



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ALOENXERTOS ÓSSEOS E ENXERTO SINTÉTICO DE HIDROXIAPATITA EM
FALHA ÓSSEA ULNAR EM GALINHAS (*Gallus gallus domesticus*)

BERNARDO SCHMITT

PORTO ALEGRE

2018



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

ALOENXERTOS ÓSSEOS E ENXERTO SINTÉTICO DE HIDROXIAPATITA EM
FALHA ÓSSEA ULNAR EM GALINHAS (*Gallus gallus domesticus*)

BERNARDO SCHMITT

Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor em Ciências
Veterinárias, na área de concentração
Morfologia, Cirurgia e Patologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Meller Alievi

PORTO ALEGRE

2018



BERNARDO SCHMITT

ALOENXERTOS ÓSSEOS E ENXERTO SINTÉTICO DE HIDROXIAPATITA EM
FALHA ÓSSEA ULNAR EM GALINHAS (*Gallus gallus domesticus*)

Aprovado em 27 de Março de 2018.

APROVADO POR:

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

Dra. Aline Silva Gouvêa (UFRGS)
Membro da Comissão

Dra. Fernanda Silveira Nóbrega
Membro da Comissão

Prof. Dr. Márcio Poletto Ferreira (UFRGS)
Membro da Comissão

CIP - Catalogação na Publicação

Schmitt, Bernardo

ALOENXERTOS ÓSSEOS E ENXERTO SINTÉTICO DE
HIDROXIAPATITA EM FALHA ÓSSEA ULNAR EM GALINHAS
(GALLUS GALLUS DOMESTICUS) / Bernardo Schmitt. --
2018.

49 f.

Orientador: Marcelo Meller Alievi.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,
BR-RS, 2018.

1. biomecânica. 2. consolidação óssea. 3. nitrogênio
líquido. 4. placa bloqueada. 5. aves. I. Meller
Alievi, Marcelo, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Agradecimentos

A minha esposa Tainã e filha Helena pelo apoio, incentivo, compreensão e amor incondicional! Amo vocês!

Aos meus pais Arnaldo e Iara pelo longo investimento na minha carreira profissional, e pelo total apoio que me dão até hoje.

Aos meus colegas pela amizade, carinho e zueiras que serão levados a toda vida.

Ao meu orientador Marcelo pela confiança, empenho, amizade e aprendizado dedicado a esses 4 anos.

A TODOS MEU MUITO OBRIGADO!!!

Resumo

A utilização de enxertos ósseos vem aumentando bastante em pequenos animais, entretanto, em aves esta utilização é menor devido à dificuldade de conseguir autoenxerto em quantidades adequadas. Sendo assim, o objetivo do projeto foi avaliar três tipos de enxertos em aves. Foram utilizadas 30 galinhas separadas em três grupos: grupo aloenxerto congelado em ultrafreezer (GUF) por duas semanas; grupo aloenxerto congelado em nitrogênio líquido (GNL) e grupo enxerto sintético de hidroxiapatita deficiente em cálcio (GHA). Os enxertos foram aplicados em defeito ósseo de aproximadamente 20mm na ulna das aves e fixados ao leito receptor com uma placa e quatro parafusos bloqueados. Os animais foram acompanhados por meio de avaliação clínica, radiográfica, histológica e biomecânica. A consolidação radiográfica ocorreu em 90% nos animais do GNL, 70% nos do GUF e 60% nos do GHA, com média de $47,14 \pm 13,50$ dias no GUF, $61,67 \pm 21,79$ dias no GNL e aos $70 \pm 18,17$ dias no GHA, havendo diferença significativa entre o GUF e GHA. Histologicamente os enxertos do GUF apresentavam-se em processo de consolidação mais avançada, com remodelação óssea e a presença de osteoclastos. Na avaliação clínica todas as ulnas operadas tinham estabilidade, sem sinal de inflamação/contaminação, articulações preservadas, sem dor e sem desvios angulares graves na asa. Na análise biomecânica houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o GNL e o GHA na resistência, já na avaliação de flexão máxima, observou-se diferença estatística entre o GHA e o GNL e entre o GHA e o GUF. Sendo assim, é possível concluir que os três enxertos testados podem ser utilizados em defeitos ósseos em aves, mas o melhor deles foi o GNL por apresentar mais vantagens na preparação, confecção, aplicação dos enxertos e resistência biomecânica, com maior taxa de consolidação óssea.

Palavras-chave: biomecânica, nitrogênio líquido, placa bloqueada, consolidação óssea, aves.

Abstract

The use of bone grafts is increasing considerably in small animals, however, in poultry this use is less due to the difficulty of obtaining autograft in adequate quantities. Therefore, the objective of the project was to test three types of grafts, evaluating their best results over a period of 90 days. For this purpose, 30 chickens were divided into three groups: frozen ultra freezer allograft group (UFG) for two weeks; allograft frozen in liquid nitrogen group (LNG) and synthetic grafts of calcium deficient hydroxyapatite group (HAG). Grafts were applied to a bone defect of approximately 20 mm in the ulna of birds, in all three groups the grafts were fixed to the recipient bed with plates blocked and 4 screws locked. The animals were followed up by serial radiographs, histological examination, clinical orthopedic evaluation and biomechanical flexion assay. Radiographic consolidation occurred in 90% of the LNG, 70% in the GUF and 60% in the GHA, mean of 47.14 ± 13.50 days without UFG, 61.67 ± 21.79 days non LNG and at 70 ± 18.17 days without HAG, with a significant difference between UFG and HAG. Histologically, UFG grafts were in a more advanced consolidation process, presenting bone remodeling with a presence of osteoclasts. In the clinical review, all of them were operated with stability, with no sign of inflammation / contamination, preserved joints, no pain and no angular deviations, graves in the nail. In the biomechanics, there was a significant difference ($p < 0.05$) between LNG and HAG in the resistance, already in the evaluation of maximum flexion, it was observed statistical difference not HAG with LNG and HAG with UFG grafts. Thus, it is possible to conclude that the three grafts tested are feasible to be used in bone loss in birds, where the LNG was superior because it presented more advantages in the preparation, preparation and application of the grafts, presenting a higher rate of bone consolidation.

Keywords: biomechanics, liquid nitrogen, lock plate, bone healing, chickens

LISTA DE FIGURAS

Artigo 1

Figura 1 – Aspecto de consolidação radiográfica dos enxertos após 90 dias de PO. Em A – B, grupo NL; em C – D, grupo UF e E – F, grupo HA.....24

Figura 2 – Avaliação histológica dos enxertos. Em A, transição enxerto/osso GNL (seta preta); em B, transição enxerto/osso GHA (seta preta); em C, transição enxerto/osso GUF (seta preta); em D, osteoclasto do GUF (seta preta).....26

Artigo 2

Figura 1 – Procedimento cirúrgico para implantação dos enxertos. Em A, exposição da diáfise ulnar; em B, ostectomia (defeito ósseo); em C, aspecto final do aloenxerto implantado na ulna; em D, aspecto final do enxerto HADC aplicado na ulna.....38

Figura 2 – Ensaio Biomecânico dos enxertos. Em A, ensaio de flexão; em B, detalhe do ensaio de flexão do GUF; em C, corpo de prova rompido após fim de ensaio de flexão.....39

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1 – Aparência radiográfica da interface enxerto/osso proximal e distal com escore de pontos. Baseada na tabela de Ehrhart et al. (2005).....22

Artigo 2

Tabela 1- Média e desvio padrão da resistência (em Newtons) dos GUF (grupo ultrafreezer) GNL (grupo nitrogênio líquido) e GHA (grupo hidroxiapatita) no ensaio de flexão avaliando membro sem enxerto e o membro com enxerto.....40

Tabela 2 – Avaliação biomecânica de flexão máxima em milímetros entre os GUF (grupo ultrafreezer) GNL (grupo nitrogênio líquido) e GHA (grupo hidroxiapatita) avaliando membro sem enxerto (SE) e o membro com enxerto (CE), com média e desvio padrão.....41



LISTA DE ABREVIATURAS

AST	Aspartato Aminotransferase
BID	Duas Vezes ao Dia
Ca/P	Cálcio/Fósforo
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
CONCEA	Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal
CPK	Creatina Fosfoquinase
GHA	Grupo Hidroxiapatita
GNL	Grupo Nitrogênio Líquido
GUF	Grupo Ultrafreezer
HADC	Hidroxiapatita Deficiente em Cálcio
HCV	Hospital de Clínicas Veterinárias
IM	Intramuscular
IV	Intravenosa
KN	Quilo Newton
mg.kg ⁻¹	Miligramas por Quilo
mm/min.	Milímetro por minuto
PO	Pós-Operatório
SC	Subcutânea
SID	Uma Vez ao Dia
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
α- TCP	Alfa-Fosfato Tricálcico



Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Fraturas em aves.....	13
2.2 Tratamento das fraturas.....	13
2.3 Utilização de enxertos ósseos em aves.....	14
2.3.1 Aloenxerto ósseo em aves.....	14
2.3.2 Enxertos ósseos sintéticos.....	15
2.3.3 Hidroxiapatita deficiente em cálcio (HADC).....	15
2.4 Ensaio biomecânicos.....	16
2.4.1 Ensaio de flexão.....	16
3. ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	18
3.1 Artigo 1:.....	18
Aloenxertos ósseos <i>versus</i> enxerto sintético de hidroxiapatita deficiente em cálcio na falha óssea ulnar em <i>Gallus gallus domesticus</i> (aspectos radiográficos, histológicos)	Erro! Indicador não definido.
3.2 Artigo 2:.....	33
Aloenxertos ósseos <i>versus</i> enxerto sintético de hidroxiapatita deficiente em cálcio na falha óssea ulnar em <i>Gallus gallus domesticus</i> (aspectos clínicos e biomecânicos)..	Erro! Indicador não definido.
4. CONCLUSÕES.....	46
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

1. INTRODUÇÃO

Enxertos ósseos alógenos são utilizados corriqueiramente na rotina cirúrgica em medicina. A necessidade de formatos específicos e de grandes quantidades de material biológico faz com que o uso de banco de ossos seja mais adequado na maioria das situações, sendo mantido e financiado pelo Hospital, gerando grandes despesas e trabalho com a manutenção, coleta e preparação desses enxertos. A utilização de enxertos se estendeu para medicina veterinária principalmente na rotina de pequenos animais, sendo grande desafio a utilização em aves. Há dificuldade de obtenção de autoenxertos no formato e quantidades adequadas, devido à baixa quantidade de osso esponjoso disponível e em virtude da presença de ossos pneumáticos com cortical fina e canal medular espesso.

A grande alternativa da enxertia em aves é a utilização dos aloenxertos e enxertos sintéticos. Fraturas em aves representam um terço dos atendimentos realizados, 50% destas fraturas são cominutivas, muitas delas com perdas ósseas significativas, justificando a importância da utilização de enxertia em fraturas com perdas ósseas expressivas em aves. O objetivo do presente trabalho é testar dois tipos de aloenxertos e um enxerto sintético de HADC em falha óssea de ulna em *Gallus gallus domesticus*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fraturas em aves

Os ossos apresentam características elásticas e anisotrópicas o que faz com que as propriedades físicas sejam diferentes conforme a direção das forças exercidas até o ponto de quebra. A anatomia diferenciada das aves, com presença de ossos pneumáticos, onde as corticais são mais finas, frágeis e com pouca cobertura de tecidos moles agravam o quadro de fraturas nessa espécie (Schwarz, 1996; Helmer e Redig, 2006; Dalmolin, 2013).

Dentro das possíveis causas de fraturas estão relacionadas principalmente à interação humana, com a colocação de obstáculos como fios elétricos, fios de telefone, grades, cercas, varais, vidros que refletem árvores ou outras barreiras físicas que impedem o voo, provocando trauma. Essas lesões também podem ser causadas por atropelamento ou interação animal relacionada à caça/presa. Como na maioria dos casos esses traumas são de alto impacto, promovem fraturas múltiplas ou cominutivas com perda óssea expressiva, necessitando a utilização de enxertos corticais para manter o tamanho do osso e principalmente a funcionalidade do membro para que essas aves voltem a utilizá-los (Bolson et al., 2005; Tunio et al., 2015).

2.2 Tratamento das fraturas

O tratamento de fraturas em aves tem promovido resultados diversos, os quais são atribuídos às variações no tamanho, no peso, na conformação das aves, à anatomia óssea única, à alta incidência de fraturas complexas e às diferenças de função entre espécies e indivíduos (Williams et al., 1987). As principais diferenças nas aves são a presença de ossos pneumáticos onde as corticais são mais finas e frágeis com pouco osso esponjoso, dificultando a estabilização dos implantes. A baixa cobertura de tecidos moles aumenta a incidência de fraturas expostas provocando danos aos nervos bem como ao aporte sanguíneo na região da fratura. Os princípios ortopédicos básicos são mantidos em aves como fixação rígida, alinhamento anatômico, retorno precoce à função e baixa morbidade. Os aparatos utilizados em osteossínteses em aves são muito variados, desde pinos

intramedulares, fixadores externos, fixadores circulares até a utilização de placas compressivas, neutras ou bloqueadas (Helmer e Redig, 2006).

2.3 Utilização de enxerto ósseo autógeno em aves

O uso de enxertia já é técnica comum em medicina veterinária, porém, em aves são apresentadas algumas limitações como a dificuldade de se obter enxerto autógeno (Sanaei et al., 2015). As técnicas de osteossíntese e os implantes a serem utilizados devem ser cuidadosamente empregados a fim de não comprometer nem quebrar o enxerto (Barboza et al., 2012; Maccoy e Haschuck, 1988).

Conforme Jones e Redig (2001), assim como em mamíferos, o uso de enxerto autógeno em aves pode causar hemorragias, dor, perda da função no local de obtenção do enxerto, além da necessidade de anestesia mais prolongada. Outro fato a se considerar é que as aves possuem pequenas áreas de osso esponjoso, sendo muitas vezes insuficientes para a obtenção de volume necessário para o preenchimento dos defeitos ósseos.

2.3.1 Aloenxerto ósseo em aves

O uso de aloenxerto nessa espécie ainda apresenta viabilidade limitada, pelo fato de haver relatos de reações inflamatórias graves nas áreas enxertadas e algumas técnicas de osteossíntese não contribuírem para que ocorra a estabilidade do enxerto ao osso do receptor (Maccoy e Haschuck, 1988).

O material que deve ser utilizado como enxerto ósseo alógeno necessita ser inerte para não gerar reações inflamatórias indesejadas, não causar modificações físicas no tecido e não provocar rejeição. Também necessita-se obter material na quantidade e na forma necessária para preencher o defeito ósseo. Além disso, deve fornecer resistência mecânica, ter preparo simples, baixo custo, com fácil estocagem e transporte (Barboza et al., 2012).

2.3.2 Enxertos ósseos sintéticos

Cimentos a base de fosfatos de cálcio tem sido utilizado como enxerto ósseo com percentual de sucesso grande nesta última década. É promissora a utilização nas áreas de odontologia, cirurgia bucomaxilofacial e ortopedia (Volkmer, 2011). Atualmente, o fosfato tricálcico é um dos fosfatos de cálcio mais frequentemente utilizados como biomateriais devido à biocompatibilidade, bioatividade *in vivo*, biorreabsorbilidade e osteocondutividade (Eslaminejad et al., 2013; Leucht et al., 2013; Stefanic et al., 2013).

Nos últimos anos, o fosfato de cálcio, especialmente fosfato tricálcico e hidroxiapatita, tem atraído interesse como substitutos ósseos. O fosfato de cálcio é um substituto ósseo muito utilizado na engenharia de tecidos, devido à sua similaridade química com a parte mineral dos ossos (Dorozhkin, 2011; Bhatt et al., 2012).

Eles são mais biocompatíveis que muitas outras biocerâmicas e partículas inorgânicas. Sua biocompatibilidade e ampla faixa de relação cálcio e fósforo (Ca/P) os tornam aplicáveis a uma série de situações distintas devido a diferentes propriedades superficiais, funcionalidade e taxas de dissolução, podendo ser usados como coberturas de implantes metálicos, cimentos, blocos, *scaffolds* que são blocos porosos que auxiliam na deposição de células ósseas quando enxertado em fraturas (Bose e Tarafder, 2012).

2.3.3 Hidroxiapatita deficiente em cálcio (HADC)

Existe especial interesse no alfa-fosfato tricálcico (α -TCP) em virtude da sua modificação ocorrer durante a consolidação inicial, reagindo ao pH do tecido vivo e se transformando em hidroxiapatita deficiente em cálcio (HADC), similar à hidroxiapatita óssea. Dessa forma, a HADC favorece o crescimento ósseo no local, estabelecendo ligações de natureza química com o tecido ósseo, promovendo excelente biocompatibilidade, caracterizada pela osteocondutividade (Yuan et al., 2005).

2.4 Ensaios biomecânicos

Ensaios mecânicos tem o objetivo de determinar as propriedades dos materiais. Existem basicamente dois tipos de ensaios: os destrutivos e os não destrutivos. Os destrutivos provocam a ruptura ou inutilização do material. Neste grupo destacam-se os ensaios de tração, impactação, flexão, torção, fadiga e compressão. Nos não destrutivos, utilizam-se o raios-x e ultrassom, por exemplo, para determinar propriedades físicas ou mecânicas (Souza, 1974; Amendola et al., 2008). As leis de Newton e Hooke formam a base da mecânica dos objetos elásticos. O comportamento mecânico do osso em situações fisiológicas é similar ao comportamento mecânico de um objeto elástico, mas apresenta anisotropia o que significa que as propriedades mecânicas não são iguais em todas as direções, sendo essa uma característica do osso cortical (Cowin, 1999).

Quando a força é aplicada causando a deformação e em seguida é removida, o objeto reassume posição e conformação original, denomina-se “deformação elástica”. Quando a carga é aplicada até o ponto em que o objeto não é capaz de reverter sua forma original, tem-se o “ponto de quiescência”, sendo essa deformação permanente denominada “deformação plástica”. Com a continuidade da aplicação da carga, obtém-se o “ponto de fratura” (Schwarz, 1996; Dalmolin et.al, 2013).

2.4.1 Ensaio de flexão

O ensaio de flexão é o mais importante em biomecânica, pois provoca encurvamento de um corpo de prova até sua ruptura, fornecendo dados quantitativos de deformação e força da amostra testada (Cordey, 2000). No ensaio de flexão em três pontos é utilizado uma barra apoiada em dois pontos equidistantes extremos com aplicação de carga no centro da distância entre os apoios, ou seja, existem três pontos de carga (Garcia et al., 2000).

Currey (2003) demonstrou que quanto maior o teor de elementos minerais, menor o módulo de elasticidade, ou seja, maior a rigidez do osso. Porém, observou-se que o aumento da rigidez torna o osso mais frágil e susceptível a pequenas fissuras. Sugere ainda,

que o conteúdo mineral seja o principal determinante das diferenças observadas nas propriedades mecânicas entre os ossos.

3. ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os materiais e métodos aplicados, os resultados e as discussões da pesquisa serão a seguir apresentados em dois artigos científicos.

Os artigos foram confeccionados conforme as regras do periódico **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** (Qualis A2).

3.1 Artigo 1:

Aloenxertos ósseos e enxerto sintético de hidroxiapatita em falha óssea ulnar em galinhas (*Gallus gallus domesticus*), aspectos radiográficos e histológicos

Bone allografts and synthetic grafts hydroxyapatite on ulnar bone defect in fowl (*Gallus gallus domesticus*), radiographic and histological aspects

Resumo

Dos atendimentos ortopédicos realizados em aves no HCV-UFRGS, 86% são fraturas, sendo que aproximadamente 30% delas são cominutivas com perda óssea expressiva, justificando a importância da utilização de enxertos em fraturas de aves. O objetivo deste trabalho foi avaliar dois aloenxertos e enxerto sintético de hidroxiapatita em defeito ósseo de galinhas. Utilizou-se 30 galinhas separadas em três grupos: aloenxerto congelado em ultrafreezer (GUF), aloenxerto congelado em nitrogênio líquido (GNL) e enxerto sintético de hidroxiapatita deficiente em cálcio (GHA). Nos três grupos os enxertos foram aplicados com placas e parafusos bloqueados de 2 mm na ulna direita das aves, avaliando a evolução por meio de exames radiográficos até completar 90 dias de pós-operatório e o resultado final com exame histológico. A média e desvio padrão relacionando o tempo de consolidação óssea radiográfica foram: GNL 61,67±21,79 dias (90% de consolidação), GUF 47,14±13,50 dias (70% de consolidação) e GHA 70±18,17 dias (60% de consolidação). Houve diferença significativa no tempo de consolidação óssea entre o GUF e o GHA. Histologicamente, os enxertos do GUF foram os que estavam em consolidação mais avançada. Os aloenxertos do GNL foram superiores no preenchimento de falha óssea ulnar de galinhas.

Palavras-chave: biomecânica, nitrogênio líquido, placa bloqueada, consolidação óssea, aves.

Abstract

Of the orthopedic visits performed in bird on HCV-UFRGS, 86% are fractures, and approximately 30% of them are comminuted with expressive bone loss, justifying the importance of the use of grafts in bird fractures.

The objective of this work was to test two allografts and a synthetic HADC graft on finishing in *Gallus gallus domesticus*. It used 30 laying hens in three groups: frozen allograft in ultrafreezer (UFG); frozen allograft in liquid nitrogen (LNG); calcium deficient synthetic hydroxyapatite graft (HAG). The three graft groups were exposed to serial radiographs until the 90 postoperative days, as well as the histological examination at the end of the experiment. were: LNG 61.67 ± 21.79 days (90% consolidation), UFG 47.14 ± 13.50 days (70% consolidation) and HAG 70 ± 18.17 days (60% consolidation). There was a significant difference in bone healing time between GUF and GHA. Histologically, GUF grafts were the ones that were in the most advanced consolidation. LNG allografts were superior in filling ulnar bone failure of fowl.

Keywords: biomechanics, liquid nitrogen, lock plate, bone healing, chickens.

INTRODUÇÃO

As fraturas podem representar até 70,3% de todos os atendimentos realizados na clínica de aves, e as principais causas são por obstáculos impostos pelo homem, como fios elétricos e telefônicos, vidros, espelhos, varais e grades. Tunio et al., (2015) observaram que as fraturas com grandes perdas ósseas são os maiores problemas na clínica de aves. Na correção das fraturas em aves, os princípios ortopédicos básicos também se aplicam, como fixação rígida, alinhamento anatômico, retorno precoce à função e mínima manipulação dos tecidos (Helmer e Redig, 2006).

A presença de ossos pneumáticos onde as corticais são mais finas e frágeis com pouco osso esponjoso, dificulta a estabilização com implantes. A baixa cobertura de tecidos moles aumenta a incidência de fraturas expostas causando danos aos nervos e ao aporte sanguíneo na região da fratura (Helmer e Redig, 2006).

A utilização de enxertia óssea é técnica consagrada em veterinária, porém em aves, existem algumas limitações importantes como a dificuldade de se obter enxerto autógeno (Sanaei et al., 2015). O material que pode ser utilizado como enxerto ósseo alógeno necessita ser inerte para não gerar reações inflamatórias indesejadas, não causar modificações físicas no tecido e não provocar rejeição. Também necessita-se obter material na quantidade e na forma necessária para preencher o defeito ósseo. Além disso, o

aloenxerto deve fornecer resistência mecânica, ter preparo simples, baixo custo, fácil estocagem e transporte (Barboza et al., 2012; Maccoy e Haschuck, 1988).

O ultrafreezer é um método consagrado de inativação e estocagem de enxertos, pois apresenta temperatura de -80 graus Celsius. Possuem controle de temperatura, alarme (quando ocorre oscilações bruscas de temperatura) e normalmente é ligado ao gerador do hospital para eventuais quedas de energia. Em condições ideais e em temperatura constante, os tecidos podem ficar estocados por um período de até cinco anos, de acordo com as normas da Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e da AATB (*American Association of Tissue Banks*) (Alencar e Vieira, 2010).

A utilização do nitrogênio líquido promove o congelamento rápido formando o gelo intracelular impedindo a água sair da célula e manter o equilíbrio osmótico, provocando morte celular. O nitrogênio líquido foi utilizado para a desvitalização cirúrgica de aloenxertos corticais em ovinos e apresentou ótimos resultados em relação a taxa de incorporação do enxerto (Albuquerque et al., 2012).

Cimentos a base de fosfatos de cálcio tem sido utilizados como enxertos ósseos com percentual de sucesso grande. Atualmente, o fosfato tricálcico é um dos fosfatos de cálcio mais utilizados como biomaterial devido à sua biocompatibilidade, bioatividade in vivo, biorreabsorbilidade e osteocondutividade (Eslaminejad et al., 2013; Leucht et al., 2013; Stefanic et al., 2013).

O alfa-fosfato tricálcico (α -TCP) é de especial interesse, porque ele se modifica rapidamente pela ação do pH do tecido vivo se transformando em hidroxiapatita deficiente em cálcio (HADC), similar à hidroxiapatita óssea. Dessa forma, a HADC favorece o crescimento ósseo no local, estabelecendo ligações de natureza química com o tecido ósseo. O fosfato de cálcio é um substituto ósseo muito utilizado na engenharia de tecidos, devido à sua similaridade química com a parte mineral dos ossos (Dorozhkin, 2011; Bhatt et al., 2012) e excelente biocompatibilidade, caracterizada por osteocondutividade (Yuan et al., 2005).

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo comparar os enxertos alógenos conservados em ultrafreezer, nitrogênio líquido e o enxerto sintético de HADC no tratamento de falha óssea segmentar diafisária em ulna de galinhas domésticas.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS sob número 32155.

Foram utilizadas 30 galinhas domésticas da raça Leghorn, adultas, com 130 dias de idade, adquiridas de aviário comercial. Elas foram separadas aleatoriamente em 3 grupos com 10 aves em cada, onde no grupo HA foi utilizado enxerto sintético de HADC, no grupo NL utilizado enxerto alógeno inativado em nitrogênio líquido a -195°C e no grupo UF enxerto alógeno inativado em ultrafreezer a -80°C .

No GHA, o enxerto sintético de HADC foi fornecido pelo Laboratório de Engenharia de Biomateriais da UFRGS, tendo sido confeccionado em formato cilíndrico, maciço, pouco poroso e com dimensões de 20mm por 7mm. Para aplicar o enxerto de HADC foi necessário confeccionar dois orifícios fixados com parafusos no centro da placa, sendo empacotado e esterilizado em autoclave. No GNL os aloenxertos foram obtidos a partir de asas de frangos de corte resfriadas e adquiridos em supermercado com Inspeção dos Órgãos de Fiscalização Agropecuária. As asas eram acondicionadas em caixa térmica e trazidas até o Bloco Cirúrgico da Faculdade de Veterinária.

Após, eram lavadas em água corrente, secadas e submetidas a antissepsia com clorexidine 2%. A ulna era acessada cirurgicamente através de incisão lateral, afastando os músculos carpo ulnar, flexor digital profundo e pronador superficial. Com a diáfise ulnar exposta e com auxílio do bisturi ultrassônico era realizada ostectomia de 20 mm de comprimento. Imediatamente após o segmento ósseo removido (aloenxerto) era submerso em nitrogênio líquido (-195°C) por 15 minutos, descongelado a temperatura ambiente por 10 minutos e submerso em solução fisiológica estéril por mais 10 minutos, adaptado da metodologia de Albuquerque (2015).

No GUF as ulnas eram obtidas da mesma forma que no GNL, entretanto, após coletados foram depositados individualmente em dois sacos plásticos vedáveis (um dentro do outro) e, em seguida, levados ao ultrafreezer sendo mantidas congeladas por no mínimo duas semanas a -80°C (Alencar e Vieira, 2010). No dia da sua utilização foi realizado descongelamento durante 10 minutos em solução fisiológica estéril.

Após duas semanas de adaptação e aclimatização, as aves passaram por avaliações pré-cirúrgicas como análise sanguínea, perfil bioquímico e avaliação clínica, sendo

excluídas se houvesse alguma alteração. As aves foram anestesiadas por meio de circuito aberto (Baraka), mantidas intubadas com isoflurano e oxigênio a 100%. Em seguida, as penas da região a ser operada foram removidas, e o local foi submetido a antissepsia com solução de clorexidina 2%. O antibiótico pré-operatório empregado foi enrofloxacina na dose de 5mg/kg/IM.

A diáfise ulnar direita foi acessada por meio de incisão lateral afastando os músculos carpo ulnar, flexor digital profundo e pronador superficial com dois afastadores de Farabeuf. Com auxílio de bisturi ultrassônico foi retirado segmento ósseo com 20 mm de comprimento da região diafisária da ulna. Este defeito produzido foi preenchido com um dos três tipos de enxertos disponíveis após sorteio. Independentemente do grupo, a ulna foi estabilizada com placa bloqueada com 8 furos e os parafusos bloqueados (2mm) foram fixados da seguinte forma: dois parafusos na porção proximal (12mm), dois no enxerto cortical (10mm) e os dois últimos na porção distal da ulna (10mm), totalizando 6 parafusos bloqueados. Restaram dois orifícios vazios na placa, um em cada região de contato entre o osso/enxerto. Em seguida, fez-se a redução do espaço morto com sutura isolada em sultana com mononáilon nº 4-0 e dermorráfia com padrão isolado simples com mononáilon nº 4-0.

No pós-operatório (PO) foi administrado meloxicam (0,5mg/kg/SID/SC/3dias), cloridrato de tramadol (15mg/kg/BID/SC/3dias) e enrofloxacina (5mg/kg/SID/IM/7dias). A limpeza da ferida cirúrgica foi realizada com NaCl 0,9% e gaze a cada 24 horas durante 10 dias, período necessário para a retirada dos pontos. Nos primeiros sete dias de PO a asa operada foi mantida imobilizada com uma atadura elástica em “oito”.

Durante todo o experimento foram registrados em ficha individual se os pacientes estavam se alimentando, tomando água, defecando, se movimentavam a asa operada, se apresentavam algum sinal de dor ou desconforto, se apresentavam aumento de volume (inflamação), necrose ou sínus no local da cirurgia, se existia mobilidade na região da osteossíntese e se o posicionamento da asa estava correto.

Logo após o procedimento cirúrgico os animais foram submetidos a exame radiográfico em dois planos (dorsoventral e laterolateral) da região operada. Este exame foi repetido a cada 15 dias até os 90 dias de PO. Todos os exames radiográficos foram feitos no Setor de Diagnóstico por Imagem do HCV-UFRGS e no mesmo aparelho de raio-x computadorizado com carga padrão. Foram avaliados o posicionamento dos implantes,

observando se havia soltura ou quebra de parafusos, e/ou deformação da placa ou quebra do enxerto. A análise da consolidação radiográfica foi realizada utilizando as informações constantes na Tabela 1.

Tabela 1 – Aparência radiográfica da interface enxerto/osso proximal e distal com escore de pontos. Baseada na tabela de Ehrhart et al. (2005).

Região	Aparência Radiográfica	Escore (pontos)
<i>Interface enxerto/osso proximal</i>	Linha de osteotomia larga	0
	Linha de osteotomia ainda visível	1
	Perda do detalhe da linha de osteotomia	2
	União óssea completa	3
Região	Aparência Radiográfica	Escore (pontos)
<i>Interface enxerto/osso distal</i>	Linha de osteotomia larga	0
	Linha de osteotomia ainda visível	1
	Perda do detalhe da linha de osteotomia	2
	União óssea completa	3

Aos 90 dias de PO os animais foram submetidos a eutanásia com tiopental (50mg/kg/IV) e cloreto de potássio respeitando as diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA e do CFMV. Após o procedimento, as asas foram dissecadas e as ulnas foram removidas e radiografadas com e sem os implantes. Em seguida foram encaminhadas três amostras de cada grupo ao Setor de Patologia Veterinária da UFRGS. Lá foram fixadas em formol tamponado a 10% por um período mínimo de 72 horas, em seguida foram descalcificadas em solução de ácido nítrico a 10% e processadas pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Os cortes histológicos tiveram a espessura de 5 micras e foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE).

As informações quantitativas foram tabuladas no programa Excel para análise estatística. As variáveis quantitativas foram descritas pela média e o desvio padrão quando simétricas. Foram descritas as variáveis categóricas pela frequência e o percentual. Para comparação de variáveis quantitativas utilizou-se o teste de Análise de Variância

(ANOVA) conforme distribuição da variável e o teste-T para variâncias diferentes entre duas amostras. Foram considerados 5% o nível de significância estatística.

RESULTADOS

O tempo médio e desvio padrão dos procedimentos cirúrgicos foi de $42,34 \pm 9,86$ minutos. Além desse período, no GNL acrescia-se 50 minutos em virtude das etapas de desvitalização do enxerto. O GNL apresentou taxa de consolidação radiográfica das interfaces de 90%, enquanto o GUF de 70% e o GHA de 60%. A média e desvio padrão em relação ao tempo de consolidação óssea radiográfica foi de $61,67 \pm 21,79$ dias no GNL, $47,14 \pm 13,50$ dias no GUF e $70 \pm 18,17$ dias no GHA. Houve diferença significativa no tempo de consolidação óssea entre o GUF e GHA. Em três aves do GUF e em uma do GNL foi verificado reabsorção dos aloenxertos e em duas do GHA não houve pega do enxerto.

Radiograficamente o GNL e o GUF tiveram um processo de consolidação muito semelhante com maior radiolucência na região do enxerto quando comparado com as extremidades ósseas do receptor. Já no GHA era observado com maior clareza a região do enxerto dada a sua maior radiopacidade quando comparado ao osso do receptor (figura 1 A – F). Radiograficamente o GUF apresentou consolidação óssea mais precoce, onde dois animais tiveram consolidação com 30 dias de PO.

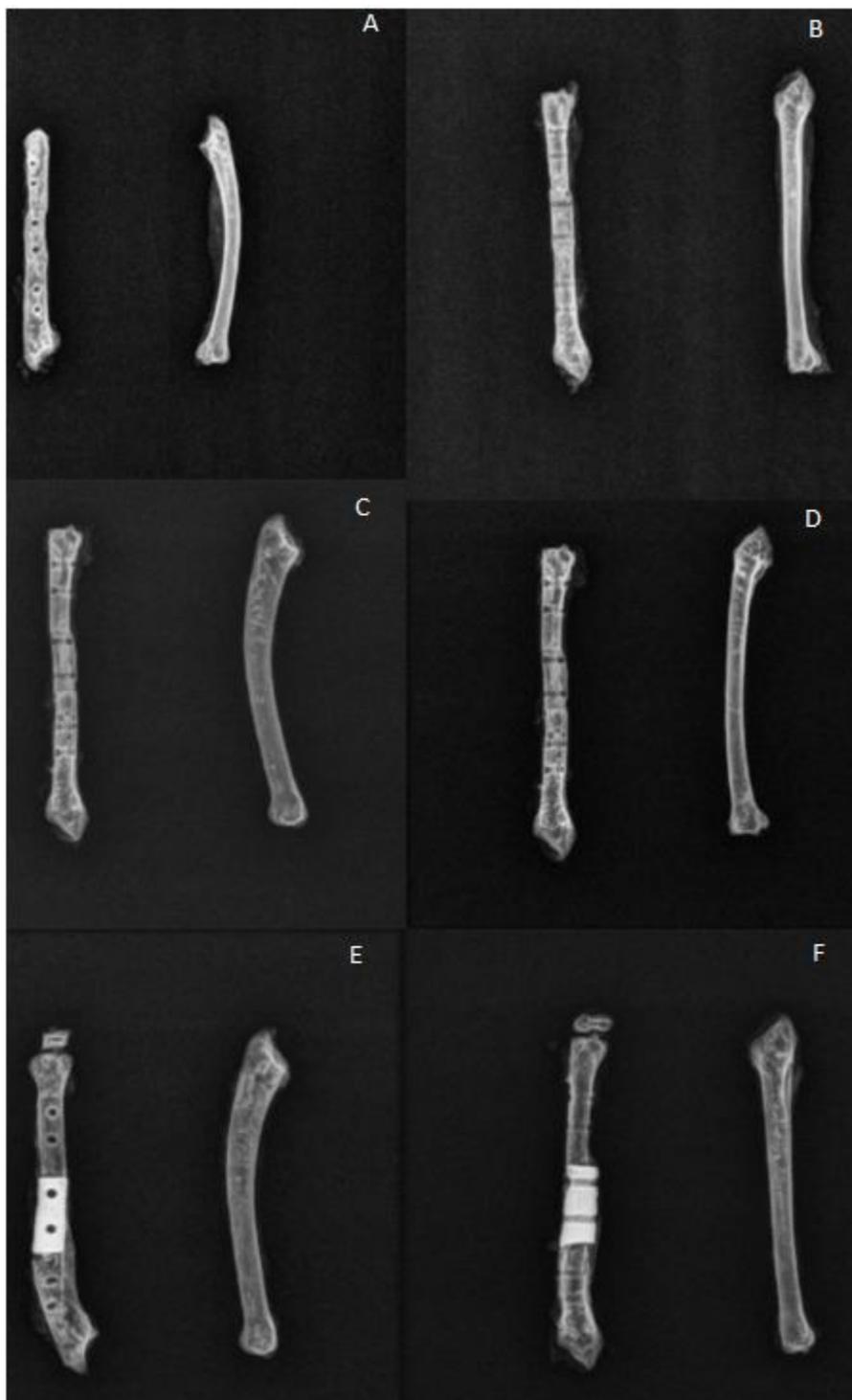


Figura 1 – Aspecto de consolidação radiográfica dos enxertos após 90 dias da cirurgia. A – B, grupo NL; em C – D, grupo UF e E – F, grupo HA.

Histologicamente os enxertos do GNL apresentaram moderada formação de trabéculas ósseas, moderada quantidade de osteoblastos e discreto osteoclastos além de

moderada quantidade de matriz osteoide e tecido conjuntivo fibroso focal acentuado (figura 2A).

No GHA não foi observado histologicamente deposição de células ósseas ao redor do enxerto, apenas nas extremidades com o osso do receptor, sendo o grupo com menor atividade celular. Foi identificado envolvimento parcial do enxerto sintético (material acelular fracamente eosinofílico), discreta formação de trabéculas ósseas, discreta quantidade de osteoblastos e osteoclastos, além de discreta quantidade de matriz osteoide e tecido conjuntivo fibroso discreto adjacente ao periósteo (figura 2B).

Histologicamente os enxertos do GUF foram os que estavam em consolidação mais avançada, apresentando remodelação óssea com acentuada formação de trabéculas, numerosos osteoblastos, acentuada quantidade de matriz osteoide e moderada quantidade de osteoclastos (figura 2 C - D). Nos três grupos, houve junção do enxerto com a ulna dos receptores, tanto radiográfica como histologicamente.

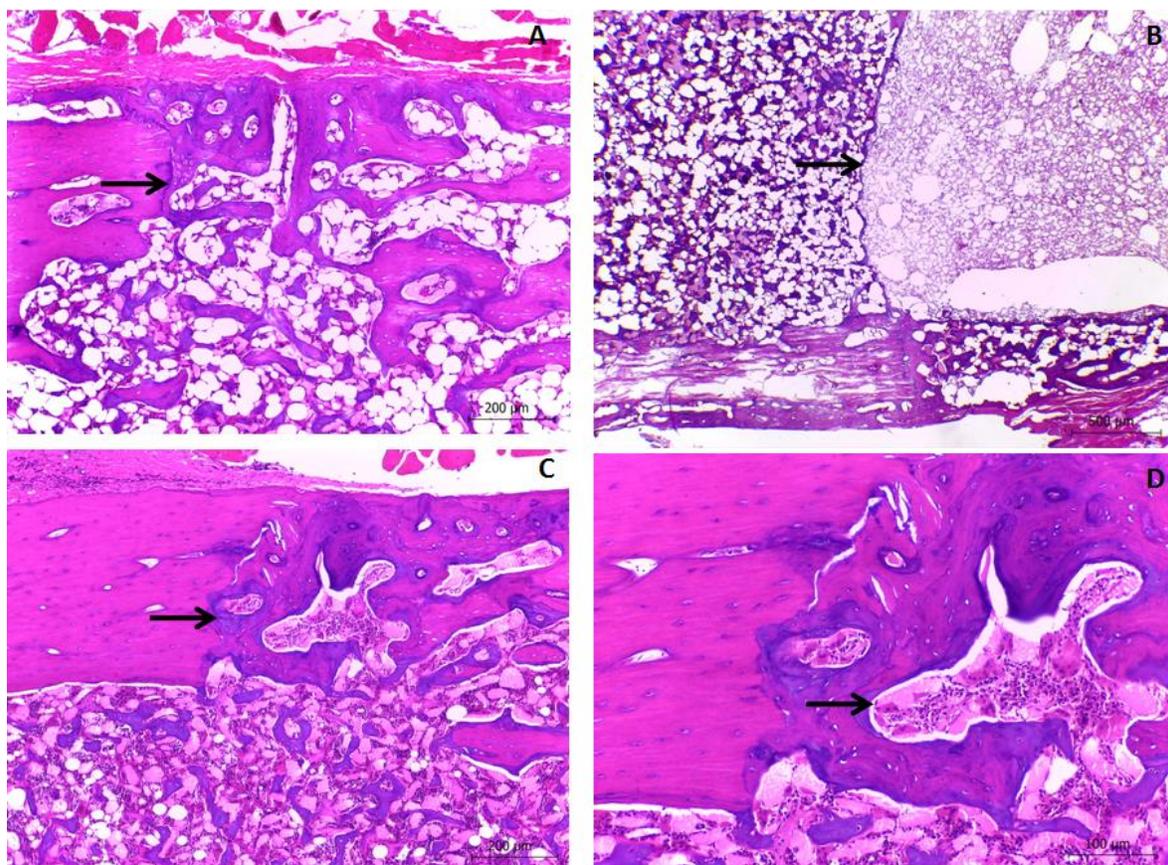


Figura 2 – Avaliação histológica dos enxertos. Em A, transição enxerto/osso GNL (seta preta); em B, transição enxerto/osso GHA (seta preta); em C, transição enxerto/osso GUF (seta preta); em D, osteoclasto do GUF (seta preta).

Os animais operados apresentaram pequena queda na alimentação, na ingestão de água, produção de ovos e na movimentação nos primeiros 3 dias de PO. A bandagem em “oito” foi adequada para restringir o movimento da asa durante a sua permanência, entretanto, houve a necessidade de substituição em alguns animais.

A tabela radiográfica nos auxiliou para avaliar a evolução dos grupos, apresentando dados precisos com intervalos de 15 dias até o fim do experimento. A utilização de escores para indicar a consolidação ou reabsorção do enxerto ajudou bastante para observar atividade nas porções enxerto/osso para depois transformar em dias e aplicar a análise estatística do trabalho.

DISCUSSÃO

A enxertia óssea é técnica consagrada em veterinária, porém em aves é recente e são encontradas limitações como a dificuldade de se obter enxerto autógeno (Sanaei et al., 2015). Por isso, a utilização de aloenxertos ou enxertos sintéticos pode ser solução para tratamento de lesões com perdas ósseas em aves, pois disponibiliza enxerto de tamanho, formato e volume adequados sem causar lesão pela coleta.

O material utilizado como enxerto ósseo alógeno necessita ser inerte, não causar modificações físicas no tecido e não provocar rejeição. Ainda, necessita possuir forma e volume suficiente para preencher o defeito ósseo, além de fornecer resistência mecânica, ter preparo simples, baixo custo e fácil estocagem e transporte (Barboza et al., 2012). Em todos estes quesitos os aloenxertos do GNL foram os que mais se destacaram devido à facilidade de aquisição (ave comercial), processamento e aplicação no dia da coleta, além de ter baixo custo, não precisar de local para estocagem e ainda obter altas taxas de consolidação óssea.

Fosfato tricálcico e hidroxiapatita tem atraído interesse como substitutos ósseos por serem mais biocompatíveis que muitas outras biocerâmicas e partículas inorgânicas, ter faixa de relação cálcio e fósforo (Ca/P) muito próxima aos ossos, tornando-se mais aplicáveis na enxertia óssea (Bose e Tarafder, 2012). Por este motivo que no GHA foi utilizado o HADC, porém este apresentou consolidação óssea em apenas 60% das interfaces no exame radiográfico. Neste grupo histologicamente foi observado o processo de consolidação em estágio menos avançado (presença de fibrose e discretos osteoblastos e

osteoclastos), o que pode estar relacionado ao enxerto ser maciço, sem canal medular e pouco poroso dificultando e deposição de células envolvidas na consolidação óssea neste enxerto.

Eslaminejad et al. (2013); Leucht et al. (2013) e Stefanic et al. (2013) comentaram que atualmente, o fosfato tricálcico é um dos fosfatos que se bioconvertem em HADC e que podem utilizados como biomateriais devido a alta biocompatibilidade, bioatividade in vivo, biorreabsorbilidade e osteocondutividade. Neste trabalho não foi observado bioatividade nem biorreabsorbilidade, visto que não houve incorporação do enxerto e nem deposição de células ósseas em torno do mesmo, apenas observou-se a pega do enxerto nas suas extremidades. Tais fatos podem estar relacionados com o curto período de observação (90 dias) dado ao fato do enxerto ser maciço, pouco poroso e sem canal medular o que dificultou a fixação das células envolvidas na consolidação óssea, fato que corrobora com Leucht et al. (2013) que afirmaram que a remodelação com integração do enxerto sintético pode levar até anos para que ocorra completamente.

Fossum (2013) afirmou que quanto mais tempo a equipe cirúrgica ficar paramentada maiores são os riscos de contaminação deixando o paciente mais suscetível a infecção. No GNL a equipe cirúrgica precisou ficar mais tempo paramentada antes de começar o procedimento cirúrgico, devido a preparação do aloenxerto, mas, apesar disso não foi verificado em nenhum animal sinais de infecção, demonstrando que o tempo de paramentação não influenciou no resultado deste grupo.

O preparo dos enxertos do GUF foram realizados duas semanas antes da cirurgia para inativar o aloenxerto, o que além de demandar mais custos com a manutenção dos enxertos, implica na necessidade de mobilização de uma equipe cirúrgica para a retirada e preparação dos enxertos. Tudo isso torna o procedimento mais complexo e oneroso, fato corroborado por Alencar e Vieira (2010) que demonstraram que a manutenção de banco de ossos é onerosa e contínua, pois os enxertos têm prazo de validade, há o processo de preparação dos enxertos até a aplicação no paciente, que são períodos críticos e passíveis de contaminação.

Conforme Bose e Tarafder (2012) as partículas inorgânicas das biocerâmicas tem relação cálcio e fósforo muito próximos aos ossos, o que acaba deixando o enxerto com alta dureza, tornando-os mais quebradiços. Este fato foi verificado no GHA tanto no momento

da perfuração para a inserção dos parafusos como no momento da remoção destes para a realização das radiografias *post mortem*.

Histológica e radiograficamente os enxertos do GUF estavam em consolidação mais avançada, apresentando remodelação óssea com a presença moderada de osteoclastos, resultado que concorda com Alencar e Vieira (2010) que citaram que a técnica de congelamento de aloenxertos em ultrafreezer está consagrada desde a década de 70 em humanos, com resultados bons tanto para enxertos ósseos quanto para enxertos de tecidos moles como tendões, meniscos, etc.

Em três aves do GUF e em uma do GNL houve reabsorção dos aloenxertos. Segundo Maccoy e Haschuck (1988) isto pode estar relacionado a reações inflamatórias e técnica de osteossíntese que não contribuem para que ocorra a fixação do enxerto com o osso, fato não verificado no presente trabalho, visto que foram utilizadas placas e parafusos bloqueados que são implantes modernos e com indicação para esses tipos de casos. Ainda, Helmer e Redig (2006) afirmaram que a baixa cobertura de tecidos moles pode provocar danos aos nervos e ao suprimento sanguíneo no acesso cirúrgico ou pela própria fratura que são mais complexas, devido às características dos ossos pneumáticos terem as corticais mais finas e frágeis com pouco osso esponjoso.

CONCLUSÃO

Nos três grupos houve a consolidação óssea, ocorrendo à incorporação do enxerto a ulna receptora, sendo histológica e radiograficamente viável a utilização destes enxertos em aves. Os aloenxertos confeccionados a partir de peças resfriadas de supermercado foram viáveis para a sua obtenção e implantação. Os enxertos do GNL mostraram-se superiores na maioria dos quesitos, sendo a primeira opção de enxertia em aves fraturadas com perdas ósseas importantes.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, P.B. et al. Aloenxerto ósseo cortical desvitalizado com nitrogênio líquido – estudo experimental em ovelhas. **Ciência Rural**, v.45, n.4, p.718-723, 2015.

ALENCAR, P.G.C.; VIEIRA, I.F.V. Banco de Ossos. **Rev. Bras. Ortop.**, v.45, n.6, p. 524-528, 2010.

BARBOZA, C.A.G. et al. Utilização de matriz óssea desmineralizada para reparo de falhas ósseas. **Rev. Odontol. UNESP**, v.41, n.3, p.209-214, 2012.

BHATT, R. A; ROZENTAL, T. D. Bone graft substitutes. **Hand clinics**, v. 28, p. 457–68, 2012.

BOSE, S.; TARAFDER, S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: A review. **Acta Biomaterialia**, v. 8, p. 1401-1421, 2012.

BOLSON, J. et al. Osteossíntese umeral em pombos (Columbalivia) com a utilização de pino intramedular estabilizado externamente por barra acrílica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA ANCLIVEPA, 26º, Salvador, BA. Anais... Salvador: **ANCLIVEPA**, 2005.

DOROZHKIN, S.V. Calcium orthophosphates - Occurrence, properties, biomineralization, pathological calcification and biomimetic applications. **Landes Bioscience**, v. 1, p. 121–164, 2011.

ESLAMINEJAD, M. B.; BORDBAR, S.; NAZARIAN, H. Odontogenic differentiation of dental pulp-derived stem cells on tricalcium phosphate scaffolds. **Journal of Dental Sciences**, v. 8, p. 306–313, 2013.

EHRHARTET, N.P;EURELL, J.A; CONSTABLE, P.D. et al. The effect of host tissue irradiation on large-segment allograft incorporation. **Clinical Orthopaedics Related Research**, n. 435, p. 43-51, 2005.

FOSSUM, T.W. Preparation of the Surgical Team. In: **Small Animal Surgery**. Elsevier, St. Louis, Missouri v. 1, cap. 6, p. 45 – 52, 2013.

HELMER, P., REDIG, P.T. Surgical resolutions of orthopedic disorders. In: HARRISON, G.J., LIGHTFOOT, T.L. **Clinical avian medicine**. Palm Beach. Florida, Spix Publishing Inc., v.2. p. 761-774, 2006.

JONES, R.; REDIG, P.T. Autogenous callus for of a humeral cortical defect in a red-tailed hawk (*Buteojamaicensis*). **Journal Avian Medicine Surgery**, v. 15, p. 302-309, 2001.

LEUCHT, P.; CASTILLO, A. B.; BELLINO, M. J. Comparison of tricalcium phosphate cement and cancellous autograft as bone void filler in acetabular fractures with marginal impaction. **Injury**, v. 44, p. 969–74, 2013.

MACCOY, D.M; HASCHCK, W.M. Healing of transverse humeral fractures in pigeons treated with ethylene oxide-sterilized, dry-stored, onlay cortical xenografts and allografts. **Am. J. Vet. Res**, v. 49,p. 106-111, 1988.

McCARTNEY, W.T. Orthopaedic injuries in pigeons. **Vet. Rec.**, v.134, p.305-307, 1994.

SANAEI, R.; ABU, J.; ZUKI, M.A.B. et al. Evaluation of osteogenic potentials of avian demineralized bone matrix in the healing of osseous defects in pigeons. **Veterinary Surgery**, v. 44, p. 603-612, 2015.

STEFANIC, M.; KRNEL, K.; KOSMAC, T. Novel method for the synthesis of a β -tricalcium phosphate coating on a zirconia implant. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 33, p. 3455–3465, 2013.

TUNIO, A.; JALILA, A., GOB, Y.M. et al. Histologic Evaluation of Critical Size Defect Healing With Natural and Synthetic Bone Grafts in the Pigeon (*Columba livia*) Ulna. **Lawrence**, v. 29, n. 2, p. 106-113, 2015.

VETH, R. et al. Cryosurgery in aggressive, benign, and low-grade malignant bone tumours. **The Lancet Oncology**, v. 6, n. 1, p. 25-34, 2005.

VOLKMER, T. M. Obtenção e caracterização de α -fosfato tricálcico por síntese de combustão e aplicação em cimentos ósseos e arcabouços de criogéis. 2011. 183p. **Tese** (Doutorado em Engenharia de Materiais) – Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, 2011.

WILLIAMS, R., HOLLAND, M., MILTON, J.L. et al. A comparative study of treatment methods for long bone fractures. **Comp. Anim. Pract.**, v.1, p.48-55, 1987.

YAMAMOTO, N.; TSUCHIYA, H.; TOMITA, K. Effects of liquid nitrogen treatment on the proliferation of osteosarcoma and the biomechanical properties of normal bone. **Journal of Orthopaedic Science**, v. 8, n. 3, p. 374-380, 2003.

YUAN, H.; DE GROOT, K. Calcium Phosphate Biomaterials: an Overview. [ed.] R. L. Reis e S. Weiner. Learning from Nature How to Design New Implantable Biomaterials: From Biomineralization Fundamentals to Biomimetic Materials and Processing Routes. **Dordrecht: Kluwer Academic Publishers**, 2005.

3.2 Artigo 2:

Aloenxertos ósseos e enxerto sintético de hidroxiapatita em falha óssea ulnar em galinhas (*Gallus gallus domesticus*), aspectos clínicos e biomecânicos

Bone allografts and synthetic grafts hydroxyapatite on ulnar bone defect in fowl (*Gallus gallus domesticus*), clinical and biomechanical aspects

Resumo

As fraturas em aves são relativamente frequentes e muitas delas possuem indicação de utilização de enxerto ósseo. Apesar de ideais, os autoenxertos ósseos são pouco utilizados em virtude do baixo volume disponível, principalmente em aves. Sendo assim, podem ser utilizados os aloenxertos, porém pouco estudados nesta espécie. O objetivo foi testar dois aloenxertos sob duas formas de preparação e um enxerto sintético. Foram utilizadas 30 galinhas poedeiras separadas em três grupos: aloenxerto congelado em ultrafreezer (GUF); aloenxerto congelado em nitrogênio líquido (GNL); e enxerto sintético de hidroxiapatita deficiente em cálcio (GHA). Nos três grupos dos enxertos foram aplicadas na ulna direita e fixados com placas e parafusos bloqueados de 2 mm. Na avaliação clínica todas as ulnas estavam estáveis, sem sinal de inflamação ou contaminação. Na avaliação biomecânica houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os enxertos do GNL e o GHA. Na flexão máxima em milímetros (mm), observou-se diferença estatística entre os enxertos do GNL e do GHA e entre os enxertos do GUF e do GHA. Sendo assim, podemos dizer que os três enxertos testados podem ser utilizados em fraturas com perdas ósseas em aves, entretanto, o GNL mostrou-se superior por apresentar mais resistência biomecânica e maior taxa de incorporação óssea.

Palavras-chave: biomecânica, nitrogênio líquido, placa bloqueada, consolidação óssea, aves.

Abstract

Fractures in birds are relatively frequent and many of them have an indication of the use of grafts. Although ideal, bone autografts are poorly utilized because of the low available volume. Thus, allografts can be used, but these still lack research. From this were the present project aimed to test two allografts under two forms of preparation and a synthetic graft. Thirty separate laying hens were used in three groups: frozen ultra freezer allograft (UFG); frozen allograft in liquid nitrogen (LNG); calcium deficient synthetic hydroxyapatite graft (HAG). In the three groups of grafts were applied to the right ulna and fixed with plates and screws locked 2 mm. In clinical evaluation, all ulna operated had stability, with no sign of inflammation / contamination. In the biomechanic aevaluation there was a significant difference ($p < 0.05$) between LNG grafts and GHA. At maximum

flexion in millimeters (mm), a statistical difference was observed between LNG grafts with GHA grafts and between GUF and GHA grafts. Thus, we can say that the three grafts tested can be used in fractures with bone losses in fowl, however, LNG was superior because it presented more biomechanical resistance and a higher rate of bone incorporation.

Keywords: biomechanics, liquid nitrogen, lock plate, bone healing, chickens.

INTRODUÇÃO

Fraturas representam 30% dos atendimentos em clínica de aves, e suas principais causas estão relacionadas principalmente com a interação humana, devido à colocação de obstáculos ou a relação caça/caçador. Na maioria dos casos esses traumas são de alto impacto, com fraturas múltiplas ou cominutivas e com frequência há perda óssea (Tunio et al., 2015), necessitando a utilização de enxertos corticais para manter o tamanho do osso e, principalmente, manter a funcionalidade do membro (Bolson et al., 2005). O uso de enxertia já é uma técnica comum em medicina veterinária, porém em aves são apresentadas algumas limitações como a dificuldade de se obter enxerto autógeno (Sanaei et al., 2015).

A presença de ossos pneumáticos, onde as corticais são mais finas e frágeis com pouco osso esponjoso, fazem da estabilização dos implantes grande desafio para o cirurgião ortopédico. Outro aspecto importante está relacionado à baixa cobertura dos ossos por tecidos moles, o que justifica a alta frequência de fraturas expostas provocando danos nervosos e vasculares (Helmer e Redig, 2006).

Alguns quesitos devem ser seguidos para que o enxerto alógeno seja incorporado, como ser inerte e não provocar reações inflamatórias exacerbadas o que pode gerar rejeição do enxerto. Além disso, precisa possuir resistência mecânica, preparo simples, baixo custo e ser de fácil estocagem e transporte (Barboza et al., 2012).

Nos últimos anos, o fosfato de cálcio, especialmente fosfatos tricálcicos e hidroxiapatita, tem atraído interesse como substitutos ósseos. O alfa-fosfato tricálcico (α -TCP) tem despertado especial interesse, pois quando em contato com os líquidos corporais, durante o processo inicial de consolidação óssea, se transforma em hidroxiapatita deficiente em cálcio (HADC), similar à hidroxiapatita óssea (Dorozhkin, 2011; Bhatt et al., 2012). Sua biocompatibilidade e ampla faixa de relação cálcio e fósforo (Ca/P) o torna aplicável em diversas situações devido a diferentes propriedades (Bose e Tarafder, 2012).

Ensaio mecânico tem o objetivo de determinar as propriedades dos materiais. Existem basicamente dois tipos de ensaios: os destrutivos e os não destrutivos. Os destrutivos promovem a ruptura ou inutilização do material. Neste grupo destacam-se os ensaios de tração, impactação, flexão, torção, fadiga e compressão. Nos não destrutivos, utilizam-se o raios-x e ultrassom, por exemplo, para determinar propriedades físicas ou mecânicas (Souza, 1974; Amendola et al., 2008). O comportamento mecânico do osso em situações fisiológicas é similar ao comportamento mecânico de um objeto elástico (Cowin, 1999).

No ensaio de flexão em três pontos é utilizado uma barra apoiada em dois pontos extremos com aplicação de carga no centro da distância entre os apoios, ou seja, existem três pontos de carga (Garcia et al., 2000). O ensaio de flexão é o mais importante em biomecânica, pois provoca encurvamento de um corpo de prova até sua ruptura, fornecendo dados quantitativos de deformação e força da amostra testada (Cordey, 2000).

Não existem trabalhos que comparem os enxertos alógenos e o enxerto sintético de hidroxiapatita deficiente em cálcio (HADC) no tratamento de perdas ósseas em aves. O objetivo deste trabalho foi avaliar clínica e biomecanicamente os enxertos em defeitos diafisários críticos produzidos na ulna de galinhas domésticas.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS sob número 32155.

Foram utilizadas 30 galinhas poedeiras de raça Leghorn, adultas, com 130 dias de idade e adquiridas de aviário comercial. Essas foram separadas aleatoriamente em 3 grupos com 10 aves em cada, onde o grupo GHA (Enxerto sintético de HADC), grupo NL (enxerto alógeno inativado em nitrogênio líquido a -195°C) e grupo UF (enxerto alógeno clássico inativado em ultrafreezer a -80°C).

No GHA, o enxerto sintético de HADC foi fornecido pelo Laboratório de Engenharia de Biomateriais da UFRGS, tendo sido confeccionado em formato cilíndrico, maciço, pouco poroso e com dimensões de 20mm por 7mm. Para aplicar o enxerto de HADC foi necessário confeccionar dois orifícios fixados com parafusos no centro da placa, sendo empacotado e esterilizado em autoclave.

No GNL os aloenxertos foram obtidos a partir de asas de frangos de corte resfriadas e adquiridos em supermercado com Inspeção dos Órgãos de Fiscalização Agropecuária. Os enxertos foram coletados seguindo preceitos de cirurgia asséptica, utilizando acesso lateral e com auxílio do bisturi ultrassônico foi realizada ostectomia de 20mm de comprimento. Imediatamente, o segmento ósseo removido (aloenxerto) foi submerso em nitrogênio líquido (-195°C) por 15 minutos, descongelado a temperatura ambiente por 10 minutos e submerso em solução fisiológica estéril por mais 10 minutos, metodologia adaptada de Albuquerque (2015).

No GUF as ulnas foram obtidas da mesma forma que no GNL, entretanto, após coletados eram depositados individualmente em dois sacos plásticos vedáveis (um dentro do outro) e, em seguida, levados ao ultrafreezer sendo mantidos congelados por no mínimo duas semanas a temperatura de -80°C (Alencar e Vieira, 2010). No dia da sua utilização foi realizado descongelamento durante 10 minutos em solução fisiológica estéril.

Após duas semanas de adaptação e aclimatização, as aves passaram por avaliações pré-cirúrgicas com análise sanguínea e bioquímica, e as que estivessem com os parâmetros dentro da normalidade foram submetidas ao procedimento cirúrgico. Os animais foram mantidos em jejum alimentar de 8 horas e hídrico de 1 hora pré-cirúrgico. A medicação pré-anestésica utilizada foi morfina (3mg/kg via intramuscular). Em seguida realizou-se acesso venoso na veia metatársica medial para a indução com propofol (4-8mg/kg/IV), efetuou-se a intubação endotraqueal com sonda traqueal de 2,5 a 4 mm de diâmetro, sendo mantidas anestesiadas com isoflurano e oxigênio a 100% de saturação em um sistema de circuito aberto (Baraka). Durante todo o procedimento foram mantidas em fluidoterapia (20ml/kg/IV) com solução de ringer lactato. Em seguida, foi realizada a retirada de penas da região ulnar, seguida de antissepsia com solução de clorexidine 2%. O antibiótico pré-operatório empregado foi enrofloxacin na dose de 5mg/kg/IM.

O acesso a ulna direita foi feito por meio de incisão lateral afastando os músculos carpo ulnar, flexor digital profundo e pronador superficial com dois afastadores de Farabeuf e expondo toda a diáfise ulnar. Com auxílio de bisturi ultrassônico foi retirado segmento ósseo com 20mm de comprimento da região diafisária da ulna. Este defeito produzido foi preenchido com um dos três tipos de enxertos disponíveis, após sorteio. Independentemente do grupo, a ulna foi estabilizada com placa e parafusos bloqueados de 2,0mm, sendo dois

na porção proximal (12mm); dois no enxerto cortical (10mm); e dois na porção distal da ulna (10mm), totalizando 6 parafusos bloqueados (figura 1 A - D).

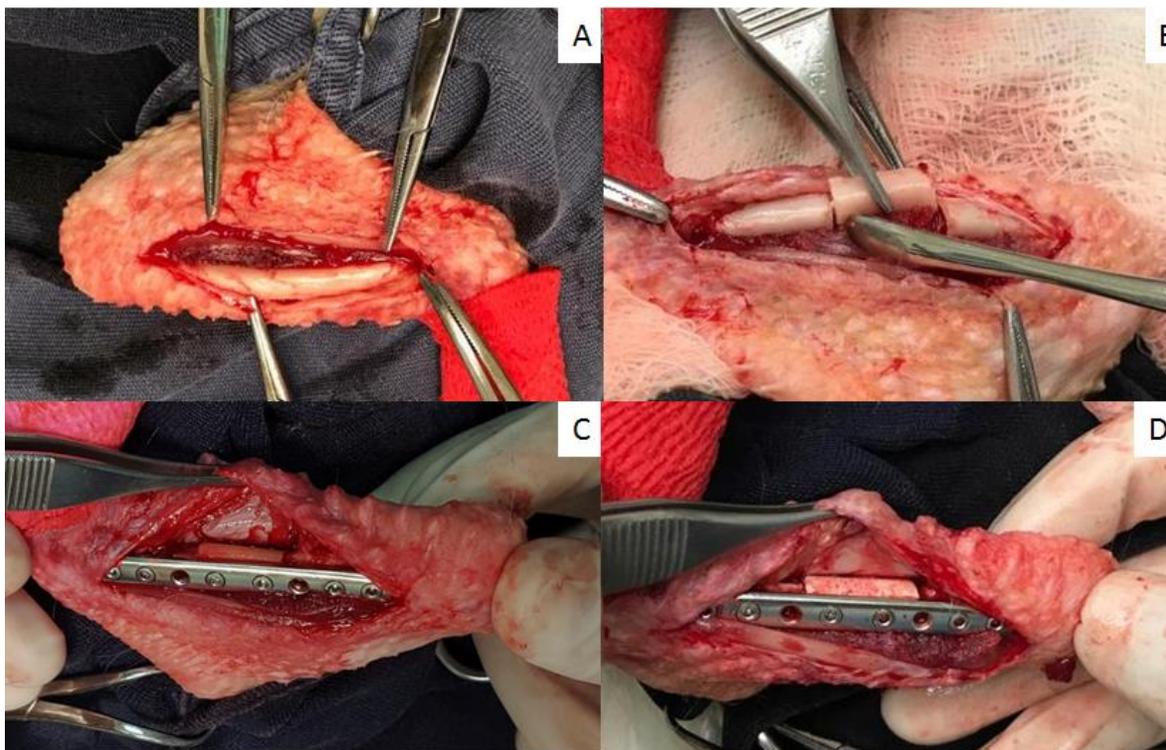


Figura 1 – Procedimento cirúrgico para implantação dos enxertos. Em A, exposição da diáfise ulnar; em B, ostectomia (defeito ósseo); em C, aspecto final do aloenxerto implantado na ulna; em D, aspecto final do enxerto HADC aplicado na ulna.

Após a fixação dos enxertos, realizou-se irrigação da região com solução de cloreto de sódio 0,9%. Em seguida, fez-se a redução do espaço morto com sutura isolada em sultán com mononáilon nº 4-0 e dermorrafia com padrão isolado simples com mononáilon nº 4-0.

No pós-operatório (PO) foi administrado meloxicam (0,5mg/kg/SID/SC/3dias), cloridrato de tramadol (15mg/kg/BID/SC/3dias) e enrofloxacina (5mg/kg/SID/IM/7dias). A limpeza da ferida cirúrgica foi realizada com NaCl 0,9% e gaze a cada 24 horas durante 10 dias, período necessário para a retirada dos pontos. Nos primeiros sete dias de PO a asa operada foi mantida imobilizada com uma atadura elástica em “oito”.

Durante todo o experimento foram registrados em ficha individual se os pacientes estavam se alimentando, tomando água, defecando, movimentavam a asa operada, se tinham sinal de dor, se apresentavam aumento de volume (inflamação), necrose ou sínus no

local, se existia ou não mobilidade na região da osteossíntese e se o posicionamento da asa estava correto.

Após 90 dias de PO os animais foram submetidos a eutanásia com tiopental (50mg/kg/IV) e cloreto de potássio respeitando as diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA e do CFMV. Imediatamente após a eutanásia, as ulnas (com e sem o enxerto) foram delicadamente dissecadas, colocadas em caixa térmica e levadas ao Laboratório de Biomateriais da Escola de Engenharia da UFRGS para realização dos ensaios biomecânicos de flexão em 3 pontos. Este foi realizado com máquina de testes Universal (Instron) com capacidade de flexão de até 50kN (quilo newtons). Cada extremidade dos ossos (corpo de prova) era colocada sobre duas barras fixas equidistantes e o terceiro ponto central se movimentava verticalmente exercendo à força de flexão a velocidade de 1 mm/min. até que o osso quebrasse ou perdesse resistência. Durante todo o ensaio um software conectado à máquina registrava o gráfico de deslocamento (mm) com a força necessária para o rompimento do osso em Newtons (N) (figura 2 A – C).

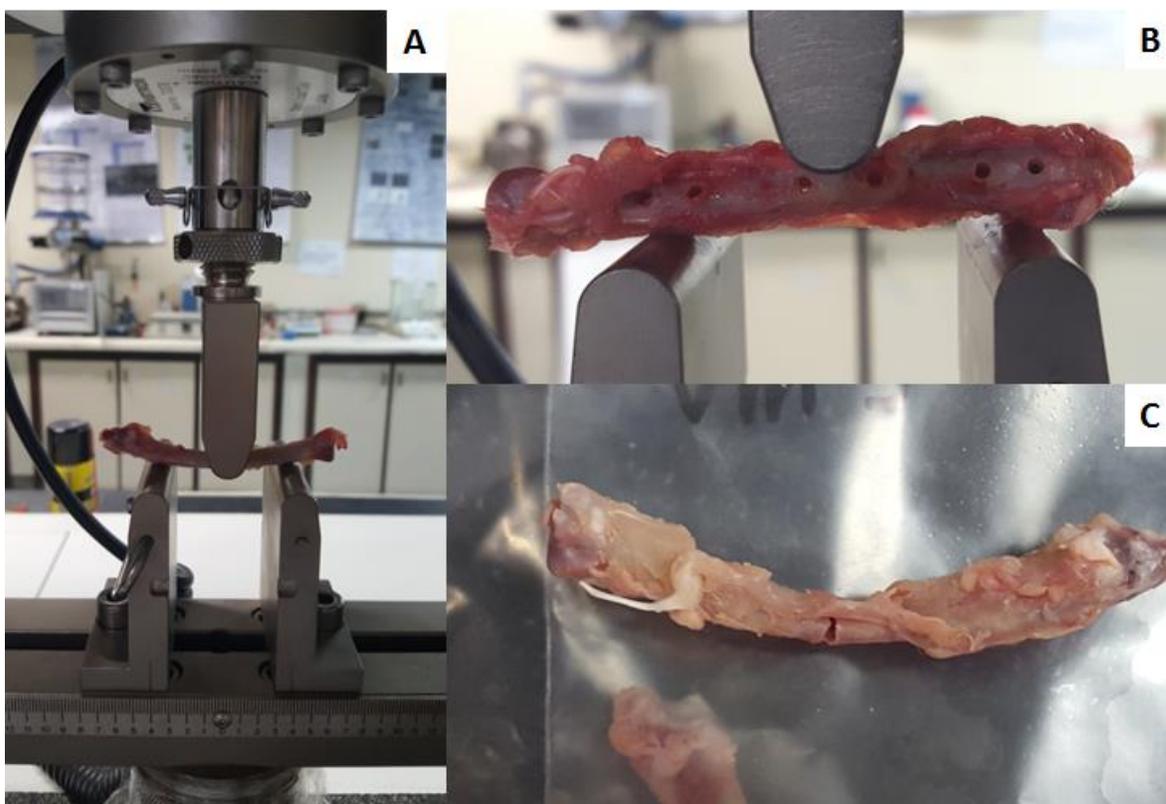


Figura 2 – Ensaio Biomecânico dos enxertos. Em A, ensaio de flexão; em B, detalhe do ensaio de flexão do GUF; em C, corpo de prova rompido após fim de ensaio de flexão.

Todos os dados foram digitados no programa Excel para análise estatística. As variáveis quantitativas foram descritas pela média e o desvio padrão quando simétricas. Foram descritas as variáveis categóricas pela frequência e o percentual. Para comparação de variáveis quantitativas utilizou-se o teste de Análise de Variância (ANOVA) conforme distribuição da variável e o teste-T para variâncias diferentes entre duas amostras. Considerou-se 5% o nível de significância estatística.

RESULTADOS

Na avaliação clínica, ainda com os implantes metálicos, todas as ulnas operadas estavam estáveis, sem sinal de inflamação/contaminação, articulações preservadas, sem dor e sem desvios angulares graves na asa. Macroscopicamente, após a retirada dos implantes metálicos, foi observado que 90% dos animais do GNL não apresentavam mobilidade nas junções osso/enxerto e que um enxerto (10%) teve reabsorção. No GUF 70% dos casos estavam estáveis e em 30% havia reabsorção do enxerto. No GHA 60% dos casos estavam estáveis, 20% apresentaram quebra do enxerto no orifício do parafuso quando retirado os implantes metálicos e em 20% deles havia mobilidade nas junções enxerto/osso. Neste grupo ainda era possível observar com bastante facilidade a região do enxerto, sendo ele bem delimitado e mais esbranquiçado quando comparado ao osso receptor.

A tabela 1 apresenta os resultados da análise biomecânica utilizando o ensaio de flexão em três pontos da ulna operada e da ulna saudável. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) em todos os grupos comparando ulna sem enxerto e ulna com enxerto. Ainda, nos grupos com enxerto, quando comparado individualmente foi verificada diferença significativa entre o GNL e o GHA.

Tabela 1- Média e desvio padrão da resistência (em Newtons) do GUF (grupo ultrafreezer), GNL (grupo nitrogênio líquido) e GHA (grupo hidroxiapatita) no ensaio de flexão avaliando membro sem enxerto e o membro com enxerto.

Grupos	Ulna sem enxerto	Ulna com enxerto
GUF	115,59±16,97	19,88±13,46
GNL	111,78±16,24	28,39±9,88
GHA	100,86±14,36	11,52±2,24

A avaliação biomecânica de flexão máxima (mm) está representada na tabela 2. Observou-se diferença estatística no GHA, na comparação entre a ulna sem enxerto com os com enxerto e quando comparados os enxertos do GNL com os enxertos do GHA e os enxertos do GUF com os enxertos do GHA. Não houve diferença estatística entre os grupos dos membros sem enxerto tanto na flexão quanto na resistência biomecânica.

Tabela 2 – Avaliação biomecânica de flexão máxima em milímetros entre o GUF (grupo ultrafreezer), GNL (grupo nitrogênio líquido) e GHA (grupo hidroxiapatita) avaliando a ulna sem enxerto (SE) e a ulna com enxerto (CE), com média (M) e desvio padrão (DP).

Nº	GUF-SE	GUF-CE	GNL-SE	GNL-CE	GHA-SE	GHA-CE
1	0,062	0,048	0,106	0,027	0,032	0,000
2	0,033	0,000	0,038	0,033	0,042	0,055
3	0,057	0,000	0,029	0,042	0,025	0,000
4	0,045	0,037	0,026	0,046	0,040	0,000
5	0,021	0,014	0,021	0,048	0,030	0,083
6	0,037	0,052	0,030	0,026	0,031	0,000
7	0,045	0,024	0,047	0,043	0,024	0,000
8	0,026	0,000	0,065	0,000	0,028	0,053
9	0,045	0,018	0,024	0,027	0,027	0,069
10	0,027	0,020	0,030	0,045	0,031	0,105
M/DP	0,040±0,013	0,031±0,015	0,042±0,026	0,037±0,009	0,031±0,006	0,073±0,022

DISCUSSÃO

O comportamento mecânico do osso em situações fisiológicas é similar ao comportamento mecânico de um objeto elástico (Cowin, 1999), por isso que os ossos foram submetidos aos ensaios biomecânicos logo após terem sido removidos, visando a manutenção deste comportamento e proporcionando resultados mais fidedignos. Segundo Cordey (2000) o ensaio de flexão é o mais importante em biomecânica, pois apresenta menos variáveis, provocando encurvamento do corpo de prova até sua ruptura, fornecendo dados quantitativos de deformação e força da amostra. O ensaio de flexão foi efetivo, pois gerou dados quantitativos em todas as amostras testadas, permitindo comparação adequada entre os grupos.

Nos três grupos, através de avaliação clínica ortopédica após a retirada dos implantes, obteve-se média geral de 73,33% de incorporação do enxerto (oscilando de 90% a 60%), dados que destoam de Tunio et al.(2015) que obtiveram 100% de incorporação dos enxertos de HA e de matriz óssea desmineralizada com HA em 12 semanas de evolução com quatro pombos em cada grupo, o que pode ser justificada pela maior porosidade e taxa de dissociação do enxerto de HA utilizado pelos neste trabalho.

A facilidade de identificação da região do enxerto no GHA pode ser atribuída ao tempo relativamente curto de permanência do enxerto (90 dias), pela baixa porosidade, ausência de canal medular e grande densidade do enxerto (maciço), fatos que também foram descritos por Bhatt et al. (2012) que citaram que os enxertos sintéticos podem demorar mais de um ano para se incorporarem ao osso do receptor e, segundo esses autores, esse tempo está diretamente relacionado as características de porosidade, taxa de dissociação, se for maciço ou não, proporcionando maior ou menor deposição de células envolvidas na consolidação óssea, fato que refletiu diretamente na resistência biomecânica, apresentando o pior resultado com média e desvio padrão ($11,52 \pm 2,24$ N).

Maccoy e Haschuck (1988) e Barboza et al. (2012) afirmaram que o uso de aloenxerto em aves ainda apresenta viabilidade limitada, pelo fato de haver relatos de reações inflamatórias graves nas áreas enxertadas e pela dificuldade de fixação do enxerto ao osso do receptor. Este fato não foi observado no projeto, pois não foi verificada reação inflamatória na região onde os aloenxertos foram aplicados. Certamente o método de fixação utilizado contribuiu para isto, visto que foi eficiente e manteve a região do implante estável.

No ensaio de flexão todas as ulnas contralaterais apresentaram maior resistência quando comparados as ulnas enxertadas, estando de acordo com Hulse e Hyman (2003) que citaram que ossos com fraturas consolidadas apresentam menos resistência e maior deformação elástica devido ao longo tempo necessário para finalizar o processo de consolidação em virtude do remodelamento continuado com deposição constante de minerais, quando comparado ao tecido ósseo íntegro.

Kaab et al. (2004) concluíram que quando se utiliza placa bloqueada não existe movimentação entre os componentes metálicos, pois a cabeça do parafuso é rosqueada no orifício da placa conferindo extrema rigidez ao sistema, fazendo as forças sejam suportadas

pelos implantes e não pelo osso, permitindo que haja estabilidade absoluta, e podendo acarretar em lise/reabsorção óssea, fenômeno que pode ser atribuído aos casos onde houve a reabsorção dos aloenxertos nos GUF e GNL, pois não foi verificada infecção no local da enxertia fator que também poderia gerar reabsorção.

O GNL obteve maior resistência no ensaio de flexão, fato que pode ter ocorrido pela incorporação mais precoce desse enxerto em relação aos outros, concordando com Currey (2003) que salientou que a resistência está diretamente relacionada à consolidação óssea onde se tem maior deposição de minerais proporcionando maior dureza e causando maior resistência óssea.

Na flexão máxima, o GHA apresentou maior deslocamento por ter união ainda incompleta do enxerto, dessa forma, maior elasticidade, o que está de acordo com Currey (2003) que citou que em união retardada o processo de consolidação está na fase fibrosa ou cartilaginosa, apresentando menor deposição de minerais, aumentando conseqüentemente à elasticidade dos ossos e apresentando menos resistência.

Conforme Barboza et al. (2012) o enxerto deve fornecer resistência mecânica, ter preparo simples, baixo custo e ser de fácil estocagem e transporte, preceitos que foram verificados no GNL, visto que possuem baixo custo e fácil obtenção. Além disso não apresenta necessidade de estocagem visto que pode ser aplicado imediatamente após o seu processamento, dispensando a necessidade de formação de banco de ossos ou de equipes somente para a extração do enxerto. Já no GHA, o processamento laboratorial e a aquisição do HADC são onerosos, assim como no GUF onde o custo do ultrafreezer e sua manutenção para a formação do banco de ossos gera muitas despesas, e ainda precisa de pelo menos duas semanas para a inativação do aloenxerto, sendo feito em duas etapas necessitando de duas equipes, uma para a coleta e outra para aplicação.

CONCLUSÃO

Sendo assim, é possível concluir que os três enxertos testados são aplicáveis em lesões com perdas ósseas em aves, entretanto, o grupo GNL mostrou-se superior por apresentar maior resistência biomecânica, ser de fácil obtenção, ser aplicado no mesmo dia e não necessitar de equipamentos para estocagem.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, P.B. et al. Aloenxerto ósseo cortical desvitalizado com nitrogênio líquido – estudo experimental em ovelhas. **Ciência Rural**, v.45, n.4, p.718-723, 2015.

ALENCAR, P.G.C.; VIEIRA, I.F.V. Banco de Ossos. **Rev. Bras. Ortop**, v.45, n.6, p. 524-528, 2010.

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

BARBOZA, C.A.G. et al. Utilização de matriz óssea desmineralizada para reparo de falhas ósseas. **Rev. Odontol. UNESP**, v.41, n.3, p.209-214, 2012.

BHATT, R.A; ROZENTAL, T.D. Bone graft substitutes. **Hand Clinics**, v. 28, p. 457–68, 2012.

BOSE, S.; TARAFDER, S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: A review. **Acta Biomaterialia**, v. 8, p. 1401-1421, 2012.

BOLSON, J. et al. Osteossíntese umeral em pombos (*Columba livia*) com a utilização de pino intramedular estabilizado externamente por barra acrílica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA ANCLIVEPA, 26º, Salvador, BA. Anais... Salvador: **ANCLIVEPA**, 2005.

CORDEY, J. Introduction: basic concepts and definitions in mechanics. **Injury, International Journal of the Care of the Injured**, v.31, n.2, p.1-13, 2000.

COWIN, S.C. Bone poroelasticity – Survey Article. **Journal of Biomechanics**, v.32, p.217-238, 1999.

CURREY, J.D. The many adaptations of bone. **Journal of Biomechanics**, v.36, n. 10, p. 1487-1495, 2003.

DALMOLIN, F. et al. Biomecânica óssea e ensaios biomecânicos - fundamentos teóricos. **Ciência Rural**, v.43, n.9, p.1675-1682, 2013.

DOROZHKIN, S.V. Calcium orthophosphates - Occurrence, properties, biomineralization, pathological calcification and biomimetic applications. **Landes Bioscience**, v. 1, p. 121–164, 2011.

GARCIA, A. et al. Ensaio de flexão. In: **Ensaio dos materiais**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos. Cap.4, p. 66-87, 2000.

HELMER, P.; REDIG, P.T. Surgical resolutions of orthopedic disorders. In: HARRISON, G.J., LIGHTFOOT, T.L. **Clinical avian medicine**. Palm Beach. Florida, Spix Publishing Inc., v.2. p. 761-774, 2006.

HULSE, D.; HYMAN, B. Biomecânica e Biologia das Fraturas. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. v. 2, cap. 126, p. 1785 – 1792, 2003.

JONES, R.; REDIG, PT. Autogenous callus for of a humeral cortical defect in a red-tailed hawk (*Buteo jamaicensis*). **Journal Avian Medicine Surgery**, v. 15, p. 302-309, 2001.

KAAB, M.J. et al. Locked internal fixator: sensitivity of screw/plate stability to the correct insertion angle of the screw. **Journal of Orthopaedic Trauma**, v.18, n.8, p. 483 – 487, 2004.

MACCOY, D.M; HASCHCK, W.M. Healing of transverse humeral fractures in pigeons treated with ethylene oxide-sterilized, dry- stored, on lay cortical xenografts and allografts. **Am. J. Vet. Res**, v. 49, p. 106-111, 1988.

McCARTNEY, W.T. Orthopaedic injuries in pigeons. **Vet. Rec.**, v.134, p.305-307, 1994.

SANAEI, R.; ABU, J.; ZUKI, M.A.B. et al. Evaluation of osteogenic potentials of avian demineralized bone matrix in the healing of osseous defects in pigeons. **Veterinary Surgery**, v. 44, p. 603-612, 2015.

SOUZA, S.A. **Ensaio mecânico de materiais metálicos**. 3,ed. São Paulo: Edgard Blucher, Cap 4, p.235-237, 1974.

SCHWARZ, P.D. Biomecânica das fraturas do esqueleto apendicular: causas e avaliação. In: BOJRAB, M.J. **Mecanismos da moléstia na cirurgia dos pequenos animais**. 2.ed. São Paulo: Manole, cap.136, p.1161-1181, 1996.

TUNIO, A.; JALILA, A., GOB, Y.M. et al. Histologic Evaluation of Critical Size Defect Healing With Natural and Synthetic Bone Grafts in the Pigeon (*Columba livia*) Ulna. **Lawrence**, v. 29, n. 2, p. 106-113, 2015.

WILLIAMS, R., HOLLAND, M., MILTON, J.L. et al. A comparative study of treatment methods for long bone fractures. **Comp. Anim. Pract.**, v.1, p.48-55, 1987.

4. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos, podemos concluir que os três enxertos testados podem ser utilizados em fraturas com perdas ósseas importantes em aves. Os aloenxertos confeccionados a partir de peças resfriadas de supermercado apresentam viabilidade para a obtenção e implantação. Os enxertos do GNL mostraram-se superiores na maioria dos quesitos, sendo a primeira opção de enxertia em aves fraturadas com perdas ósseas importantes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, P.G.C.; VIEIRA, I.F.V. Banco de Ossos. **Rev. Bras. Ortop.**, v.45, n.6, p. 524-528, 2010.

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

BARBOZA, C.A.G. et al. Utilização de matriz óssea desmineralizada para reparo de falhas ósseas. **Rev. Odontol. UNESP**, v.41(3): p.209-214, 2012.

BHATT, R. A; ROZENTAL, T. D. Bone graft substitutes. **Hand clinics**, v. 28, p. 457–68, 2012.

BOLSON, J. et al. Osteossíntese umeral em pombos (*Columba livia*) com a utilização de pino intramedular estabilizado externamente por barra acrílica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA ANCLIVEPA, 26º, Salvador, BA. Anais... Salvador: ANCLIVEPA, 2005.

BOSE, S.; TARAFDER, S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: A review. **Acta Biomaterialia**, v. 8, p. 1401-1421, 2012.

CORDEY, J. Introduction: basic concepts and definitions in mechanics. **Injury, International Journal of the Care of the Injured**, v.31, n.2, p.1-13, 2000.

COWIN, S.C. Bone poroelasticity – Survey Article. In: **Journal of Biomechanics**, v.32, p.217-238, 1999.

CURREY, J. D. The many adaptations of bone. **Journal of Biomechanics**, v.36, n. 10, p. 1487-1495, 2003.

DALMOLIN, F. et al. Biomecânica óssea e ensaios biomecânicos - fundamentos teóricos. **Ciência Rural**, v.43, n.9, p.1675-1682, 2013.

DOROZHUKIN, S.V. Calcium orthophosphates - Occurrence, properties, biomineralization, pathological calcification and biomimetic applications. **Landes Bioscience**, v. 1, p. 121–164, 2011.

ESLAMINEJAD, M. B.; BORDBAR, S.; NAZARIAN, H. Odontogenic differentiation of dental pulp-derived stem cells on tricalcium phosphate scaffolds. **Journal of Dental Sciences**, v. 8, p. 306–313, 2013.

GARCIA, A. et al. Ensaio de flexão. In: **Ensaio dos materiais**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos. Cap.4, p. 66-87, 2000.

HELMER, P., REDIG, P.T. Surgical resolutions of orthopedic disorders. In: HARRISON, G.J., LIGHTFOOT, T.L. **Clinical avian medicine**. Palm Beach. Florida, Spix Publishing Inc., v.2. p. 761-774, 2006.

JONES, R.; REDIG, PT. Autogenous callus for of a humeral cortical defect in a red-tailed hawk (*Buteo jamaicensis*). **Journal Avian Medicine Surgery**, v. 15, p. 302-309, 2001.

LEUCHT, P.; CASTILLO, A. B.; BELLINO, M. J. Comparison of tricalcium phosphate cement and cancellous autograft as bone void filler in acetabular fractures with marginal impaction. **Injury**, v. 44, p. 969–74, 2013.

MACCOY, D.M; HASCHCK, W.M. Healing of transverse humeral fractures in pigeons treated with ethylene oxide-sterilized, dry- stored, on lay cortical xenografts and allografts. **Am. J. Vet. Res**, v. 49, p. 106-111, 1988.

McCARTNEY, W.T. Orthopaedic injuries in pigeons. **Vet. Rec.**, v.134, p.305-307, 1994.

SANAEI, R.; ABU, J.; ZUKI, M.A.B. et al. Evaluation of osteogenic potentials of avian demineralized bone matrix in the healing of osseous defects in pigeons. **Veterinary Surgery**, v. 44, p. 603-612, 2015.

SCHWARZ, P.D. Biomecânica das fraturas do esqueleto apendicular: causas e avaliação. In: BOJRAB, M.J. **Mecanismos da moléstia na cirurgia dos pequenos animais**. 2.ed. São Paulo: Manole, cap.136, p.1161-1181, 1996.

SOUZA, S.A. **Ensaaios mecânicos de materiais metálicos**. 3,ed. São Paulo: Edgard Blucher, Cap 4, p.235-237, 1974.

STEFANIC, M.; KRNEL, K.; KOSMAC, T. Novel method for the synthesis of a β -tricalcium phosphate coating on a zirconia implant. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 33, p. 3455–3465, 2013.

TUNIO, A.; JALILA, A., GOB, Y.M. et al. Histologic Evaluation of Critical Size Defect Healing With Natural and Synthetic Bone Grafts in the Pigeon (*Columba livia*) Ulna. **Lawrence**, v. 29, n. 2, p. 106-113, 2015.

VOLKMER, T. M. Obtenção e caracterização de α -fosfato tricálcico por síntese de combustão e aplicação em cimentos ósseos e arcabouços de criogéis. 2011. 183p. **Tese** (Doutorado em Engenharia de Materiais) – Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, 2011.

WILLIAMS, R., HOLLAND, M., MILTON, J.L. et al. A comparative study of treatment methods for long bone fractures. **Comp. Anim. Pract.**, v.1, p.48-55, 1987.

YUAN, H.; DE GROOT, K. Calcium Phosphate Biomaterials: an Overview. [ed.] R. L. Reis e S. Weiner. Learning from Nature How to Design New Implantable Biomaterials: From Biomineralization Fundamentals to Biomimetic Materials and Processing Routes. **Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2005.**