

ANDRESSA DE FARIAS FEHLBERG

**HIDROXIAPATITA SINTÉTICA NA REGENERAÇÃO DE FALHA ÓSSEA
PROVOCADA EM FRATURA COMPLETA DE TERÇO INTERMÉDIO DE TÍBIA
IMOBILIZADA PELA FIXAÇÃO PERCUTÂNEA EM CÃES.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2001

Ser mestre...

...ser mestre é transmitir conhecimentos e experiências de vida de forma serena, com a certeza de estar sempre fazendo o melhor.

...é se sentir responsável pela formação profissional e de caráter de mentes jovens, moldando-as no caminho do bem e da sabedoria na plenitude da palavra.

...é ter a consciência tranqüila em saber que o desempenho de suas tarefas está se desenvolvendo com o máximo de sua competência e responsabilidade.

...é transmitir o prazer de aprender pelo amor de ensinar.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me presentear com as oportunidades.

Aos meus pais, Nair e Alberto, minha avó Ilza, minha irmã Karina, meu sobrinho querido Pedro Henrique e a meu noivo Cristian, pelo constante apoio, estímulo e torcida.

À minha querida e saudosa orientadora Andrea, por todos os ensinamentos e pelo convívio agradável, que nossa amizade perdure por longos anos.

Às minhas amigas de república, Jussara, Sanny, Janaína e Viviane, por fazerem da minha volta a Campos dos Goytacazes uma estada feliz, com muitas cumplicidades e boas risadas. Viva a ala feminina do Carandirú, que em tempos de racionamento de energia, não racionava bom humor.

À Viviane Lewicki, pela afetuosa acolhida em seu lar durante a fase final de elaboração da tese.

Aos professores Cláudio, João Carlos e Tarcísio, pelas importantes correções sugeridas e principalmente ao professor Flavio Miguens, pela afetuosa reaproximação, por me mostrar que devemos ser fortes superando as dificuldades da vida, trabalhando muito, sempre. Obrigada, Flavio, pela paciência e pela valiosa compreensão.

Aos professores do Departamento de Veterinária da UFV, Luiz Gonzaga Pompermayer e José Antônio Viana, dos quais sentirei imensas saudades, que me ensinaram a crescer profissional e pessoalmente. Obrigada pela torcida e por serem essas pessoas maravilhosas e inesquecíveis.

Ao professor Eldo, chefe do Departamento de Biologia da UFV, por me ceder o laboratório de fotografias e por me ensinar um pouco sobre a arte de fotografar.

Ao querido amigo Mário Sérgio, por estar sempre por perto. Saudades imensas!

Aos amigos Bolivar, Kátia, Elenir e Carlinha, pela torcida apesar da distância, que a vida de todos vocês seja repleta de grandes vitórias e reencontros. Saudades de todos.

Às colegas de mestrado Carla Armênio e Denise Kawata pelo companheirismo.

Aos alunos de Iniciação científica e bolsistas de trabalho, pela ajuda indispensável durante as cirurgias e cuidados pós-operatórios, principalmente às “Cristianes”, que moram no meu coração.

Às queridas Beatriz Ferreira Ribeiro e Giovana, por todo o apoio no preparo do material para microscopia eletrônica no Laboratório de preparo de amostras CBB-UENF.

Aos funcionários do DVT-UFV, Toninho, Etelvina, Simone, Prof. Romeu, Maninha, Claudio, Adão, Luiz Márcio, Lucinda e todos os outros que foram importantes e imprescindíveis para que os dias em Viçosa fossem simplesmente maravilhosos.

Ao feliz reencontro com Edilaine e Cleber como colegas de trabalho na FIPLAC, sem os quais a adaptação à nova vida seria muito mais difícil. Obrigada pelo convívio alegre e engrandecedor.

À minha sogrinha especial, D. Rosa, por nos conhecermos melhor e termos um convívio muito agradável.

À Prof^a. Marlene, por me provar que ninguém é insubstituível.

Aos animais, por simplesmente tudo.

BIOGRAFIA

Andressa de Farias Fehlberg, filha de Alberto Coelho Fehlberg e Nair Neves de Farias Fehlberg, graduou-se em Medicina Veterinária em janeiro de 1999, pela Universidade Estadual do Norte Fluminense. Em março do mesmo ano, ingressou na Pós-graduação *Lato Sensu* da Universidade Federal de Viçosa, na área de clínica e cirurgia de pequenos animais, onde logrou o título de especialista em Medicina Veterinária em agosto de 2000. A partir do segundo semestre do ano de 2000, matriculou-se no programa de Pós-graduação *Stritu Sensu* também na Universidade Federal de Viçosa. Em julho do ano de 2001, foi contratada como professora de clínica médica e clínica cirúrgica de pequenos animais das Faculdades Integradas do Planalto Central (FIPLAC).

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	IX
RESUMO	X
ABSTRACT	XII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Alterações vasculares durante a reparação óssea	3
2.2. Uso da fixação percutânea na estabilização de fraturas de ossos longos	5
2.3. Características da hidroxiapatita como substituto ósseo	7
2.4. Uso da angiografia e da radiografia na monitoração da reparação de fraturas e de falhas ósseas	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1. Aspectos clínicos e cirúrgicos do pós-operatório	17
4.2. Aspectos radiográficos e angiográficos após a cirurgia	22
4.3. Aspectos histológicos dos efeitos do uso de hidroxiapatita sintética após a cirurgia.	32
5. CONCLUSÕES	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1- Fratura provocada no terço médio da tíbia esquerda. (seta)	15
Figura 2- Falha óssea provocada experimentalmente no fragmento distal da fratura. (seta)	15
Figura 3- Preenchimento de falha óssea com hidroxiapatita sintética (seta).	16
Figura 4- Tíbia esquerda imobilizada com fixação percutânea, logo após a cirurgia. A- pinos de Steinmann; B- Resina acrílica autopolimerizável; C- Barra de conexão.	16
Figura 5- Animal do grupo controle 10 dias após cirurgia.	21
Figura 6- Animal do grupo tratado, 45 dias após a cirurgia, com evidência clínica de consolidação da fratura, sem diferenças entre os membros pélvicos, direito e esquerdo.	21
Figura 7- Radiografias dos animais do grupo tratado com hidroxiapatita sintética em forma de grânulos. A- oito dias após a cirurgia posição craniocaudal; B- 30 dias após a cirurgia posição craniocaudal; C- 60 dias após a cirurgia posição mediolateral; D- 90 dias após cirurgia posição mediolateral.	27
Figura 8- Radiografias dos animais do grupo- controle A oito dias após a cirurgia posição craniocaudal; B- 30 dias após a cirurgia posição craniocaudal; C- 90 dias após a cirurgia posição mediolateral; D- 120 dias após cirurgia posição mediolateral.	28

- Figura 9- Angiografia dos animais do grupo tratado com hidroxiapatita em forma de grânulos. A- oito dias após a cirurgia posição craniocaudal; B-90 dias após a cirurgia posição mediolateral; C- 120 dias após a cirurgia posição mediolateral. 29
- Figura 10- Angiografia dos animais do grupo- controle com hidroxiapatita em forma de grânulos. A- oito dias após a cirurgia posição craniocaudal; B-90 dias após a cirurgia posição mediolateral; C- 120 dias após a cirurgia posição mediolateral. 30
- Figura 11- Artéria nutrícia restaurada aos 60 dias de pós-operatório. (seta) 31
- Figura 12- Artéria nutrícia restaurada aos 90 dias de pós-operatório. (seta) 31
- Figura 13- Presença de osteócitos encerrados em tecido ósseo trabecular e ação osteoblástica incipiente aos oito dias de pós-operatório no grupo- controle; Azul de toluidina; 100X. 34
- Figura 14- Presença de osteoclastos participando do processo de reabsorção das bordas da fratura aos oito dias de pós-operatório do grupo tratado e medula óssea preservada; HE; 10X. 34
- Figura 15- Presença de osteoblastos participando do processo de formação de matriz óssea e presença de osteócitos encerrados na matriz, aos 30 dias de pós-operatório, no grupo controle; Azul de toluidina; 100X. 35
- Figura 16- Presença de osteoblastos participando menos do processo de formação de matriz óssea e presença de osteócitos encerrados na matriz, aos 30 dias de pós-operatório, no grupo tratado; Azul de toluidina; 100X. 35
- Figura 17- Presença de osteócitos encerrados na matriz óssea aos 90 dias de pós operatório, no grupo- controle; Azul de toluidina; 100X. 36
- Figura 18- Presença de osteócitos encerrados na matriz óssea, aos 90 dias de pós-operatório, no grupo tratado; Azul de toluidina; 100X. 36

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Graus variados de claudicação nos animais do grupo tratado com hidroxiapatita sintética em forma de grânulos, em falha óssea associada à fratura de tíbia provocada experimentalmente e imediatamente imobilizada por fixação percutânea.....19
- Tabela 2- Graus variados de claudicação nos animais do grupo controle com falha óssea associada à fratura de tíbia provocada experimentalmente e imediatamente imobilizada por fixação percutânea.....20
- Tabela 3- Resultado do exame radiográfico do local de osteotomia e de defeito ósseo, em relação ao osso circunvizinho nos animais do grupo- controle.....25
- Tabela 4- Resultado do exame radiográfico do local de osteotomia e de defeito ósseo preenchido por hidroxiapatita sintética em forma de grânulos, em relação ao osso circunvizinho nos animais do grupo tratado.....26

RESUMO

FEHLBERG, Andressa de Farias, M.S., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2001. **Hidroxiapatita sintética na regeneração de falha óssea provocada em fratura completa de terço intermédio de tibia imobilizada pela fixação percutânea em cães.** Orientadora: Andréa Pacheco Batista Borges. Conselheiros: João Carlos Pereira da Silva e Tarcízio Antônio Rego de Paula.

Para avaliar clínica, radiológica, angiográfica e histologicamente o uso da Hidroxiapatita sintética (HAP) em forma de grânulos, como substituto ósseo na reparação de defeitos ósseos provocados no fragmento distal de fraturas de diáfise de tibia imobilizadas por fixação percutânea, foi realizado estudo experimental, utilizando 20 cães, clinicamente sadios. Os animais foram separados em dois grupos de dez, tendo recebido o grupo 1 HAP e o grupo 2 utilizado como controle. Após protocolo anestésico rotineiro, o procedimento cirúrgico constou de incisão de pele e tecido subcutâneo na face medial da diáfise da tibia esquerda. Produziu-se uma fratura transversa em seu terço médio e com auxílio de osteótomo, foi provocado defeito ósseo no fragmento distal da fratura. No grupo tratado, a falha óssea foi imediatamente preenchida por HAP e, no grupo- controle, a falha permaneceu sem tratamento. Em seguida, os tecidos foram suturados de maneira convencional. Os animais foram submetidos a avaliações clínicas diárias e a avaliação radiográfica foi feita logo após a cirurgia, aos oito, 30, 60, 90 e 120 dias de pós-operatório. Nos mesmos dias dois animais de cada grupo foram submetidos à análise angiográfica e histológica. Ao exame clínico, os animais apresentaram graus variados de claudicação, ocorrendo o retorno do membro à função aproximadamente no décimo dia. Os exames

radiográficos revelaram, aos 30 dias, evidências radiológicas de consolidação da fratura. Nos dias subseqüentes, ficou evidente um processo de remodelação do calo ósseo e do canal medular. Os exames angiográficos revelaram aos oito dias de pós-operatório aumento do suprimento sangüíneo extra-ósseo em todos os animais com a diminuição gradativa da neovascularização nas avaliações subseqüentes, revelando uma organização vascular do tecido cicatricial. No exame histológico, aos oito dias de pós-operatório, observaram-se regiões de hemorragia e reação osteoclástica nas bordas da lesão em ambos os grupos. Aos 30 dias de pós-operatório, no grupo tratado, observou-se crescimento ósseo a partir das bordas da lesão, com tecido ósseo trabecular preenchendo a região da falha óssea, já no grupo controle, observou-se formação de osso novo a partir das bordas da lesão, mas com a região da falha óssea preenchida por tecido fibrovascular, evidenciando um processo de reparação óssea normal. Aos 60 dias, no grupo 1, foi observada remodelação do tecido lamelar, bem como a presença de numerosos vasos sangüíneos e, em ambos os grupos, presença de ósteons secundários. Aos 90 dias, ambos os grupos apresentavam tecido ósseo maduro na região da falha e da osteotomia. Aos 120 dias, ambos apresentavam tecido ósseo maduro basicamente constituído por osteócitos. A presença de maior número de vasos sangüíneos na região de osteotomia e da falha óssea no grupo tratado, com evidente remodelação do canal medular nos animais do grupo 1 demonstra uma capacidade angiogênica da HAP. Durante o experimento, não houve reação do tipo corpo estranho, e os animais do grupo tratado demonstraram mais rápida consolidação da fratura e regeneração da falha óssea com remodelação do canal medular, quando comparados com os do grupo-controle.

ABSTRACT

FEHLBERG, Andressa de Farias, M.S., Universidade Federal de Viçosa, september, 2001. **Synthetic hidroxyapatite in heath of bone deffects in tibia fracture immobilized by external squeletal fixation in dog.** Adviser: Andréa Pacheco Batista Borges. Committee members: João Carlos Pereira da Silva and Tarcízio Antônio Rego de Paula.

The use of synthetic hidroxyapatite as osseus substitute in repairing bone deffects in tibia fracture of dogs, immobilized by external squeletal fixation, was experimentaly evaluated. With this purpouse, a total of 20 health dogs were divided into two groups as treated with HAP (Group 1) and not treated (Group 2). After usual anesthesical procedure, a skin and subcutaneous incision was performed on diaphysis medial face of the left tibia. Then, a transversal fracture was produced and an osseous deffect on distal fragment of this fracture was induced. The treated group had the deffect bone immediatly filled up with HAP; the control group had no treatment. Then, a convencional suture was made. The dogs had daily clinical evaluations and radiological observation right after surgery, and on days eight, 30, 60, 90 and 120 after surgery. At the same days, two animals from each group were also observed by angiologycal and hystological analysis. Variable degress of lameness were observed, with the function returning approximately ten days after surgery. On day 30, healing fracture were observed by radiographic exams. Remodelling of deffect bone and fracture was detected on subsequent analysis. An increased extra-osseous blood supply was confirmed by angiologycal exams eight days after surgery, and decrease of neovascularization wich indicated vascular organization was observed later. On day eighth, hystological exams revealed hemorrhagic regions and osteoclastic reaction on the region of

defect bone and fracture in both groups. Thirty days after surgery, osseous growth with trabecular tissue was observed in the defect bone of the treated dogs. Otherwise, a fibrovascular tissue growth was observed in the control dogs, which evidences a normal repairing process. On day 60 it was possible to observe remodeling of the lamellar tissue with numerous blood vessels in the treated group. After 120 days, both groups exhibited compact bone tissue. A greater number of blood vessels and evident remodeling of the fracture in the treated group, suggests an angiogenic capacity of HAP. During this experiment, foreign body reaction was not observed, and the treated group demonstrated more efficient healing fracture and bone repair, when compared to the control group.

1- INTRODUÇÃO

O aprimoramento técnico-científico em ortopedia faz-se necessário pela frequência de traumatismos nos animais e no homem. Além disso, muitos acidentes provocam fraturas, às vezes com perda óssea significativa. Métodos convencionais para reparo destas falhas são o auto-enxerto e o aloenxerto. Todavia, a disponibilidade limitada e a dificuldade de armazenamento, além de maior tempo cirúrgico no emprego das técnicas indicadas, levam à busca de métodos alternativos (Franco, 2000).

As técnicas alternativas devem permitir rápida osteogênese, osteoindução e osteocondução nos processos de reparação óssea. É com este intuito que pesquisadores buscam técnicas que facilitem a reparação óssea, restabelecendo assim suas funções fisiológicas. O emprego de substâncias químicas, com este propósito, vem sendo vislumbrado como uma opção viável. Assim, os materiais sintéticos adquirem importância, desde que sejam biocompatíveis, de fácil aplicação, além de favorecerem o crescimento ósseo, seja por ação osteoindutora, seja por ação osteocondutora (Borges, 1998).

A cicatrização de fraturas tem sido detalhadamente estudada nas espécies domésticas, sendo o suprimento sanguíneo local um fator essencial para a cura. Quando o tecido sofre injúria, ocorre resposta inflamatória aguda caracterizada por aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, com acúmulo de líquido e células, e por ação de mediadores inflamatórios. Alguns destes mediadores inflamatórios estimulam a osteogênese a partir de pré-osteoblastos e da célula tronco do estroma medular, o que permite estabelecer a importância do suprimento sanguíneo e da estabilidade da fratura no processo de cicatrização óssea (Takahashi et al, 1999).

Este trabalho teve como objetivos descrever o efeito da hidroxiapatita sintética na regeneração de falha óssea provocada em fraturas de terço médio de tíbia e a sua reparação

quando imobilizadas pela fixação percutânea, em cães. Para tal, foram utilizados recursos radiográficos, angiográficos e histológicos.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Alterações vasculares durante a reparação ossea

Todos os processos fisiológicos e de reparação dependem da presença de suprimento sanguíneo adequado. Assim, a cicatrização óssea é influenciada por um sistema vascular funcional. A resposta desse sistema vascular à injúria óssea é essencial no tratamento e prognóstico de fraturas (Rai et al, 1981; Wilson, 1991).

Segundo Rai et al. (1981), Rhinelander & Wilson (1982), Abdel Hamid et al. (1990), os ossos longos recebem suprimento vascular de três principais fontes: artéria nutrícia, artéria metafisária e arteríolas periosteais. Estudos anatômicos e angiográficos revelaram uma passagem diagonal da artéria nutrícia pelo forame nutrício (Sher, 1975; Dyce et al., 1990).

Na cavidade medular, a artéria nutrícia divide-se em dois ramos, sendo um proximal e um distal (Abdel Hamid et al., 1990), que por sua vez, subdividem-se em arteríolas que são distribuídas por toda a superfície endosteal (Rhinelander & Wilson, 1982).

A circulação intramedular é interrompida quando o osso é fraturado (West et al., 1996), formando um hematoma responsável pela produção de calo ósseo e permitindo que o osso sobreviva (Sher, 1975; Dyce et al., 1990). Portanto, sabendo-se a maior parte do suprimento sanguíneo ósseo é fornecido pela circulação medular, um suprimento sanguíneo extra-ósseo começa a se desenvolver imediatamente após a fratura.

O carregamento de mediadores inflamatórios, células inflamatórias e células precursoras osteogênicas é feito através de um suprimento vascular funcional, através deste, osteoblastos estarão envolvidos diretamente no processo de diferenciação, fusão e ativação

de osteoclastos juntamente com moléculas reguladoras de diferenciação e função osteoclástica (Takahashi et al., 1999). Assim, o início do processo de cicatrização é dependente do suprimento sanguíneo extra-ósseo que auxilia na formação de um calo periosteal até que a fratura alcance suficiente estabilidade que permita a restauração da circulação intramedular (West et al., 1996).

Fatores biomecânicos podem contribuir para a continuação da instabilidade do osso no local da fratura após a redução e imobilização, e dentre eles podem ser citados o local anatômico da fratura e a sua configuração. Tais fatores podem prejudicar a estabilidade dos fragmentos ósseos não permitindo uma reorganização vascular eficiente, essencial no tratamento das fraturas (Welch et al., 1997).

Rhineland (1974) e Dyce et al. (1990) constataram que a imobilização de fraturas com pino intramedular lesa ainda mais os vasos já agredidos pela lesão inicial. Mesmo assim, o sucesso obtido por este tipo de imobilização enfatiza o valor das anastomoses e do suprimento sanguíneo extra-ósseo.

Para Owen (1980), os dois tipos celulares ósseos, osteoblastos e osteoclastos, são derivados, respectivamente, do estroma e do sistema hematopoiético. Portanto, no processo de reparação óssea, células presentes na medula desempenham papel importante na osteogênese ou fagocitose, dependendo das condições do meio (Burwell, 1985).

Não existem evidências de que as células tronco estromais participam da fisiologia óssea normal, mas sim, que células precursoras osteogênicas, presentes na medula óssea, diferenciam-se em osteoblastos que participam do processo de ossificação endocondral Burwell (1985).

A medula óssea é constituída por células tronco que tem sido definidas como células indiferenciadas caracterizadas por baixa taxa de crescimento, capacidade de auto-renovação e potencial para se diferenciarem em várias linhagens celulares (Owen, 1980; Connolly, 1995). Estas células, segundo Seale & Rudnick (2000), podem ser originadas além da medula óssea, do tecido muscular.

Barros (2000), utilizando auto-enxerto percutâneo de medula óssea em falhas segmentares produzidas em rádio de coelhos, constatou capacidade osteogênica do enxerto de medula óssea principalmente a partir da primeira e segunda semana após a enxertia. Atribuiu este fato à presença de células osteoprogenitoras. Nas primeiras observações, foi

evidenciado um estágio diferente de reparação, estando o grupo tratado com a medula óssea, em uma fase mais avançada de regeneração, quando comparada ao grupo controle, nas avaliações radiográficas e histológicas. Com cinco semanas, as semelhanças radiológicas foram maiores do que as diferenças, fato este confirmado pelos exames histológicos realizados em ambos os grupos.

2.2- Uso da fixação percutânea na estabilização de fraturas de ossos longos

Estabilização de fraturas de ossos longos e tratamento de pseudoartrose com a fixação percutânea tem sido amplamente difundida entre os cirurgiões veterinários na tentativa de propiciar a osteossíntese de forma eficiente e com mínima injúria aos tecidos moles. Esta fixação é também indicada para o tratamento de fraturas expostas, não uniões infectadas, artrodeses e correções de anormalidades de crescimento (Mears & Behrens, 1983; Bouvy et al., 1993; Langley-Hobbs et al., 1997).

Bruce (1999), estudando o uso de fixação esquelética externa em tratamento de luxação da articulação do joelho de gatos no intuito de promover a artrodese, observou que este método de imobilização favorecia o rápido retorno à função do membro com uma rígida estabilidade da articulação, permitindo o crescimento de tecido fibroso suficiente para estabilizar a articulação após a remoção do implante.

Embora fraturas simples possam ser tratadas com diferentes técnicas, a fixação percutânea pode ser uma boa escolha em determinadas circunstâncias. A facilidade de remoção do implante, a capacidade de proteger contra a pressão axial e de flexão e o retorno mais rápido à função do membro fraturado são algumas destas vantagens, o que não é conseguido com o uso de pinos intramedulares e de placa óssea (Egger, 1993; Gueiros & Borges, 1999; Langley-Hobbs et al., 1997). Ainda a imobilização pode ser retirada três a cinco semanas após sua implantação, quando o calo ósseo torna-se suficientemente organizado para controlar a rotação (Egger, 1993).

A resina acrílica como barra de conexão tem sido difundida por sua simplicidade na utilização e facilidade de adaptação em uma variedade de diâmetros de pinos, quando

comparada com outros sistemas de fixação da barra de conexão. Ela é facilmente moldada seguindo os pinos em diferentes planos (Gueiros & Borges, 1999; Shahar, 2000).

Como desvantagens do uso da fixação percutânea, Seguin et al. (1997) citaram a possibilidade de ocorrer osteomielite focal e seqüestro ósseo, em conseqüência da possível infecção no trajeto dos pinos. Citaram ainda a possibilidade de aparecimento de lesões neuromusculares iatrogênicas, fraturas patológicas e novas fraturas no local de inserção dos pinos.

Welch et al. (1997) constataram, através de angiografias, que cães de pequeno porte apresentavam menor densidade vascular na metáfise do rádio quando comparados com cães de grande porte, e concluíram ser o restabelecimento da vascularização medular particularmente importante naqueles animais. Para esses autores, técnicas de imobilização como fixação percutânea e placas ósseas promovem boa estabilidade e restabelecimento mais rápido da circulação intramedular e conseqüentemente, consolidação mais rápida da fratura.

2.3- Características da hidroxiapatita como substituto ósseo

A hidroxiapatita é utilizada por sua excelente biocompatibilidade com o tecido ósseo e por possuir constituição química semelhante ao osso humano (Borges, 1998; Rezende et al., 1998). Problemas com enxertos, tais como; volume limitado e reação imunológica de rejeição, têm estimulado interesse pelos materiais sintéticos biocompatíveis como substitutos ósseos (Borges, 1998; Borges et al., 2000).

Dada a pouca resistência mecânica, a hidroxiapatita precisa ser associada a técnicas de imobilização de fraturas, principalmente em locais onde há necessidade de maior sustentação de peso, uma vez que ela mostra pouca resistência mecânica (Geesink & Hoefnagel, 1995).

Segundo Ball et al. (2001), o preparo da hidroxiapatita interfere em sua resposta biológica. Os autores estudaram a densidade de osteoblastos em prótese de titânio coberta com hidroxiapatita submetida a diferentes intensidades de exposição a laser e calor. Observaram que, quanto maior a intensidade e duração de exposição ao laser e quanto maior a temperatura utilizada no tratamento da hidroxiapatita, maior a recristalização de

suas partículas, maior o crescimento de osteoblastos e maior a atividade celular na superfície tratada.

Franco (2000), utilizando hidroxiapatita sintética pura, associada a colágeno e lipossomo, em defeito provocado experimentalmente na tíbia de cães, constatou hemorragia abundante durante a cirurgia em todos os animais que receberam hidroxiapatita, exceto naquela associada ao colágeno.

Cullun et al. (1988) utilizaram hidroxiapatita natural em alvéolo dentário de cães e observaram, com uma e duas semanas de pós-operatório, proliferação de tecido conjuntivo imaturo e altamente celular, preenchendo todo o defeito, e, nas margens do osso original, atividades, osteoclástica e osteoblástica, incipientes na fase inicial do processo de reparação. Não foi observada reação do tipo corpo estranho ou resposta inflamatória. Com quatro, oito e 20 semanas, o tecido conjuntivo tornou-se denso e menos celular, estimulando a formação de osteóide. Com 30 semanas, todo o tecido conjuntivo foi substituído por tecido ósseo bem delimitado entre o osso e a hidroxiapatita.

Segundo Borges (1998), a característica de o implante de HAP sintética tornar-se envolto por tecido fibrovascular foi observada logo aos oito dias de pós-operatório. Nos animais dos grupos, tratado e controle, houve proliferação de tecido conjuntivo frouxo, muito celular e vascular, com áreas de hemorragia e pequenas ilhas de tecido ósseo neoformado, principalmente na região endosteal. Aos 30 dias, no grupo- controle, a proliferação de tecido conjuntivo com presença de fibras colágenas e atividade osteoclástica e osteoblástica. No grupo tratado, aos 45 dias de pós-operatório, a HAP foi observada envolvida por tecido conjuntivo denso com células gigantes do tipo corpo estranho e células mononucleares do tipo fagocitárias provavelmente envolvidas no processo de biodegradação.

Franco (2000), utilizando hidroxiapatita sintética pura, associada ao colágeno e associada a lipossomo, em defeito provocado experimentalmente na tíbia de cães, constatou, no exame histológico, total regeneração da falha óssea em todos os animais a partir de 60 dias, exceto no grupo que recebeu a hidroxiapatita associada ao colágeno. Neste grupo, houve a formação de trabéculas ósseas delgadas e tecido fibrocartilaginoso.

Estudos histológicos realizados por Geesink (1993) em implantes de hidroxiapatita no fêmur de cães, por seis semanas, revelaram tecido periosteal, osteoblastos e osteócitos maduros em contato com a HAP, sem a interferência de tecido fibroso.

Callan & Rohrer (1993) acreditam ser o tecido ósseo formado em contato com a hidroxiapatita natural originário do tecido conjuntivo circunvizinho às partículas do material.

Segundo Geesink (1993), a resposta inicial da medula óssea ao implante caracterizada por uma reação inflamatória, pode, provavelmente, ser atribuída ao trauma cirúrgico da implantação ou pode indicar um fenômeno imunológico.

O tamanho ideal do poro, para permitir a neoformação óssea, é discutido. Schliephake et al. (1991) consideram ser de 100 μm , para permitir crescimento ósseo integrado ao implante. Daculsi & Passuti (1990), comparando poros de 100 a 600 μm , encontraram que, apesar de poros de 100 μm permitirem crescimento ósseo, a invasão tecidual se dá mais rapidamente em estruturas com poros maiores.

Schliephake et al. (1991) afirmaram que as propriedades físicas e químicas da HAP são responsáveis pela sua capacidade osteoindutora.

Apesar de Green et al. (1995) descreverem uma capacidade osteoindutiva da hidroxiapatita sintética, o mesmo não foi observado por Callan & Rohrer (1993), Heikkilla et al. (1993), Borges (1998), Rezende et al. (1998), Borges et al. (2000), que afirmaram ser a hidroxiapatita um material osteocondutor atuando somente como matriz passiva para o crescimento ósseo.

Wiese & Merten (1993), estudando o papel do perióstio na osteointegração de grânulos de hidroxiapatita utilizada como implante, constataram que o perióstio desempenha importante papel na osteointegração, atuando como membrana limitante responsável por conduzir a regeneração de tecido ósseo.

Para Bulchoz et al. (1987), o nível de biodegradação da hidroxiapatita depende de sua composição química e cristalográfica, da densidade e da proximidade entre o tecido mole e o osso. Os autores acreditam que a degradação possa ocorrer por simples dissolução ou, então, ser mediada por células, como os osteoclastos.

2.4- Uso da angiografia e radiografia na monitoração da reparação de fraturas e de falhas ósseas.

A angiografia consiste na visualização radiológica dos vasos sanguíneos, obtida pela injeção de substâncias radiopacas no aparelho circulatório. Esta técnica permite o estudo anatômico do aparelho vascular (Neto, 1994). Para a introdução de substâncias de contraste no aparelho vascular, emprega-se o cateterismo que pode ser arterial ou venoso, realizado na maioria dos casos, com anestesia local (Sabiston, 1999).

Neto (1994) relatou que as substâncias químicas utilizadas como contraste são de alto peso molecular, baixa toxidez e alta tolerância. Em medicina humana, utilizam-se compostos hidrossolúveis à base de iodo. Para esse autor, a viscosidade do agente contrastante é outra qualidade importante, determinando maior ou menor grau de mistura com o sangue circulante. O resultado depende da concentração da substância de contraste no sangue, do grau de opacidade e da nitidez das imagens obtidas, que é diretamente proporcional à velocidade da injeção e inversamente proporcional ao fluxo da corrente sanguínea no ponto injetado.

Rose et al. (1988), Jebara et al. (1991) e Willians et al. (1992), estudando a angiografia na monitoração da consolidação óssea, esclareceram que a técnica também possibilita identificar as lesões vasculares, localizá-las e conhecer as condições da circulação colateral. Os distúrbios mais freqüentemente encontrados são as obstruções dos vasos sanguíneos, o extravasamento de contraste por lesões da parede vascular, os pseudoaneurismas, as fístulas arteriovenosas, o estreitamento do lúmen e os desvios do curso arterial ou venoso.

Applebaum et al. (1990) citaram que a técnica ainda oferece excelente visualização dos vasos sanguíneos em procedimentos experimentais, contribuindo grandemente na avaliação de enxertos ósseos, implantes e reparação de fraturas, sobretudo quando associada à histologia. Porém, esta técnica é realizada apenas em casos clínicos específicos, não sendo aplicada na rotina veterinária.

A angiografia ainda depende de equipamentos de raios X que regulam o número de exposições por período de tempo, diante da velocidade da corrente sanguínea, proporcionando a visualização de diversas fases, arterial, capilar e venosa (Neto, 1994).

Em veterinária, Franch (1994) utilizou a angiografia no estudo da microcirculação no local da osteotomia experimental em tibia de cães, empregando a fixação percutânea como método de imobilização e concluiu que a angiografia permitiu avaliar eficientemente a interferência deste método de imobilização na consolidação da fratura.

Cullun et al. (1988) e Mwanza et al. (1996) relataram que a radiografia é um método clínico de verificação eficaz tanto para acompanhar a evolução da cicatrização óssea, quanto para detectar o aparecimento de complicações, constituindo importante ferramenta em diagnóstico veterinário, apesar da pouca relação existente entre a observação clínica e radiológica da falha óssea.

Ackerman & Silverman (1978) afirmaram que a reparação de fraturas pode ser monitorada radiograficamente. A seqüência de eventos que podem ser observados na radiografia depende da idade do animal, do tipo de fratura, do tratamento, do suprimento sanguíneo do osso fraturado, da estabilidade no foco da fratura e da presença de complicações, tais como infecções e formação de seqüestro ósseo. A formação do calo ósseo é visível radiologicamente, a partir de quatorze dias após a fratura. A consolidação é observada quando o calo torna-se denso, nova sombra cortical manifesta-se e a linha de fratura é obliterada. Entretanto, a remodelação óssea pode continuar por meses.

Borges (1998) e Rezende et al. (1998), utilizando HAP-91 com porosidade de 250µm em defeitos ósseos provocados na tibia de cães, realizaram observações radiológicas com zero, oito, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 dias de pós-operatório. Os autores relataram maior radiopacidade do produto se comparado ao osso normal, na primeira observação, que gradualmente foi diminuindo. Aos 60 dias, o defeito estava com radiopacidade semelhante ao do osso normal, quadro que se repetiu nas observações subsequentes. Radiograficamente, os autores constataram, nos grupos tratados com hidroxiapatita pura e associada ao lipossomo, um aumento da radiopacidade da falha óssea que, aos 120 dias, assemelhava-se ao osso normal, o que não foi observado nos animais do grupo tratado com a hidroxiapatita associada ao colágeno.

3- MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 20 cães adultos, do sexo feminino, sem raça definida, pesando entre oito e 20 quilos, isentos de sinais aparentes de doenças infecto-contagiosas e provenientes do canil experimental do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram separados em dois grupos de dez cada: os animais do grupo 1 foram tratados com hidroxiapatita sintética em forma de grânulos, enquanto os do grupo 2 não receberam tratamento. Os animais foram alojados em canis individuais, onde receberam ração comercial¹ e água à vontade.

Após jejum alimentar e hídrico de 12 horas, todos os animais foram sedados com acepromazina² na dose de 0,1mg/kg de peso vivo por via intravenosa. A anestesia geral foi feita com pentobarbital sódico por via intravenosa na dose de 12,5 mg/kg, e a manutenção com um terço desta dose pela mesma via, à medida que se fez necessário.

No membro pélvico esquerdo, após tricotomia e desengorduramento, fez-se uma incisão longitudinal de pele e de tecido subcutâneo na face medial da diáfise da tíbia e produziu-se uma fratura completa transversa no seu terço médio (Fig 1), com o auxílio de um osteótomo e martelo ortopédico.

Logo após, com o mesmo instrumental cirúrgico auxiliar, foi provocada uma falha óssea em forma triangular de aproximadamente um centímetro de comprimento, com auxílio de furadeira elétrica, no fragmento distal da fratura (Fig 2). No grupo tratado, esta falha foi preenchida com hidroxiapatita sintética³ (HAP-91), produzida, segundo Andrade et al. (1997), em forma de grânulos, com porosidade de 250µm (Fig 3). A fratura foi imobilizada pela fixação percutânea, utilizando dois pinos de Steinmann distais e dois

¹ Canina - Purina

² Acepran - Univet

³ HAP-91 JHS Laboratório Químico Ltda

proximais em um ângulo de 45° entre eles. Utilizou-se resina acrílica autopolimerizável⁴ para fixar as barras de conexão (Fig 4). Os tecidos incisados foram suturados de maneira convencional.

O exame clínico local constou de observação diária da ferida cirúrgica avaliando a presença de reação inflamatória, no foco da fratura, claudicação, sensibilidade dolorosa, mobilidade dos pinos no local de sua inserção. Os graus variados de claudicação foram descritos nos dias um, cinco e 10 dias de pós-operatório, segundo a seguinte escala: 0- Ausente; 1- Leve; 2- Moderada; 3- Intensa.

Foram feitos curativos diários que constaram de limpeza com solução fisiológica e colocação de ataduras envolvendo o aparelho como um todo, para evitar que os animais se prendessem em superfícies ou objetos pontiagudos. Aos 15 dias de pós-operatório retiraram-se os pontos de pele em todos os animais e aos 45 dias de pós-operatório, foram retirados os pinos percutâneos, decorrente da mobilidade dos pinos.

Os animais não receberam nenhum tipo de medicação durante todo o experimento. Foram feitas radiografias na posição craniocaudal, antes do procedimento cirúrgico, para verificar ausência de alterações ósseas dos animais. As radiografias na mesma posição foram repetidas logo após a cirurgia, aos oito, 30, 60, 90 e 120 dias de pós-operatório. Avaliaram-se a radiopacidade da falha óssea e a formação do calo ósseo em todos os animais. A radiopacidade foi graduada através de comparação com o osso circunvizinho segundo a seguinte escala: 1- Radiopacidade zero; 2- Radiopacidade intensamente abaixo da radiopacidade do osso circunvizinho; 3- Radiopacidade moderadamente abaixo da radiopacidade do osso circunvizinho; 4- Radiopacidade discretamente abaixo da radiopacidade do osso circunvizinho; 5- Radiopacidade semelhante à radiopacidade do osso circunvizinho; 6- Radiopacidade discretamente acima da radiopacidade do osso circunvizinho; 7- Radiopacidade moderadamente acima da radiopacidade do osso circunvizinho; 8- Radiopacidade intensamente acima da radiopacidade do osso circunvizinho; 9- Radiopacidade máxima.

Aos oito, 30, 60, 90 e 120 do pós-operatório, utilizando dois animais de cada grupo, foi realizado o estudo da microcirculação no local da osteotomia, por meio do método angiográfico descrito por Franch (1994), com os animais mantidos sob anestesia geral. Os

⁴ Vipi Cor – Vipi Flash – Dental Vipi Ltda

animais foram pré-medicados com heparina (5000 U.I./animal) para evitar a formação de coágulos intravasculares. Em seguida, separaram-se a artéria e a veia femorais do membro pélvico esquerdo, colocando-se, sem ajustar, três ligaduras, proximal, intermédia e distal, com fio de algodão ao redor de ambos os vasos. Fez-se uma incisão incompleta e oblíqua em ambos os vasos entre a ligadura intermédia e distal depois de haver ajustado previamente a ligadura proximal para evitar hemorragia. Através da incisão introduziu-se um cateter intravenoso que foi fixado pelo ajustamento da ligadura intermédia. Uma vez canulados os vasos, promoveu-se a eutanásia dos animais com super dosagem de pentobarbital sódico. Em seguida, através da cânula arterial e por meio de seringa manual, injetou-se uma suspensão de sulfato de bário a 30% em soro fisiológico até que houvesse refluxo pela cânula venosa. Neste momento, substituiu-se a solução anterior por uma de sulfato de bário a 30% em formaldeído a 10%, até que a solução drenasse pelo cateter venoso. Então, retiraram-se as cânulas e procedeu-se à amputação do membro pélvico na articulação coxofemoral. Este mesmo procedimento foi feito no membro pélvico direito, de todos os animais, para ser utilizado como comparação.

Foram feitas radiografias na posição craniocaudal e na posição mediolateral do membro para evidenciar a rede vascular da região de osteotomia. Uma vez realizadas as radiografias, os membros pélvicos isolados ficaram submersos durante 24 horas em um tanque que continha álcool 95% e formalina tamponada a 10% em uma proporção de 2:1 o que permitiu a estabilização e coagulação do sulfato de bário. Após 24 horas, a pele foi removida, para facilitar a fixação dos tecidos mais profundos e então as peças novamente retornaram ao tanque por mais 48 horas. Após esse período, as peças foram colocadas em um tanque com somente formol a 10% para se conseguir fixação melhor dos tecidos. Transcorridos seis dias, todas as tíbias foram dissecadas e colocadas novamente no tanque fixador por mais três dias. Então foram feitas secções longitudinais do foco de fratura e da falha óssea com o auxílio de uma serra manual, posteriormente radiografadas, evidenciando-se a trama vascular do osso no local da osteotomia.

Em seguida, parte das amostras do defeito ósseo do grupo tratado foi fixada em formol neutro a 10% durante 48 horas, e, em seguida, descalcificada (ácido fórmico a 10% em tampão citrato). Após total descalcificação, os fragmentos foram lavados em água corrente durante 24 horas, desidratados em álcool sob concentrações crescentes de 30, 70,

90 e 100%, por aproximadamente 12 horas em cada solução, embebidos em xylol por quatro a seis horas e processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina. O material foi cortado em micrótomo de rotação, obtendo-se cortes histológicos com 5 μ m de espessura, que foram corados pela técnica de hematoxilina e eosina e observadas ao microscópio óptico (Bancroft, 1996).

Outra parte das amostras do local de osteotomia do defeito ósseo dos grupos (tratado e controle), de aproximadamente dois centímetros, foi fixada em formol neutro a 10% durante 48 horas, e, em seguida, descalcificada. Após descalcificação em solução saturada de EDTA, as amostras foram desidratadas em série acetônica, incluídas e polimerizadas em resina epóxi (Epon 812). O material foi cortado em ultramicrótomo Ultracut/ Reichert, onde foram obtidos cortes de 0,5 μ m e corados com azul de toluidina (Merck).

Nas secções histológicas, foi feita uma análise qualitativa descritiva, avaliando o padrão de regeneração tecidual, baseado na atividade celular caracterizada pela presença de osteoclastos e osteoblastos e pela observação de osteócitos, formação de osso lamelar e formação de osso trabecular.

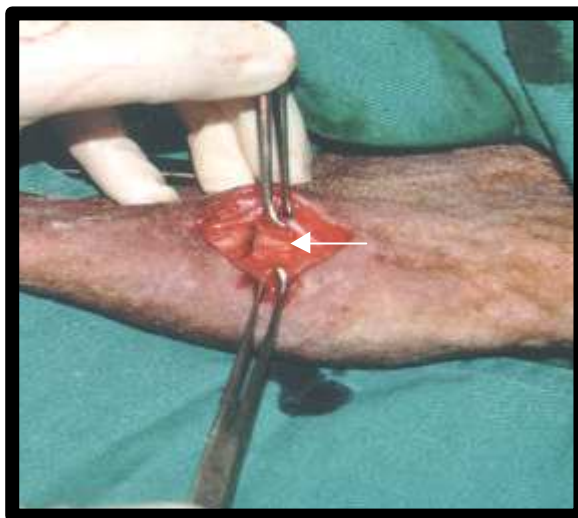


Figura 1- Fratura provocada no terço médio da tíbia esquerda (seta).

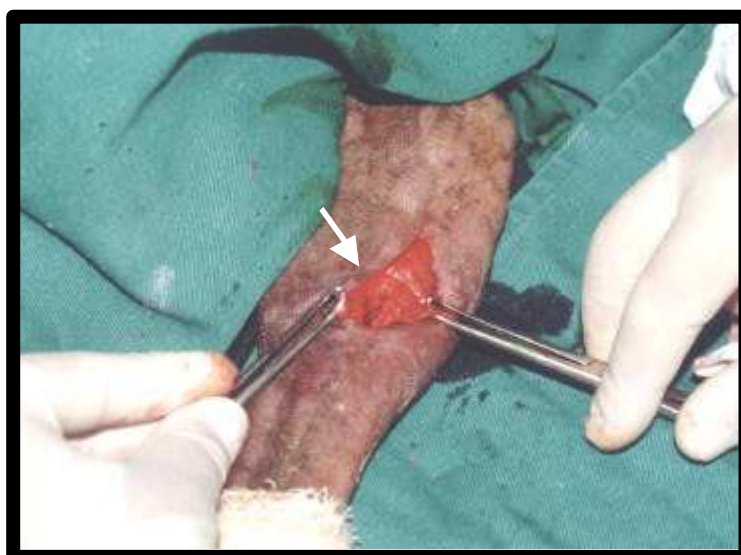


Figura 2- Falha óssea provocada experimentalmente no fragmento distal da fratura (seta).



Figura 3- Preenchimento de falha óssea com hidroxapatita sintética (seta).

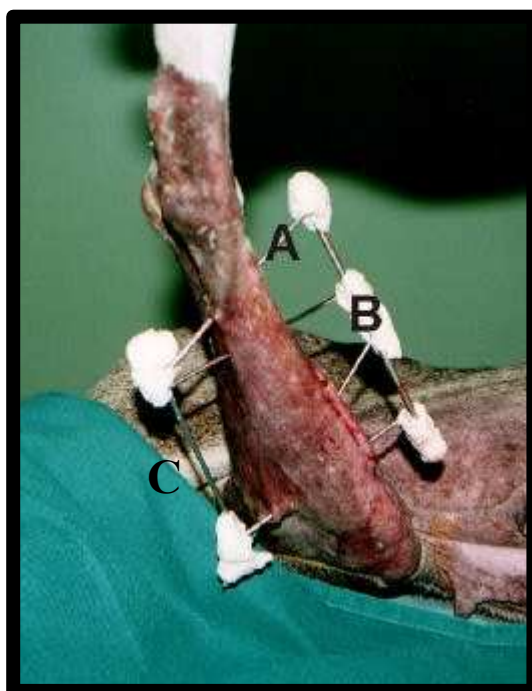


Figura 4- Tíbia esquerda imobilizada com fixação percutânea, logo após a cirurgia. A- pinos de Steinmann. B- resina acrílica autopolimerizável. C- Barra de conexão.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Aspectos clínicos e cirúrgicos do pós-operatório

Logo após a cirurgia, os animais não apoiaram o membro operado. A partir do segundo dia, os animais apresentaram claudicação em graus variados, tanto no grupo tratado quanto no grupo- controle (Tabelas 1 e 2), tendo o retorno completo à função do membro operado (Fig 5) ocorrido em aproximadamente dez dias. Acredita-se que este rápido retorno à função do membro se deva à fixação percutânea, por promover pequena lesão ao sistema vascular e nervoso e pela grande estabilidade promovida por este aparelho, como citado por Welch et al. (1997) e Bruce (1999).

Nos primeiros cinco dias de pós-operatório, os animais apresentavam edema no local da cirurgia, que regrediu espontaneamente a partir do quinto dia e não variou entre o grupo tratado e o grupo- controle. Acredita-se que este edema esteja relacionado com o trauma cirúrgico, como descrito por Langley-Hobbs et al. (1997). Conforme relatado por Seguin et al. (1997), observou-se secreção sero-sanguinolenta no local da cirurgia e nos locais de inserção dos pinos, em todos os animais deste experimento.

Como relatado por Franco (2000), também foi observada uma hemorragia abundante no grupo tratado, no momento do preenchimento da falha óssea, fato este que pode ser atribuído ao produto utilizado.

O exame clínico revelou o afrouxamento dos pinos, em todos os animais, aproximadamente aos 45 dias de pós-operatório, indicando a necessidade da retirada dos pinos. Nesta data, os animais não apresentavam diferenças entre o membro operado e o membro contralateral (Fig 6), com evidência clínica de cicatrização da fratura.

As vantagens da fixação percutânea citadas por Mears & Behrens (1983), Bouvy et al. (1993), Egger (1993) e Gueiros & Borges (1999) indicaram o seu uso em Medicina Veterinária. A colocação dos pinos percutâneos, neste experimento, seguiu as recomendações de Franch (1994), sendo de simples aplicação. Além disso, a resina acrílica

autopolimerizável utilizada para fixar a barra de conexão proporcionou custo menor ao aparelho, quando comparado aos aparelhos comerciais, como descrito por Shahr (2000).

A imobilização percutânea com pinos de Steinmann e o emprego de resina acrílica autopolimerizável para fixar a barra de conexão foi de fácil aplicação, eficiente e permitiu a cicatrização de fratura de tibia a partir de trinta dias de sua ocorrência tanto no grupo tratado quanto no grupo controle, concordando com as observações de Bouvy et al (1993), Egger (1993), Welch et al. (1997), Bruce (1999), e Gueiros & Borges (1999).

Acredita-se que o maior grau de claudicação dos animais do grupo tratado (Tabela 1 e 2) seja devido ao uso da hidroxiapatita, estando em concordância ao observado por Borges (1998), apesar de o produto utilizado ser biocompatível.

Tabela 1- Graus variados de claudicação nos animais do grupo tratado com hidroxiapatita sintética em forma de grânulos, em falha óssea associada a fratura de tibia provocada experimentalmente e imediatamente imobilizada por fixação percutânea.

ANIMAIS	GRAUS DE CLAUDICAÇÃO APÓS CIRURGIA		
	DIA 1	DIA 5	DIA 10
1	1	1	0
2	1	1	0
3	2	1	0
4	2	1	0
5	2	1	0
6	2	1	0
7	1	1	0
8	1	1	0
9	1	1	0
10	2	1	0

0- Ausente;

1- Leve;

2- Moderada;

3- Intensa;

Tabela 2- Graus variados de claudicação nos animais do grupo controle com falha óssea associada a fratura de tíbia provocada experimentalmente e imediatamente imobilizada por fixação percutânea.

ANIMAIS	GRAUS DE CALUDICAÇÃO APÓS CIRURGIA		
	DIA 1	DIA 5	DIA 10
11	0	0	0
12	1	0	0
13	1	0	0
14	1	0	0
15	1	0	0
16	1	0	0
17	1	0	0
18	1	0	0
19	1	0	0
20	1	0	0

0- Ausente;

1- Leve;

2- Moderada;

3- Intensa;



Figura 5- Animal do grupo- controle, 10 dias após a cirurgia.



Fig 6- Animal do grupo tratado, 45 após a cirurgia, com evidência clínica de consolidação da fratura, sem diferenças entre os membros pélvicos, direito e esquerdo.

4.2- Aspectos radiográficos e angiográficos após a cirurgia

A radiografia feita antes do procedimento cirúrgico foi utilizada para registrar a higidez do tecido ósseo dos animais selecionados para o experimento.

Os animais apresentaram variados graus de radiopacidade que podem ser observados nas Tabelas 3 e 4.

Concordando com a monitoração citada por Ackerman & Silverman (1978), os exames radiográficos realizados aos oito dias de pós-operatório não revelaram quaisquer evidências de formação de calo ósseo, visto que as áreas de osteotomia e da falha óssea encontravam-se radiotransparentes, semelhantes aos achados radiográficos realizados logo após a cirurgia.

No grupo tratado, logo após a cirurgia e aos oito dias de pós-operatório (Figura 7A) notou-se grau máximo de radiopacidade do defeito ósseo, quando comparado com o osso circunvizinho, por apresentar a constituição química da hidroxiapatita sintética em forma de grânulos alta densidade. Já no grupo controle, foi observada radiopacidade zero com relação ao osso circunvizinho (Figura 8A). Em todo o processo de regeneração óssea, inicialmente se desenvolve tecido conjuntivo no foco da lesão, cuja radiopacidade é insuficiente para ser perceptível ao exame radiográfico, pelo fato de os constituintes químicos do tecido neoformado possuírem baixa densidade, concordando com os achados de Borges (1998), Rezende et al. (1998), Borges (2000) e Franco (2000).

Aos 30 dias, foram evidenciadas áreas de osteólise, traduzidas por radiotransparência, ao redor dos pinos percutâneos em todos os animais dos grupos (tratado e controle), o que também foi previamente observado por Egger (1993) e Franch (1994). Mesmo sendo esperado, estas áreas não foram suficientes para promover clinicamente o afrouxamento dos pinos, o que só foi atingido aos 45 dias.

Os exames radiográficos permitiram observar, aos 30 dias de pós-operatório, no grupo tratado, diminuição gradativa da radiopacidade (Fig 7B), e, já no grupo- controle, aumento desta radiopacidade (Fig 8B), dados semelhantes também foram encontrados por Borges (1998) e Rezende et al. (1998). Isto se deve ao fato de o tecido ósseo neoformado apresentar menor radiopacidade do que o produto utilizado e maior radiopacidade do que o

tecido conjuntivo. Observou-se ainda presença de calo ósseo, bem caracterizado pela continuidade da cortical óssea.

Observou-se, em alguns animais, intensa reação periosteal nos locais de inserção dos pinos tanto no grupo tratado quanto no grupo controle, evidenciada facilmente pelo aumento da radiopacidade e espessura da cortical adjacente aos mesmos, situação também descrita por Egger (1993) e Franch (1994).

Nas radiografias feitas aos 60 dias, no grupo tratado, pôde ser observado processo de remodelação do calo ósseo e do canal medular como indicados por Ackerman & Silverman (1978) e Cullun et al (1988), caracterizado pela intensidade de radiopacidade entre a falha óssea preenchida e o osso, quadro que se repetiu aos 90 e 120 dias de pós-operatório (Fig 7C, 7D). Nas radiografias realizadas aos 60 dias de pós-operatório no grupo controle, apesar de já ser encontrada evidência de formação do calo ósseo a partir dos trinta dias de pós-operatório, o processo de remodelação do canal medular não foi evidenciado (Figs 8C e 8D). Possivelmente, tal diferença entre os grupos deveu-se ao fato de no grupo tratado haver a presença de HAP sintética em forma de grânulos funcionando como agente osteocondutor.

As radiografias foram importantes para acompanhar a evolução da reparação óssea e a interferência dos pinos de Steinmann na cortical, além de permitir a perfeita visualização da hidroxiapatita utilizada como substituto ósseo em defeito provocado experimentalmente, como relatado por Egger et al (1993) e Franch (1994).

A angiografia oferece excelente visualização dos vasos sangüíneos, contribuindo para a avaliação da cicatrização das fraturas, como citado por Rhinelande & Baragry (1962), Rhinelande (1974) e Rhinelande & Wilson (1982). A utilização de sulfato de bário como agente contrastante, neste experimento, mesmo não seguindo as recomendações de Neto (1994), deveu-se à utilização de cadáveres. A cateterização orientada por Franch (1994) e Sabiston (1999) permitiu a distribuição de contraste por todo o membro e, conseqüentemente, a visualização de toda rede vascular, tanto no grupo tratado quanto no grupo controle.

Aos oito dias de pós-operatório, os exames angiográficos realizados tanto no grupo tratado (Fig 9A) quanto no grupo controle (Fig 10A) permitiram evidenciar aumento do suprimento sangüíneo extra-ósseo. Este aumento, provavelmente originou-se de vasos

formados a partir da medula e dos tecidos moles adjacentes ao foco da fratura, como citado por Sher (1975) e West et al (1996), responsável, em grande parte, pelo carreamento de células precursoras osteogênicas e mediadores inflamatórios (Takahashi et al., 1999). Como os processos fisiológicos e a resposta do sistema vascular à injúria óssea dependem de um suprimento vascular adequado (Rai et al., 1981 e Wilson, 1991), considera-se este fator essencial no tratamento e prognóstico das fraturas. Assim, enfatiza-se a importância da utilização de métodos de imobilização que preservem o canal medular, permitindo com isto a restauração precoce do suprimento sanguíneo.

Apesar de a angiografia não ser um método diagnóstico utilizado rotineiramente em medicina veterinária (Applebaum et al., 1990), tal técnica, neste experimento, permitiu observar a reorganização vascular durante o processo de cicatrização óssea.

Os exames angiográficos realizados tanto no grupo tratado quanto no grupo controle, aos 30, 60, 90 e 120 dias mostraram diminuição gradativa da neovascularização (Fig. 9B, 9C, 10B e 10C), quando comparados aos exames angiográficos realizados aos oito dias de pós-operatório (Fig 9A e 10A). Tal fato se deveu, provavelmente à reorganização local do sistema vascular. Ainda aos 120 dias de pós-operatório, o membro contralateral permitiu observar que a irrigação do membro operado era semelhante, caracterizando, desta maneira, a reorganização vascular (Fig 9C e 10C).

Pelo método angiográfico, a ruptura da artéria nutricia foi perfeitamente observada nos membros fraturados, a partir das amostras processadas logo após a cirurgia, como observado por Rai et al. (1981), Rhinelander & Wilson (1982), Abdel Hamid et al. (1990), Dyce et al. (1990) e Jebara et al. (1991). Nas amostras processadas a partir de 60 dias, no grupo tratado, observou-se a sua aparente integridade (Figs 11 e 12), evidenciando-se mais uma vez, a reorganização vascular.

A angiografia permitiu o acompanhamento da reorganização vascular durante o processo de cicatrização óssea, mas não permitiu avaliar eficientemente o uso da hidroxiapatita, diferentemente do citado por Rhinelander & Baragry (1962) Rhinelander (1974) e Rhinelander & Wilson (1982), provavelmente porque o sulfato de bário e o produto utilizado mostram alto número atômico e suas imagens se assemelham em tonalidades de branco nas radiografias.

Tabela 3- Resultado do exame radiográfico do local de osteotomia e de defeito ósseo, em relação ao osso circunvizinho nos animais do grupo controle.

ANIMAIS	RADIOGRAFIA APÓS CIRURGIA					
	DIAS					
	0	8	30	60	90	120
11	1	2	3	4	5	6
12	1	2	3	4	5	6
13	1	2	3	4	5	
14	1	2	3	4	5	
15	1	2	3	4		
16	1	2	3	4		
17	1	2	3			
18	1	2	3			
19	1	2				
20	1	2				

- 1- Radiopacidade zero;
- 2- Radiopacidade intensamente abaixo da radiopacidade do osso circunvizinho;
- 3- Radiopacidade moderadamente abaixo da radiopacidade do osso circunvizinho;
- 4- Radiopacidade discretamente abaixo da radiopacidade do osso circunvizinho;
- 5- Radiopacidade semelhante à radiopacidade do osso circunvizinho;
- 6- Radiopacidade discretamente acima da radiopacidade do osso circunvizinho;

Tabela 4- Resultado do exame radiográfico do local de osteotomia e de defeito ósseo preenchido por hidroxiapatita sintética em forma de grânulos, em relação ao osso circunvizinho nos animais do grupo tratado.

	RADIOGRAFIA APÓS CIRURGIA					
	DIAS					
ANIMAIS	0	8	30	60	90	120
1	10	9	8	7	6	6
2	10	9	8	7	6	6
3	10	9	8	7	6	
4	10	9	8	7	6	
5	10	9	8	7		
6	10	9	8	7		
7	10	9	8			
8	10	9	8			
9	10	9				
10	10	9				

- 5- Radiopacidade semelhante à radiopacidade do osso circunvizinho;
- 6- Radiopacidade discretamente acima da radiopacidade do osso circunvizinho;
- 7- Radiopacidade moderadamente acima da radiopacidade do osso circunvizinho;
- 8- Radiopacidade intensamente acima da radiopacidade do osso circunvizinho;
- 9- Radiopacidade máxima.



Figura 7- Radiografias dos animais do grupo tratado com hidroxapatita sintética em forma de grânulos. A- oito dias após cirurgia posição craniocaudal; B- 30 dias após cirurgia posição craniocaudal; C- 60 dias após cirurgia posição mediolateral; D- 90 dias após a cirurgia posição mediolateral. (setas)



Figura 8- Radiografias dos animais do grupo- controle. A- oito dias após a cirurgia posição craniocaudal; B- 30 dias após cirurgia posição craniocaudal; C- 90 dias após a cirurgia posição mediolateral; D- 120 dias após a cirurgia posição mediolateral. (setas)

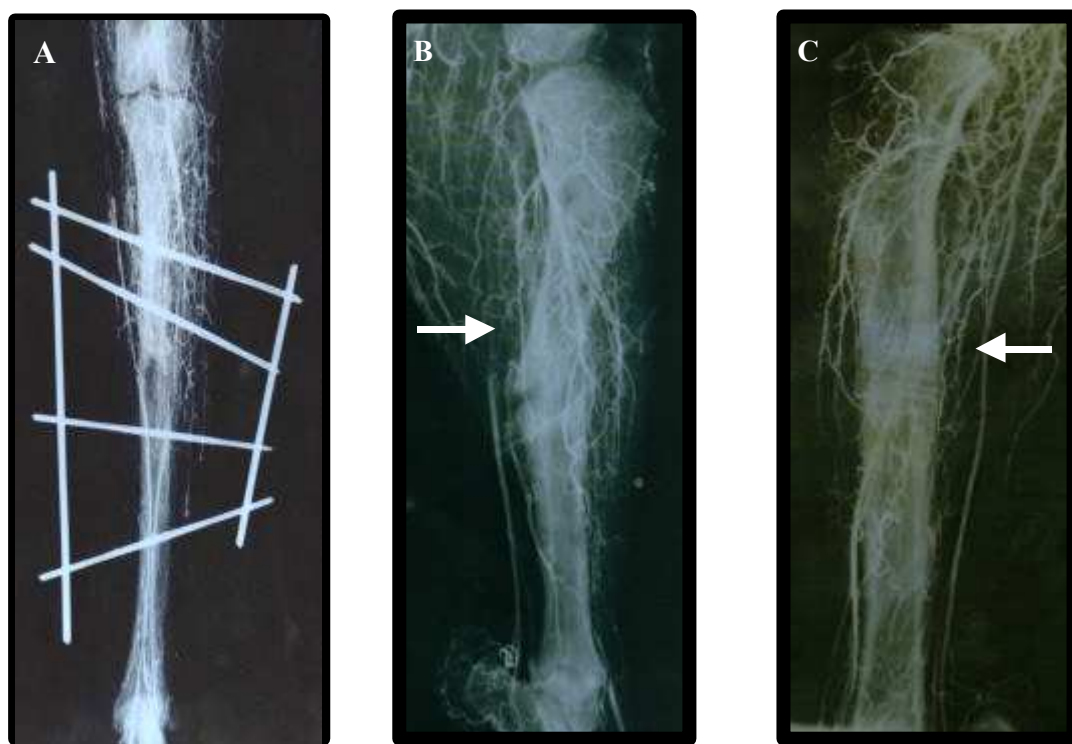


Figura 9- Angiografias dos animais do grupo tratado com Hidroxiapatita em forma de grânulos. A- oito dias após a cirurgia posição craniocaudal; B- 90 dias após a cirurgia posição mediolateral; C- 120 dias após a cirurgia posição mediolateral. (setas)

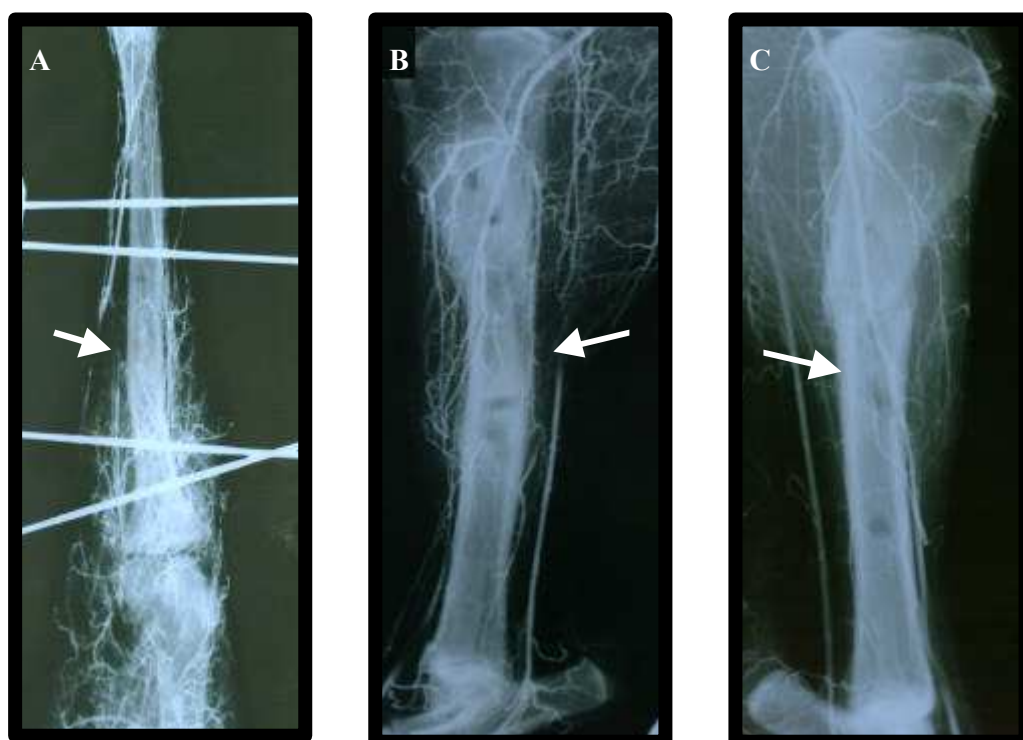


Figura 10- Angiografias dos animais do grupo- controle. A- oito dias após a cirurgia posição craniocaudal; B- 90 dias após a cirurgia posição mediolateral; C- 120 dias após a cirurgia posição mediolateral. (setas)



Figura 11- Artéria nutrícia restaurada aos 60 dias de pós-operatório no grupo tratado. (seta)



Figura 12- Artéria nutrícia restaurada aos 90 dias de pós-operatório no grupo tratado. (seta)

4.3- Aspectos histológicos dos efeitos do uso de hidroxiapatita sintética após a cirurgia

A caracterização da presença de hidroxiapatita foi evidenciada por meio de análise histológica das amostras do grupo tratado, sob a forma de material amorfo, acelular, bem delimitado e sem afinidade pelo corante utilizado.

No grupo controle, aos oito dias de pós-operatório, foram identificados osteócitos encerrados em osso trabecular (Fig 13) bem como osteoblastos localizados nas bordas das trabéculas ósseas, seguindo um processo normal de reparação óssea.

No grupo tratado, foi observada, aos oito dias de pós-operatório, atividade osteoclástica nas bordas da fratura, sugerindo processo inicial de consolidação caracterizada pelo debridamento das bordas da lesão (Fig 14), de maneira semelhante ao descrito por Borges (1998) e Franco (2000). Foram ainda observadas áreas de medula óssea preservadas. A importância deste fato é que a medula exerce influência no início do processo de reparação, por fornecer aporte celular e quimiotático, essenciais ao processo de reparação óssea, de acordo com Burwell (1985), Connolly (1995), West et al. (1996), Takahashi et al. (1999), Barros (2000) e Seale & Rudnick (2000).

Aos 30 dias de pós-operatório, os animais do grupo- controle apresentaram formação de osso novo a partir das bordas da lesão, mas com a falha óssea preenchida por tecido conjuntivo frouxo (Fig 15), característico de processo de reparação normal compatível com os achados clínicos e radiográficos. Encontrou-se proliferação de tecido conjuntivo bastante vascular e celular, com presença de fibras colágenas.

Aos 30 dias de pós-operatório, nos animais do grupo tratado, foi observado tecido ósseo trabecular preenchendo a região da osteotomia e da falha óssea (Fig 16). Estes achados foram também descritos por Wiese & Merten (1993), Borges (1998), Borges (2000) e Franco (2000), que evidenciaram histologicamente a evolução da reparação da fratura, coincidindo com os achados clínico-cirúrgicos e radiológicos. Foi observado também grande número de vasos sanguíneos, o que revela potencial angiogênico do material utilizado, descrito também por Geesink & Hoefnagels (1995) e Geesink (1993).

Aos 60 dias de pós-operatório, observou-se, nos animais do grupo tratado, a presença de ósteons secundários de tecido lamelar, tanto na região da fratura como no tecido de preenchimento da falha óssea.

Aos 90 dias de pós-operatório, tanto os animais do grupo tratado como os do grupo-controle apresentaram tecido ósseo maduro na região da falha e da osteotomia, além da intensa ação osteoclástica presente nos animais do grupo tratado. Este achado pode indicar uma franca remodelação do calo ósseo e do canal medular, coincidindo com os achados radiográficos. O presente quadro repetiu-se aos 120 dias de pós-operatório.

Ainda, aos 90 dias de pós-operatório os achados histológicos apresentavam semelhanças maiores que diferenças, provavelmente porque os processos de reparação óssea já se encontravam em fase avançada (Figs 17 e 18), com evidências clínicas e radiológicas de consolidação da fratura e reparação da falha óssea, fato também descrito por Barros (2000).

A avaliação histológica do uso da hidroxiapatita na regeneração da falha óssea, provocada em fraturas de terço médio de tibia de cães, imobilizadas pela fixação percutânea, indicou que nos animais do grupo tratado, houve mais rápida e eficiente consolidação da fratura e regeneração da falha óssea quando comparadas às do grupo-controle, na fase inicial de reparação. Este fato pode ser atribuído ao uso do material empregado, que demonstrou ser biocompatível e atuou como agente osteocondutor para a regeneração óssea, conforme já descrito por Bulchoz et al. (1987), Borges (1998), Rezende (1998), Borges (2000), Franco (2000) e Ball et al. (2001).

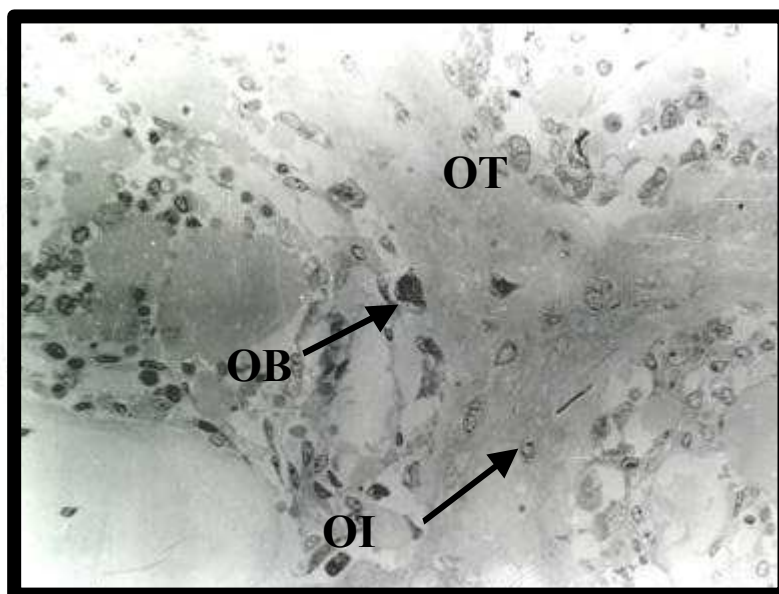


Figura 13- Presença de osteócitos (OI) encerrados em tecido ósseo trabecular (OT) e ação osteoblástica (OB) incipiente aos oito dias de pós-operatório no grupo- controle; Azul de toluidina; 100X.

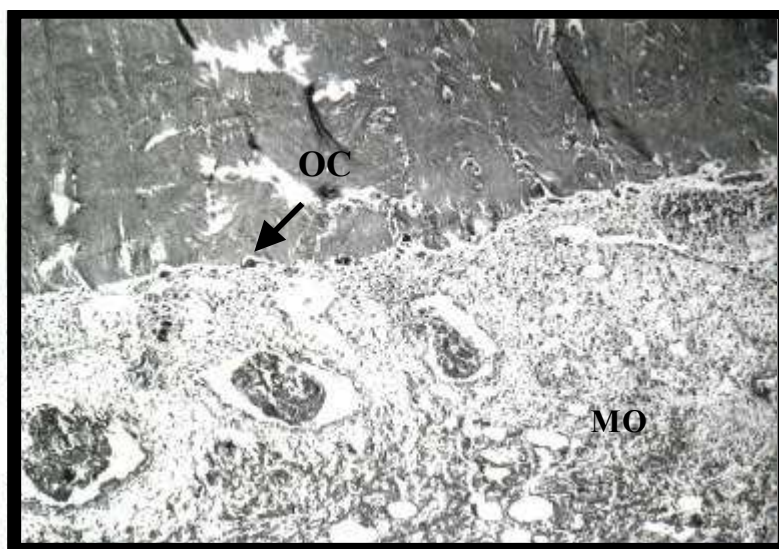


Figura 14- Presença de osteoclastos (OC) participando do processo de reabsorção das bordas da fratura aos oito dias de pós-operatório do grupo tratado e medula óssea preservada (MO); HE; 10X.

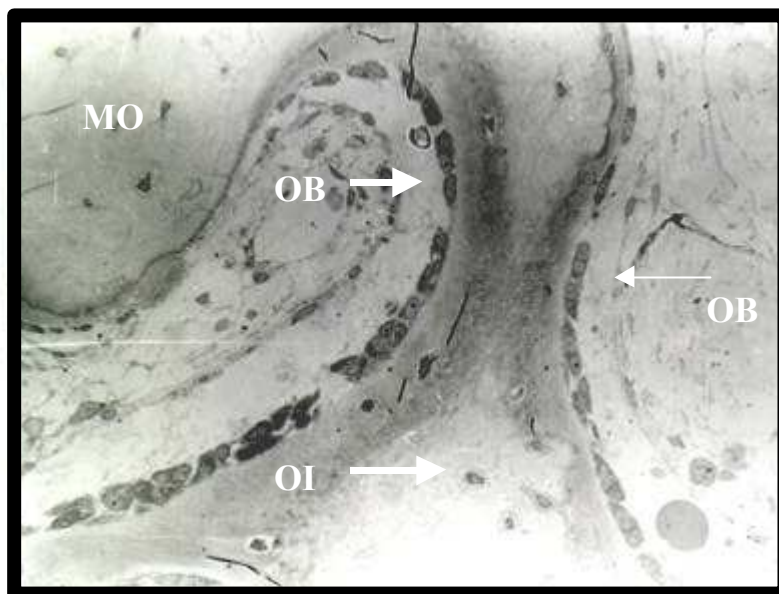


Figura 15- Presença de osteoblastos (OB) participando do processo de formação de matriz óssea (MO) e presença de osteócitos (OI) encerrados na matriz, aos 30 dias de pós-operatório, no grupo- controle; Azul de toluidina; 100X.

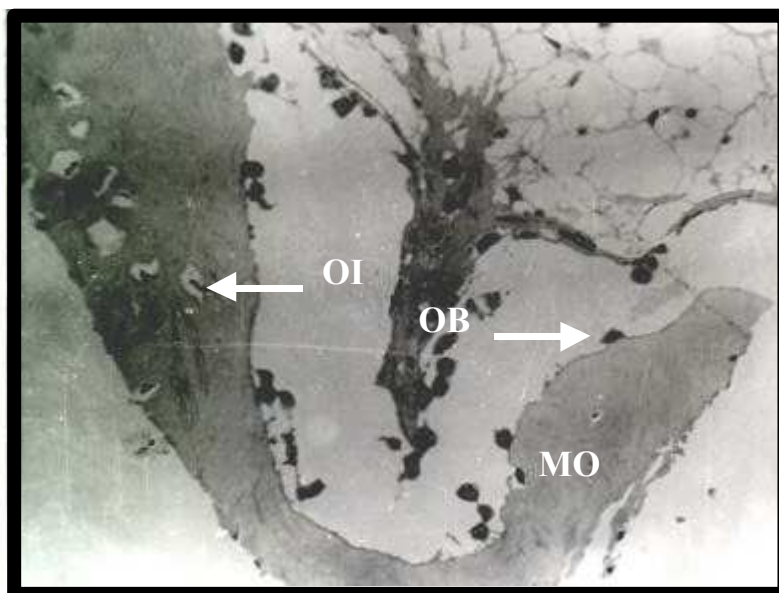


Figura 16- Presença de osteoblastos (OB) participando menos do processo de formação de matriz óssea (MO) e presença de osteócitos (OI) encerrados na matriz, aos 30 dias de pós-operatório, no grupo tratado; Azul de toluidina; 100X.

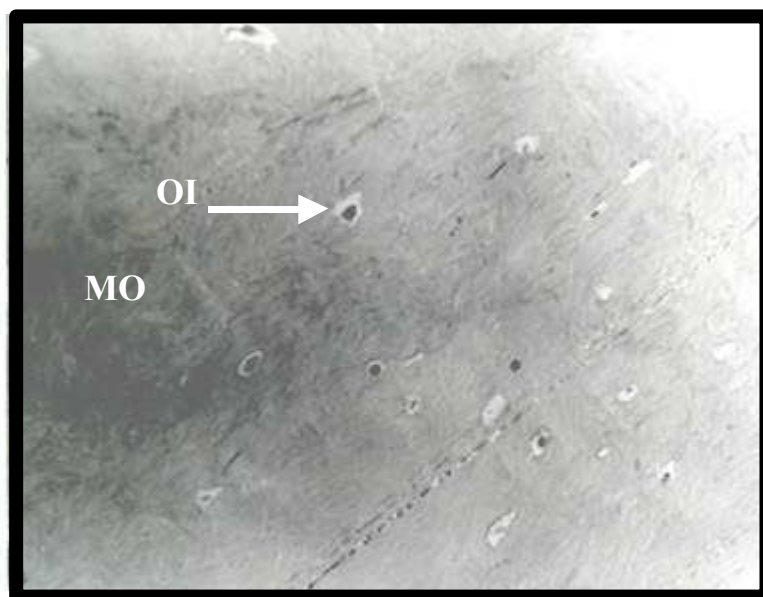


Figura 17- Presença de osteócitos (OI) encerrados na matriz óssea (MO), aos 90 dias de pós-operatório, no grupo- controle; Azul de toluidina; 100X.

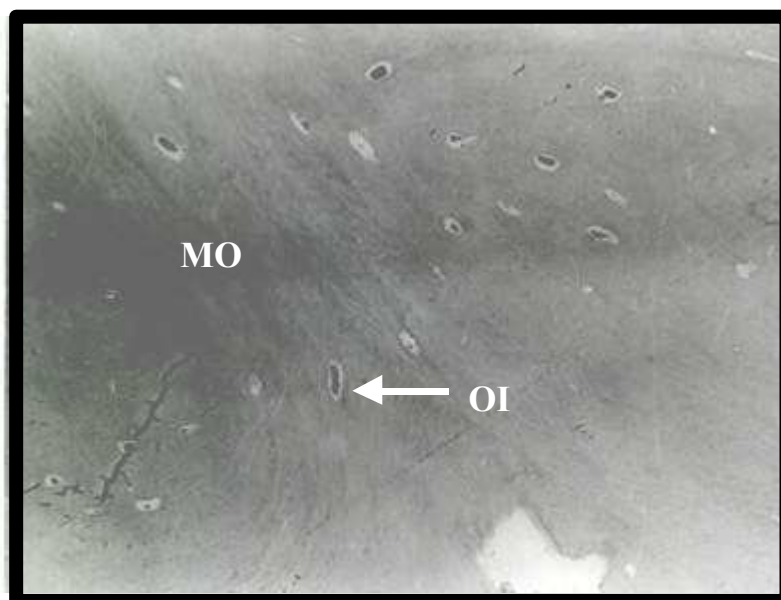


Figura 18- Presença de osteócitos (OI) encerrados na matriz óssea (MO), aos 90 dias de pós-operatório, no grupo tratado; Azul de toluidina; 100X.

5- CONCLUSÃO

Com base nos resultados clínico-cirúrgicos, radiográficos, angiográficos e histológicos obtidos nas condições em que este experimento foi realizado, pode-se concluir que o uso da Hidroxiapatita Sintética em forma de grânulos favoreceu o processo de reparação de falhas ósseas provocadas em fraturas de terço médio de tíbia, imobilizadas por fixação percutânea, principalmente nas fases iniciais do processo de reparação.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL HAMID, M.A., EL NAHLA, S. M., ERASHA, A. M. et al. Intraosseous distribution of the nutrient artery of the humerus in the dog and goat. **Vet. Med. J. Gisa**. v.38, n. 2, p. 165-172, 1990.
- ACKERMAN, N., SILVERMAN, S. Fracture healing. **Med. Vet. Pract.**, v. 59, n. 5, p.381-384, 1978.
- APPLEBAUM, R., YELLIN, A. E., WEAVER, F. A. et al. Role of Routine Arteriography in Blunt Lower Extremity Trauma. **The American Journal of Surgery**, v.160, p.221-225, 1990.
- BANCROFT, J.D.; STEVENS, A. Theory And Practice of Histological Techniques. 4^a ed New York: Churchill Livingstone, 1996. 766p.
- BALL M.D., DOWNES S., SCOTCHFORD C.A., et al. Osteoblast growth on titanium foils coated with hidroxyapatite by pulsed laser ablation. **Biomaterials**, v.22, p.337-347, 2001.
- BARROS, S.V. **Auto enxerto percutâneo de medula óssea em falhas segmentares produzidas no rádio de coelhos**. Dissertação de Mestrado Universidade Federal de Viçosa, 2000, 52p.
- BORGES, A.P.B. **O efeito da hidroxiapatita sintética na regeneração óssea de defeito provocado experimentalmente no terço proximal da tíbia de cães (*Canis familiares*): Estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico por microscopia de luz e microscopia eletrônica de retrodispersão**. Tese de Doutorado, Escola de Veterinária – UFMG, Belo Horizonte, 1998, 111 p.

- BORGES, A. P. B., REZENDE, C.M.F., RIBEIRO, M.F.B., MELO, E.G., NOBREGA NETO, P.I. Hidroxiapatita sintética como substituto ósseo em defeito experimental provocado no terço proximal da tíbia em cão: aspectos à microscopia eletrônica de transmissão. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 52, n. 6, p. 616-620, 2000.
- BOUVY M.B., MARKEL D.M., CHELIKANI S., et al. Ex vivo biomechanics of Kischner- Ehmer External Skeletal Fixation Applied to canine tibiae, **Veterinary Surgery**, v.22, p.194- 207, 1993.
- BRUCE W.J., Stifle joint Luxation in the cat: treatment using transarticular external skeletal fixation. **Journal of Small Animal Practice**, v. 40, p.482-488, 1999.
- BUCHOLZ, R. W., CARLTON, A. & HOLMES, R. E. Hidroxiapatite and tricalcium Phosphate Bone Graft Substitutes. **Orthopedic Clinics of North America**, v. 18, p. 323-333, 1987.
- BURWELL, R. G. The function of bone marrow in the incorporation of a bone graft. **Clin. Orthop**, n. 200. P. 125-141, 1985.
- CALLAN, D. P. & ROHRER, M.D. Use of bovine-derived hydroxyapatite in the treatment of edentulous defects: a human clinical and histologic case report **J Periodontol**, v.64, n.6, p.575-582, 1993.
- CONNOLLY, J. F. Injectable Bone Marrow preparations to stimulate osteogenic repair. **Clin. Orthop**, n. 313, p. 8-18, 1995.
- CULLUN, P. E., FROST, D. E., NEWLAND, T. B., et al. Evaluation of hydroxyapatite particles in repair of alveolar clefts in dogs. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 46, n. 4, p. 290-296, 1988.
- DACULSI, G. e PASSUTI, N. Effect of macroporosity for osseous substitution of calcium phosphate ceramics. **Biomaterials**, v. 11, n. 1, p. 86-89, 1990.
- DYCE, K. M., SACK, W. O. e WENSING, C. J. G. **Tratado de Anatomia Veterinária**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1990. p. 576.
- EGGER, E. L. External Skeletal Fixation. General Principles. In: SLATTER D. H. (ed). **Textbook of Small Animal Surgery**. 2a Ed., Saunders. Philadelphia p. 1641-1656, 1993.

- FRANCH, J. S. **Efecto de la implantacion angulada o transversa com flexion de las agujas transfixantes sobre la cicatrizacion de osteotomias tibiales en perro reducidas mediante fijadores externos**. Tesis Doctoral, Bellaterra, 1994, 138 p.
- FRANCO, K. L. **Avaliação Clínico-Cirúrgica, Radiológica e Histológica da Reparação Óssea Após Utilização de Hap-91, Col. Hap-91 e Int.Hap-91 em Defeito Provocado Experimentalmente na Tíbia de Cães**. Monografia Especialização - Departamento de Veterinária - UFV, Viçosa, 2000, 22 p.
- GEESINK, R. G. T. Clinical, Radiological and Human Histological Experience with Hydroxiapatite Coatings in Orthopaedic Surgery. **Acta Orthopaedica Belgica**, v. 59, n. 1, p. 161-164, 1993.
- GEESINK, R. G. T. & HOEFNAGELS, N. H. M. Six-year results of hydroxyapatite-coated total hip replacement. **J. Bone Joint Surg. Br**, v. 77, n. 4, p. 534-547, 1995.
- GREEN, J. P., WOJNO, T. H., MATTHEW, W. W., GROSSNIKLAUS, H. E.. Bone Formation in Hydroxyapatite Orbital Implants. **American Journal of Ophthalmology**, v. 120, n. 5, p. 681-682, 1995.
- GUEIROS, V. A. & BORGES, A. P. B. Fixação esquelética externa e sua aplicação em pequenos animais – revisão. **Clínica veterinária**, v.4, n. 22, p. 31-36, 1999.
- HEIKKILA, J., AHO, A.J., YLI-URPO, A., et al. Bioactive glass versus hydroxylapatite in reconstruction of osteochondral defects in rabbit **Acta Orthop Scand**, v. 64, n. 6, p. 678-682, 1993.
- JEBARA, V. A., HADDAD, S. N., GHOSAIN, M. A. et al. Emergency Arteriography in the Assessment of Penetrating Trauma to the Lower Limbs. **The Journal of Vascular Diseases**, July, p.527-532, 1991.
- LANGLEY-HOBBS S.J., CARMICHAEL S., MC CARTNEY W.T. External Skeletal Fixation for Stabilization of comminuted humeral fractures in Cats. **Journal of Small Animal Practice**, v.38, p.280-285, 1997.
- MEARS, D.C. & BEHRENS, F. The application and use of external fixation. In: MEARS, D. C. (ed). **External Skeletal Fixation**. The Williams and Wilkins Co. Baltimore, p. 161-209, 1983.

- MWANZA T., MIYAMOTO T., OKUMURA M., et al. Ultrasonography and angiographic examination of normal canine liver vessels. **Japan Journal Veterinary Research**, v.44, n.3, p. 179 – 188, 1996.
- NETO, A. P., **Clínica cirúrgica**. Sarvier, São Paulo, 4ª ed., v.2, 1545p., 1994.
- OWEN, M. The origin of Bone Cells in the Post Natal organism. **Arthritis Rheum.**, v. 23, n. 10, p. 1073-1077, 1980.
- RAI, R., NIGAM, J. M., SINGH, A. P. et al. Angiografic Observations Following Intramedullary Fixation of Femoral Fracture in Dogs. **Indian vet. J.**, v. 58, p. 973-977, 1981.
- REZENDE, C.M.F.; BORGES, A. P.B.; BERNIS, W. O et al. Aspectos clínicos-cirúrgicos e radiográficos da hidroxiapatita sintética na diáfise proximal da tíbia de cães. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.50, n.5, p.537-545, 1998.
- RHINELANDER, W.F.; BARAGRY, R.A. Microangiography in Bone Healing. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 44, n. 7, p.1273-1298, 1962.
- RHINELANDER, F. W. Tibial Blood Supply in Relation to Fracture Healing. **Clinical Orthopaedics**, v. 105, n. 12, p. 34-79, 1974.
- RHINELANDER, F. W. & WILSON, J. W. Blood Supply to Developing Mature and Healing Bone. In: SUMNER-SMITH, G. **Bone in clinical orthopaedics**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, p. 81-158, 1982.
- ROSE, S. C. & MOORE, E. E. Trauma Angiography: The Use of Clinical Findings to Improve Patient Selection and Case Preparation. **The Journal of Trauma**, v. 28, n. 2., p. 240-245, 1988.
- SABISTON. **Tratado de Cirurgia**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 15ª ed., v.2, 1577p., 1999.
- SCHLIEPHAKE, H., NEUKAM, F. W. e KLOSA, D. Influence of poroe dimensions on bone ingrowth into porous hydroxyapatite blocks used as bone graft substitutes. **Int. J. Oral Maxillofacial. Surg**, V. 20, n. 1, p. 53-58, 1991.
- SEALE, P. & RUDNICK, M. A. A new look at the origin, function and Stem Cell Status of muscle satellite cells. **Developmental Biology**, n. 218, p. 115-124, 2000.

- SEGUIN, B, HARARI, J, WOOD, R.D., et al. Bone Fracture and Sequestration as Complications of External Skeletal Fixation. **Journal of Small Animal Practice**, v. 38, p. 81-84, 1997.
- SHAHAR R. Relative Stiffness and Stress of type I and Type II External fixators: Acrylic Versus Stainless Steel Connecting Bars _ A theoretical Approach. **Veterinary Surgery**, v.29, p.59- 69, 2000.
- SHER, M. H. Principles in the Management of Arterial Injuries Associated with Fractures/ Deslocations. **Ann. Surg**, v. 182, n. 5, p. 630-634, 1975.
- TAKAHASHI, N., UDAGAWA, N. & SUDA, T. A New member of tumor necrosis factor Deslocations. *Ann. Surg.*, v. 182, n. 5, p. 630-634, 1975. ligand family, ODF/ OPGF/ TRANCE/ RANKL, regulates Osteoclast Differentiation and function. **Biochemical and Biophysical Research Communications** , v. 256, p. 449-455, 1999.
- WELCH, J.A., BOUDRIEAU, R.J., DEJARDIN, L.C. et al. The Intraosseous Blood Supply of the Canine Radius: Implications for Healing of Distal Fractures in Small Dogs. **Veterinary Surgery**.. v.26, p.57-61, 1997.
- WEST P.G., ROWLAND G.R., BUDSBERG S.C., et al. Histomorphometric and Angiographic Analysis of the Humerus in Pigeons. **American Journal Veterinary Research**, v. 57, n. 7, p. 982–986, 1996.
- WIESE, K.G. & MERTEN, H.A. The role of the periosteum in osteointegration of hydroxyapatite granules. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg**, v. 22, n. 5, p. 306-308, 1993.
- WILLIAMS, J., BAILEY, M. Q., SCHERTEL, E. R. et al. Compartment Syndrome in a Labrador Retriever. **Veterinary Radiology & Ultrassound**, v. 33, n. 6, p. 244-248, 1992.
- WILSON, J. W. Vascular Supply to Normal Bone and Healing Fractures. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, v. 6, n. 1, p. 26-38, 1991.