação do osso removido após tratamento extracorpóreo com calor (BÖHM *et al.*, 1998; BURACCO *et al.*, 2002; MORELLO *et al.*, 2003; MANABE *et al.*, 2004; KHATTAK *et al.*, 2006; JEON *et al.*, 2007a), congelamento (YAMAMOTO *et al.*, 2003; TSUCHIYA *et al.*, 2004; TSUCHIYA *et al.*, 2005; SAKAYAMA *et al.*, 2006; RAHMAN *et al.*, 2009; TSUCHIYA *et al.* 2010) ou irradiação (BÖHM & SCHERER, 1997; CHEN *et al.*, 2002).

A utilização de autoenxerto desvitalizado tem muitas vantagens quando comparada aos aloimplantes, entre elas a diminuição da reação imunológica, a ausência dos riscos de transmissão de doenças, o baixo custo, a facilidade de acesso (BURACCO *et al.*, 2002; YAMAMOTO *et al.*, 2003; JEON *et al.*, 2007a; TSUCHIYA *et al.*, 2010) e a adequada conformação anatômica (JEON *et al.*, 2007b; TSUCHIYA *et al.*, 2010).

A utilização de autoenxertos ósseos desvitalizados extracorporeamente, deve garantir, não apenas uma adequada margem de segurança, mas a morte definitiva de todas as células neoplásicas, sendo esta “*conditio sine qua non*” para esse método (BÖHM *et al.*, 1998). Além disso, a técnica de desvitalização extracorpórea não deve ser utilizada em lesões ósseas malignas destrutivas, e quando realizada em pacientes com osteossarcoma estes devem passar por uma rigorosa seleção (RAHMAN *et al.*, 2009).

Conforme RAHMAN *et al.* (2009), as técnicas de desvitalização extracorpóreas têm como desvantagens o fato de impedirem posterior análise histológica das margens

de segurança do segmento “removido”, já que este é reimplantado. Segundo os autores isso poderia interferir na escolha do protocolo quimioterápico mais adequado.

O nitrogênio líquido, cujo ponto de ebulição é a -196°C , atinge uma temperatura mais baixa do que o uso de óxido nitroso ($-89,7^{\circ}\text{C}$) e de dióxido de carbono ($-78,5^{\circ}\text{C}$), portanto, pode levar a um congelamento mais profundo. Acredita-se que temperaturas abaixo de -20°C causam a morte celular de mamíferos, por uma combinação de lesões intra e extracelulares, devido a distúrbios osmóticos, eletrolíticos e à formação de cristais de gelo (PORCEL, 1993).

YAMAMOTO *et al.* (2003), em um estudo utilizando metatarsos de bovinos, estabeleceram que o protocolo ideal, em relação à temperatura e ao tempo de preparação de autoenxertos ósseos desvitalizados, é de 20 minutos de imersão em nitrogênio líquido, seguida do descongelamento em temperatura ambiente de 20°C por 15 minutos e imersão em solução salina 0,9% a 30°C por 15 minutos. Esse protocolo manteve a estabilidade durante as mudanças de temperatura do autoenxerto, sem a ocorrência de fraturas. Quando o enxerto desvitalizado era colocado diretamente em solução salina 0,9%, os autores observaram a ocorrência de fraturas pela fragilização durante a brusca troca de temperatura. Verificaram também que não existe perda da resistência do autoenxerto após o seu congelamento com nitrogênio líquido, e que um ciclo de congelamento é suficiente para a morte das células neoplásicas.

TANZAWA *et al.* (2008) deixaram de usar osso autoclavado para reconstrução de ressecções tumorais, por conta da perda da força dinâmica do osso tratado com calor alto (130°C). Passaram a utilizar a técnica de congelamento de autoenxerto por nitrogênio líquido devido às suas vantagens, como simplicidade no manuseio, osteoindução, osteocondução, tempo curto de tratamento, preservação da matriz cartilaginosa, ajuste adequado ao leito receptor, força biomecânica suficiente, desejável reserva de osso e devido ao fato de não necessitar de uma formação de banco de ossos.

TSUCHIYA *et al.* (2005) desenvolveram, após testes *in vitro* e *in vivo*, um método de desvitalização de autoenxerto ósseo utilizando nitrogênio líquido. Os autores testaram esse método em 28 pacientes humanos. A técnica utilizada consistia na excisão em bloco do segmento ósseo neoplásico, remoção dos tecidos moles, curetagem do tumor, incubação do segmento em nitrogênio líquido por 20 minutos, descongelamento em temperatura ambiente por 15 minutos e em água destilada por 10 minutos. Após, o segmento desvitalizado era fixado ao seu leito original com placas metálicas, hastes

intramedulares ou próteses. A função do membro foi considerada excelente em 71,4%, boa em 10,7%, regular em 10,7% e ruim em 7,1% dos pacientes. A união óssea ocorreu em média 6,7 meses após a operação em 26 pacientes. Houve sete complicações, sendo três infecções profundas, duas fraturas e dois casos de recorrência local, sendo todos manejados com sucesso. Com isso, os autores sugeriram que esse método é simples e efetivo para a reconstrução biológica.

TSUCHIYA *et al.* (2004) obtiveram sucesso no transporte ósseo de segmento cortical desvitalizado com nitrogênio líquido experimentalmente em coelhos e em um caso clínico numa criança.

SAKAYAMA *et al.* (2006) verificaram que, dois anos após a reimplantação de um autoenxerto cortical desvitalizado utilizando nitrogênio líquido em uma criança, havia completa união óssea sem recorrência local e que, na análise histológica, foi verificado neovascularização no osso cortical desvitalizado.

RAHMAN *et al.* (2009) e TSUCHIYA *et al.* (2010) ressaltam que, apesar dos promissores resultados obtidos com a desvitalização extracorpórea com nitrogênio líquido até agora, o acompanhamento clínico em longo prazo torna-se necessário, já que a técnica é utilizada em pacientes oncológicos.

RAHMAN *et al.* (2009) avaliaram a efetividade da reimplantação óssea do enxerto, após desvitalização em nitrogênio líquido, em dez pacientes oncológicos humanos, acometidos por tumores malignos. Após aproximadamente 4,5 anos, não havia recorrência local ou sistêmica e o escore funcional médio era de 82,4%. Houve incorporação nas interfaces proximais e distais em nove pacientes num período entre 6 e 10 meses.

TSUCHIYA *et al.* (2010), aperfeiçoando a técnica de desvitalização para evitar a ressecção em bloco, propuseram a manutenção de um pedículo vascular e o congelamento ósseo utilizando manobras de rotação da extremidade para em seguida submergir em nitrogênio líquido. Isso foi realizado em 33 pacientes humanos com tumores malignos, com excelentes resultados funcionais em 75,7% dos casos. Entretanto, obtiveram algumas complicações, sendo 4 infecções profundas, 3 fraturas, 3 recorrências locais e 2 não uniões, porém todas tiveram um controle adequado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi previamente analisado e liberado (Anexo A) pelo Comitê de Ética da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Foram utilizadas 12 ovelhas adultas clinicamente saudáveis, Corriedale, pesando entre 40 e 50 quilos, com idade estimada entre dois e três anos, provenientes de uma fazenda criadora de ovinos, na cidade de Alegrete - RS. Os animais foram alojados em baias coletivas, com período de adaptação de, no mínimo, 30 dias antes da cirurgia e passaram por exame clínico geral e vermifugação. Também passaram por avaliação bioquímica e hematológica no Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias (LACVET-UFRGS) e por exame radiográfico das tíbias. Permaneceram nas baias até o término das avaliações aos 180 dias, com água *ad libitum*, ração comercial para ovinos e feno de alfafa na quantidade e proporção recomendadas para a espécie.

As ovelhas foram separadas aleatoriamente em dois grupos de seis animais cada, sendo grupo controle (GC) e grupo nitrogênio líquido (GNL).

No GC seis ovelhas foram submetidas ao procedimento cirúrgico de osteotomia de um segmento de 7 cm da diáfise tibial direita com serra oscilatória¹. Em seguida, foram removidos o perióstio e a medula óssea, com elevador periosteal e pino de Steinmann, respectivamente. O segmento cortical foi estabilizado com placa de compressão dinâmica² (DCP) de 4 mm de espessura, estreita, com 10 furos e oito parafusos corticais³.

No GNL os animais foram submetidos à osteotomia da mesma maneira que o GC, mas o segmento de 7 cm da diáfise tibial direita foi imerso em nitrogênio líquido⁴ por 20 minutos, visando a desvitalização óssea extracorpórea. Após isso, o osso foi mantido em temperatura ambiente por 15 minutos e, em seguida, imerso em solução salina⁵ 0,9% por mais 15 minutos. Uma placa de compressão dinâmica (DCP) de 4 mm de espessura, estreita, com 10 furos e oito parafusos corticais foi utilizada para fixação do segmento ósseo. O controle radiográfico se deu no pós-operatório imediato e aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.

¹ Synthes Brasil, São Paulo, SP.

² Ortosintese, São Paulo, SP.

³ Ortosintese, São Paulo, SP.

⁴ Air Liquid Brasil, São Paulo, SP.

⁵ Cloreto de Sódio 0,9%, Texon, Viamão, RS

3.1 Procedimento anestésico

Os animais receberam, como medicação pré-anestésica (MPA), 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, a indução anestésica foi efetuada com propofol na dose de 5mg.kg^{-1} , pela via intravenosa (IV), seguida de intubação orotraqueal. A manutenção anestésica foi feita com isoflurano em oxigênio a 100%, utilizando um aparelho de anestesia inalatória em circuito anestésico semiaberto. Durante o procedimento cirúrgico foi administrado solução de ringer lactato em gotejamento venoso de 15ml.kg^{-1} por hora e citrato de fentanila ($2\mu\text{g.kg}^{-1}$ IV), caso houvesse superficialização do plano anestésico ou qualquer evidência de dor.

3.2 Procedimento cirúrgico

Após indução anestésica, o animal foi posicionado na mesa em decúbito lateral com o membro a ser operado voltado para baixo, a antisepsia foi feita da maneira habitual com álcool e povidine.

O acesso medial à diáfise tibial foi iniciado com incisão de pele e afastamento dos tecidos moles adjacentes, com dois afastadores autoestáticos de Weitlaner. A região da diáfise tibial foi exposta (Figura 1A), seguindo-se da incisão do periósteo e sua elevação com elevador periosteal. As osteotomias proximal e distal foram realizadas com serra oscilatória pneumática (Figura 1B), sendo dessa forma retirado um fragmento ósseo diafisário de 7 cm de comprimento (Figura 1C). Durante a secção óssea, a área foi constantemente irrigada com solução salina 0,9% estéril em temperatura ambiente. Após a remoção do periósteo, da medula óssea e do endósteo, o segmento ósseo foi lavado com solução salina 0,9%. Nos animais do grupo controle (GC), o enxerto foi reimplantado em seu leito receptor sem qualquer processo de desvitalização extracorpórea. Nos animais do grupo nitrogênio líquido (GNL), o enxerto ósseo foi submetido a congelamento extracorpóreo pela submersão em nitrogênio líquido durante 20 minutos (Figura 2A), seguido de descongelamento em temperatura ambiente por 15 minutos (Figura 2B) e em solução salina 0,9% por mais 15 minutos (Figura 2C), conforme protocolo estabelecido por TSUCHIYA *et al.* (2005).

Os autoenxertos ósseos de ambos os grupos foram reimplantados utilizando-se uma placa de compressão dinâmica (DCP) de 10 furos, considerando o 1º como o mais

proximal e o 10º o mais distal, e oito parafusos corticais com 4,5 mm de diâmetro. A placa media 170 mm de comprimento, 12 mm de largura e 4 mm de espessura. Foi moldada antes da osteotomia, para que ficasse anatomicamente ajustada à superfície óssea/enxerto. Posteriormente, foi fixada ao enxerto com o auxílio de duas pinças de Verbrugge para ser inserida no defeito ósseo e, em seguida, ser fixada temporariamente aos segmentos proximal e distal com pinças ortopédicas. Com um motor pneumático ortopédico, broca de 3,2 mm de diâmetro e guia de broca neutro, foram confeccionados os orifícios em ambas as corticais. A seguir, a profundidade cortical foi mensurada e confeccionou-se a rosca com macho, para posterior inserção dos parafusos corticais de diferentes comprimentos, entre 20 e 22 mm (Figura 3A). Utilizou-se 6 parafusos corticais de 4,5mm de diâmetro e comprimento de 20 a 36 mm, de acordo com a espessura óssea dos leitos receptores, sendo 3 no fragmento proximal e 3 no distal, para fixar a placa ao osso receptor. Os dois parafusos imediatamente adjacentes ao implante, 3º e 8º furos, foram inseridos primeiramente com efeito compressivo, sendo para tal utilizado o guia de broca compressivo. A seguir, os demais parafusos foram inseridos de maneira aleatória (Figura 3B e 3C) intercalando-se os segmentos e sem efeito compressivo, utilizando-se o guia de broca neutro.

Efetuada a fixação da placa, o local foi copiosamente lavado com solução salina 0,9% estéril morna. O tecido subcutâneo foi suturado utilizando-se fio sintético absorvível de poliglactina 910, número 2-0 e padrão contínuo simples. Para dermorráfia, foi utilizado mononáilon 3-0 e padrão isolado simples.

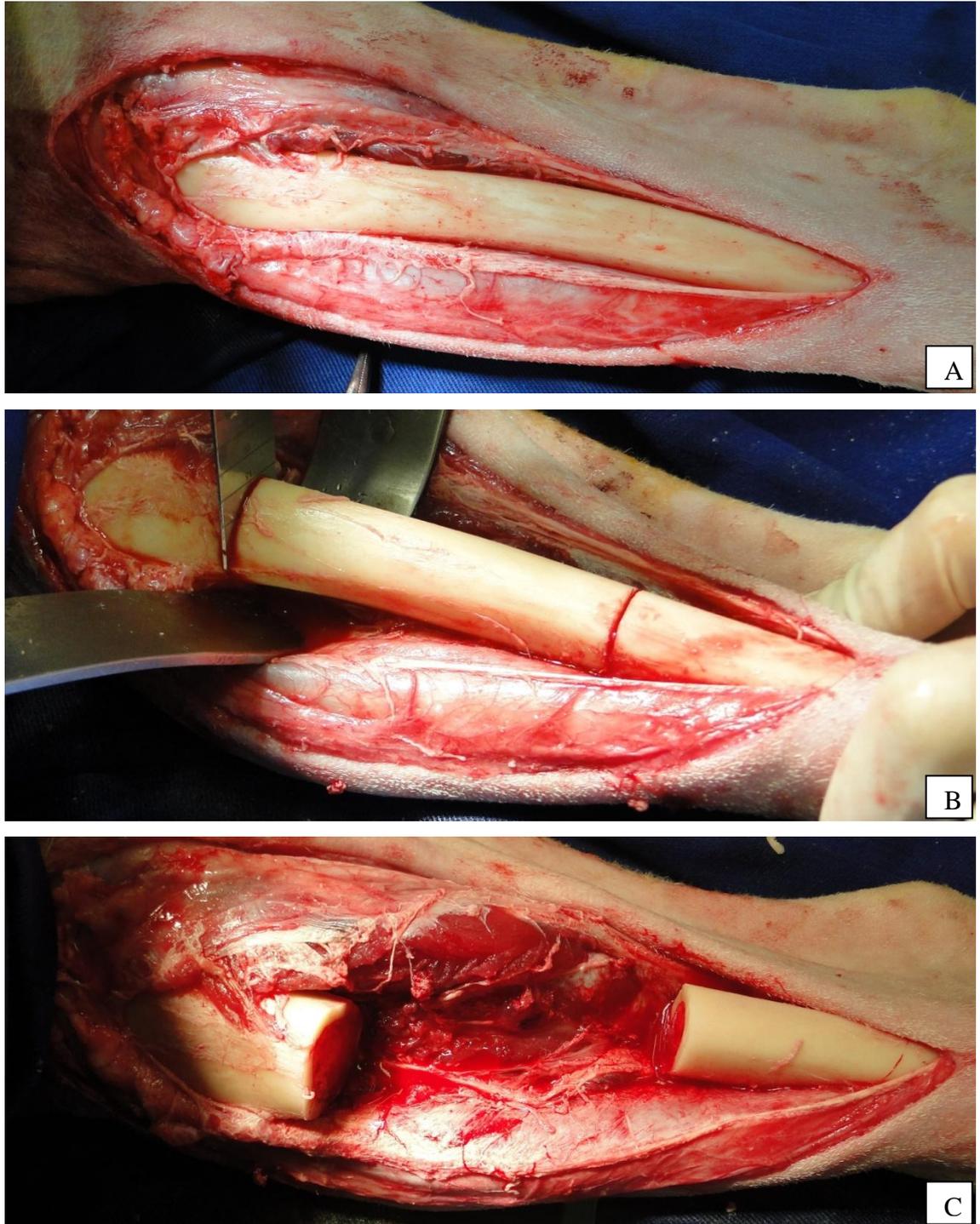


Figura 1 – Sequência da osteotomia tibial em ovelha. A) Acesso cirúrgico à tibia. B) Osteotomia utilizando serra oscilatória. C) Área após a remoção do segmento ósseo.



Figura 2 – Imagem do processo de desvitalização extracorpórea de autoenxerto ósseo cortical. A) autoenxerto submerso em nitrogênio líquido. B) autoenxerto descongelando em temperatura ambiente. C) autoenxerto descongelando em solução salina 0,9%.

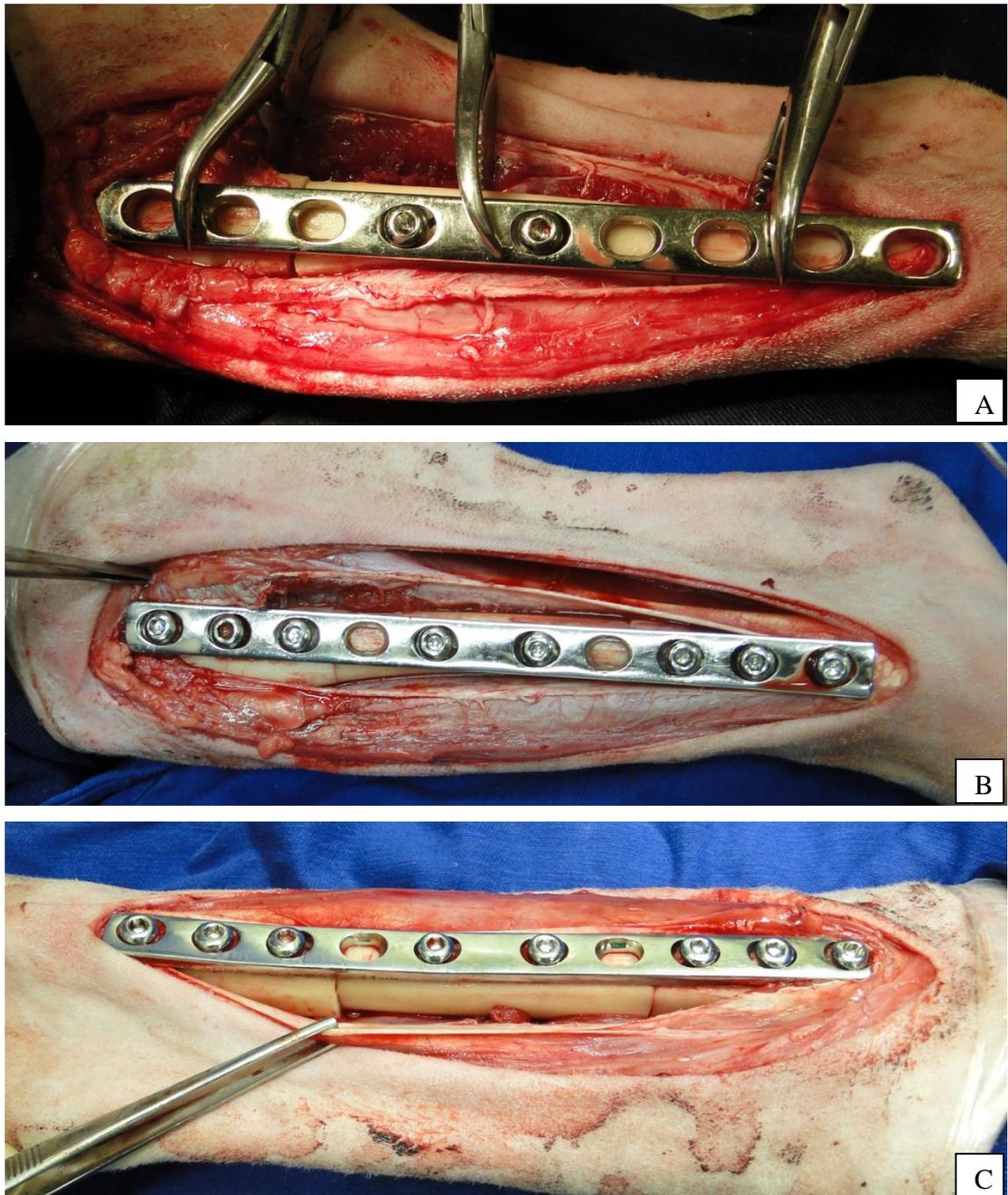


Figura 3 – Sequência da fixação do autoenxerto tibial em ovelha. A) Fixação do autoenxerto com dois parafusos. B) Vista lateral da fixação do autoenxerto ao leito receptor. C) Vista oblíqua da fixação do autoenxerto ao leito receptor.

3.3 Cuidados pós-operatórios

Como terapia analgésica e antiinflamatória no pós-operatório imediato, os animais receberam cloridrato de tramadol, 2 mg.kg⁻¹ IM, e meloxicam, 0,5 mg.kg⁻¹. Como terapia antimicrobiana foi utilizada enrofloxacin, 5 mg.kg⁻¹ IM no pré, no pós-operatório imediato e a cada 12 horas durante 7 dias. Manteve-se o meloxicam pelo tempo total de 5 dias. A analgesia foi realizada com morfina, 0,2 mg.kg⁻¹ a cada 12 horas, por 2 dias. Os curativos foram realizados diariamente, envolvendo limpeza dos pontos com solução salina 0,9% estéril e cobertura com gaze e atadura, até a retirada dos pontos de pele aos 7 dias.

3.4 Avaliação clínica

Os animais eram mantidos em baias individuais nos primeiros 10 dias após a cirurgia, para que houvesse um repouso adequado e observação da ingestão hídrica e alimentar, cuidados com a ferida cirúrgica e administração das medicações. Os animais foram alimentados com ração específica e feno de alfafa, na quantidade indicada de acordo com o peso de cada um.

Os animais foram avaliados quanto à deambulação através de observação clínica e quando havia mudanças essas eram registradas em planilha.

3.5 Avaliação radiográfica

Todos os animais foram submetidos a exame radiográfico do membro pélvico direito previamente à cirurgia, para descartar qualquer alteração óssea. Após o procedimento cirúrgico, foram feitas avaliações radiográficas do membro operado a cada 30 dias, até o término do período de avaliação aos 180 dias, resultando em sete exames radiográficos por animal.

Os exames radiográficos foram feitos apenas com contenção física dos animais, no setor de radiologia do HCV – UFRGS, com o mesmo aparelho radiográfico, com carga padrão e nas projeções crânio-caudal e médio-lateral.

A união radiográfica era considerada presente a partir do momento em que houvesse continuidade cortical completa na interface osso/autoenxerto e os calos periosteal e endosteal apresentavam-se em remodelamento ativo.

Os exames radiográficos foram avaliados através da Tabela 1 proposta por Ehrhart *et al.* (2005) e adaptada para este trabalho, onde um experiente ortopedista, que desconhecia a que grupo pertencia cada animal, avaliou e estabeleceu um escore de pontuação para cada radiografia.

Tabela 1 – Escore para avaliação radiográfica proposto por Ehrhart *et al.* (2005) e adaptado para avaliação dos autoenxertos corticais desvitalizados extracorporeamente e reimplantados em diáfise tibial de ovelhas.

Critérios para o escore	Pontos
INCORPORAÇÃO/UNIÃO DO AUTOENXERTO	
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 AUTOENXERTO	
Contorno do autoenxerto 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 retardada.	1
Mínima ou sem evidência radiográfica de união.	0

3.6 Avaliação macroscópica

Ao término dos 180 dias, dois animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia, com cloreto de potássio IV, após anestesia geral com tiopental sódico IV, conforme determina o Conselho Federal de Medicina Veterinária na resolução nº 714 de junho de 2002.

Após a remoção das tíbias foram observados 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 autoenxerto ósseo. A placa e os parafusos foram removidos e a tíbia foi fixada em formol a 10%, por um período mínimo de 72 horas.

3.7 Avaliação microscópica

A tíbia foi seccionada transversalmente em seis locais para confecção de três fragmentos ósseos que foram enviados para análise microscópica. As secções foram feitas 1 cm acima e 1 cm abaixo das interfaces osso hospedeiro e enxerto, tanto proximal quanto distalmente, e no meio do enxerto ósseo.

Os segmentos foram descalcificados em solução de ácido nítrico a 10% e processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Os cortes histológicos tinham a espessura de 5 micras e foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE). O material foi examinado em microscópio óptico para análise descritiva dos achados.

3.8 Análise estatística

Os dados foram tabulados em planilha do programa Excel e exportados para análise estatística no programa SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*), versão 14.0. As variáveis quantitativas foram descritas pela média e desvio padrão e comparadas pelo teste ANOVA, seguido de Tukey para comparações múltiplas. Foi considerado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). A variável incorporação (sim/não) foi comparada pelo teste Qui-quadrado, realizando posteriormente as comparações múltiplas dos percentuais. As variáveis categóricas foram representadas graficamente.

4 RESULTADOS

4.1 Procedimento anestésico

O protocolo anestésico utilizado foi adequado para a realização dos procedimentos de osteotomia e osteossíntese, promovendo analgesia, um bom relaxamento muscular, manutenção apropriada do plano anestésico e um retorno da anestesia sem complicações. As medicações pós-operatórias foram suficientes para manter o controle analgésico e anti-inflamatório, sem que houvesse dor, falta de apetite e infecção da ferida cirúrgica.

4.2 Procedimento cirúrgico

O acesso à tíbia foi adequado à exposição óssea, osteotomia e reimplantação do enxerto. A osteotomia realizada provocou um sangramento leve, que foi controlado facilmente após compressão com gaze na região da medula óssea.

A preparação inicial do enxerto, que consistia na remoção da medula óssea e restos do periósteo, foi realizada de maneira rápida e sem dificuldades nos dois grupos. Devido à evaporação do nitrogênio líquido, houve a necessidade da sua reposição durante o processo de desvitalização para que o enxerto permanecesse completamente submerso. A quantidade total de nitrogênio líquido utilizada a cada cirurgia foi de até 1 litro.

Não foi observada diferença entre os grupos com relação à resistência durante a perfuração dos autoenxertos. Porém, aconteceram algumas complicações no momento do macheamento para inserção dos parafusos corticais no enxerto de duas ovelhas, uma de cada grupo. Na do GNL houve desprendimento de um fragmento ósseo (10 mm de comprimento x 4 mm de largura) na cortical lateral do enxerto no local de inserção do parafuso proximal. Essa falha não causou afrouxamento do parafuso tanto a curto quanto a longo prazo. No animal do GC aconteceu uma falha semelhante, no local de inserção do parafuso proximal no enxerto, entretanto, não houve o desprendimento do fragmento ósseo. Nesse caso não foi verificado comprometimento da fixação da placa e do parafuso. Nos dois animais a evolução clínica, em relação ao apoio do membro e à

deambulação, foi satisfatória e o processo de incorporação do enxerto ocorreu adequadamente.

Em dois animais do GC, ao final do procedimento cirúrgico foi verificado o desalinhamento entre o enxerto e o osso receptor distal, o enxerto ficou deslocado cranialmente, em torno de 5 mm. Isso não comprometeu o apoio do membro no pós-operatório, a deambulação, nem a evolução satisfatória do processo de incorporação do enxerto.

4.3 Avaliação clínica

A terapia antimicrobiana utilizada no pré e pós-operatório, associada à limpeza da ferida cirúrgica e sua proteção com ataduras foram suficientes para prevenir processos infecciosos, já que nenhum animal apresentou sinais clínicos como febre, inapetência ou drenagem de secreção purulenta durante o pós-operatório.

Os animais ficavam em estação e eram capazes de se alimentar assim que se recuperavam da anestesia. Mantê-las em baias individuais nos primeiros 10 dias de pós-operatório facilitou os cuidados com a ferida cirúrgica, o monitoramento da ingestão hídrica e alimentar, bem como a avaliação do estado geral de cada ovelha.

Ao longo dos primeiros dias após a cirurgia as ovelhas não apoiavam o membro operado ao caminhar, tocavam a ponta dos cascos de forma discreta no solo apenas para se equilibrar, sem exercer carga de apoio. O uso funcional do membro aconteceu de forma gradual a partir da segunda semana, e aos 30 dias de pós-operatório tinham uma deambulação claudicante. Aos 60 dias houve evolução para apoio completo durante a deambulação, exceto em uma ovelha do GNL. Esse animal mantinha o membro elevado quando em estação. Com 120 dias ela demonstrava um apoio discreto do membro para ficar em estação e para se equilibrar ao dar o passo. A partir dos 150 dias de pós-operatório ela apresentou um andar claudicante, entretanto, em momento algum teve apoio completo do membro ao caminhar. Durante o período de avaliação os exames ortopédicos realizados não demonstraram instabilidade da placa, enxerto ou osso receptor, tampouco secreção ou fístula na região operada.

4.4 Avaliação radiográfica

O fato de se fazer as radiografias sem contenção química levou à necessidade da repetição de alguns exames por falha no posicionamento ou baixa qualidade radiográfica. Apesar de não demonstrarem dor ou desconforto durante o exame, nos animais mais agitados foi necessário, ao invés de duas pessoas, três para o adequado posicionamento.

Os resultados das avaliações radiográficas em relação aos parâmetros incorporação das interfaces proximal e distal, qualidade óssea do autoenxerto, qualidade do osso receptor, aspecto e fixação da placa e parafusos, impressão global da consolidação estão ilustrados nas Figuras 4 a 9.

Considerando-se que havia 12 interfaces enxerto/osso em cada grupo, sendo 6 proximais e 6 distais, observou-se incorporação do autoenxerto em 100% delas no GC e em 91,67% no GNL. O tempo médio para incorporação foi 75 dias (mínimo 60 e máximo 90 dias) para o GC (Figura 10) e de 84,54 dias (mínimo 60 e máximo 120 dias) para o GNL (Figura 11). Não houve diferença estatisticamente significativa tanto na taxa quanto no tempo de incorporação entre os grupos e entre as interfaces. As Figuras 12 e 13 ilustram a evolução radiográfica de uma ovelha do GNL e uma do GC, respectivamente. Em um animal do GNL foi observada não-união da interface proximal (Figura 14), sendo essa interface excluída da análise quantitativa e estatística.

Verificou-se no pós-operatório imediato um desvio acentuado do eixo axial na interface distal enxerto/osso receptor em dois animais do GC, levando a uma pequena área de contato entre as corticais. Isso não prejudicou a incorporação do enxerto, que ocorreu satisfatoriamente.

Em outro animal do GC, foi observado aos 30 dias um pequeno afastamento da placa junto ao fragmento receptor proximal. Apesar disso, a incorporação ocorreu sem qualquer intercorrência.

Em outra ovelha do GC, aos 30 dias houve o afrouxamento dos parafusos do leito receptor proximal, com afastamento da placa e desvio do eixo longitudinal na interface proximal, que ficou com uma angulação aproximada de 25° (Figura 15B). Aos 90 dias o calo ósseo era exuberante (Figura 15C), mas ao longo do período de avaliação houve remodelamento e incorporação (Figura 15D).

No animal do GNL em que houve o desprendimento de um fragmento da cortical lateral no furo 5 do enxerto, foi verificado aos 30 dias um discreto desvio do

eixo axial na interface proximal levando à formação de calo ósseo exuberante aos 60 dias. Aos 90 dias foram observados incorporação e remodelamento na referida interface.

No animal do GNL em que a evolução clínica foi insatisfatória, aos 30 dias foi observado reabsorção do enxerto (Figura 14B), que se acentuou nas avaliações seguintes (Figura 14C). Com 90 dias a reabsorção era mais intensa na porção proximal do enxerto, porém na projeção radiográfica ML foi notada ponte óssea originária do fragmento proximal dirigindo-se ao enxerto (Figura 14D). Aos 120 dias havia incorporação na interface distal associada à exuberante calo ósseo. Marcante reabsorção na região central e proximal do enxerto também foi percebida (Figura 14E). Com 150 dias havia sinais de remodelamento na interface distal e uma evidente não-união na interface proximal (Figura 14F). Aos 180 dias permanecia a não-união proximal, com reação periosteal na superfície óssea em contato com a placa e ao redor dela, tanto no osso proximal quanto no enxerto (Figura 14G e 14H).

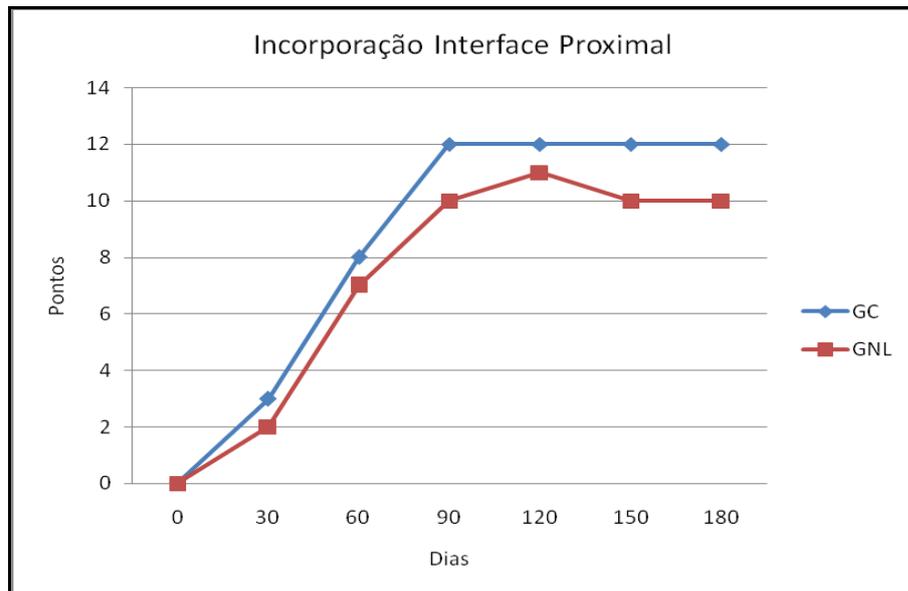


Figura 4 – Representação gráfica da pontuação atribuída por avaliador imparcial utilizando o escore radiográfico proposto por Ehrhart *et al.* (2005), adaptado para avaliação de autoenxertos ósseos corticais desvitalizados em nitrogênio líquido (GNL) ou não (GC) e aplicados em diáfise tibial de ovelhas no item incorporação/união do autoenxerto na interface proximal.

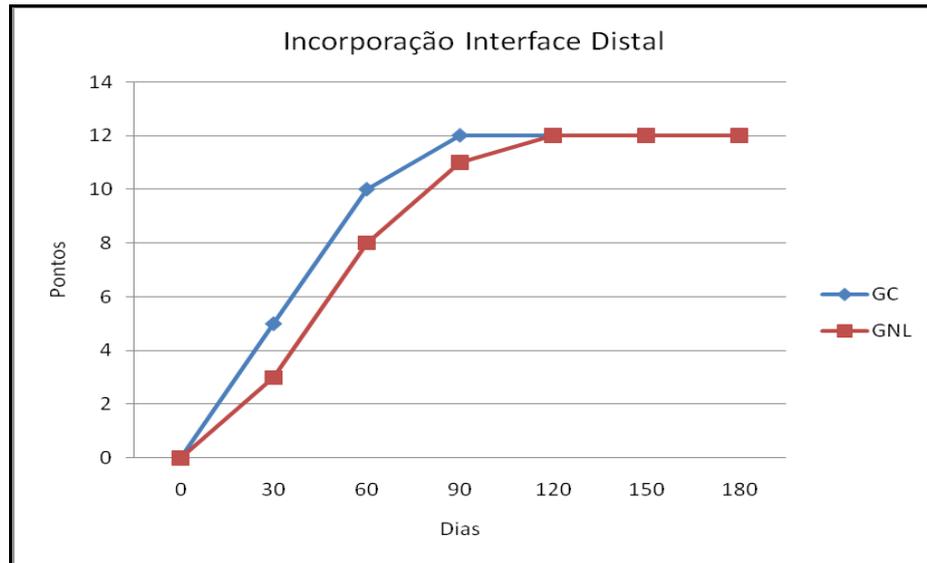


Figura 5 – Representação gráfica da pontuação atribuída por avaliador imparcial utilizando o escore radiográfico proposto por Ehrhart *et al.* (2005) e adaptado para avaliação de autoenxertos ósseos corticais desvitalizados em nitrogênio líquido (GNL) ou não (GC) e aplicados em diáfise tibial de ovelhas no item incorporação/união do autoenxerto na interface distal.

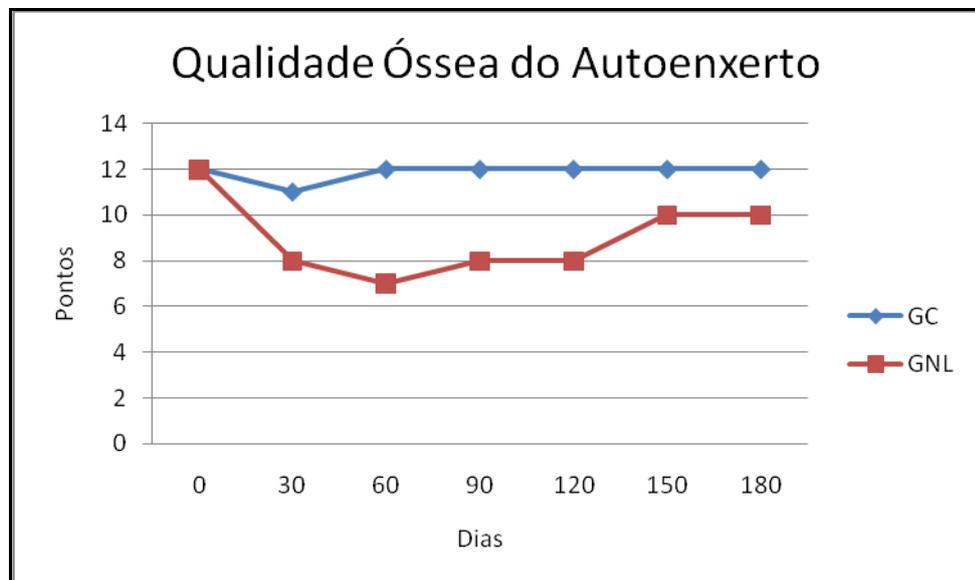


Figura 6 – Representação gráfica da pontuação atribuída por avaliador imparcial utilizando o escore radiográfico proposto por Ehrhart *et al.* (2005) e adaptado para avaliação de autoenxertos ósseos corticais desvitalizados em nitrogênio líquido (GNL) ou não (GC) e aplicados em diáfise tibial de ovelhas no item qualidade óssea do autoenxerto.



Figura 7 – Representação gráfica da pontuação atribuída por avaliador imparcial utilizando o escore radiográfico proposto por Ehrhart *et al.* (2005) e adaptado para avaliação de autoenxertos ósseos corticais desvitalizados em nitrogênio líquido (GNL) ou não (GC) e aplicados em diáfise tibial de ovelhas no item qualidade do osso receptor.

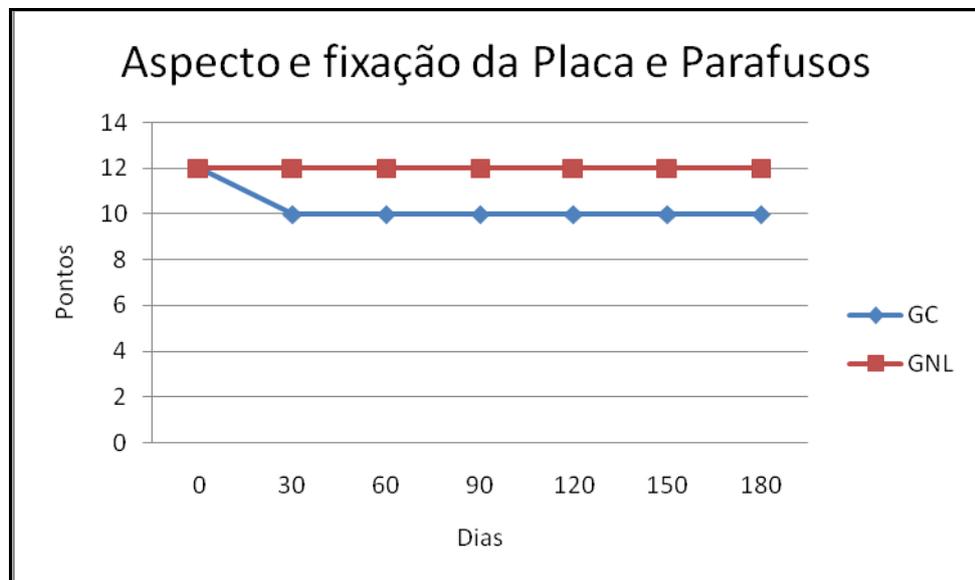


Figura 8 – Representação gráfica da pontuação atribuída por avaliador imparcial utilizando o escore radiográfico proposto por Ehrhart *et al.* (2005) e adaptado para avaliação de autoenxertos ósseos corticais desvitalizados em nitrogênio líquido (GNL) ou não (GC) e aplicados em diáfise tibial de ovelhas no item aspecto e fixação da placa e parafusos.

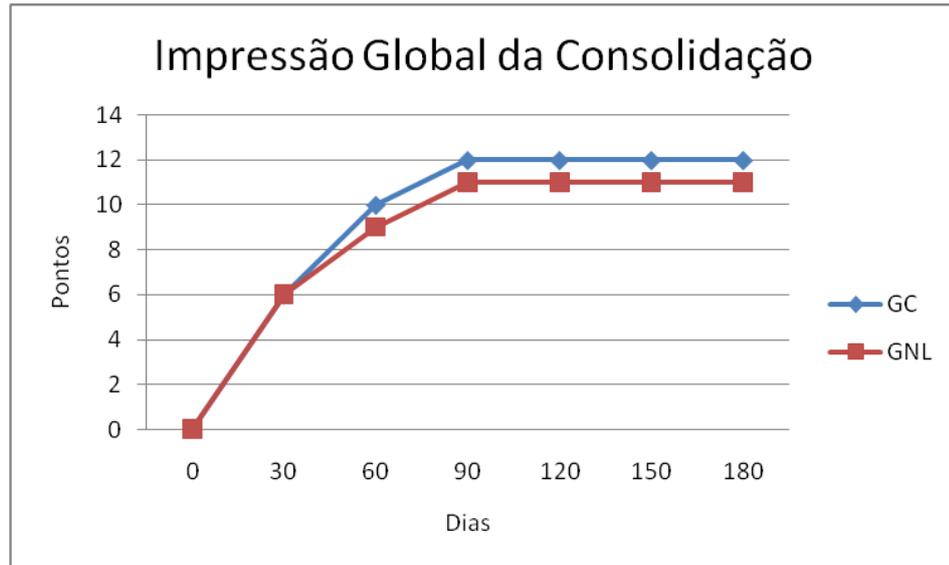


Figura 9 – Representação gráfica da pontuação atribuída por avaliador imparcial utilizando o escore radiográfico proposto por Ehrhart *et al.* (2005) e adaptado para avaliação de autoenxertos ósseos corticais desvitalizados em nitrogênio líquido (GNL) ou não (GC) e aplicados em diáfise tibial de ovelhas no item impressão global da consolidação.

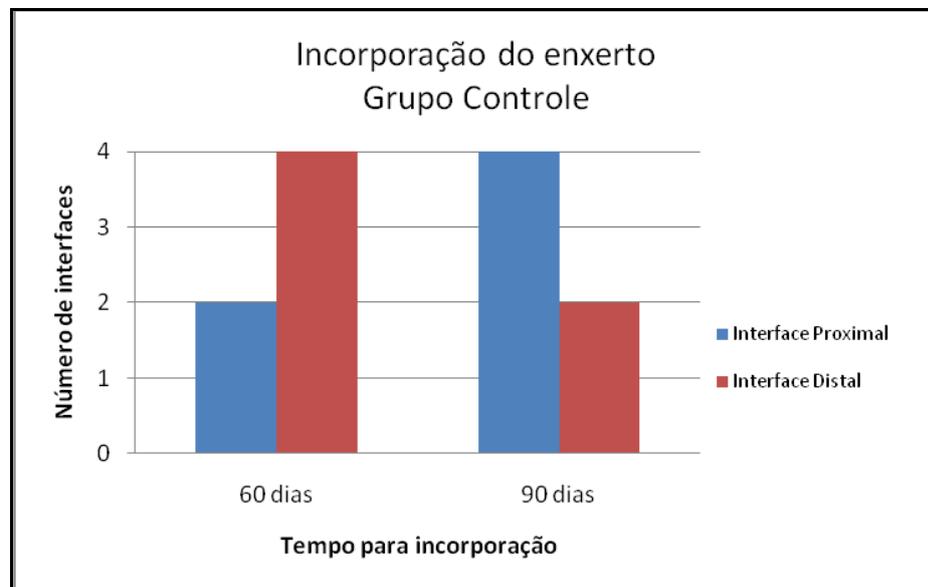


Figura 10 – Representação gráfica do tempo de incorporação radiográfica das interfaces proximal e distal de ovelhas submetidas à implantação de segmento ósseo cortical autógeno, grupo controle (GC).

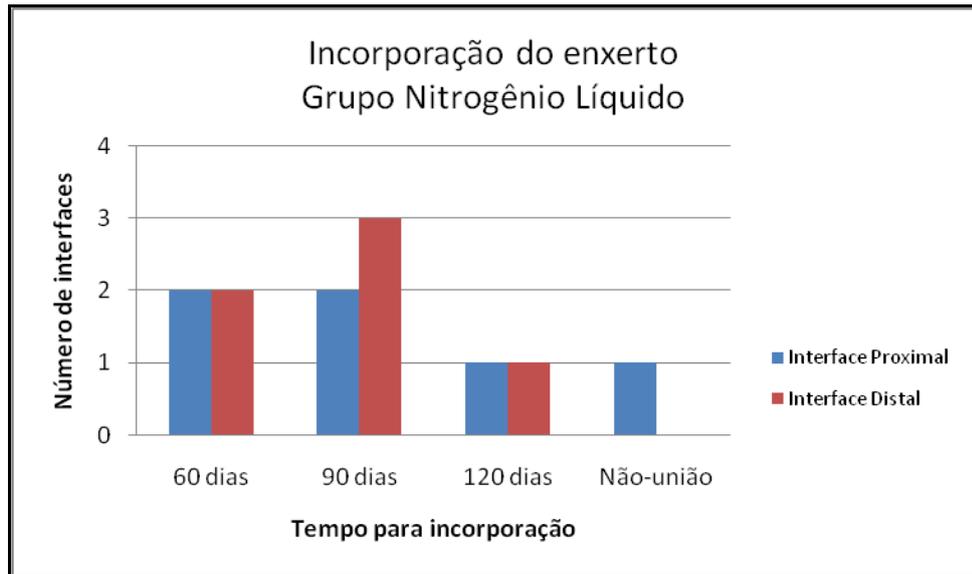


Figura 11 – Representação gráfica do tempo de incorporação radiográfica das interfaces proximal e distal do grupo de ovelhas submetidas à implantação de segmento ósseo cortical autógeno desvitalizado em nitrogênio líquido (GNL).

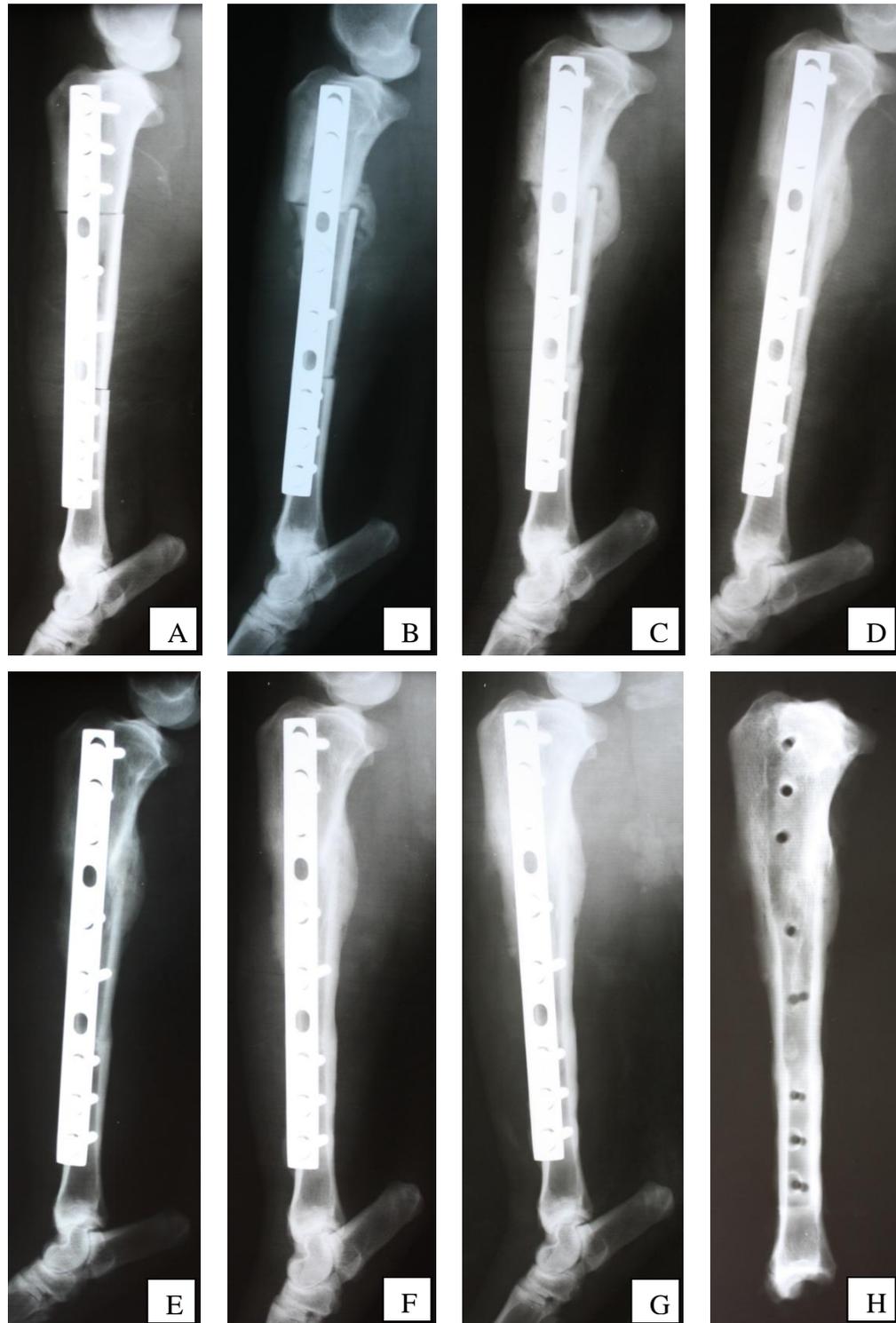


Figura 12 - Imagem radiográfica médio-lateral da incorporação do autoenxerto ósseo desvitalizado com nitrogênio líquido (GNL), implantado em tíbia de ovelha, em diferentes períodos de pós-operatório. A) Pós-operatório imediato; B) 30 dias; C) 60 dias; D) 90 dias; E) 120 dias; F) 150 dias; G) 180 dias; H) 180 dias, após a remoção da placa e parafusos.

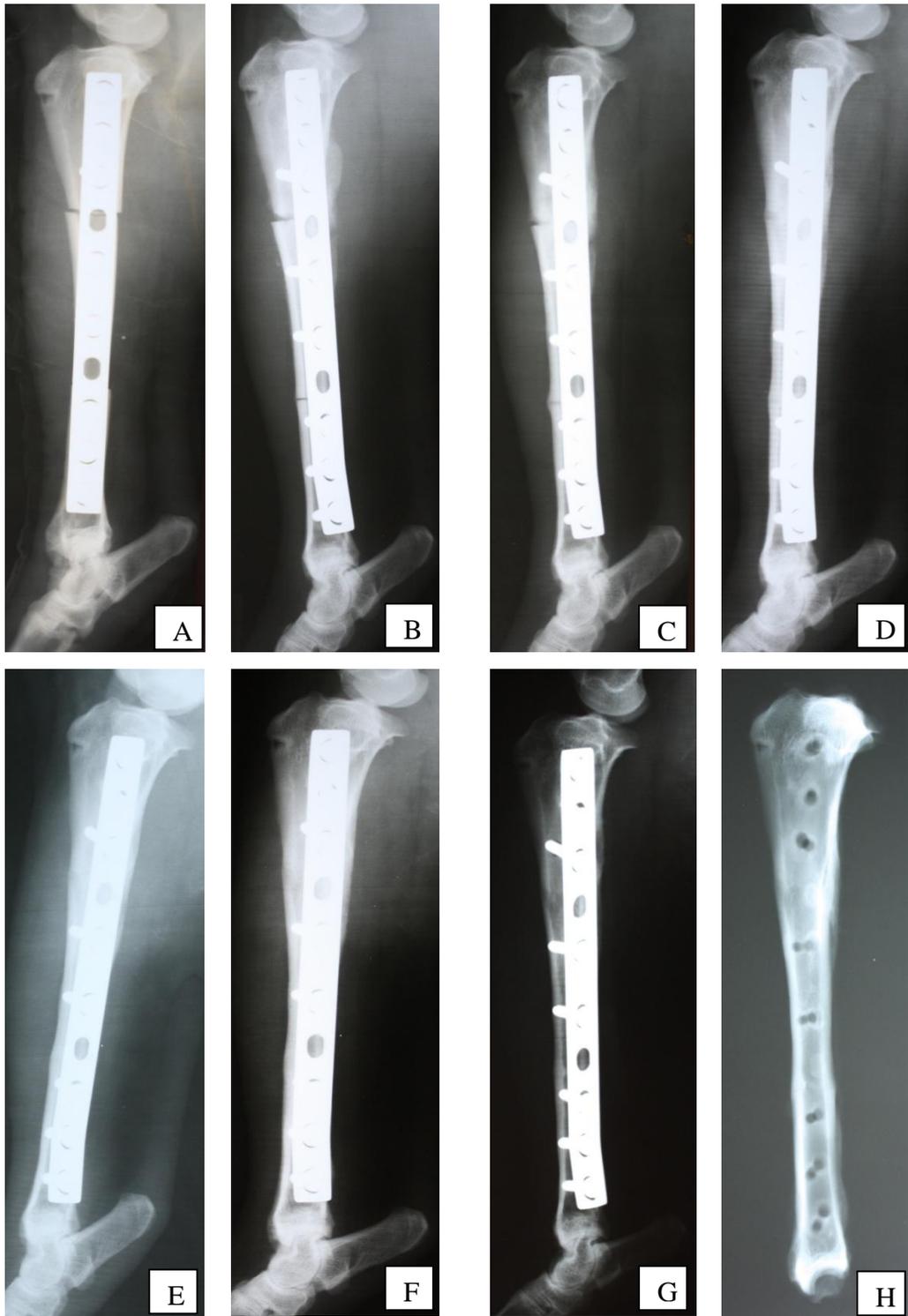


Figura 13 - Imagem radiográfica médio-lateral da incorporação do autoenxerto ósseo não desvitalizado (GC) implantado em tíbia de ovelha, em diferentes períodos de pós-operatório. A) Pós-operatório imediato; B) 30 dias; C) 60 dias; D) 90 dias; E) 120 dias; F) 150 dias; G) 180 dias; H) 180 dias, após a remoção da placa e parafusos.

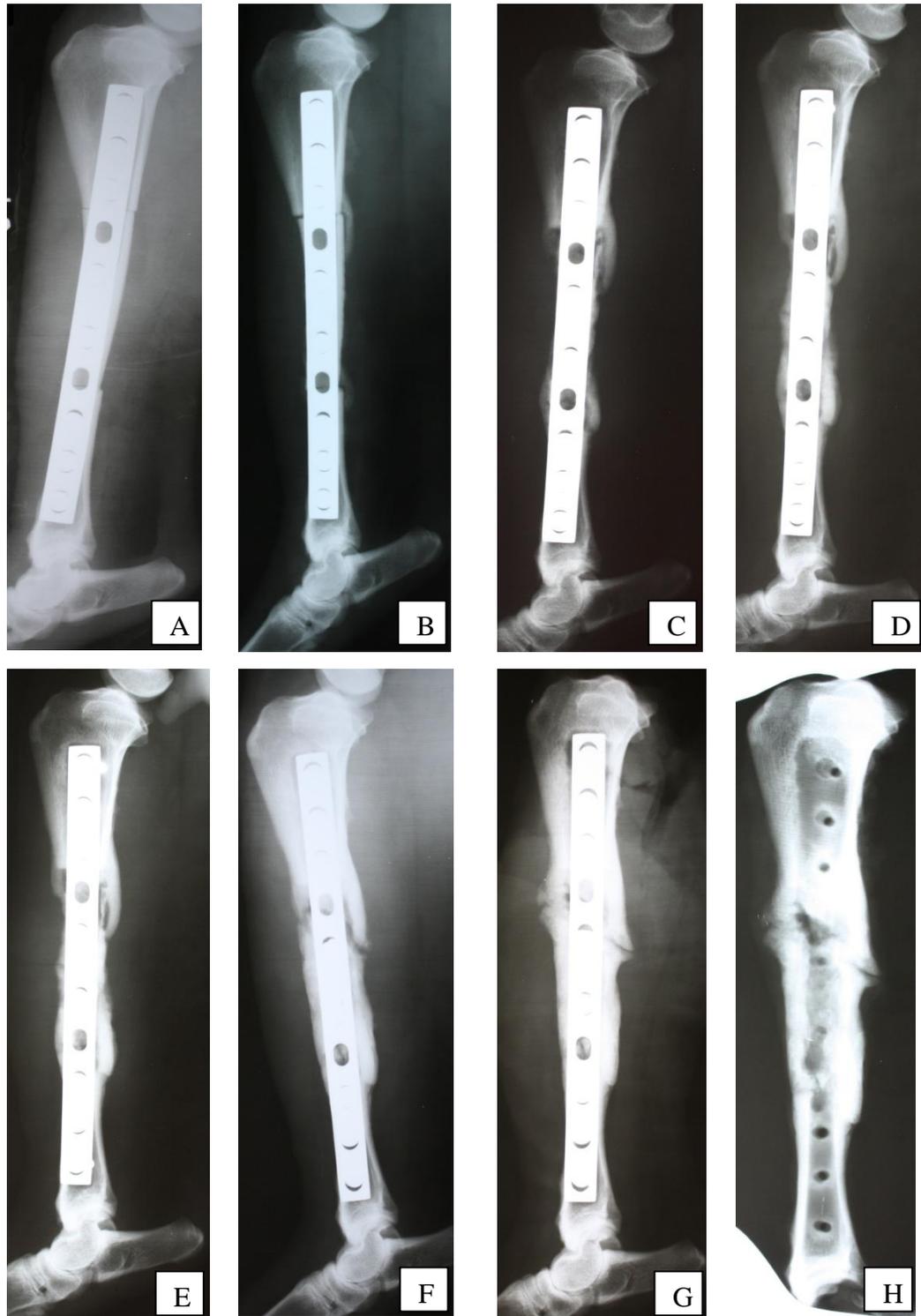


Figura 14 - Imagem radiográfica médio-lateral da incorporação do autoenxerto ósseo desvitalizado com nitrogênio líquido (GNL), implantado em tíbia de ovelha, em diferentes períodos de pós-operatório. A) Pós-operatório imediato; B) 30 dias; C) 60 dias; D) 90 dias; E) 120 dias; F) 150 dias; G) 180 dias; H) 180 dias, após a remoção da placa e parafusos. Notar a não-união na interface proximal.

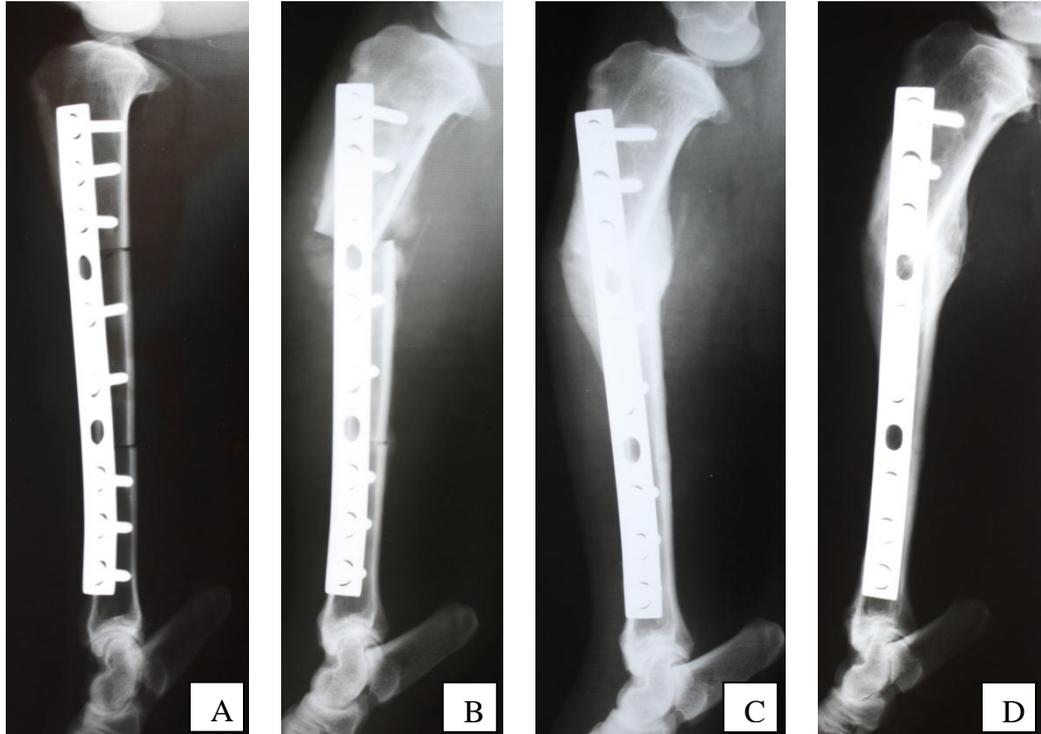


Figura 15 - Imagem radiográfica médio-lateral da incorporação do autoenxerto ósseo não desvitalizado (GC), implantado em tíbia de ovelha, em diferentes períodos de pós-operatório. A) Pós-operatório imediato; B) 30 dias; C) 90 dias; D) 180 dias. Observar o deslocamento do fragmento proximal aos 30 dias e a posterior incorporação do autoenxerto.

4.5 Avaliação macroscópica

Não foram identificadas diferenças entre os grupos avaliados. Em todos os animais foi observada presença de tecidos moles aderidos ao osso e envolvendo completamente a placa e os parafusos. Houve certa dificuldade para remoção dos implantes metálicos, já que estavam firmemente fixados à tíbia, exceto no animal do GNL em que ocorreu não união, pois os parafusos utilizados no enxerto foram removidos facilmente. Após a remoção da placa não foi percebida qualquer mobilidade nas interfaces, sendo difícil a diferenciação entre enxerto e osso receptor.

4.6 Avaliação microscópica

Nos animais do GC foi verificada completa incorporação do enxerto com dificuldade na diferenciação entre ele e o osso receptor proximal e distal. Em um animal foram identificados restos necróticos na região periosteal do enxerto.

Em um animal do GNL foi identificado restos necróticos no centro do enxerto, com presença de osteoblastos envolvidos por material basofílico. Também foram observados restos necróticos com abundantes osteoclastos e fibrose periosteal. Na outra ovelha foi notada uma pequena reação periosteal na interface proximal, com presença de abundantes osteoclastos. Nos demais segmentos não havia alterações histológicas (Figura 16).



Figura 16 – Avaliação histológica de autoenxerto cortical ósseo desvitalizado em nitrogênio líquido, com presença de osteoclastos (setas) entre o enxerto e o periosteio.

5 DISCUSSÃO

O modelo experimental de remoção de um segmento diafisário de osso longo já foi utilizado por ALIEVI *et al.* (2007) e FERREIRA (2008), para avaliar aloimplantes em cães e gatos, respectivamente. Apesar de não mimetizar a grande maioria dos casos de neoplasias ósseas nos pacientes veterinários, pois a maioria acometem as extremidades ósseas (MORELLO *et al.*, 2001; LIPTAK *et al.*, 2006a), o modelo mostrou-se adequado à padronização da técnica de desvitalização extracorpórea em nitrogênio líquido, já que a falha óssea realizada era grande, correspondente a uma ressecção de neoplasia óssea diafisária com margem de segurança (LIPTAK *et al.*, 2004).

A técnica de desvitalização extracorpórea de autoenxertos é amplamente utilizada na medicina humana de alguns países asiáticos, que, por razões sócio-religiosas, têm restrição quanto ao uso de aloenxertos (YAMAMOTO *et al.*, 2003; TSUCHIYA *et al.*, 2010). Além disso, enxertos autógenos minimizam as chances de reações imunogênicas, a transmissão de doenças, permitem um adequado encaixe ósseo ao leito receptor e evitam a necessidade de formação de banco de ossos (BURACCO *et al.*, 2002; YAMAMOTO *et al.*, 2003; JEON *et al.*, 2007a; JEON *et al.*, 2007b; TSUCHIYA *et al.*, 2010). Tais vantagens foram percebidas no presente estudo, já que não houve maior dificuldade na realização da desvitalização, tampouco no encaixe do enxerto no sítio receptor e também não foi necessária formação de banco de ossos. Essa última, além de evitar a transmissão de doenças e reações imunes, diminui os custos do procedimento.

As principais técnicas de desvitalização extracorpórea são a autoclavagem (BÖHM & SCHERER, 1997; HAYASHI *et al.*, 2005), a pasteurização (BURACCO *et al.*, 2002; MANABE *et al.*, 2004; SAKAYAMA *et al.*, 2004; JEON *et al.*, 2007a; JEON *et al.*, 2007b), a irradiação (BÖHM & SCHERER, 1997; BOSTON *et al.*, 2007) e o congelamento com nitrogênio líquido (TSUCHIYA *et al.*, 2004; TSUCHIYA *et al.*, 2005; RAHMAN *et al.*, 2009; TSUCHIYA *et al.*, 2010). Os relatos sobre a desvitalização extracorpórea de enxertos ósseos em medicina veterinária são raros e foram relatados a pasteurização (BURACCO *et al.*, 2002) e a irradiação (BOSTON *et al.*, 2007).

Dentre as vantagens do nitrogênio líquido em relação às demais técnicas de desvitalização extracorpórea, como autoclavagem, pasteurização e irradiação, foi possível verificar neste estudo o baixo custo, a pequena quantidade de equipamento especializado necessária, a simplicidade da técnica, e a dispensa no controle rigoroso da temperatura durante a desvitalização (TSUCHIYA *et al.*, 2005; TANZAWA *et al.*, 2008; TSUCHIYA *et al.*, 2010). TSUCHIYA *et al.* (2005), NISHIDA *et al.* (2008) e KAWANO *et al.* (2010) citam ainda como outra grande vantagem a crioimunologia, que é a liberação de proteínas teciduais com propriedades antigênicas durante o congelamento. Isso desencadeia uma resposta imunológica diretamente contra o tumor, reduzindo as chances de recorrência local ou de metástases pulmonares.

Mesmo não tendo sido tecnicamente testada, a aparente similaridade da resistência à perfuração do enxerto ósseo entre os dois grupos avaliados no presente estudo pode referendar o citado por YAMAMOTO *et al.* (2003), que verificaram em ensaios biomecânicos a manutenção da resistência dos ossos submetidos à desvitalização pelo nitrogênio líquido, comparados a ossos frescos.

A não ocorrência de fraturas ou fissuras no enxerto durante o processo de desvitalização extracorpórea, provavelmente deve-se ao fato de que foi submetido a um descongelamento lento em temperatura ambiente, antes de sua submersão em solução salina 0,9%, já que YAMAMOTO *et al.* (2003) testaram diferentes protocolos e verificaram a ocorrência de tais complicações quando essa etapa não foi realizada.

Apesar dos bons resultados obtidos neste estudo, ressalta-se que, quando se utiliza essa técnica em casos clínicos, deve-se levar em consideração a característica tumoral, dando-se preferência às neoplasias osteoblásticas, já que as osteolíticas agressivas a contraindicam, por fragilizar a estrutura óssea e sua consequente fixação (BÖHM *et al.*, 1998; TSUCHIYA *et al.*, 2010).

Vários protocolos recomendam um rápido congelamento do tecido, o que leva à máxima formação possível de cristais de gelo intracelulares, seguido de um lento descongelamento tecidual, para causar um maior distúrbio eletrolítico, já que essas duas situações resultam em efeito máximo de morte celular (PORCEL, 1993).

A escolha da fixação do autoenxerto com placa de compressão dinâmica e parafusos deveu-se ao fato de ser um método amplamente utilizado em medicina veterinária nas cirurgias de preservação do membro (LA RUE *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).

Para prevenir a formação de fratura ou falha no enxerto durante a fase inicial de incorporação, é crucial manter protegida e com uma fixação rígida a interface osso-enxerto (GOLDBERG & AKHAVAN, 2005). Essa foi outra preocupação tomada no experimento e motivo de escolha da fixação com placa de compressão dinâmica e parafusos. Dentre as vantagens verificadas com esse método, destacam-se sua estabilidade e a compressão nas interfaces proximais e distais (HENRY JR. & WADSWORTH, 1981; STEVENSON *et al.*, 1991; ALIEVI *et al.*, 2007), fatores fundamentais para que ocorra a incorporação. A técnica também permitiu que os animais deste estudo obtivessem um uso funcional precoce do membro, o que evitou as complicações advindas de sua não utilização (BRADEN & BRINKER, 1973).

Com relação aos dois casos em que houve a soltura da placa no fragmento proximal, provavelmente isso aconteceu pelo fato de os parafusos estarem mal fixados à cortical lateral, já que o formato triangular da tíbia em sua porção proximal pode dificultar a adequada “pega” dos parafusos no local, acarretando numa fixação monocortical. Apesar disso, o processo de incorporação não foi afetado.

A forma e o tempo de incorporação observado radiograficamente foram similares entre os grupos, mostrando que o nitrogênio líquido não altera ou retarda esse processo. TSUCHIYA *et al.* (2004) e TSUCHIYA *et al.* (2010), avaliando pacientes humanos com neoplasias ósseas tratadas com autoenxerto desvitalizado por nitrogênio líquido, verificaram sua incorporação em 6,7 meses e 7,3 meses, respectivamente, entretanto os autores utilizaram pacientes oncológicos recebendo quimioterapia, o que pode ter retardado o processo de incorporação.

A não ocorrência de complicações infecciosas nesse projeto provavelmente está relacionada com os cuidados de assepsia, profilaxia antimicrobiana e adequada síntese dos tecidos moles, já que PORGEL *et al.* (1993), utilizando nitrogênio líquido para tratamento de tumores orais, enfatizaram que a sutura dos tecidos moles e o uso de antibiótico profilaticamente são fundamentais, pois a desvitalização óssea pode facilmente ser contaminada e sofrer sequestro ósseo. Salienta-se, entretanto, que também existem complicações descritas quando de sua utilização em pacientes oncológicos, entre elas infecções profundas, fraturas, recorrências locais (TSUCHIYA

et al., 2004; RAHMAN *et al.*, 2009; TSUCHIYA *et al.*, 2010), não-união e colapso do enxerto (TSUCHIYA *et al.*, 2010).

A taxa de não-união (8,3%) encontrada nesse estudo foi inferior às encontradas por TSUCHIYA *et al.* (2010), 15,38%, utilizando nitrogênio líquido em pacientes oncológicos humanos e por ALIEVI *et al.* (2007) em cães, 20,83% e ORTIZ-CRUZ (1997) em humanos, 30%, que utilizaram aloimplantes. Com isso, é possível inferir que a desvitalização extracorpórea com nitrogênio líquido não afeta a incorporação do enxerto. A utilização de osso esponjoso em casos clínicos onde ocorre a não-união deve ser sempre considerada, já que estimula a consolidação por fornecer células com potencial para formação de novo osso (STEVENSON, 1998). Neste experimento foi optado por não o utilizar para que não influenciasse na análise da ação do nitrogênio líquido sobre o autoenxerto.

Assim como verificado por ALIEVI *et al.* (2007) e FERREIRA (2008), utilizando aloenxertos, houve dificuldade na diferenciação histológica entre o tecido receptor e o implantado. Isso pode ser justificado pelo adiantado processo de incorporação que os animais encontravam-se. O animal do GNL que evoluiu para não-união na interface proximal, apresentou restos necróticos e abundantes osteoclastos, o que pode ter justificado essa complicação.

6 CONCLUSÕES

Baseado nos resultados alcançados no presente estudo é possível concluir que o nitrogênio líquido é um método adequado de desvitalização extracorpórea de autoenxertos ósseos corticais, já que não interfere na taxa e no tempo de incorporação das interfaces.

Mesmo com os resultados promissores atingidos existe a necessidade de uma pesquisa sobre os ensaios biomecânicos de ossos desvitalizados em nitrogênio líquido, aplicabilidade clínica e também uma avaliação a longo prazo sobre o comportamento biológico desses enxertos.

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., 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.
- AMENDOLA, G.F. **Aspectos biomecânicos, bacteriológicos e micológicos de diáfises femorais caninas conservadas em glicerina a 98% ou mel.** 2007. 100f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2007.
- BÖHM, P.; SCHERER, M.A. Incorporation of devitalized autografts in dogs. **International Orthopaedics**, v. 21, p. 283-290, 1997.
- BÖHM, P.; SPRINGFELD, R.; SPRINGER, H. Re-implantation of autoclaved bone segments in musculoskeletal tumor surgery: clinical experience in 9 patients followed for 1.1-8.4 years and review of the literature. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 118, p. 57-65, 1998.
- 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, p314-323, 2007.
- 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.
- CHEN, W.M., CHEN, T.H., HUANG, C.K. *et al.* Treatment of malignant bone tumours by extracorporeally irradiated autograft-prosthetic composite arthroplasty. **Journal of Bone and Joint Surgery (Br)**, v.84-B, p. 1156-1161, 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.
- DENNY, H.R., BUTTERWORTH, S.J. **Cirurgia ortopédica em cães e gatos.** São Paulo: Roca, 4.ed., 2006.
- 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. **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) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

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

HAYASHI, K.; TSUCHIYA, H.; MINATO, H. *et al.* Histological examination of autoclaved bone removed 12 years after it was transplanted. **Journal of Orthopaedic Science**, v. 10, p. 425-429, 2005.

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.

JEON, D.; KIM, M.S.; CHO, W.H. *et al.* Reconstruction with pasteurized autograft for distal tibial tumor. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 128, n. 2, p. 159-165, 2007b.

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.

KHATTAK, M.J.; UMER, M.; RASHEED, H. *et al.* Autoclaved tumor bone for reconstruction: an alternative in developing countries. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n.447, p. 138-144, 2006.

LA RUE, 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. 195, n.12, 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 JM, EHRHART N, SANTONI BG, *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.

MANABE, J.; AHMED, A.R.; KAWAGUCHI, N *et al.* Pasteurized autologous bone graft in surgery for bone and soft tissue sarcoma. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n.419, p. 258-266, 2004.

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.

MORELLO, E.; VASCONI, E.; MARTANO, M. *et al.* Pasteurized tumoral autograft and adjuvant chemotherapy for the treatment of canine distal radial osteosarcoma: 13 cases. **Veterinary Surgery**, v. 32, p. 539-44, 2003.

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.

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

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.

RAHMAN, M. A., BASSIONY, A., SHALABY, H. Reimplantation of the resected tumour-bearing segment after recycling using liquid nitrogen for osteosarcoma **International Orthopaedics**, v. 33, p. 1365–1370, 2009.

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.

SAKAYAMA, K., KIDANI, T., FUJIBUCHI T. *et al.* Reconstruction surgery for patients with musculoskeletal tumor, using a pasteurized autogenous bone graft. **International Journal of Clinical Oncology**, v. 9, p. 167-173, 2004.

SAKAYAMA, K.; TSUCHIYA, H.; FUJIBUCHI, T. *et al.* Pathological findings of an autograft containing osteosarcoma treated by liquid nitrogen retrieved 2 years after implantation. **Journal of Orthopaedic Science**, v. 11, p. 655-656, 2006.

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.

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.

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., v.2, cap. 127, p. 2006-2017. São Paulo: Manole, 1998.

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.; SAKURAKICHI, K.; YAMASHIRO, T. *et al.* Bone transport with frozen devitalized bone: an experimental study using rabbits and a clinical application. **Journal of Orthopaedic Science**, v. 9, p. 619-624, 2004.

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.

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.

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

ANEXO A – Carta de aprovação da Comissão de Ética no uso de animais



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CARTA DE APROVAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

Título : Avaliação do auto-enxerto ósseo cortical desvitalizado extracorporeamente com nitrogênio líquido – estudo experimental em tíbia de ovelhas

Nº no Sistema Pesquisa: 18353

Pesquisador (es)

<u>NOME</u>	<u>PARTICIPAÇÃO</u>
MARCELO MELLER ALIEVI	PESQUISADOR RESPONSÁVEL
CARLOS AFONSO DE CASTRO BECK	PESQUISADOR
DAVID DRIEMEIER	PESQUISADOR
LANUCHA FIDELIS DA LUZ MOURA	PESQUISADOR
LUCIANA MACHADO DA SILVA	PESQUISADOR
LETÍCIA GUTIERREZ DE GUTIERREZ	PESQUISADOR
THADEU MOURÃO PINTO	PESQUISADOR
VERONICA NORIEGA TORRES	PESQUISADOR
RENATO BARBOSA SILVA	PESQUISADOR
PAULO BARROS DE ALBURQUERQUE	PESQUISADOR

O mesmo foi aprovado 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, 1º de julho de 2010

Flávio Antônio Pacheco de Araújo
Flávio Antônio Pacheco de Araújo
Presidente da CEUA/UFRGS