

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**IMPLANTE ÓSSEO ALÓGENO LIOFILIZADO E
ESTERILIZADO POR IRRADIAÇÃO GAMA UTILIZADO
COMO ESPAÇADOR NO AVANÇO DA TUBEROSIDADE
TIBIAL MODIFICADA PARA TRATAMENTO DA DOENÇA DE
LIGAMENTO CRUZADO CRANIAL EM CÃES.**

Gláucia de Oliveira Morato

Médica Veterinária

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**IMPLANTE ÓSSEO ALÓGENO LIOFILIZADO E
ESTERILIZADO POR IRRADIAÇÃO GAMA UTILIZADO
COMO ESPAÇADOR NO AVANÇO DA TUBEROSIDADE
TIBIAL MODIFICADA PARA TRATAMENTO DA DOENÇA DE
LIGAMENTO CRUZADO CRANIAL EM CÃES.**

Gláucia de Oliveira Morato

Orientador: Prof. Dr. João Guilherme Padilha Filho

Coorientador: Prof. Dr. Luis Gustavo Gosuen Gonçalves Dias

**Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias –
Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como
parte das exigências para a obtenção
do título de Doutor em Cirurgia
Veterinária.**

2017

M831i Morato, Gláucia de Oliveira
Implante ósseo alógeno liofilizado e esterilizado por irradiação gama utilizado como espaçador no avanço da tuberosidade tibial modificada para tratamento da doença de ligamento cruzado cranial em cães / Gláucia de Oliveira Morato. -- Jaboticabal, 2017
x, 54 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017

Orientador: João Guilherme Padilha Filho

Banca examinadora: Paola Castro Moraes, Fabrício Singaretti de Oliveira, Gustavo Garkalns de Souza Oliveira, Elói dos Santos Portugal

Bibliografia

1. Claudicação. 2. Doença Articular. 3. Banco de ossos. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.71:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

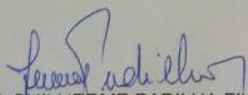
TÍTULO DA TESE: IMPLANTE ÓSSEO ALÓGENO LIOFILIZADO E ESTERILIZADO POR IRRADIAÇÃO GAMA UTILIZADO COMO ESPAÇADOR NO AVANÇO DA TUBEROSIDADE TIBIAL MODIFICADA PARA TRATAMENTO DA DOENÇA DE LIGAMENTO CRUZADO CRANIAL EM CÃES

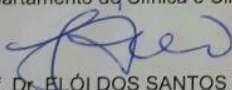
AUTORA: GLÁUCIA DE OLIVEIRA MORATO

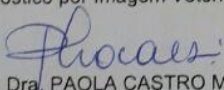
ORIENTADOR: JOÃO GUILHERME PADILHA FILHO

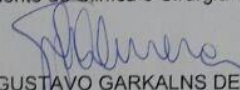
COORIENTADOR: LUIS GUSTAVO GOSUEN GONÇALVES DIAS

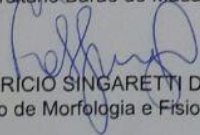
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JOÃO GUILHERME PADILHA FILHO
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. ELÓI DOS SANTOS PORTUGAL
Diagnóstico por Imagem Veterinário / IFSULDEMINAS / Muzambinho/MG


Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. GUSTAVO GARKALNS DE SOUZA OLIVEIRA
Centro Universitário Barão de Mauá / Ribeirão Preto/SP


Prof. Dr. FABRÍCIO SINGARETTI DE OLIVEIRA
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 10 de julho de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GLÁUCIA DE OLIVEIRA MORATO - nascida em 7 de setembro de 1984, em Piumhi-MG. Médica Veterinária formada pela Universidade Federal de Viçosa - MG, em janeiro de 2009. Realizou residência em Clínica Cirúrgica e Anestesiologia de Pequenos Animais de 2009 a 2011 no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Universidade Estadual Paulista –Unesp – Câmpus Jaboticabal. Nesta mesma instituição, obteve o título de Mestre em Cirurgia Veterinária pelo Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária com pesquisa intitulada “Osso esponjoso liofilizado de cão utilizado como enxerto puro e associado a plasma rico em plaquetas ou medula óssea em falhas ósseas induzidas em coelhos – estudo experimental”, orientada pelo Prof. Dr. João Guilherme Padilha Filho. Em março de 2013 ingressou no Doutorado pelo Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária da Universidade Estadual Paulista – Unesp – Câmpus Jaboticabal, onde atua no Setor de Cirurgia e Neurologia de Pequenos Animais e desenvolve diversos projetos de pesquisa.

“Que ninguém se engane,
só se consegue a simplicidade
através de muito trabalho.”

Clarice Lispector

Dedico este trabalho aos meus pais,

Que desde minha existência, colocam seus interesses e vontades em segundo plano em prol do minha felicidade e sucesso profissional. Esta conquista é do Sr. e Sra. Morato !

AGRADECIMENTOS

- Ao Artur Gouveia Rocha, que foi meu suporte e minha motivação na realização de TODAS as etapas desta pesquisa. Obrigada pelo apoio incondicional, pela atenção e boa vontade na resolução de “pepinos” encontrados durante toda a coleta de dados. Obrigada por possibilitar de forma profissional o acesso à rotina hospitalar do Hospital Escola Unicastelo – Descalvado, importantíssimo para compor o número de pacientes necessários para realização deste trabalho.
- Aos meus pais e meu irmão, que me deram força durante toda minha jornada em Jaboticabal, contribuindo de forma indireta, e algumas vezes direta, na realização dos meus projetos e pesquisas. A força que vocês me transmitiram ajudou na minha progressão e na superação de todos os obstáculos encontrados. Amo muito vocês!
- A Denise Chung, que tem como segundo nome a prontidão em ajudar! Obrigada sempre Denise!
- A República Misto Quente e Casa da Bia por fornecer meus “almoços” e apoio emocional, principalmente nas terapias com Dr. Xavante, muito úteis para meu equilíbrio mental!
- Ao Professor João Guilherme Padilha Filho, meu orientador, que é uma inspiração na arte da cirurgia. Obrigada pelos seus ensinamentos, pelas boas conversas e pela confiança, que permitiram meu amadurecimento profissional,
- Ao Professor Luis Gustavo Gosuen Gonçalves Dias, por se mostrar disponível em se tornar coorientador nesta pesquisa e por toda ajuda durante os processos burocráticos principalmente! Obrigada!
- À EMBRARAD, que realizou gratuitamente a esterilização dos enxertos ósseos utilizados nesta pesquisa,
- Ao CNPq e CAPES, pela bolsa de doutorado, sem a qual seria impossível a realização desta pesquisa,

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 DOENÇA DO LIGAMENTO CRUZADO CRANIAL	4
2.1.1 Considerações Gerais	4
2.1.2 Apresentação clínica e diagnóstico	5
2.1.3 Tratamento Clínico	6
2.1.4 Tratamento Cirúrgico	6
2.2 SUBSTITUTOS ÓSSEOS	9
2.2.1 Funções	9
2.2.2 Coleta dos Enxertos	11
2.2.3 Liofilização	13
3. OBJETIVOS	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 OBTENÇÃO DO IMPLANTE ÓSSEO CÓRTICO- ESPONJOSO DE CÃO	16
4.2 PACIENTES	19
4.2.1 Avaliações pré-operatórias e diagnóstico	19
4.2.2 Critérios de inclusão dos pacientes no estudo	19
4.3 PROCEDIMENTOS PRÉ-OPERATÓRIOS	19
4.3.1 Planejamento cirúrgico	20
4.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	23
4.4.1 Avanço da tuberosidade tibial	23
4.4.2 Artrotomia	26

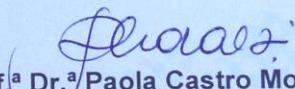
4.5 RECOMENDAÇÕES PÓS-OPERATÓRIAS.....	26
4.6 AVALIAÇÕES PÓS- OPERATÓRIAS.....	27
4.6.1 Avaliação Clínica.....	27
4.6.2 Avaliação radiográfica	27
4.6.3 Análise dos dados	28
5. RESULTADOS	29
5.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA	31
5.1.1 Ferida cirúrgica.....	31
5.1.2 Avaliação da locomoção	32
5.2 AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA	33
6. DISCUSSÃO	39
7. CONCLUSÃO.....	47
8. REFERÊNCIAS.....	48

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 07401/14 do trabalho de pesquisa intitulado **“Avaliação do osso córtico-esponjoso alógeno liofilizado canino utilizado como espaçador na TTA modificada realizada em cães com ruptura de ligamento cruzado cranial – Estudo clínico e radiográfico”**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. João Guilherme Padilha Filho está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 08 de maio de 2014.

Jaboticabal, 08 de maio de 2014.


Prof.^a Dr.^a Paola Castro Moraes
Coordenadora - CEUA

LISTA DE ABREVIações

atm: atmosfera

cm: centímetros

kg: kilogramas

KGy: kilo grey

mm: milímetros

MPD: membro pélvico direito

MPE: membro pélvico esquerdo

PO: pós-operatório imediato

TPLO: Osteotomia Niveladora do Platô Tibial

LCCr: Ligamento cruzado cranial

RLCC: Ruptura de ligamento cruzado cranial

TTA: Avanço da tuberosidade tibial

TTAm: Avanço da tuberosidade tibial modificada

UNESP: Universidade Estadual Paulista

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação de pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico da ruptura do ligamento cruzado cranial pela técnica do avanço da tuberosidade tibial modificada utilizando cage ósseo.....	29
Tabela 2: Resumo dos resultados referentes transoperatório da TTA.....	31
Tabela 3: Comparações múltiplas das frequências dos escores de claudicação dentro dos momentos pré-operatório, 30, 60, 90 e 120 dias pós-operatórios seguida da mediana e valor máximo e mínimo observado em cada momento.	33
Tabela 4: Comparações múltiplas dos escores referentes a união óssea avaliada radiograficamente nos diferentes momentos.....	34

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Perfil de cães doadores de ossos.....	16
Quadro 2: Escores radiográficos referentes a união óssea segundo John et al. (1996).....	28

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Imagem fotográfica de pelve de cão demonstrando as osteotomias para coleta de cunha óssea para utilização como espaçador na TTA modificada. Após enxertia, as medidas “a” e “b” da cunha corresponderão, respectivamente ao avanço da tuberosidade e ao comprimento da osteotomia tibial. Fonte: Arquivo pessoal (2013).....17
- Figura 2: Implantes ósseos caninos córtico-esponjosos submetidos ao processo de liofilização e esterilização por meio de irradiação gama. Notar formato de cunha com larguras variadas, da esquerda para a direita: 3, 6, 9, e 12 mm. Observar ainda a ambarização dos frascos, antes translúcidos, ocasionada pela irradiação gama.: Arquivo pessoal (2014).18
- Figura 3: Método da tangente comum aplicado para cálculo do avanço da tuberosidade tibial modificada. Projeção mediolateral de joelho de cão com ruptura do ligamento cruzado cranial. Da esquerda para a direita, inicialmente, círculos são sobrepostos às superfícies do fêmur e tíbia. O centro destes círculos é ligado, formando uma reta (azul). Perpendicular a esta reta é traçada a reta tangente comum (TG), reta amarela, entre a superfície articular do fêmur e da tíbia. Para identificar o avanço da tuberosidade tibial, uma reta (vermelha) é traçada tangente à patela e perpendicular à TG. A distância (A) entre a crista tibial e esta reta, é a medida em milímetros que deve assumida como avanço necessário para a tuberosidade tibial na TTAm. Fonte: Arquivo pessoal (2014).....21
- Figura 4: Exposição de face medial da tíbia de membro pélvico direito de cão preparado para cirurgia de TTA modificada. Notar bandagem medial da tíbia. Fonte: Arquivo pessoal (2014).22
- Figura 5: Imagem de membro pélvico esquerdo de cão submetido avanço da tuberosidade tibial modificada. Observar a exposição da face medial da tíbia (A) para realização de osteotomia (B). Em C, notar linha de osteotomia finalizada, mantendo porção distal da tuberosidade tibial íntegra. A seta amarela indica perfuração feita previamente à osteotomia. Em D, a tuberosidade sendo afastada em seguida, preenchimento do gap implante ósseo córtico-esponjoso alógeno liofilizado (seta verde, E e F). Fonte: Arquivo Pessoal (2014).24
- Figura 6: TTAm (cont.) Fixação da crista tibial e enxerto ósseo córtico-esponjoso por meio de parafusos de titânio aplicados em sentido craniocaudal. Fonte: Arquivo Pessoal (2014).25
- Figura 7: Membro pélvico esquerdo de cão sem raça definida, 30 (foto da esquerda) e 60 dias (foto da direita) pós-operatórios. Notar alteração cutânea no foco cirúrgico

aos 30 dias, com presença de fístula no foco cirúrgico. Aos 60 dias, após terapia antimicrobiana é possível ver remissão dos sinais. Fonte: Arquivo Pessoal (2014). 32

Figura 8: Imagens radiográficas de joelho direito de dois pacientes (A-E e A'-E') submetidos a TTAm com uso de osso córtico-esponjoso como espaçador e fixação com parafusos de titânio. Notar a evolução da união óssea entre implante ósseo e sítio receptor do momento pós-operatório imediato (A, A'), aos 30 (B, B'), 60 (C, C'), 90 (D, D') e 120 dias (E, E') após o tratamento. Fonte: Arquivo Pessoal (2014).....35

Figura 9: Imagens radiográficas de joelho esquerdo de dois pacientes (A-E e A'-E') submetidos a TTAm com uso de osso córtico-esponjoso como espaçador e fixação com parafusos de titânio. Notar a evolução da união óssea entre implante ósseo e sítio receptor do momento pós-operatório imediato (A, A'), aos 30 (B, B'), 60 (C, C'), 90 (D, D') e 120 dias (E, E') após o tratamento. Fonte: Arquivo Pessoal (2014).....36

Figura 10: Evolução da consolidação óssea em tíbia esquerda de cão submetido à TTAm. Notar a fratura da porção distal da tíbia aos 30 dias e aos 60, 90 e 120 dias progressão na cicatrização óssea. PO: pós-operatório imediato; d: dias. Fonte: Arquivo Pessoal (2014).....37

Figura 11: Imagens radiográficas de joelho esquerdo de cão submetido a TTAm com uso de implante ósseo córtico-esponjoso como espaçador e fixação com parafusos de titânio. Em B, 30^o dias após a cirurgia, notar lise e início de reabsorção do osso implantado decorrente de infecção do foco cirúrgico. Em C (60 dias), após terapia antimicrobiana oral, já é possível verificar união óssea entre implante e tecido adjacente. e em D (120 dias), união completa, sem distinção entre implante e osso adjacente. Fonte: Arquivo Pessoal (2014).38

IMPLANTE ÓSSEO ALÓGENO LIOFILIZADO E ESTERILIZADO POR IRRADIAÇÃO GAMA UTILIZADO COMO ESPAÇADOR NO AVANÇO DA TUBEROSIDADE TIBIAL MODIFICADA PARA TRATAMENTO DA DOENÇA DE LIGAMENTO CRUZADO CRANIAL EM CÃES.

RESUMO- O presente estudo teve como objetivo avaliar, clínica e radiograficamente a utilização de cunha de osso alógeno córtico-esponjoso liofilizada e esterilizada em raio gama, obtida de banco de ossos, implantada como espaçador na TTA modificada em 16 joelhos de 15 cães com diagnóstico clínico de doença do ligamento cruzado cranial. Os pacientes foram submetidos a radiografias e avaliação da locomoção previamente ao procedimento cirúrgico. No pós-operatório, as avaliações foram realizadas imediatamente após a cirurgia e aos 30, 60, 90 e 120 dias. A ferida cirúrgica foi avaliada quanto a sinais de infecção e rejeição do implante ósseo. Locomoção foi graduada em escores 0-5, sendo 0: paciente clinicamente saudável e 5: impotência funcional do membro. As interfaces corpo da tíbia-implanteósseo-crista tibial foram avaliadas radiograficamente em escores de 0-3 cada interface, sendo 0: nenhum contato entre implante e osso adjacente e 3 ponte óssea em toda extensão da interface. Os pacientes apresentaram boa recuperação clínica e radiográfica. A utilização dos espaçadores ósseos para TTAm oriundos de banco de ossos apresentou praticidade e comodidade em termos de armazenamento e transporte dos ossos. O espaçador ósseo liofilizado permitiu execução rápida e satisfatória da TTAm, apresentando resistência à perfuração e fixação com parafusos em 87,5 % dos casos (14, n=16) e tempo cirúrgico médio de 45,9 minutos. Não se observou reações imunogênicas com consequências clínicas em 93,7% dos casos. Um paciente (n=16) apresentou infecção do foco cirúrgico, com remissão dos sinais após terapia antimicrobiana. Foi possível verificar recuperação funcional do membro em todos os pacientes, sendo observado aos 120 dias, maior número de pacientes clinicamente saudáveis em comparação aqueles com claudicação ($p \leq 0,05$). Em todos os pacientes, foi possível verificar incorporação do implante ósseo à tíbia. A união óssea ocorreu de forma progressiva, sendo os estágios de união óssea observados nas radiografias aos 60, 90 e 120 dias significativamente maiores ($p < 0,05$) que aqueles observados aos 30 dias e pós imediato. Com base nos dados desta pesquisa foi possível concluir que o osso liofilizado apresenta baixa imunogenicidade, propriedades osteocondutoras e osteoindutoras quando utilizado como espaçador na TTAm. Este espaçador mantém o avanço da tuberosidade tibial adequadamente, permitindo recuperação clínica dos pacientes enquanto o *gap* na tíbia é preenchido com osso neoformado.

Palavras-chave: claudicação, doença articular, banco de ossos.

FREEZE-DRIED BONE ALLOGRAFT STERILIZED BY GAMMA-RADIATION AS SPACER DEVICE FOR NOVEL TIBIAL TUBEROSITY ADVANCEMENT IN CRANIAL CRUCIATE LIGAMENT DISEASE IN DOGS.

ABSTRACT- This study proposed to use wedge of lyophilized cortico-cancellous bone and sterilized by gamma ray, obtained from bone bank, as a spacer device in TTA modified in 16 knees of 15 dogs with cranial cruciate ligament disease. Animals were submitted to radiographic and gait assessments preoperatively, early postoperatively and following 30, 60, 90 and 120 days. The surgical wound was evaluated for signs of infection and rejection of the bone implant. Locomotion was graded 0-5, with 0: clinically healthy patient and 5: limb functional impotence. As tibial-tibial-implant-tibial crest interfaces were evaluated radiographically in scores of 0-3 each interface, being 0: no contact between implant and adjacent bone and 3 bone bridge throughout the interface. All animals exhibited good clinical outcome.. The use of bone grafts from bone bank was practical and convenient in terms of grafts storage and transportation. Freeze-dried bone graft allowed rapid and satisfactory execution of modified TTA, presenting resistance to drilling and screw fixation in 87.5% of cases (14, n = 16) and mean time of procedures 45.9 minutes. Immunogenic responses with clinical consequences wasn't observed in 93.7% of cases. One patient (n = 16) presented infection of surgical focus, with remission of signs after antibiotic therapy. It was possible to verify functional recovery of the limb in all patients, being observed at 120 days, more clinically healthy patients in comparison with those claudication ($p \leq 0.05$). In all patients, we found the incorporation of the graft to the tibia. Bone union occurred gradually, with the bone union stages observed in radiographs at 60, 90 and 120 days significantly higher ($p < 0.05$) than those observed at 30 days and immediately after surgery. Based on the data of this research it was possible to conclude that the lyophilized bone presents low immunogenicity, osteoconductive and osteoinductive properties when used as a spacer in the TTAm. This spacer maintains the advancement of the tibial tuberosity adequately, allowing clinical recovery of the patients while the *gap* in the tibia is filled with neofomed bone.

Keywords: lameness, joint disease, bone bank.

1. INTRODUÇÃO

A deficiência ou doença do ligamento cruzado cranial é a condição mais comum que afeta o joelho canino, representando a maior causa de claudicação do membro pélvico e doença articular degenerativa desta articulação (DENNY; BUTTERWORTH, 2006).

Diversos procedimentos cirúrgicos foram desenvolvidos ao longo dos anos para o tratamento desta afecção (KOWALESKI; BOUDRIEAU; POZZI, 2012). Entretanto, os mais recentes têm se fundamentado na biomecânica do joelho e na sua estabilização, consistindo-se basicamente de osteotomias corretivas (BODRIEAU, 2009)

O avanço da tuberosidade tibial (TTA) para tratamento do joelho com ligamento cruzado cranial deficiente em cães foi introduzido no ano de 2002 e vem sendo utilizada com excelentes resultados, sendo observado retorno funcional do membro em curto período pós-operatório (MONTAVON; DAMUR; TEPIC, 2002; LAFAVER et al., 2007). A articulação do joelho é estabilizada durante o apoio de peso em consequência da neutralização do impulso tibial cranial. A neutralização é alcançada por meio da osteotomia e avanço da tuberosidade da tíbia que posiciona o ligamento patelar mais cranialmente, perpendicular à linha do platô tibial (TEPIC; DAMUR; MONTAVON, 2002).

A crista da tíbia osteotomizada é mantida sob avanço cranial mediante um espaçador de titânio, denominado *cage*, parafusos, placa e “garfo” fixado a placa, todos implantes de titânio (MONTAVON; DAMUR; TEPIC, 2002).

Modificações da TTA foram realizadas, mantendo-se resultados comparáveis à técnica original (MEDEIROS, 2011; ROCHA, 2012; ROCHA et al., 2012; (MEDEIROS et al., 2016). Medeiros (2011) e Rocha (2012) utilizaram biomateriais como espaçadores em substituição ao *cage* de titânio e, utilizando o mesmo princípio da técnica de Maquet (1976), mantiveram a porção distal da crista da tíbia osteotomizada unida a diáfise tibial, fixando a tuberosidade com parafusos em sentido craniocaudal. De acordo com os autores, a técnica de Avanço da Tuberosidade Tibial modificada (TTAm) pode ser utilizada para o tratamento da

RLCCr em cães de qualquer tamanho, apresentando menor custo de implantes e sendo mais versátil que o TTA convencional.

A utilização de materiais bioativos em detrimento do cage de titânio tem ganhado destaque. Rocha et al. (2012) e Lima (2012) utilizaram o enxerto autógeno colhido em formato de cunha da crista ilíaca como espaçador, fixando com parafusos crânio-caudais a crista ao enxerto e este à diáfise da tíbia. A utilização do osso autógeno, consagrado como padrão ouro de enxertia, além de apresentar custos reduzidos mostrou-se procedimento de excelência na reparação óssea e recuperação precoce da funcionalidade do membro com LCCr deficiente. Contudo, a necessidade de um segundo procedimento cirúrgico, aumento do tempo cirúrgico e a morbidade pós-operatória do sítio de coleta do enxerto (ROCHA et al. 2012; LIMA, 2012), estimula pesquisadores a buscarem alternativa que possa se assemelhar a excelência na consolidação do enxerto autógeno, porém que não gere morbidade adicional ao paciente.

Os enxertos e implantes diferem entre si de acordo com sua estrutura e composição podendo basicamente prover um ou mais dos componentes essenciais como matriz óssea osteocondutora; proteínas osteoindutoras e células vivas osteogênicas (DINOPOULOS; DIMITRIOU; GIANNOUDIS, 2012).

Embora o enxerto ósseo autógeno mantenha-se como “padrão ouro” para estimular a reparação óssea, a dor e recuperação pós-operatórias associadas ao sítio de coleta, necessidade de intervenção cirúrgica adicional e fornecimento muitas vezes insuficiente de enxerto associada a esta técnica, gera a busca de diferentes estratégias e substitutos ósseos. Uma alternativa utilizada em detrimento ao enxerto autógeno é a enxertia alógena, ou seja, oriunda de outros indivíduos, porém da mesma espécie (FINKEMEIER, 2002).

Tecido ósseo alógenos e xenógenos podem ser armazenados em bancos de ossos, tornando-se facilmente disponíveis durante o ato cirúrgico em grandes quantidades. Ademais, não causam danos às estruturas ósseas do hospedeiro não havendo necessidade de cuidados pós-operatórios relacionados à coleta do enxerto (FINKEMEIER, 2002).

Para formação de banco de ossos é necessário que este tecido seja devidamente processado e armazenado (ROOS; CAMISA JÚNIOR; MICHELIN,

2000). A liofilização tem se mostrado cada vez mais um método eficiente na conservação de tecidos para uso a longo prazo (GALIA et al., 2005). Trata-se de um método de preservação por desidratação causando mínima alteração bioquímica do tecido (BOSS, 2004).

O osso liofilizado é rotineiramente armazenado em bancos de ossos em medicina e utilizado como implante ósseo. Sua aplicação é feita tanto de maneira alógena como xenógena, tendo em vista a semelhança físico-química apresentada por estes ossos de diferentes origens após a liofilização (GALIA et al., 2009; MORATO, 2013). Após o processamento, o osso esponjoso mantém propriedades ostecondutoras e osteoindutoras (DINOPOULOS; DIMITRIOU; GIANNOUDIS, 2012).

Morato (2013) realizando estudos pré-clínicos em coelhos, observou que o osso esponjoso liofilizado canino atuou como bom preenchedor de falhas ósseas guiando o processo de regeneração. Observou-se ainda baixa antigenicidade, osteointegração do implante ao osso receptor e propriedades de osteocondução e osteoindução.

Sendo assim, este estudo propõe a utilização de uma cunha óssea alógeno córtico-esponjosa liofilizada, como espaçador na TTA modificada em cães com doença do ligamento cruzado cranial. Pretende-se avaliar a exequibilidade da técnica quando da utilização do implante alógeno, bem como reações locais ao implante após a cirurgia. Adicionalmente, pretende-se evidenciar radiograficamente os possíveis benefícios à consolidação óssea decorrentes da utilização do osso liofilizado como espaçador.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DOENÇA DO LIGAMENTO CRUZADO CRANIAL

2.1.1 Considerações Gerais

O ligamento cruzado cranial (LCCr) possui três funções biomecânicas básicas, sendo estas, restringir a rotação medial da tíbia, evitar o deslocamento cranial da tíbia em relação ao fêmur e impedir a hiperextensão do joelho (PIERMATEI; FLO; DeCAMP, 2009).

O termo doença do ligamento cruzado cranial (DLCCr) é utilizado para definir uma variedade de desordens que podem afetar esta estrutura anatômica resultando em falha de sua função (KOWALESKI; BOUDRIEAU; POZZI, 2012). A exata etiopatogenia da DLCCr é pouco entendida e controversa, sendo condição multifatorial que culmina na completa “falência do órgão”, ou seja, da articulação do joelho (COOK, 2010; GRIFFON, 2010).

Fatores que têm sido implicados como causadores da DLCCr e conseqüente ruptura do ligamento incluem a conformação anormal do membro, obesidade, falta de exercício, angulação excessiva do platô tibial; entretanto, nenhuma destes fatores são comprovadamente estabelecidos como causa direta da degeneração e ruptura do ligamento cruzado cranial (KOWALESKI; BOUDRIEAU; POZZI, 2012).

Durante algum tempo, a excessiva inclinação do platô tibial foi reportada em cães com RLCC diferentemente do que se observava em cães hípidos. Contudo investigações adicionais falharam em atribuir a esta conformação, causa direta da doença do ligamento (WILKE et al., 2002; REIF; PROBST, 2003)

Estudos têm revelado cargas as quais o joelho é submetido gerando a contração da musculatura caudal da coxa o relaxamento do quadríceps, que atua naturalmente como mecanismo de proteção ao estiramento excessivo do LCCr. Desta forma a obesidade e uma condição muscular alterada poderiam resultar em injúria repetitiva ao LCCr levando a falha mecânica, stress e ruptura (KOWALESKI; BOUDRIEAU; POZZI, 2012).

A RLLC afeta ampla variedade de raças. De acordo com Hoffman et al. (2006), as raças mais acometidas são o Labrador (29 %) e cães sem raça definida (23 %). Contudo outros estudos demonstram a prevalência em diversas raças, tais como, Rottweiler, Staffordshire Terrier, Akita, Mastiff Napolitano, São Bernardo dentre outros (KOWALESKI; BOUDRIEU; POZZI, 2012).

Foi observada maior prevalência da RLCC em fêmeas caninas do que em machos e ainda maior incidência em pacientes castrados (DUVAL et al., 1999).

Em muitos casos, a RLLC estará presente em ambos os joelhos. Muito embora o quadro clínico possa se manifestar em um membro inicialmente, é comum o acometimento do joelho contralateral (PIERMATEI; FLO; DeCAMP, 2009). Buote Fusco e Radasch (2009), em estudo realizado em pacientes da raça Labrador, demonstrou que o tempo médio para ruptura do LCCr contralateral ao ligamento já rompido é de cerca de 5,5 meses. Ainda, outros autores demonstram que 37% dos pacientes apresentarão RLCC contralateral após período médio de 17 meses após o diagnóstico da RLLC unilateral (KOWALESKI; BOUDRIEU; POZZI, 2012).

2.1.2 Apresentação clínica e diagnóstico

O exame físico pode revelar dor à manipulação do joelho, flexão e extensão, graus variáveis de crepitação dependentes do estágio da doença articular degenerativa ou de lesão de menisco concomitante (KOWALESKI; BOUDRIEU; POZZI, 2012).

Embora a dor seja notada prematuramente com claudicação sem apoio de peso, a maioria dos pacientes começará a utilizar o membro dentro de duas a três semanas e aparentemente podem melhorar por alguns meses até que o declínio gradual ou súbito do membro seja notado (PIERMATEI; FLO; DeCAMP, 2009).

Os testes clínicos de compressão tibial e movimento de gaveta cranial, nos quais é feito o diagnóstico de instabilidade do joelho, são o esteio para o diagnóstico da RLCC (KOWALESKI; BOUDRIEU; POZZI, 2012).

O diagnóstico de RLLC baseia-se no exame físico do paciente, ainda assim exame radiográfico deve ser realizado a fim de se verificar o deslocamento cranial

da tíbia em relação ao fêmur e o grau de doença articular degenerativa, sendo importante fator prognóstico (PIERMATEI; FLO; DeCAMP, 2009).

Um dos achados radiográficos precoces mais consistentes é a perda da radiopacidade da gordura infra-patelar na projeção médio-lateral. Este achado indica volume aumentado de líquido sinovial (efusão articular), alteração inicial quando da injúria articular (KOWALESKI; BOUDRIEU; POZZI, 2012).

2.1.3 Tratamento Clínico

Raças de pequeno porte com menos de 15 kg de peso corpóreo podem ser submetidas a tratamento conservativo que consiste na restrição de exercícios a curtas caminhadas na coleira e no uso de anti-inflamatórios (VASSEUR, 2007).

Se a claudicação persistir, a estabilização cirúrgica da articulação deve ser recomendada (DENNY; BUTTERWORTH, 2006). Esses pacientes aparentam função normal do membro pélvico acometido; entretanto, a instabilidade persiste e frequentemente se desenvolve doença articular degenerativa (KOWALESKI; BOUDRIEU; POZZI, 2012).

2.1.4 Tratamento Cirúrgico

Os tratamentos cirúrgicos são divididos em técnicas de reconstrução intracapsulares, extracapsulares e periarticulares ou osteotomias corretivas.

Métodos intracapsulares geralmente envolvem substituição anatômica do LCCr com enxertos autógenos, alógenos ou materiais sintéticos. Tais técnicas mimetizam a posição e a biologia original do LCCr sendo, contudo, relativamente invasivas. O material utilizado na substituição do ligamento pode esgarçar ou romper, configurando uma desvantagem do procedimento (PIERMATEI; FLO; DeCAMP, 2009).

Na reconstrução extracapsular o objetivo é estabilizar a articulação pelo aumento da tensão ou reforço dos tecidos retinaculares laterais (DENNY; BUTTERWORTH, 2006). Envolve a colocação de suturas fora da articulação ou

redirecionamento do ligamento colateral lateral. Reconstrução extracapsular com suturas são geralmente incorretamente referidas como suturas de imbricação. Numerosos padrões e combinações de origens e inserções de suturas têm sido descritos. A origem mais comumente usada na sutura extracapsular é a fabela lateral, e a inserção mais comum é a crista tibial (JOHNSON; HULSE, 2005).

As técnicas para tratamento da DLCC periarticulares e as osteotomias corretivas restauram a estabilidade através da mudança na anatomia local do joelho (DENNY; BUTTERWORTH, 2006).

Alguns exemplos dessas técnicas são o Avanço da Cabeça da Fíbula, a Osteotomia Niveladora do Platô Tibial (TPLO), a Osteotomia Tibial em Cunha (TWO), a Osteotomia Tibial Tripla (TTO) e o Avanço da Tuberosidade Tibial (TTA).

2.1.4.1 Avanço da Tuberosidade Tibial (TTA)

O avanço da tuberosidade da tibia, comumente referida pela sigla TTA, bem como a TPLO são técnicas que modificam a geometria da tibia em seu aspecto proximal de tal forma que restaura a estabilidade dinâmica do joelho, recuperando assim a funcionalidade do membro, prevenindo a deterioração do menisco medial e minimizando o desenvolvimento de doença articular degenerativa no joelho com LCCr deficiente (LAFEVER et al., 2007; BOUDRIEU, 2009).

Esta técnica foi inicialmente descrita em humanos por Maquet (1976) como um procedimento para diminuir a pressão femoropatelar e para reduzir o índice de osteoartrite do joelho e condromalácia da patela.

O avanço da tuberosidade tibial como tratamento da doença do ligamento cruzado cranial em pacientes da espécie canina foi introduzido por Montavon, Damur e Tepic em 2002.

A técnica foi baseada na análise do modelo mecânico das forças internas e externas atuantes no joelho. Esse modelo assume que forças atuantes na sustentação do peso pela articulação do joelho resultam em uma força total aproximadamente paralela ao ligamento patelar (GUERRERO, 2003; BOUDRIEU, 2006; HOFFMAN et al., 2006). O princípio biomecânico desse método consiste em neutralizar a força tibial cranial posicionando o tendão patelar perpendicular ao platô

tibial, pois se a angulação entre eles for mantida no máximo a 90°, quando o joelho está em extensão de 135°, não haverá força femorotibial cranial direta, resultando na ausência da subluxação cranial da tíbia, obtendo uma articulação funcional (BOUDRIEAU, 2006; TEPIC, 2006; MILLER et al., 2007). A TTA é um método relativamente simples de alterar a inserção do ligamento patelar, modificando assim a função do joelho. A dissecação cirúrgica é limitada à superfície medial da tíbia, com osteotomia similar à realizada na transposição da tuberosidade tibial para correção de luxação de patela, embora com osteotomia de um fragmento maior de osso (LAFEVER et al., 2007; KOWALESKI; BOUDRIEAU; POZZI, 2012).

É realizada a osteotomia da tuberosidade tibial, e usando-se o *cage*, que age como espaçador, a tuberosidade tibial é deslocada cranialmente, então se faz a estabilização desse segmento unindo sua porção distal novamente ao corpo da tíbia por meio de uma placa de titânio (BOUDRIEAU, 2006). A placa para estabilização, especialmente desenhada, é fina e feita de titânio puro, o que garante excelente biocompatibilidade, sendo fixada na tuberosidade tibial por um “garfo” que se encaixa na placa, e no corpo da tíbia por parafusos (LAFEVER et al., 2007).

Modificações desta técnica já foram realizadas, mantendo-se resultados satisfatórios em relação à técnica original (MEDEIROS, 2011; ROCHA, 2012; ROCHA et al., 2012). Medeiros (2011) e Rocha (2012) demonstraram, em estudo clínico em cães com RLCC, que o avanço da tuberosidade tibial pode ser realizado com menor quantidade de implantes, ou seja, apenas dois parafusos corticais posicionais em sentido craniocaudal na tíbia. Ademais, estes autores utilizaram biomateriais como espaçadores em substituição ao *cage* de titânio e, utilizando o mesmo princípio da técnica de Maquet (1976), mantiveram a porção distal da crista da tíbia unida a diáfise tibial, seja por tecido ósseo ou por perióstio.

A utilização de materiais bioativos em detrimento do *cage* de titânio tem ganhado destaque. Rocha et al. (2012) e Lima (2012) utilizaram o enxerto autógeno colhido da crista íliaca como espaçador, fixando com parafusos crânio-caudais a crista ao enxerto e este ao corpo da tíbia. A utilização do osso autógeno, consagrado como padrão ouro de enxertia, mostrou-se um procedimento de excelência na reparação óssea e recuperação precoce da funcionalidade do membro com LCCr

deficiente. A morbidade pós-operatória do sítio de coleta do enxerto deve ser considerada quando da utilização desta técnica (ROCHA et al. 2012; LIMA, 2012).

2.2 SUBSTITUTOS ÓSSEOS

Os substitutos ósseos são classificados de acordo com seu local de origem e composição. De acordo com Denny e Butterworth, (2006), podem ser obtidos do próprio indivíduo (autólogo/autógeno), de indivíduos da mesma espécie (homólogo/alógeno) ou ainda de indivíduos de espécies diferentes (heterólogo/xenógeno), sendo que os dois últimos devem passar por algum tipo de processamento para conservação e estocagem em banco de ossos previamente a implantação no hospedeiro.

Em relação à composição, tecidos ósseos esponjosos, corticais, córtico-esponjosos e osteocondrais, podem ser utilizados para enxertia. O tecido esponjoso consiste de tecido ósseo trabecular removido do interior de ossos longos na região metafisária, sendo mais comumente utilizado para preenchimento de falhas ósseas. Já o tecido cortical é composto por osso compacto, que promove principalmente suporte estrutural. O córtico-esponjoso é a associação dos dois anteriores, enquanto que o tecido osteocondral resulta da associação entre cartilagem articular e osso subcondral (MILLIS; MARTINEZ, 2007).

2.2.1 Funções

As características biológicas de cada substituto ósseo variam, fazendo que os mesmos apresentem diferentes propriedades de osteoindução, osteocondução, osteogênese e suporte estrutural (DINOPOULOS; DIMITRIOU; GIANNOUDIS, 2012).

A osteoindução é o processo pelo qual células tronco mesenquimais pluripotenciais e células osteoprogenitoras são induzidas a diferenciarem-se em osteoblastos, que então proliferam e produzem matriz mineralizada. Esta indução ocorre após exposição das células mesenquimais à matriz óssea e a várias moléculas incluindo a proteína óssea morfogênica (BMP) e outros fatores de

crescimento (CAVASSANI; MORAES; PADILHA FILHO, 2001; MILLIS; MARTINEZ, 2007; DINOPOULOS; DIMITRIOU; GIANNOUDIS, 2012).

A osteoindução está presente em maior intensidade em enxertos frescos. Após serem submetidos ao congelamento ou liofilização, os tecidos corticais alógenos ou xenógenos perdem a capacidade osteoindutora. No caso dos ossos esponjosos a capacidade osteoindutora também é reduzida pelo processamento, muito embora haja certa manutenção desta função (DINOPOULOS; DIMITRIOU; GIANNOUDIS, 2012).

Outra propriedade importante dos enxertos ósseos é a osteocondução, processo tridimensional de crescimento de capilares, tecidos perivasculares e células osteoprogenitoras do leito receptor para o interior do enxerto, o qual servirá de molde para o intracrescimento desses tecidos (GOLDBERG; STEVENSON, 1987; CORNELL; LANE, 1998; MARTINEZ; WALKER, 1999; FINKEMEIER, 2002). A osteocondução é dependente da arquitetura do tecido ósseo, sendo mais rápida em tecido esponjoso do que em tecido cortical, devido à maior porosidade do primeiro (CORNELL; LANE, 1998).

A osteogênese é a formação de osso novo por células do enxerto que sobreviveram à transferência do local doador para o leito receptor. Por resultar da transferência de células vivas, só ocorre em enxertos autógenos (MILLIS; MARTINEZ, 2007; DINOPOULOS; DIMITRIOU; GIANNOUDIS, 2012). Alguns estudos *in vitro* sugerem que 60% das células transplantadas, mantidas em solução salina à temperatura ambiente podem sobreviver até três horas após a coleta (MILLIS; MARTINEZ, 2007).

O osso esponjoso autógeno é mais osteogênico em comparação ao enxerto cortical autógeno. Embora os implantes preservados não possam produzir osso imediatamente devido à ausência de células vivas viáveis, tecidos ósseos frescos e preservados podem contribuir para regeneração óssea por meio da osteoindução e osteocondução (FINKEMEIER, 2002; MILLIS; MARTINEZ, 2007).

O suporte estrutural é outra propriedade que o substituto ósseo pode apresentar. É uma característica observada apenas nos enxertos corticais, autógenos ou não, os quais têm basicamente a função de prover suporte estrutural e osteocondução (WEIGEL, 1996; ZILLOTTO et al., 2003; MILLIS; MARTINEZ, 2007;

PADILHA FILHO; PENHA; SOUZA, 2008). Eles conferem primariamente sustentação mecânica, agindo como preenchedores de espaço ou escoras de sustentação de peso, juntamente com o dispositivo de fixação interna rígida que o fixa ao leito receptor (FINKEMEIER, 2002). Os aloimplantes corticais são excelentes meios de suporte mecânico, possuem potencial osteocondutor embora este seja maior em ossos esponjosos, porém, estimulam pouca resposta osteogênica por serem acelulares. A dificuldade encontrada frente ao uso desta técnica é a grande variação dos tamanhos dos esqueletos dos animais, o que reduz consideravelmente a possibilidade de se encontrar um doador que seja compatível com a conformação física do animal receptor (FINKEMEIER, 2002; DINOPOULOS; DIMITRIOU; GIANNOUDIS, 2012).

Osso esponjoso, tanto autógeno quanto alógeno, é bom preenchedor de lacunas e falhas ósseas (MORATO, 2013), contudo não proporciona substancial suporte estrutural imediato. Alguns autores afirmam que este tipo de estrutura pode fornecer algum suporte mecânico em relação à compressão (FINKEMEIER, 2002; DINOPOULOS; DIMITRIOU; GIANNOUDIS, 2012).

2.2.2 Coleta dos Enxertos

O enxerto ósseo esponjoso pode ser colhido da metáfise de qualquer osso longo e pode ser implantado de maneira autógena. Os sítios de coleta mais comuns incluem a crista ilíaca, úmero proximal e tibia proximal. Porém, esta técnica muitas vezes fornece quantidade insuficiente de material, além de aumentar o risco de infecções cirúrgicas, de dor pós-operatória e a ocorrência de transtornos durante o procedimento para reposicionamento do animal para coleta (SANTOS; RAHAL, 2004; DINOPOULOS; DIMITRIOU; GIANNOUDIS, 2012).

O osso cortical autógeno tem seu uso limitado, devido à dificuldade que se enfrenta em encontrar um local doador que não cause prejuízo pós-operatório ao paciente. Segmentos ósseos corticais autógenos podem ser coletados da ulna ou das costelas, por exemplo, sem maiores complicações. Ainda assim, permanecem os inconvenientes de um segundo procedimento cirúrgico, reposicionamento do

paciente, aumento do tempo de anestesia e dor e necessidade de cuidados pós-operatórios relacionados ao sítio de coleta (DENNY; BUTTERWORTH, 2006).

Quando se trata de implantes ósseos corticais e esponjosos alógenos ou xenógenos, sua coleta deve ser feita em animais jovens, porém, esqueleticamente maduros (linha de crescimento fechada) , livres de doenças neoplásicas ou infectocontagiosas. O doador pode ter sido submetido à eutanásia ou ter vindo a óbito desde que a coleta dos ossos seja realizada imediatamente (DENNY; BUTTERWORTH, 2006). Estes são armazenados em bancos de tecido ósseo para enxertia.

Bancos de ossos fornecem comodidade e praticidade ao cirurgião visto que possibilitam a rápida obtenção de fragmentos ósseos em grandes quantidades e formas variadas para serem utilizados como implantes ósseos no procedimento cirúrgico (ROOS; CAMISA JUNIOR; MICHELIN, 2000).

Os implantes obtidos em bancos de ossos devem ser processados e conservados de forma que possam ficar armazenados até o momento do procedimento cirúrgico no qual serão utilizados. Existem diversos métodos de conservação de ossos, tais como, glicerina a 98%, mel, congelamento, tintura de iodo a 2%, liofilização e esterilização em óxido de etileno e irradiação gama (ALIEVI, 2006).

Devido ao fato de tais ossos terem sido retirados de outros indivíduos para uso alógeno ou mesmo xenógeno, há o risco de transmissão de doenças e contaminação dos tecidos durante a manipulação. Sendo assim, quando da escolha do doador, há a necessidade de se seguir rigorosamente os critérios de inclusão para doação de ossos no tocante a ausência de doença infecciosa sistêmica ou neoplásica do doador, sendo também necessária a escolha de métodos confiáveis de conservação de tecidos visto que alguns deles não apresentam eficiência na eliminação de todos os tipos de micro-organismos, sobretudo de formas esporuladas (ALIEVI, 2006; ROOS; CAMISA JUNIOR; MICHELIN, 2000).

Tendo em vista que durante a estocagem dos ossos por longos períodos pode haver contaminação destes tecidos, é imperativa a realização de avaliações microbiológicas periódicas a fim de averiguar a integridade dos enxertos (FARRINGTON et al., 1998).

2.2.3 Liofilização

Para o procedimento cirúrgico de implantação de tecido ósseo é necessário que os mesmos previamente retirados do animal doador e preservados de uma forma adequada (PAPAS, 1968; ROOS; CAMISA JUNIOR; MICHELIN, 2000). Diferentes métodos de processamento e armazenamento de tecido ósseo têm sido propostos e intensamente estudados. Entre esses métodos está a liofilização, que permite o processamento, a esterilização e o armazenamento de tecido ósseo (FEOFILOFF; GARCIA, 1996).

A técnica de liofilização consiste basicamente da remoção de toda água da matéria alvo de conservação. Esta desidratação ocorre pelo fenômeno da sublimação, ou seja, passagem da água do estado sólido diretamente para o gasoso, sem passar pelo estado líquido. Inicialmente as amostras a serem liofilizadas devem ser congeladas para que a água nelas contida se solidifique, em seguida as amostras podem ser direcionadas ao equipamento denominado liofilizador, que mantém temperaturas e pressão baixas o suficiente para induzir a sublimação da água. Diversos protocolos que associam temperatura/pressão/tempo são encontrados na literatura, podendo haver variações dependendo do tecido a ser desidratado (ABD-KHORSAND; SABER-SAMANDARI; SABER-SAMANDARI, 2017; SILVA; DUARTE; BARROZO, 2017)

A liofilização é um método de preservação no qual ocorre mínima alteração bioquímica do tecido e preservação de sua estrutura celular, o que não ocorreria no processo de desidratação convencional por evaporação (CRENSHAW, 1991; BOSS, 2004; SILVA; DUARTE; BARROZO, 2017).

Por não se tratar de um processo estéril, o material liofilizado requer subsequente esterilização o que permite desta forma seu uso com segurança para posterior enxertia cirúrgica. A esterilização é realizada preferencialmente por irradiação gama ou autoclavagem (FEOFILOFF; GARCIA, 1996; HACHIYA et al., 1999; CORNU et al., 2000). Segundo alguns autores, tanto a liofilização como o processo de esterilização resultam em alterações biomecânicas e maior fragilidade do enxerto ósseo (STEVENSON, 1998, CORNU et al., 2000). Ainda assim, vale ressaltar que alguns autores afirmam que o processo conjunto de liofilização e

reidratação do osso não altera sua propriedade biomecânica de compressão (MACEDO et al., 1999), sendo necessários mais estudos a respeito.

A liofilização tem se mostrado cada vez mais um método eficiente na conservação de tecidos para uso em longo prazo (GALIA et al., 2005; VULCANI; MACORIS; PLEPIS, 2008). O osso liofilizado pode ser armazenado por um período de aproximadamente cinco anos (CRENSHAW, 1991), além disso, pode permanecer em temperatura ambiente (PAPAS, 1968; TOMFORD et al., 1983). Esses fatores facilitam sobremaneira o manuseio transoperatório, o envio do material para hospitais de diferentes localidades e sua estocagem, que pode ser feita em pacotes ou pequenos frascos de vidro bastando que sejam acondicionados em locais limpos e secos (OLIVEIRA et al., 2007).

O processo de liofilização óssea proporciona diminuição da antigenicidade do enxerto e conseqüentemente menor risco de rejeição pelo receptor. Adicionalmente, a liofilização, associada à esterilização, é considerada um dos processamentos de tecidos com menor risco de transmissão de doenças (KÜBLER et al., 1993), propriedade esta de suma importância tanto na medicina, quanto na veterinária.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar o osso esponjoso liofilizado como opção de material a ser utilizado como espaçador na TTA modificada para tratamento da doença do ligamento cruzado cranial em cães.

Os objetivos específicos foram:

- a) Avaliação trans-operatória da utilização do osso liofilizado como espaçador;
- b) Verificar aspectos clínicos e radiográficos inerentes ao enxerto quando aplicado com o espaçador na TTA modificada;
- c) Avaliação de aspectos clínicos quanto à deambulação e reações teciduais pós-operatórias;

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os protocolos desta pesquisa foram submetidos à avaliação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Câmpus Jaboticabal, tendo sido aprovados sob protocolo nº 07401/14.

4.1 OBTENÇÃO DO IMPLANTE ÓSSEO CÓRTICO- ESPONJOSO DE CÃO

Para produção do banco de ossos deste estudo, amostras de osso córtico-esponjoso foram coletadas das cristas ilíacas de cães de médio e grande porte, de raças variadas, submetidos à eutanásia por causas traumáticas e malformação estrutural (Quadro 1).

Quadro 1: Perfil de cães doadores de ossos.

Raça	Idade (anos)	Óbito
Sem raça definida	2	Atropelamento/Pneumotórax
Labrador Retriever	2	Atropelamento/Fratura e luxação grave de coluna
Boxer	1	Atropelamento/Fratura e luxação grave de coluna
Dogue alemão	6	Espondilomielopatia cervical caudal/ Eutanásia

Após o procedimento de eutanásia finalizado, iniciou-se o processo de coleta do implante ósseo.

Foi feita tricotomia da região da pelve do cão, antissepsia com clorexidina 2% e, em seguida acesso cirúrgico dorsal à asa do ílio. Utilizando-se serra oscilatória, fragmentos ósseos córtico-esponjosos foram coletados da asa do ílio, em formato de cunha conforme descrito por Rocha et al. (2012) e ilustrado na Figura 1. Foram coletadas três ou quatro cunhas de osso córtico-esponjoso bilateralmente com larguras variadas (3mm, 6 mm, 9 mm, 12 mm, 15 mm), equivalentes às larguras de cages de titânio utilizados na TTA convencional para manter o avanço da tuberosidade tibial.

Periósteo, tecido fibroso e muscular aderidos ao osso foram removidos com a utilização de bisturi. Em seguida, foram feitas lavagens em água corrente com auxílio de uma lavadora de alta pressão¹, a fim de eliminar toda medula óssea contida no osso esponjoso.

Sequencialmente, as amostras ósseas foram submetidas ao processo de desengorduramento. Este processo consistiu de sucessivos banhos químicos nos quais as cunhas ósseas foram submergidas em solução homogênea de etanol e clorofórmio (proporção 1:1), durante quatro horas cada banho a temperatura de 4º Celsius. Durante a submersão, há formação de sobrenadante de gordura, visto que esta possui densidade menor que a solução de etanol e clorofórmio. Após o período de 4 horas, as amostras foram novamente lavadas em água sob alta pressão para remoção de gordura remanescente. Os banhos de desengorduramento foram realizados até que cessasse a formação de sobrenadante na solução.



Figura 1: Imagem fotográfica de pelve de cão demonstrando as osteotomias para coleta de cunha óssea para utilização como espaçador na TTA modificada. Após enxertia, as medidas “a” e “b” da cunha corresponderão, respectivamente ao avanço da tuberosidade e ao comprimento da osteotomia tibial. Fonte: Arquivo pessoal (2013).

Os implantes ósseos foram então submetidos ao processo de liofilização junto ao Departamento de Tecnologia de Produtos de Origem Animal da UNESP -

¹ Lavadora de Alta Pressão Doméstica Intech Machine /HL1600 - 1450 Libras

Jaboticabal em um liofilizador industrial². Para tanto, as amostras foram inicialmente congeladas em *freezer* convencional (-18° Celcius). Em seguida, colocadas em bandejas dentro do liofilizador, que inicia o processo com redução da temperatura até -60° Celcius, estabilizando a pressão em torno de 4×10^{-1} atm. O material permaneceu sob estas condições de temperatura e pressão por três dias para completa desidratação.

Os implantes foram acondicionados em frascos de vidro com tampa rosca³ e submetidos à esterilização por meio de irradiação gama⁴, na dosagem de 25 kGy. O material foi mantido em temperatura ambiente até o momento de sua utilização (Figura 2).



Figura 2: Implantes ósseos caninos córtico-esponjosos submetidos ao processo de liofilização e esterilização por meio de irradiação gama. Notar formato de cunha com larguras variadas, da esquerda para a direita: 3, 6, 9, e 12 mm. Observar ainda a ambarização dos frascos, antes translúcidos, ocasionada pela irradiação gama.: Arquivo pessoal (2014).

² Liofilizador industrial. Marca Edwards. Modelo Pirani 501

³ Frasco reagente boro 100 ml- Uniglas®

⁴ EMBRARAD – Empresa Brasileira de Radiações LTDA – Irradiador Industrial JS- 7500, número de série IR 106 - Cotia - SP

4.2 PACIENTES

Este estudo foi realizado em 16 joelhos de 15 cães com doença de ligamento cruzado cranial atendidos na rotina clínico-cirúrgica do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da UNESP Câmpus Jaboticabal e Hospital Veterinário Escola da UNICASTELO – Câmpus Descalvado.

4.2.1 Avaliações pré-operatórias e diagnóstico

Os pacientes com suspeita de RLCC foram submetidos ao exame físico, exame ortopédico, hemograma completo e dosagem sérica de ALT (alaninoamino transferase) e creatinina.

O exame físico incluiu a palpação de linfonodos, avaliação da coloração das mucosas oral e ocular, aferição de temperatura retal e auscultação cardiorrespiratória.

Ao exame ortopédico, além da avaliação das demais articulações, os pacientes foram avaliados quanto à presença de deslocamento cranial da tíbia (movimento de gaveta) e teste de compressão tibial para diagnóstico clínico da RLCC.

4.2.2 Critérios de inclusão dos pacientes no estudo

Pacientes selecionados para participar do estudo apresentaram:

- Parâmetros avaliados durante o exame clínico dentro dos limites considerados normais para a espécie canina;
- Dosagem sérica de ALT e Creatinina e hemograma com resultados dentro dos limites considerados normais para a espécie;
- Ausência de afecção ortopédica com manifestações clínicas, associada à RLCC,
- Doença do ligamento cruzado cranial com diagnóstico clínico ou radiográfico

4.3 PROCEDIMENTOS PRÉ-OPERATÓRIOS

4.3.1 Planejamento cirúrgico

O joelho dos pacientes incluídos nesta pesquisa foi radiografado em projeção médio-lateral, com posicionamento em ângulo de aproximadamente 135 graus, equivalente a extensão completa do membro, não causando hiperextensão. Esta radiografia foi utilizada para calcular a quantidade de avanço, em milímetros, ao qual a crista da tíbia deveria ser submetida na técnica de TTA modificada.

Para tanto, utilizou-se o método da tangente comum. Neste método, um ponto de contato entre côndilos femorais e platô tibial é determinado posicionando-se círculos nas superfícies articulares do fêmur e tíbia. Em seguida, é traçada uma reta ligando o centro destes círculos. A partir desta reta, a reta da tangente comum é traçada. Para identificação da medida do avanço da tuberosidade tibial, a terceira reta deve ser traçada tangente à patela e ao mesmo tempo, perpendicular à tangente comum. A distância entre a tuberosidade tibial e esta última reta será a medida em milímetros que a tuberosidade tibial deve ser deslocada cranialmente na TTA_m (Figura 3).

No presente estudo, transparência padronizada⁵ foi utilizada para a determinação destes valores.

⁵ Kyon TTA Common Tangent Template – Zurich, Switzerland.

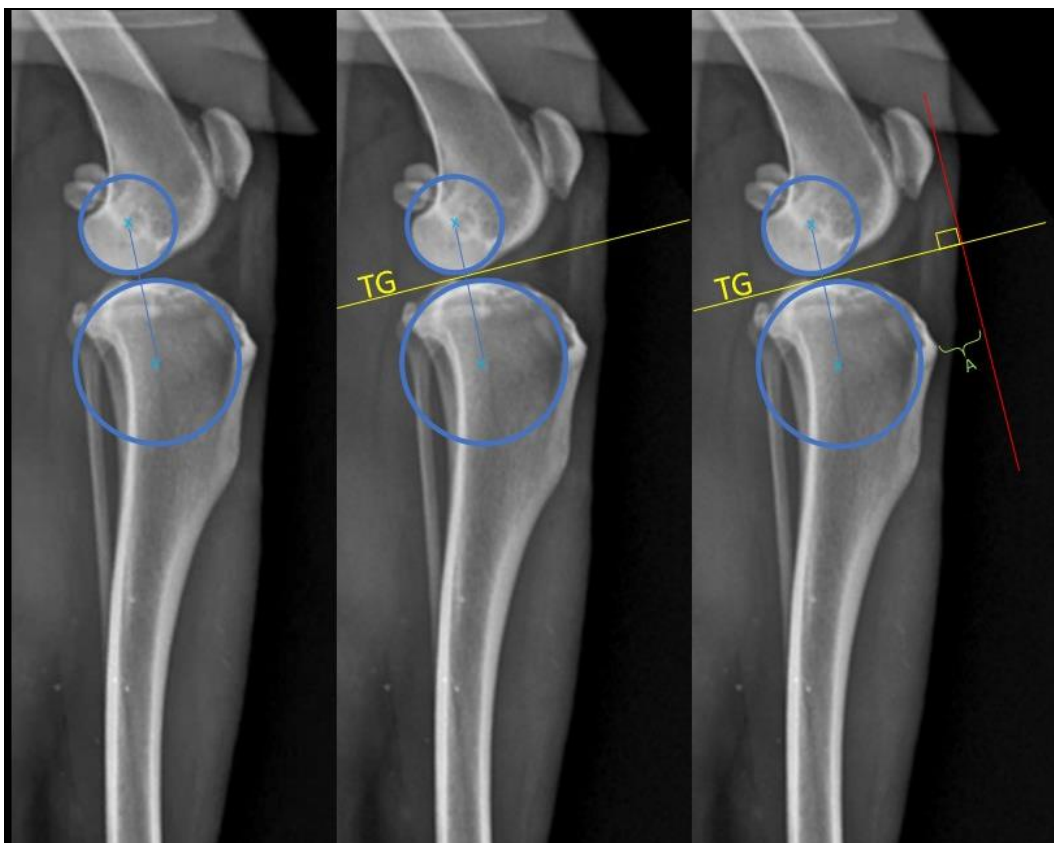


Figura 3: Método da tangente comum aplicado para cálculo do avanço da tuberosidade tibial modificada. Projeção mediolateral de joelho de cão com ruptura do ligamento cruzado cranial. Da esquerda para a direita, inicialmente, círculos são sobrepostos às superfícies do fêmur e tíbia. O centro destes círculos é ligado, formando uma reta (azul). Perpendicular a esta reta é traçada a reta tangente comum (TG), reta amarela, entre a superfície articular do fêmur e da tíbia. Para identificar o avanço da tuberosidade tibial, uma reta (vermelha) é traçada tangente à patela e perpendicular à TG. A distância (A) entre a crista tibial e esta reta, é a medida em milímetros que deve assumida como avanço necessário para a tuberosidade tibial na TTAm. Fonte: Arquivo pessoal (2014).

4.3.2 Manejo pré-operatório e anestesia

Os pacientes foram admitidos em jejum alimentar de 12 horas e jejum hídrico de 4 horas. Os procedimentos anestésicos seguiram o protocolo de rotina do “Hospital Veterinário GNL” Fcav/Unesp – Jaboticabal e Hospital Veterinário Escola da UNICASTELO – Câmpus Descalvado.

Realizou-se a tricotomia ampla do membro pélvico, posicionamento do paciente em decúbito lateral e antisepsia prévia com clorexidina degermante a 2% e álcool a 70%. A extremidade do membro foi isolada com bandagem estéril e em seguida procedeu-se antisepsia definitiva com clorexidina alcoólica e álcool 70 %. Os campos cirúrgicos foram posicionados permitindo acesso à face medial da porção proximal da tibia e joelho (Figura 4).



Figura 4: Exposição de face medial da tibia de membro pélvico direito de cão preparado para cirurgia de TTA modificada. Notar bandagem medial da tibia. Fonte: Arquivo pessoal (2014).

4.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

4.4.1 Avanço da tuberosidade tibial

O acesso cirúrgico para a TTA modificada se iniciou com uma incisão cutânea linear no aspecto crânio-medial da articulação do joelho, estendendo-se desde a altura do platô tibial até aproximadamente 5 mm distal à crista da tibia. Tecido subcutâneo foi divulsionado e periósteo elevado, resultando na exposição do aspecto medial da tibia proximal.

Para determinação da linha de osteotomia da tuberosidade da tibia, o ligamento patelar foi identificado e isolado posicionando-se pinça Kelly curva entre o ligamento e cápsula articular. A linha de osteotomia foi determinada, imediatamente cranial ao platô tibial, seguindo distalmente até orifício perfurado na porção final da tuberosidade da tibia, o qual atuou tanto como ponto de referência distal da osteotomia, quanto como “dobradiça”, reduzindo a probabilidade de fratura distal da crista após a osteotomia.

Utilizando-se serra oscilatória, procedeu-se osteotomia longitudinal da crista da tibia, desde a porção proximal até o orifício perfurado, mantendo-se a porção distal da tuberosidade íntegra. Durante a osteotomia irrigação constante com solução fisiológica NaCl 0,9% foi feita afim de se evitar termonecrose óssea.

Cunha óssea alógena córtico-esponjosa liofilizada foi selecionada em banco de ossos levando-se em consideração o planejamento cirúrgico, sendo de largura igual ao avanço pré-calculado e, comprimento aproximado ao da osteotomia.

Com auxílio de distratores, a tuberosidade foi afastada do corpo da tibia. O *gap* formado foi preenchido com enxerto ósseo de tamanho adequado, previamente reidratado por imersão em solução fisiológica 0,9% durante 3 minutos (Figura 5).

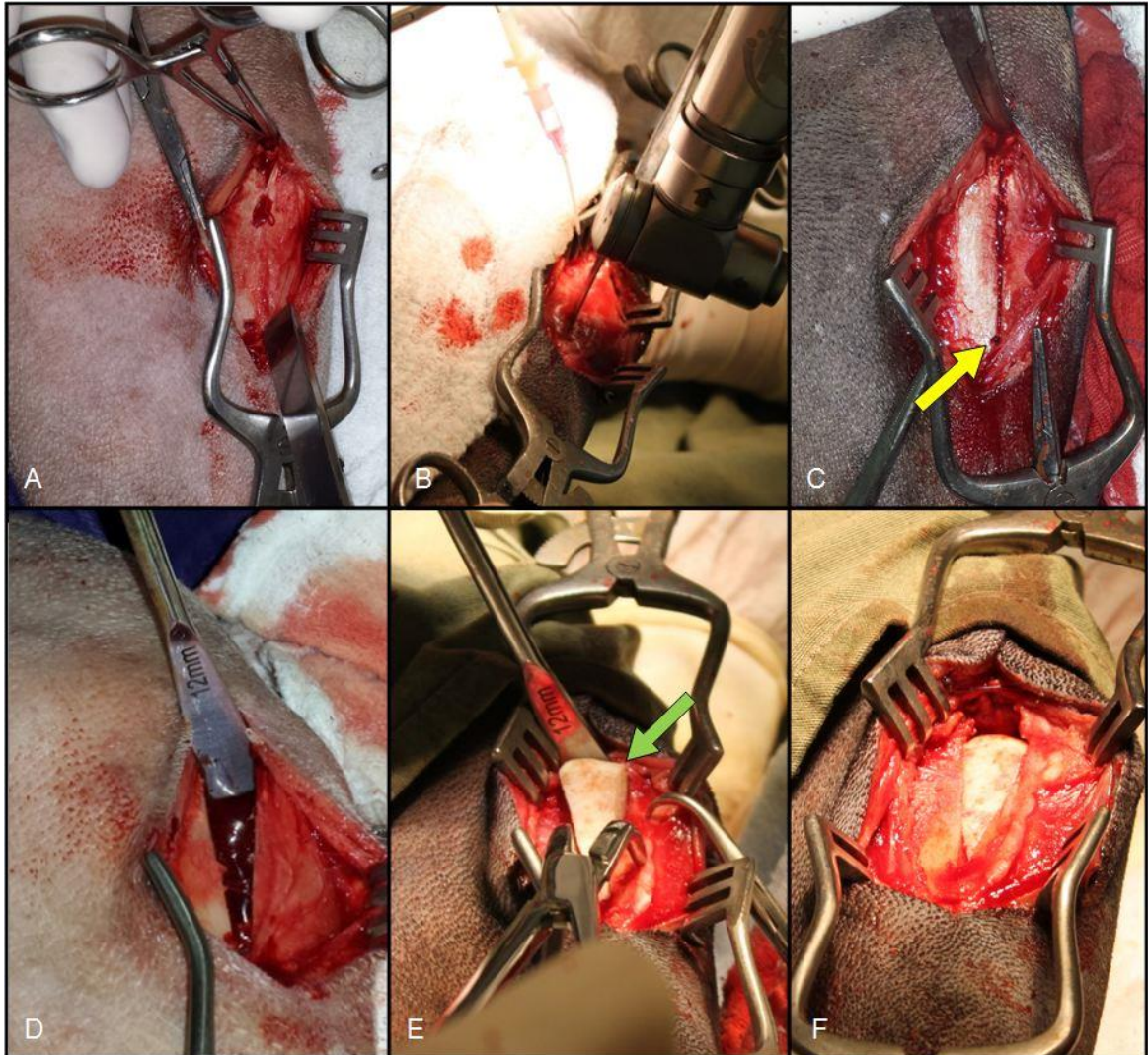


Figura 5: Imagem de membro pélvico esquerdo de cão submetido avanço da tuberosidade tibial modificada. Observar a exposição da face medial da tíbia (A) para realização de osteotomia (B). Em C, notar linha de osteotomia finalizada, mantendo porção distal da tuberosidade tibial íntegra. A seta amarela indica perfuração feita previamente à osteotomia. Em D, a tuberosidade sendo afastada em seguida, preenchimento do *gap* implante ósseo córtico-esponjoso alógeno liofilizado (seta verde, E e F). Fonte: Arquivo Pessoal (2014).

Em seguida, procedeu-se a fixação da tuberosidade por meio de dois parafusos de titânio⁶ posicionais em sentido craniocaudal, transpassando a crista tibial, osso liofilizado e tíbia. Para tanto, perfurou-se um orifício imediatamente distal à inserção do ligamento patelar e outro, cerca de 0,5 cm distalmente ao primeiro. Após macheamento e mensuração da profundidade dos orifícios com medidor de

⁶ Cãoméica – Campinas-SP

cortical, parafusos de titânio com diâmetro variando de 2.7 a 4.0 mm foram inseridos, fixando assim a tuberosidade tibial, o espaçador (osso alógeno liofilizado) e o corpo da tíbia (Figura 6). Perióstio e tecido subcutâneo foram suturados em padrão simples contínuo com poliglecaprone 25⁷. A sutura de pele apresentou padrão colchoeiro ou Wolf com fio de náilon cirúrgico⁸.

O tempo cirúrgico da TTAm foi cronometrado, iniciando-se desde a incisão até a sutura de pele.

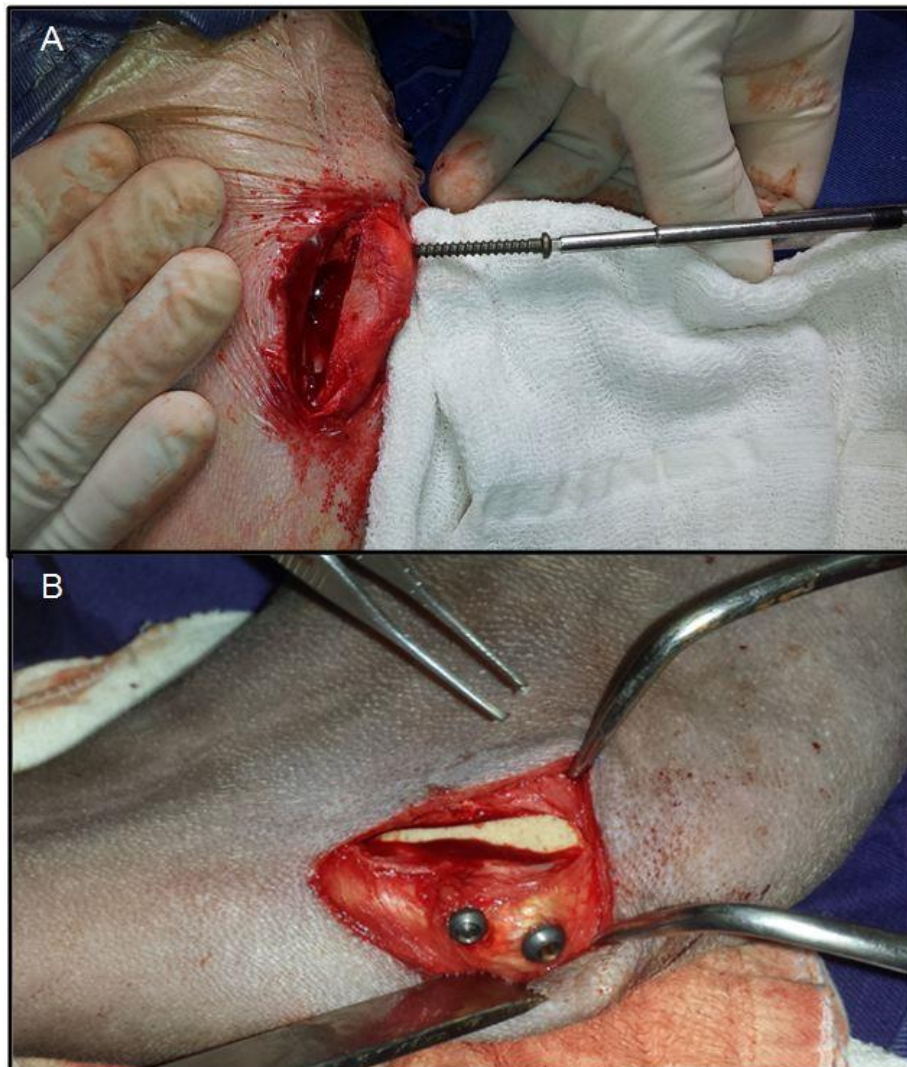


Figura 6: TTAm (cont.) Fixação da crista tibial e enxerto ósseo córtico-esponjoso por meio de parafusos de titânio aplicados em sentido craniocaudal. Fonte: Arquivo Pessoal (2014).

⁷ Caprofil ETHICON® Johnson & Johnson LTDA.

⁸ Nylon SHALON® Fios Cirúrgicos LTDA - São Luis de Belos Montes - GO

4.4.2 Artrotomia

Pacientes que ao exame físico apresentaram sinais de lesão em menisco foram submetidos inicialmente a artrotomia e, na sequência procedeu-se a TTAm.

Para a realização da artrotomia, realizou-se acesso medial a articulação femoro-tíbio-patelar por meio de incisão de pele, subcutâneo e cápsula articular. O platô tibial foi exposto com auxílio de distratores articulares. Após a visualização do menisco lesionado, foi realizada a meniscectomia total ou parcial, variando conforme tipo de lesão. Nos casos nos quais se observava ausência de meniscos por excessivo desgaste articular, restos teciduais foram removidos da articulação.

A sutura da cápsula articular foi realizada com poliglecaprone 25⁹. A redução de espaço morto e pele manteve os mesmos padrões e materiais utilizados para TTAm.

4.5 RECOMENDAÇÕES PÓS-OPERATÓRIAS

As prescrições pós-operatórias incluíram:

- Uso de colar elizabetano até a retirada dos pontos de pele (10 – 15 dias)
- Terapia antimicrobiana com Cefalexina (30 mg/kg) a cada 12 horas durante 10 a 15 dias
- Terapia analgésica com Tramadol (4 mg/kg) e dipirona (25 mg/kg) a cada 8 horas durante 10 dias.
- Terapia com ranitidina (2 mg/kg) a cada 12 horas durante 10 dias.
- Limpeza da ferida cirúrgica com solução fisiológica e rifamicina spray.

⁹ Caprofyl ETHICON® Johnson & Johnson LTDA.

4.6 AVALIAÇÕES PÓS- OPERATÓRIAS

4.6.1 Avaliação Clínica

Os pacientes foram submetidos à avaliação da ferida cirúrgica a fim de que fosse verificada qualquer reação tecidual aos 10 dias pós-operatórios e 30, 60, 90 e 120 dias após a intervenção cirúrgica.

Nos referidos tempos foram avaliados visualmente a presença ou ausência de secreções na ferida cirúrgica e presença ou ausência de sinais de reação inflamatória exacerbada no local da cirurgia, tais como edema, rubor, calor e reação comportamental que evidenciasse dor, verificada por meio de palpação da ferida cirúrgica.

A recuperação funcional do membro dos pacientes foi verificada mediante observações da marcha realizadas previamente a cirurgia e, 30, 60, 90 e 120 dias após a mesma. Escores foram atribuídos ao grau de claudicação conforme escala numérica, a saber, 0=Ausente, paciente clinicamente saudável; 1= Ausente a leve, ligeira claudicação detectável; 2= claudicação leve; 3= claudicação moderada; 4= moderada a severa, poupa o membro ao trote e, 5= severa, não possível estar mais claudicante (QUENN et al., 2007).

4.6.2 Avaliação radiográfica

Radiografias em projeção médio-lateral foram feitas dos joelhos operados nos momentos: pós-operatório imediato, 30, 60, 90 e 120 após a cirurgia.

Nas imagens obtidas, avaliou-se a união óssea entre implante ósseo e sítio receptor, bem como a reabsorção do implante.

União óssea foi avaliada conforme metodologia previamente descrita por John et al. (1996) e Minier et al. (2014), na qual se estabelecem escores de 0-3 para cada uma das interfaces (proximal e distal, ou cranial e caudal) entre implante ósseo e sítio receptor (Quadro 2), sendo 6 o escore total máximo de união óssea e zero o escore total mínimo.

No presente estudo, definiu-se a interface espaçador ósseo/crista tibial, como interface cranial e, interface espaçador/epífise da tíbia como interface caudal.

A reabsorção do implante ósseo foi avaliada qualitativamente e descrita quando presente.

Quadro 2: Escores radiográficos referentes a união óssea segundo John et al. (1996).

Escore	Descrição
0	Nenhum contato entre o enxerto e osso adjacente
1	Ponte parcial (< 50%) entre enxerto e osso adjacente
2	Ponte parcial (>50%) entre enxerto e osso adjacente
3	Ponte completa entre enxerto e osso adjacente

4.6.3 Análise dos dados

As frequências dos níveis de claudicações observadas nos cães foram confrontados pelo teste Exato de Fisher dentro dos momentos comparando os escores, com nível de significância de 95%, utilizando o software Statistica, versão 10 (2011)¹⁰.

Os escores atribuídos a união óssea nas avaliações radiográficas nos momentos zero, 30, 60, 90 e 120 dias pós-operatórios foram confrontados pelo teste de Kruskal-Wallis, ao nível de 95% de confiabilidade utilizando o mesmo software.

Para os demais dados obtidos qualitativamente, realizou-se uma análise descritiva.

¹⁰ StatSoft, Inc. (2011). STATISTICA (data analysis software system), version 10. www.statsoft.com.

5. RESULTADOS

O perfil dos pacientes incluídos nesta pesquisa consistiu de 16 joelhos de 15 cães de raças variadas, 1,2 a 12 anos de idade e peso corporal médio 32,7 Kg variando entre 19 e 52 kg, conforme Tabela 1.

Tabela 1: Relação de pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico da ruptura do ligamento cruzado cranial pela técnica do avanço da tuberosidade tibial modificada utilizando *cage* ósseo.

Raça	Idade (anos)	Sexo	Peso (kg)
Buldogue Inglês	2,5	F	25,00
Buldogue Americano	9	M	34,50
Labrador Retriever	5	F	30,00
SRD	7	M	47,00
SRD	6	F	31,00
Labrador Retriever	9	F	27,00
Chow Chow	1,2	F	19,00
American Pitbull	3	F	31,00
American Pitbull	6	F	39,80
American Pitbull	8	F	32,40
Labrador Retriever	4	F	31,00
SRD	4	M	29,00
Rottweiler	2	F	39,00
American Pitbull	3	F	52,00
American Pitbull	12	F	22,80

* SRD: Sem raça Definida

Durante o processamento, notou-se maior rigidez a palpação das cunhas ósseas após a liofilização e coloração mais esbranquiçada.

A esterilização por irradiação gama não alterou os implantes ósseos macroscopicamente, contudo ocasionou a ambarização dos frascos de vidro antes translúcidos.

No tocante a manejo pré-operatório, a utilização dos implantes oriundos de banco de ossos apresentou grande praticidade e comodidade em termos de armazenamento e transporte dos ossos.

O osso córtico-esponjoso liofilizado e esterilizado em raio gama, permitiu execução satisfatória da técnica de avanço da tuberosidade tibial modificada,

apresentando resistência à perfuração e fixação com parafusos com diâmetro variando entre 2,7 a 4.0 mm em 87,5 % dos casos (14, n=16). Em 2 procedimentos cunha óssea fraturou após a inserção dos parafusos, sendo então removida e substituída imediatamente por outra cunha do banco de ossos.

Ao ser posicionado como espaçador, o enxerto manteve-se estável e sob pressão entre a crista e o corpo da tíbia. Este fato foi favorável a manobra de perfuração de orifícios na crista tibial-enxerto-corpo da tíbia e fixação dos parafusos. O tempo cirúrgico médio registrado foi de 45,9 minutos, considerando desde incisão até a sutura da pele (Tabela 2). Durante a alocação do implante ósseo no *gap* formado entre a crista e corpo da tíbia, frente a dificuldades em tal manobra, o implante pôde ser rapidamente esculpido de modo que melhor se encaixasse no *gap*, otimizando assim o tempo cirúrgico.

Implantes requeridos em maior quantidade foram aqueles medindo 12mm (75%) e 9 mm de largura (25%) com comprimentos variados.

Na tabela 2, é possível verificar demais dados referentes ao procedimento cirúrgico.

Em 5 (31,2 %) dentre os 16 joelhos operados realizou-se artrotomia e meniscectomia, sendo que em um deles (Labrador, 9 anos) o platô tibial encontrava-se em estado avançado de erosão, com meniscos ausentes.

Tabela 2: Resumo dos resultados referentes transoperatório da TTA.

Raça	Membro	Avanço (mm)	Artrotomia	Parafuso Proximal	Distal Proximal	Tempo cirúrgico (min)
Bulldogue Inglês	D	9	N	2,7 x 30		50
Bulldogue Americano	D	9	N	4,0 x 48	3,5 x 40	60
Labrador	D	12	N	3,5 x 42	3,5 x 42	45
SRD	E	12	N	4,0 x 52	4,0 x 52	47
SRD	D	12	N	3,5 x 42	3,5 x 44	38
Labrador	D	9	S	3,5 x 42	3,5 x 38	45
Chow Chow	E	9	N	3,5 x 38	2,7 x 36	35
American Pitbull	D	12	N	3,5 x 42	3,5 x 40	48
American Pitbull	E	12	N	4,0 x 46	4,0 x 46	37
American Pitbull	D	12	N	4,0 x 42	3,5 x 38	37
Labrador	E	12	S	3,5 x 42	3,5 x 42	45
SRD	D	12	S	3,5 x 42	3,5 x 40	43
Rottweiler	E	12	S	4,0 x 48	4,0 x 48	43
	D	12	N	3,5 x 48	3,5 x 46	55
American Pitbull	D	12	S	4,0 x 52	4,0 x 46	69
American Pitbull	E	9	N	3,5 x 38	2,7 x 38	38

S: sim; N: não

5.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA

5.1.1 Ferida cirúrgica

Durante o período de acompanhamento clínico dos pacientes não foram observadas fístulas ou reações inflamatórias intensas em 15 (93,75%) dos joelhos operados (n=16). Apenas um dos pacientes apresentou aos 30 dias, secreção purulenta e infecção do foco cirúrgico (Figura 7). O paciente, SRD, sete anos e 47 Kg, apresentava dermatite úmida recidivante em diversas regiões do corpo e foi submetido à terapia com ciprofloxacina 10mg/kg a cada 12 horas durante 30 dias. Aos 60 dias pós-operatórios foi possível verificar remissão dos sinais de infecção.

A cicatrização das feridas cirúrgicas ocorreu em média após 10 dias, quando procedeu-se remoção da sutura de pele, não sendo observadas secreções, purulentas ou não, em todo o período de avaliação.



Figura 7: Membro pélvico esquerdo de cão sem raça definida, 30 (foto da esquerda) e 60 dias (foto da direita) pós-operatórios. Notar alteração cutânea no foco cirúrgico aos 30 dias, com presença de fístula no foco cirúrgico. Aos 60 dias, após terapia antimicrobiana é possível ver remissão dos sinais. Fonte: Arquivo Pessoal (2014).

5.1.2 Avaliação da locomoção

Clinicamente foi possível observar que todos os pacientes apresentaram recuperação funcional do membro e retorno a deambulação satisfatória. Observou-se piora do quadro clínico após o procedimento cirúrgico, seguido de recuperação progressiva e redução do grau de claudicação perceptível visualmente no período de acompanhamento.

Na avaliação pré-operatória, os pacientes apresentaram-se com apoio em pinça, quando não, sem apoio (1, n=16) e, graus de claudicação variados (escores 1 a 5). O escore mediano observado no pré-operatório foi 3,5 e aos 120 dias pós-

operatório 0,5, demonstrando a recuperação progressiva dos pacientes de um modo geral (Tabela 3)

Na Tabela 3 é possível observar a frequência de cada escore (0 a 5) atribuído ao grau de claudicação em cada momento (pré-operatório, 30, 60, 90 e 120 dias). O número de pacientes clinicamente saudáveis (escore 0) observada aos 120 dias (8 cães, n=16) foi significativamente maior ($p \leq 0,05$) que a quantidade de pacientes com claudicação de moderada a severa (nenhum paciente com escores 4 ou 5 e apenas um paciente com escore 1).

A quantidade de pacientes com claudicação de moderada a severa, poupando o membro ao trote (escore 4) observada antes do tratamento cirúrgico é significativamente maior ($p < 0,05$) do que o número de pacientes (zero, n=16) clinicamente não claudicantes (escore 0).

Tabela 3: Comparações múltiplas das frequências dos escores de claudicação dentro dos momentos pré-operatório, 30, 60, 90 e 120 dias pós-operatórios seguida da mediana e valor máximo e mínimo observado em cada momento.

Momentos (dias)	Escore						Mediana	Amplitude (máx-mín)
	0	1	2	3	4	5		
Pré-operatório	0 ^b	2 ^{ab}	2 ^{ab}	4 ^{ab}	6 ^a	2 ^{ab}	3,5	(1-5)
30	0 ^b	4 ^{ab}	2 ^{ab}	6 ^{ab}	3 ^{ab}	1 ^b	3	(1-5)
60	3 ^{ab}	3 ^{ab}	6 ^a	1 ^b	3 ^{ab}	0 ^b	2	(0-4)
90	4 ^{ab}	4 ^{ab}	5 ^a	3 ^{ab}	0 ^b	0 ^b	1,5	(0-3)
120	8 ^a	3 ^{ab}	4 ^{ab}	1 ^b	0 ^b	0 ^b	0,5	(0-3)

* Valores seguidos pela mesma letra, na linha e dentro de cada momento não diferem entre si pelo teste Exato de Fisher ($p \geq 0,05$)

5.2 AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA

Em todos os pacientes, foi possível verificar incorporação do implante ósseo à tibia no decorrer do período observado, bem como manutenção do avanço da crista tibial e posicionamento dos parafusos. Fraturas ou colapsos do implante não foram observadas nos pacientes deste estudo.

A união óssea ocorreu de forma progressiva, sendo os escores observados nas radiografias aos 60, 90 e 120 dias significativamente maiores ($p < 0,05$) que aqueles observados aos 30 dias e pós imediato (Tabela 4).

A partir do 60º dia pós operatório, observou-se predominância significativa de união óssea completa entre enxerto e osso adjacente, escore total 6, quando comparados com os momentos pós-operatório imediato e 30 dias (Tabela 4).

Muito embora o escore total máximo tenha se mantido com valor mediano semelhante ($p \geq 0,05$) aos 60, 90 e 120 dias (escore mediano 6), foi possível visibilizar a remodelação e organização óssea neste período de acompanhamento (Figura 8 e 9).

Tabela 4: Comparações múltiplas dos escores referentes a união óssea avaliada radiograficamente nos diferentes momentos

Momentos (dias)	Mediana	Amplitude (máx-mín)
Pós - operatório imediato	0 ^c	(0-0)
30	3,5 ^b	(1-6)
60	6 ^a	(4-6)
90	6 ^a	(4-6)
120	6 ^a	(2-6)
Valor do teste de Kruskal-Wallis		106,81
Probabilidade de significância		<0,0001

* Valores seguidos pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p \geq 0,05$).



Figura 8: Imagens radiográficas de joelho direito de dois pacientes (A-E e A'-E') submetidos a TTAm com uso de osso córtico-esponjoso como espaçador e fixação com parafusos de titânio. Notar a evolução da união óssea entre implante ósseo e sítio receptor do momento pós-operatório imediato (A, A'), aos 30 (B, B'), 60 (C, C'), 90 (D, D') e 120 dias (E, E') após o tratamento. Fonte: Arquivo Pessoal (2014).



Figura 9: Imagens radiográficas de joelho esquerdo de dois pacientes (A-E e A'-E') submetidos a TTAm com uso de osso córtico-esponjoso como espaçador e fixação com parafusos de titânio. Notar a evolução da união óssea entre implante ósseo e sítio receptor do momento pós-operatório imediato (A, A'), aos 30 (B, B'), 60 (C, C'), 90 (D, D') e 120 dias (E, E') após o tratamento. Fonte: Arquivo Pessoal (2014).

Em 37,5% dos casos (6 cães, n=16), observou-se fratura da porção distal da crista da tíbia, sendo 3 no trans-operatório, durante o afastamento da tuberosidade tibial para posicionamento do espaçador e, 3 verificado no exame radiográfico de 30 dias de acompanhamento.

Os 3 pacientes que apresentaram fratura verificada somente na radiografia do 30º dia de acompanhamento, consistiram de cães da raça American Pitbull com vigorosa massa muscular em quadríceps e todo o membro pélvico. Tais pacientes foram resistentes ao período de repouso e restrição de exercícios de alta intensidade, realizando atividades normalmente imediatamente após a cirurgia.

Ainda com a porção distal da crista tibial fraturada, os pacientes apresentaram evolução da consolidação óssea sem maiores consequências clínicas ou radiográficas (Figura 10)



Figura 10: Evolução da consolidação óssea em tibia esquerda de cão submetido à TTAm. Notar a fratura da porção distal da crista da tibia aos 30 dias e aos 60, 90 e 120 dias progressão na cicatrização óssea. PO: pós-operatório imediato; d: dias. Fonte: Arquivo Pessoal (2014).

Reabsorção óssea do implante foi observada no exame radiográfico do paciente que se apresentou com secreção purulenta no foco cirúrgico.

Na imagem obtida aos 30 dias pós-cirúrgicos, notou-se reabsorção da porção distal da cunha óssea bem como presença de e áreas radioluscentes (Figura 11, B)

O paciente, submetido à terapia antimicrobiana por 30 dias, apresentou evolução da consolidação óssea, não havendo necessidade de remoção de implantes para controle da infecção, verificada clínica e radiograficamente (Figura 11).



Figura 11: Imagens radiográficas de joelho esquerdo de cão submetido a TTAm com uso de implante ósseo córtico-esponjoso como espaçador e fixação com parafusos de titânio. Em B, 30^o dias após a cirurgia, notar lise e início de reabsorção do osso implantado decorrente de infecção do foco cirúrgico. Em C (60 dias), após terapia antimicrobiana oral, já é possível verificar união óssea entre implante e tecido adjacente. e em D (120 dias), união completa, sem distinção entre implante e osso adjacente. Fonte: Arquivo Pessoal (2014).

6. DISCUSSÃO

A possibilidade de manutenção do osso liofilizado em frascos de fácil manuseio e a temperatura ambiente, mostrou-se prática conforme já mencionado por outros autores (ROECK; DRABU, 2001; ZHI; ZU-BING, 2005; INNES; MYINT, 2010). A facilidade no armazenamento e transporte, acesso aos implantes ósseos durante os procedimentos cirúrgicos e a possibilidade de armazenamento por longos períodos proporcionados pela liofilização (ROECK; DRABU, 2001; INNES; MYINT, 2010) assumem marcada relevância, notadamente quando se leva em consideração a otimização de procedimentos cirúrgicos.

Em relação ao preparo dos implantes ósseos para utilização neste estudo, as cunhas ósseas coletadas mantiveram seu formato e estrutura trabecular envolvida por tecido ósseo cortical após o processamento. Notou-se por meio de palpação, maior rigidez das cunhas ósseas. Esta alteração na consistência pode ter sido decorrente do ressecamento provocado pela desidratação durante o processo de liofilização (SILVA; DUARTE; BARROZO, 2017).

Adaptações na conformação das cunhas ósseas puderam ser realizadas com maior facilidade após sua reidratação. Conrad et al. (1993) notaram que a reidratação dos enxertos esponjosos humanos pode reduzir sua rigidez e resistência à compressão. Características semelhantes foram percebidas por compressão digital do osso liofilizado, contudo faz-se necessária a execução de testes biomecânicos para análise objetiva destes dados. Vale ressaltar que o intuito da aplicação implante ósseo cortiço esponjoso alógeno, segundo Finkemeier (2002), não é o de promover suporte mecânico e sim o de fornecer suporte estrutural para o intracrescimento ósseo e vascular e induzir a formação óssea. Em virtude disso, neste estudo os parafusos de fixação da crista tibial e implante ósseo foram aplicados como parafusos posicionais, não exercendo efeito compressivo sobre o implante ósseo.

Ainda, no que concerne ao preparo das cunhas ósseas, seu desengorduramento previamente à liofilização, é indicado e utilizado durante o preparo processamento para implantação alógena ou xenógena com intuito de se remover os possíveis agentes imunogênicos, como células medulares e gordura.

Além disso, a completa remoção celular elimina virtualmente o risco de transmissão de doenças tumorais (GALIA et al., 2005; ZHI; ZU-BING, 2005).

No presente estudo, após lavagem com água corrente sob alta pressão, as cunhas ósseas córtico-esponjosas não aparentavam possuir gordura aderida em meio às trabéculas. Todavia, ao se fazer o desengorduramento por imersão em solução homogênea de álcool e clorofórmio, notou-se quantidade considerável de gordura remanescente formando sobrenadante espesso na solução. Galia et al. (2005) e Zhi e Zu-Bing, (2005) não mencionam a quantidade de banhos necessários para a completa retirada da gordura dos enxertos, recomendando banhos sucessivos provavelmente devido a variação na quantidade de gordura entre os fragmentos ósseos de cada doador. Esta variação também foi observada neste estudo, sendo as imersões para desengorduramento realizadas até que o sobrenadante deixasse de se formar, o que ocorreu em média com cinco banhos.

Em relação ao procedimento cirúrgico, notou-se que para realização da TTAm, é requerida incisão de pele menor que aquela necessária para se proceder a TTA convencional. Enquanto na TTAm é necessária incisão de 2-3 cm para posicionamento do implantes ósseos e fixação com parafusos (LIMA, 2012; ROCHA, 2012; MEDEIROS et al., 2016), a TTA convencional requer incisão de aproximadamente 10cm para permitir a colocação da fixação da placa no corpo da tíbia (MONTAVON; DAMUR; TEPIC, 2002; LAFAVER et al., 2007).

A aplicação de dois parafusos em sentido craniocaudal para estabilização da crista tibial e espaçador para manutenção do avanço, foi sugerida por Medeiros (2011) e Rocha (2012). Os autores utilizaram tanto um ou dois parafusos com bons resultados em termos de fixação da crista tibial. A presente pesquisa incluiu um paciente, buldogue inglês de 25 kg, no qual somente o parafuso proximal foi aplicado devido a largura e comprimento insuficiente da crista da tíbia. A integração completa do osso liofilizado foi observada aos 30 dias pós-operatório deste paciente, que apresentou retorno a deambulação normal aos 60 dias pós-operatórios.

O uso de apenas dois parafusos na TTAm e implante ósseo absorvível como espaçador, quando comparado aos diversos implantes específicos necessários para realização da TTA convencional, na visão dos autores, faz da primeira técnica alternativa simples e de custo reduzido para tratamento da DLLC. Adicionalmente,

vale ressaltar que no caso da TTAm, após completa regeneração óssea, os parafusos podem ser facilmente removidos da tíbia do paciente, resultando em tíbia com crista tibial avançada e sem a presença de implantes de qualquer natureza.

Através do acompanhamento clínico da cicatrização da ferida cirúrgica da consolidação óssea, pôde-se obter respostas indiretas quanto a possíveis reações imunogênicas ao implante ósseo.

No decorrer do acompanhamento dos pacientes por 120 dias, não foram notados sinais que representassem clinicamente reações inflamatórias intensas características de rejeição de implantes. Ainda, avaliando-se o tempo médio de 10 dias para selamento da pele e remoção de sutura observados neste estudo, foi possível perceber que tal processo ocorreu dentro do que seria normalmente esperado segundo Cornel (2012). O autor refere que, em pacientes saudáveis, a fase de reparo da ferida tem duração aproximada de 4 a 12 dias, e tem como objetivo atingir o fechamento dos tecidos lesionados.

Tecido necrótico, carga bacteriana excessiva e presença de corpos estranhos retardam ou mesmo inibem o processo de cicatrização da ferida. A reação inflamatória decorrente da presença de corpos estranhos tem como consequência a produção de seromas que por sua vez podem formar fístulas recorrentes que impedem a cicatrização dos tecidos adjacentes. Ainda que não sejam observadas fístulas, o acúmulo de líquido inflamatório pode se apresentar como coleção de líquido palpável, que mecanicamente pode impedir o processo de cicatrização por causar isquemia dos tecidos adjacentes devido à pressão excessiva nos capilares. (CORNEL, 2012). Os pacientes desta pesquisa não apresentaram sintomatologia que evidenciasse reações tipo corpo estranho até os 120 dias após a cirurgia. Tais observações, aliadas ao progresso da cicatrização de tecidos moles observado nos pacientes, nos permitem inferir a respeito da baixa imunogenicidade do osso liofilizado.

Corroboram com os achados deste estudo, aqueles observados por Morato (2013) que, mediante implantação xenógena de osso canino liofilizado e esterilizado em irradiação gama não relatou sinais clínicos, radiográficos e histológicos característicos de rejeição. Adicionalmente, Wang et al. (2010), obtiveram resultados semelhantes e, histologicamente observaram que o osso liofilizado alógeno

implantado na reconstrução da mandíbula de cães no período de 12 meses não resultou em reações tipo corpo estranho nos pacientes, sendo completamente reabsorvido e substituído por osso neoformado.

Tecidos viáveis que são capazes de provocar reações imunogênicas são o periósteo, musculatura, células sanguíneas e medula óssea. Elementos imunogênicos são tipicamente marcadores de histocompatibilidade de superfície celulares, os quais são encontrados em enxertos alógenos e xenógenos frescos e, facilmente provocariam reações no hospedeiro após enxertia. O processamento de ossos para armazenamento em bancos, elimina tais elementos imunogênicos por meio da remoção mecânica dos tecidos moles, lavagens, tratamentos químicos, liofilização e irradiação, gerando redução do potencial imunogênico dos tecidos a serem implantados (KRAUS, 2012).

Vale ressaltar ainda que, o osso liofilizado após implantação, é reabsorvido e substituído gradativamente por osso novo, o que faz com que reações tardias sejam de ocorrência improvável. O tempo de substituição completa osso liofilizado por osso novo não é claramente estabelecido, havendo relatos de 12 a 48 semanas. Sabe-se que tal processo é influenciado por fatores tais como idade, tipo de tecido ósseo (cortical, córtico-esponjoso, esponjoso), sítio de implantação e fatores de crescimentos associados (plasma rico em plaquetas, medula óssea). O fato é que o tecido implantado é completamente reabsorvido pelo hospedeiro, reduzindo a possibilidade de ocorrência de reações tardias (INNES; MYINT, 2010; WANG et al., 2010; KRAUS, 2012; MORATO, 2013).

A união óssea observada radiograficamente entre o espaçador ósseo e a tíbia, reforçam as afirmações da literatura acerca da capacidade de integração do osso liofilizado ao sítio receptor, a qual está diretamente relacionada com as propriedades osteocondutora e osteoindutora deste tipo de implante (INNES; MYINT, 2010; KRAUS, 2012; MORATO, 2013). Mediante processo de consolidação óssea normal, a reabsorção progressiva de uma matriz óssea alógena resulta na exposição da BMP, altamente osteoindutora, e outros fatores de crescimento que por sua vez induzem células mesenquimais osteoprogenitoras a se diferenciarem em osteoblastos. Estas células produzem ativamente matriz óssea que posteriormente se torna mineralizada (KRAUS, 2012). Os autores podem inferir que, sendo a porção

proximal da tíbia rica em medula óssea que contem grande quantidade de células precursoras de osteoblastos, a migração destes componentes pelo arcabouço ósseo do espaçador aliado a exposição da BMP, foram fatores chave para que a incorporação completa ocorresse, de modo geral, aos 60 dias pós-operatórios.

Na porção distal do *gap* da osteotomia, o preenchimento foi mais lento. Como o espaçador não preencheu perfeitamente esta porção, é provável tenha havido prejuízo do processo de osteocondução visto que, para que haja adequada migração celular por entre a estrutura tridimensional do implante ósseo faz-se necessário contato próximo e estabilidade no sítio receptor. Se por um lado este achado pode ser interpretado como aspecto negativo do uso da cunha óssea, ou seja, não há preenchimento completo do *gap* já é pouco provável um encaixe perfeito entre uma cunha oriunda de banco de ossos e um *gap* que pode ter medidas variáveis, por outro lado este aspecto reforça ainda mais o benefício de se ter um bom preenchedor de espaço no *gap* da TTA, que possua estrutura porosa suficiente para permitir a migração celular, porém rigidez compatível alguma compressão que possa ocorrer durante a realização da TTAm (BOUDRIEU, 2011).

As complicações observadas na TTAm utilizando osso liofilizado como espaçador incluíram a quebra do implante ósseo durante a aplicação (2, n=16), fratura da porção distal da crista da tíbia (3, n=16) e reabsorção do enxerto (1, n=16).

A reabsorção foi atribuída a osteomielite associada a infecção de tecidos moles adjacentes ao foco cirúrgico manifestada radiograficamente por pontos de osteopenia e reabsorção parcial do espaçador de paciente SRD, macho, 47 Kg. De acordo com Budsberg (2012) alterações radiográficas decorrentes de infecção óssea incluem reabsorção óssea, proliferação periosteal e aumento da radiopacidade medular. Na fase inflamatória da osteomielite, perda da estrutura óssea organizada comumente ocorre, gerando obliteração dos canais de Volkmann e Havers, os quais normalmente acomodam os vasos sanguíneos do tecido ósseo. A isquemia consequente de tal obliteração provoca o aumento da atividade osteoclástica resultando em necrose e reabsorção óssea. A atividade osteoclástica produz perda óssea e osteoporose localizada, conforme observado no paciente deste estudo.

Referente a fonte desta infecção, patógenos causadores de osteomielite podem ter acesso ao osso por via hematógena, inoculação direta por ferida penetrante ou por disseminação a partir de infecção focal em tecidos moles (BUDSBERG, 2012). O referido paciente apresentava histórico de dermatite úmida recidivante durante pelo menos dois anos segundo relato do proprietário e, durante a preparação pré-operatória notou-se presença lesões por dermatite úmida na face e no dorso do paciente, com extensão de aproximadamente 10 x15 cm. Acredita-se que as afecções dermatológicas apresentadas pelo paciente possam ter sido a fonte infecciosa.

A osteomielite é uma das complicações que podem ocorrer nas osteotomias corretivas, sendo consenso que tal afecção requer terapia antimicrobiana aliada a remoção de implantes metálicos devido a potencial formação de biofilme (MALEY; MERTENS; BAHR, 2010; COSTA et al., 2017). A falha da terapia antimicrobiana em casos de infecções relacionada a implantes ocorre devido a diminuição do efeito do fármaco no microrganismo protegido pelo biofilme (BUDSBERG, 2012). No caso da TTA convencional, a remoção de implantes pode ser extremamente complexa devido à localização do *cage*, dentro do *gap* da osteotomia e, o design do garfo que mantém a placa em sua posição (COSTA et al., 2017). Neste estudo, foi possível perceber que a utilização do osso liofilizado em substituição ao *cage* favoreceu o controle da infecção do foco com terapia antimicrobiana via oral, não tendo sido necessária intervenções cirúrgicas.

Visto que o tecido ósseo córtico esponjoso, permite o crescimento de vasos por entre suas trabéculas (DINOPOULOS; DIMITRIOU; GIANNOUDIS, 2012; MORATO, 2013), é possível assumir que a distribuição do fármaco tenha alcançado toda a extensão do espaçador ósseo gerando maior eficácia da terapia, o que não ocorreria no caso de um espaçador metálico. Ainda, caso os autores se deparassem com infecção persistente decorrente da formação de biofilme nos parafusos, a partir do 90º dia pós-operatório, os mesmos poderiam ser removidos sem prejuízo ao paciente conforme relatam Rocha et al. (2012) e Lima (2012).

Ainda, referente a formação de biofilme, Budsberg (2012) afirma que a adesão dos microrganismos é inicialmente reversível e, depende da superfície do implante tornando-se gradativamente irreversível a medida que glicocálix é

produzido pelos microrganismos. Visto que o processo de substituição do osso liofilizado por osso neoformado se inicia logo após implantação (INNES; MYINT, 2010; DINOPOULOS; DIMITRIOU; GIANNOUDIS, 2012), este fator pode ter contribuído de forma positiva para o tratamento da osteomielite por interromper o processo de adesão bacteriana e conseqüentemente dificultar a formação de biofilme.

Em relação a intercorrências transoperatórias, em dois pacientes ocorreram fratura do implante ósseo no momento do rosqueamento do parafuso. O fato de se tratar de implantes ósseos oriundos de banco de ossos os torna facilmente substituíveis por outro implante de mesmo tamanho presente no banco. É importante notar que, ambos sofreram quebra decorrente do rosqueamento do parafuso distal que é posicionado na porção, mais estreita da cunha.

A fratura da porção distal da crista tibial observada radiograficamente em três pacientes não interferiu na recuperação clínica e radiográfica dos pacientes. A osteotomia incompleta realizada na TTAm, permite que a crista tibial permaneça aderida distalmente ao corpo da tibia e mantenha a continuidade do periósteo, fundamental no processo de vascularização e consolidação óssea (ROCHA et al., 2012; CROSS, 2012, MEDEIROS, et al., 2016), diferente da TTA convencional, a qual requer osteotomia completa da crista tibial, que permanece livre até que a fixação com placa de titânio e *cage* seja realizada (LAFEVER et al., 2007).

Outras complicações decorrentes da utilização do osso liofilizado como espaçador na TTAm, tais como, como colapso do implante ósseo ou quebra de parafusos não ocorreram nos pacientes, tendo sido possível notar manutenção do avanço da tuberosidade da tibia e posição dos implantes metálicos durante todo o período de observação.

Tais observações nos permitem inferir que o espaçador manteve suas propriedades mecânicas tempo suficiente para que o crescimento ósseo ocorresse através do *gap*, garantindo a manutenção das mudanças biomecânicas proporcionadas pela técnica cirúrgica e por conseguinte, recuperação da deambulação dos pacientes. Todos os pacientes deste estudo apresentaram recuperação funcional do membro pélvico e melhora clínica gradual ao longo do acompanhamento pós-operatório. Dados semelhantes são reportados em cães com

DLCC tratados por meio da TTA convencional (MONTAVON; DAMUR; TEPIC, 2002; LAFAYER et al., 2007; KOWALESKI; BOUDRIEU; POZZI, 2012) e TTAm (LIMA 2012, ROCHA et al., 2012; MEDEIROS et al. 2016), evidenciando desta forma os resultados positivos que tem sido obtido com o uso do princípio biomecânico TTA para recuperação funcional do membro.

7. CONCLUSÃO

Por meio deste estudo foi possível concluir que

- Cunhas de osso córtico-esponjoso liofilizadas e esterilizadas por raio gama podem ser utilizadas de forma alógena como opção de espaçador na TTAm em cães;
- A implantação alógena do osso córtico-esponjoso liofilizado na tíbia de cães apresenta baixa imunogenicidade clinicamente perceptível;
- O osso córtico-esponjoso alógeno liofilizado quando utilizado como espaçador na TTAm, se incorpora a tíbia e crista tibial, demonstrando propriedades de osteointegração, osteocondução e osteoindução;
- Cunhas de osso córtico-esponjoso liofilizado, mantém o avanço da tuberosidade tibial na TTAm,
- Cães com peso entre 19 e 52 Kg com DLCC submetidos à TTAm tendo como espaçador o osso córtico-esponjoso liofilizado apresentam retorno funcional progressivo do membro durante o período de 120 dias de observação.

8. REFERÊNCIAS

ABD-KHORSAND, S.; SABER-SAMANDARI, S.; SABER-SAMANDARI, S. Development of nanocomposite scaffolds based on TiO₂ doped in grafted chitosan/hydroxyapatite by freeze drying method and evaluation of biocompatibility. **International Journal of Biological Macromolecules**. Guildford, v. 16, n. 101, p. 51-58, 2017.

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

BOSS, E. A. **Modelagem e otimização do processo de liofilização**: aplicação para leite desnatado e café solúvel. 2004. 129 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

BOUDRIEAU, R. J. Bone grafting and tibial tuberosity advancement. **Veterinary Surgery**, Philadelphia, v. 40, p. 641-643, 2011.

BOUDRIEAU, R. J. Tibial plateau leveling osteotomy or tibial tuberosity advancement ? **Veterinary Surgery**, Philadelphia, v. 38, p. 1–22, 2009.

BOUDRIEAU, R. J. Tibial tuberosity advancement (TTA): early results in 63 dogs. In: CONGRESS ESVOT,13., 2006. Munich. **Proceedings...** Munich: ESVOT, 2006, p. 21 – 22.

BUDSBERG, S. C. Osteomyelitis. In: TOBIAS, K. M.; JOHNSTON, S. A. **Veterinary surgery small animal**. St. Louis: Elsevier, 2012. Cap. 48, p.669 – 675.

BUOTE, N.; FUSCO, J.; RADASCH, R. Age, tibial plateau angle, sex and weight as risk factors for contralateral rupture of the cranial cruciate ligamente in Labradors. **Veterinary Surgery**, Philadelphia, v. 38, p. 481 – 489, 2009.

CAVASSANI, M. M.; MORAES, J. R. E.; PADILHA FILHO, J. G. Função osteoindutora de fragmentos ósseos conservados em glicerina a 98%: estudo experimental em ratos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 3, p. 445-448, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782001000300013>>.

COOK, J. L. Cranial cruciate ligamente disease in dogs: biology versus biomechanics. **Veterinary Surgery**, Philadelphia, v. 39, p. 270- 277, 2010.

CORNEL, K. Wound healing. In: TOBIAS, K. M.; JOHNSTON, S. A. **Veterinary surgery small animal**. St. Louis: Elsevier, 2012. Cap. 9, p.125 – 134.

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

CORNU, O.; BANSE, X.; DOCQUIER, P. L.; LUYCKX, S.; DELLOYE, Ch. Effect of freeze-drying and gamma irradiation on the mechanical properties of human cancellous bone. **Journal of Orthopaedic Research**, Hoboken, v. 18, n. 3, p. 426-431, 2000.

COSTA, M.; CRAIG, D.; CAMBRIDGE, T.; SEBESTYEN, P.; SU, Y.; FAHIE, M. A. Major complications of tibial tuberosity advancement in 1613 dogs. **Veterinary Surgery**, Philadelphia, v. 46, n. 4, p. 494-500, 2017.

CRENSHAW, A. H. Bone grafting. In: CANALE, S. T.; DAUGHERTY, K.; JONES, L. J. **Campbell's operative orthopaedics**. Missouri: Mosby Year Book, 1991. p. 12-22.

CROSS, A. R. Fracture biology and biomechanics. In: TOBIAS, K. M.; JOHNSTON, S. A. **Veterinary surgery small animal**. St. Louis: Elsevier, 2012. Cap. 41, p.565 - 571.

DENNY, H. R.; BUTTERWORTH, S. J. Enxertos ósseos. In: _____. **Cirurgia ortopédica em cães e gatos**. 4. ed. São Paulo: Roca, 2006. cap. 42, p. 396- 427.

DINOPOULOS, H.; DIMITRIOU, R.; GIANNOUDIS, P. V. Bone graft substitutes: what are the options?. **The Surgeon**, Edinburgh, p. 1-10, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.surge.2012.04.001>>.

DUVAL, J. M.; BUDSBERG, S. C.; FLO, G. L.; SAMMARCO, J. L. Breed, sex, and body weight as risk factors for rupture of the cranial cruciate ligament in young dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 205, n.6, p. 811 - 804, 1999.

FARRINGTON, M.; MATTHEWS, I.; FOREMAN, J.; RICHARDSON, K. M.; CAFFREY, E. Microbiological monitoring of bone grafts: two years'experience at a tissue bank. **Journal of Hospital Infection**, Londres, v. 38, p. 261-271, 1998.

FEOFILOFF, E. D.; JESUS-GARCIA, R. Técnicas de obtenção, processamento, armazenamento e utilização de homoenxertos ósseos Protocolo do Banco de Ossos da Escola Paulista de Medicina. **Revista Brasileira de Ortopedia**, São Paulo, v. 31, n. 11, p. 895-903, 1996.

FINKEMEIER, C. G. Bone-grafting and bone graft substitutes. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, Needham, v. 84, n. 3, p. 649-58, 2002.

GALIA, C. R.; MACEDO, C. A. S.; ROSITO, R.; MELLO, T. M.; DIESEL, C.; MOREIRA, L. F. Caracterização físico-química de ossos liofilizados de origem bovina

e humana. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 2, p. 157-160, 2009.

GALIA, C. R.; ROSITO, R.; MELLO, T. M.; MACEDO, C. Uso de enxerto ósseo homólogo e heterólogo em diáfise femoral de ratos: comparação entre enxerto ósseo congelado e liofilizado. **Revista Brasileira de Ortopedia**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 141-146, 2005.

GOLDBERG, V.; STEVENSON, S. Natural history of autografts and allografts. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, New York, n. 225, p. 7-16, 1987.

GRIFFON, D. J. A review of the pathogenesis of canine cranial cruciate ligament disease as a basis for future preventive strategies. **Veterinary Surgery**, Philadelphia, v. 39, p. 399 – 409, 2010.

GUERRERO, T. G. Advancement of the tibial tuberosity for the treatment of cranial cruciate deficient canine stifle. 2003. **Tese (PhD in Small Animal Surgery)** Vetsuisse Faculty, University of Zurich, Zurich, 2003.

HACHIYA, Y.; SAKAI, T.; NARITA, Y.; IWATA, H.; YOSHIZAWA, H.; HACHIYA, K.; MURITA, C. M. Status of bone banks in Japan. **Transplantation Proceedings**, Philadelphia, v. 31, n. 5, p. 2032-2035, 1999.

HOFFMANN, D. E.; MILLER, J. M.; LANZ, O. I., MARTIN, R. A.; SHIRES, P. K. Tibial tuberosity advancement in 65 canine stifles. **Veterinary and Comparative Orthopedics and Traumatology**, Columbus, v. 19, n. 4, p. 219-227, 2006.

INNES, J. F.; MYINT, P. Demineralised bone matrix in veterinary orthopaedics: a review. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, Stuttgart, v. 2, n. 23, p. 393–399, 2010.

JOHN, K. D.; FRIERSON, K. E.; KELLER, T. S.; COOK, C.; SCHEINBERG, R.; ZERWEKH, J.; MEYERS, L.; SCIADINI, M. F. Porous ceramics as bone graft substitutes in long bone defects: a biomechanical, histological, and radiographic analysis. **Journal of Orthopaedic Research**, Hoboken, v. 14, n. 6, p. 351 – 369, 1996.

JOHNSON, A. L.; HUSE, D. A. Artopatias. In: FOSSUM, T. H.; HEDLUND, C. S.; HULSE, D. A.; JOHNSON, A. L.; SEIM, H. B.; WILLARD, M. D.; CARROLL, G. L. **Cirurgia de Pequenos Animais**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2005. cap.35, p. 1125-1133.

KOWALESKI, M. P.; BOUDRIEAU, R. J.; POZZI, A. Stifle joint. In: TOBIAS, K. M.; JOHNSTON, S. A. **Veterinary surgery small animal**. St. Louis: Elsevier, 2012. cap. 62, p. 906 – 998.

KRAUS, K. H. Bone grafts and substituted. In: TOBIAS, K. M.; JOHNSTON, S. A. **Veterinary surgery small animal**. St. Louis: Elsevier, 2012. Cap. 49, p.676 – 684.

KÜBLER, N.; REUTHER, J.; KIRCHNER, T.; PRIESSNITZ, B.; SEBALD, W. Osteoinductive, morphologic, and biomechanical properties of autolyzed, antigen-extract-ed, allogeneic human bone. **Journal Oral Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 51, n. 12, p. 1346-1357, 1993.

LAFEVER, S.; MILLER, N. A.; STUBBS, W. P.; TAYLOR, R. A.; BOUDRIEAU, R. J. Tibial tuberosity advancement for stabilization of the canine cranial cruciate ligament-deficient stifle joint: Surgical technique, early results, and complications in 101 dogs. **Veterinary Surgery**, Philadelphia, v. 36, p. 573–586, 2007.

LIMA, C. G. D. **Autoenxerto de crista íliaca como espaçador na técnica modificada de avanço da tuberosidade tibial na ruptura do ligamento cruzado cranial – estudo clínico em cães**. 2012. 48 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2012.

MACEDO, C. A. S.; GALIA, C. R.; SILVA, A. L. B.; CÉSAR, P. C.; SANCHES, P. R. S.; DUARTE, L. S.; MÜLLER, L. M. Comparação da resistência à compressão do osso bovino congelado e liofilizado. **Revista Brasileira de Ortopedia**, São Paulo v. 34, n. 9/10, p. 529-534, 1999.

MALEY, J. R.; MERTENS, W. D.; BAHR, A. Osteomyelitis-related sequestrum formation with the combination tibial plateau levelling osteotomy and cranial closing wedge osteotomy procedure. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, Stuttgart, v. 2, n. 23, p. 141-147, 2010.

MALININ, T.; TEMPLE, H. T. Comparison of frozen and freeze-dried particulate bone allografts. **Cryobiology**, San Diego, v. 55, n. 2, p. 167 – 170, 2007.

MAQUET, P. Advancement of the tibial tuberosity. **Clinical Orthopaedics Related Research**, v. 115, p. 225 – 230, 1976.

MARTINEZ, S. A.; WALKER, T. Bone grafts. **Veterinary Clinincs of North America Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 29, n. 5, p. 1207-1219, 1999

MEDEIROS, R. M. **Desenvolvimento, aplicação e avaliação de nova técnica de avanço da tuberosidade tibial com uso de espaçador de polímero de mamona fixado com parafusos para correção da ruptura do ligamento cruzado cranial em cães**. 2011. 58 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2011.

MEDEIROS, R. M.; SILVA, M. A. M.; TEIXEIRA, P. P. M.; DIAS, L. G. G. G.; CHUNG, D. G.; ZANI, C. C.; FELICIANO, M. A. R.; DA CONCEICAO, M. E. B. A. M.;

MACHADO, M. R. F.; ROCHA, A. G., CHIERICE, G. O.; COUTINHO, L. N.; PADILHA FILHO, J. G. Use of castor bean polymer in developing a new technique for tibial tuberosity advancement for cranial cruciate ligament rupture correction in dogs. **Veterinarni Medicina**, Praga, v. 61, n. 7, p. 382-388, 2016.

MILLER, J. M.; SHIRES, P. K.; LANZ, O. I.; MARTIN, R. A.; GRANT, J. W. Effect of 9 mm tibial tuberosity advancement on cranial tibial translation in the canine cranial cruciate ligament – deficient stifle. **Veterinary Surgery**, Hagenstown, v. 36, n. 4, p. 335 – 340, 2007.

MILLIS, D. L.; MARTINEZ, S. A. Enxertos ósseos. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 3. ed. Barueri: Manole, 2007. cap. 133, p. 1875-1891.

MINIER, K.; TOURÉ, A.; FUSELLIER, M.; FELLAH, B.; BOUVY, B.; WEISS, P.; GAUTHIER, O. BMP-2 delivered from a self-cross-linkable CaP/hydrogel construct promotes bone regeneration in a critical-size segmental defect model of non-union in dogs. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, Stuttgart, v. 27, n6, p. 411-421, 2014.

MONTAVON, P. M.; DAMUR, D. M.; TEPIC, S. Advancement of the tibial tuberosity for the treatment of cranial cruciate deficient canine stifle. In: WORLD ORTHOPEDIC VETERINARY CONGRESS, 1., Munich. **Proceedings...** Munich, 2002. p. 152.

MORATO, G. O. **Ossos esponjosos liofilizados de cão utilizados como enxerto puro e associado a plasma rico em plaquetas ou medula óssea em falhas ósseas induzidas em coelhos – estudo experimental**. 2013. 80 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

MORATO, G. O.; ROCHA, A. G.; CATANDI, P. B.; CHUNG, D. G.; COSTA, P. F.; AVANTE, M. L.; PADILHA FILHO, J. G. Preparação de osso esponjoso de cão liofilizado e esterilizado por irradiação gama para uso como enxerto. **Brazilian Journal of Animal Science** v.5, n.10, suplemento, p. 346 – 348, 2012

OLIVEIRA, A. C. P.; COLLARES, M. V. M.; GALIA, C. R.; EDELWEISS, M. I.; PINTO, R. A.; KNEIBEL, L. Comparação entre enxerto ósseo autólogo, homólogo congelado e homólogo liofilizado em modelo experimental de cranioplastia. **Revista da Sociedade Brasileira de Cirurgia Craniomaxilofacial**, São Paulo, v. 10, n. 4, p. 140-146, 2007.

PADILHA FILHO, J. G.; PENHA, L. H. C.; SOUZA, S. F. Uso do enxerto ósseo cortical bovino conservado em glicerina a 98% na osteotomia femoral em gatos. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 9, n. 4, p. 1071-1078, 2008.

PAPAS, A. M. Current methods of bone storage by freezing and freeze-drying. **Cryobiology**, Maryland Heights, v. 4, n. 6, p. 358- 375, 1968.

PIERMATEI, D. L.; FLO, G. L.; DeCAMP, C. E.; A articulação do Joelho. In: _____. **Brinker, Piermatei, Flo, Ortopedia e tratamento de fraturas de pequenos animais**. 4. Ed. Barueri: Manole, 2009, cap. 18, p.637-717.

QUINN, M.; KEULER, N. S.; YAN LU; FARIA M. L. E.; MUIR, P.; MARKEL, M. D. Evaluation of agreement between Numerical Rating Scales, Visual Analogue Scoring Scales, and Force Plate Gait Analysis in dogs. **Veterinary Surgery**, Stuttgart, v. 1, n. 36, p. 360-367, 2007.

REIF, U.; PROBST, C. W. Comparison of tibial plateau angles in normal and cranial cruciate deficient stifles of Labrador Retrievers. **Veterinary Surgery**, Philadelphia, v. 32, p. 385, 2003.

ROCHA, A. G. **Uso simultâneo das técnicas de avanço e transposição da tuberosidade da tíbia para tratamento de ruptura do ligamento cruzado cranial associado à luxação patelar em cães**. 2012. 59 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2012.

ROCHA, A. G.; MORATO, G. O.; LIMA, C. G. D.; PADILHA FILHO, J. G. Use of autogenous cortico-cancellous bone graft as a spacer device in a novel tibial tuberosity advancement procedure. Surgical technique, and results in 23 dogs. In: **ESVOT Congress, 16., 2012, Bolonha. Proceedings...**Bologna: European Society of Veterinary Orthopaedics and Traumatology, 2012. P.454 – 455.

ROOS, M. V.; CAMISA JÚNIOR, A.; MICHELIN, A. F. Procedimentos de um banco de ossos e a aplicabilidade dos enxertos por ele proporcionados. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v. 8, n. 3, p. 122-127, 2000.

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

SILVA, N. C.; DUARTE, C. R.; BARROZO, A. S. Effects of dehydration methods on quality characteristics of yellow passion fruit coproducts. **Journal of the Science of Food and agriculture**, 2017.

STEVENSON, S. Enhancement of fracture healing with autogenous and allogeneic bone grafts. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, New York, v. 355, suppl., p. S239-S246, 1998.

TEPIC, S.; DAMUR D. M.; MONTAVON, P. M. Biomechanics of the stifle joint. In: **WORLD ORTHOPEDIC VETERINARY CONGRESS, 1., Munich. Proceedings...** Munich, 2002. p.189–190.

TEPIC, T. Cranial tibial tuberosity advancement for cruciate deficient stifle. In: **WORLD VETERINARY ORTHOPEDIC CONGRESS, 2.**, 2006, Keystone, **Proceedings...** Keystone, 2006, p.44 – 45.

TOMFORD, W. W.; DOPPELT, S. H.; MANDIN, H. J.; FRIEDLAENDER, G. E. 1983 bone bank procedures. **Clinical Orthopaedics Related Research**, Philadelphia, n. 174, p. 15-21, 1983.

VASSEUR, P. B. Articulação do joelho. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 3. ed. Barueri: Manole, 2007. cap. 147, p. 2090 – 2157.

VULCANI, V. A. S.; MACORIS, D. G.; PLEPIS, A. M. G. Membranas biológicas homólogas preservadas em solução alcalina seguida de liofilização, glicerina a 98% e por liofilização para implantação em eqüinos. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 5, 2008.

WANG, H.; JING, C.; LUO, C.; LIU, C.; HU, M. An experimental study on segmental defects reconstruction of canine mandible with allogenic bone marrow mesenchymal stem cells combined with lyophilized bone. **Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi**, Beijing, v. 50, n. 12, p. 720- 724, 2015.

WEIGEL, J. P. Enxerto ósseo. In: BORJAB, M. J. **Mecanismos da moléstia na cirurgia de pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1996. p. 791-798.

WILKE, V. L.; CONZEMIUS, M. M. G.; BESANCON, M. F.; EVANS, R. B.; RITTER, M. Comparison of tibial plateau angle between clinically normal greyhounds and labrador retrievers with and without rupture of the cranial cruciate ligament. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 221, n.10, p. 1426 - 1429, 2002.

WOLF, R. E.; SCAVELLI, T. D.; HOELZLER, M. G.; FULCHER, R. P.; BASTIAN, R. P. Surgical and postoperative complications associated with tibial tuberosity advancement for cranial cruciate ligament rupture in dogs: 458 cases (2007-2009). **Journal of the American Veterinary Medical Association**. Schaumburg, v. 240, n. 12, p. 1481-1487, 2012.

ZILIOOTTO, L.; DALECK, C. R.; PADILHA FILHO, J. G.; SOUZA, A. P.; FANTINATTI, A. P.; DINIZ, P. P. V. P. Utilização de implante ósseo cortical alógeno conservado em glicerina para preservação de membro torácico: estudo experimental em cães. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 107-115, 2003.