

ENXERTOS E SUBSTITUTOS ÓSSEOS EM CIRURGIA ORTOPÉDICA RECONSTRUTIVA NOS ANIMAIS DE COMPANHIA - UMA BREVE REVISÃO*

Maria Isabel Ribeiro Dias¹⁺, Cristina Maria Peixoto de Sousa², Pedro Miguel Pires de Carvalho², Marthin Raboch Lempek³, Carlos Alberto Antunes Viegas¹ e Jorge Manuel Teixeira de Azevedo⁴

ABSTRACT. Dias M.I.R., de Sousa C.M.P., de Carvalho P.M.P., Lempek M.R., Viegas C.A.A. & de Azevedo J.M.T. [**Bone grafts and substitutes in small animal orthopaedic reconstructive surgery - A brief review**]. Enxertos e substitutos ósseos em cirurgia ortopédica reconstrutiva nos animais de companhia - Uma breve revisão. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 35(4):339-350, 2013. Instituto de Ciências da Vida e Saúde, Grupo de Investigação em Biomateriais, Biodegradáveis e Biomiméticos, Departamento de Ciências Veterinárias, Escola das Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Apartado 1013, 5001-801, Vila Real, Trás-os-Montes, Portugal. E-mail: idias@utad.pt

We present here an overview of the scientific literature concerning the clinical application of autografts and allografts of the skeletal tissues and of the natural and synthetic bone graft substitutes available in small animal orthopedic surgery for resolution of congenital, traumatic and tumoral etiology situations or for reconstructive arthroplastic surgeries. This article focuses the terminology, definitions and characteristics of the bone grafts and bone graft substitutes based in their functions and composition, the process of incorporation of the bone grafts and bone graft substitutes, the collection of autogenous cancellous or corticocancellous bone for grafting, the available commercial forms of bone graft or bone graft substitutes and the biologic/synthetic composite grafts, other accessible options in small animal orthopedic surgery with osteogenic and/or osteoinductive characteristics (ex. collection and use of the autogenous bone marrow or platelet rich plasma), the principal clinical indications and surgical techniques in which are recommended the use of bone graft and/or bone graft substitutes and how to select the best option for each specific clinical case. At last, the future perspectives in reconstructive orthopedic surgery are also pointed, namely the tissue engineering of bone and cartilage tissues and the medical three dimensional biomodulation.

KEY WORDS. Orthopedic surgery, traumatology, autograft, allograft, bone graft substitute, small animals.

RESUMO. Neste artigo pretendeu realizar-se uma revisão da literatura científica da informação disponível sobre os vários tipos de auto- e aloenxertos do

sistema musculo-esquelético e substitutos ósseos naturais e sintéticos do tecido ósseo para utilização em cirurgia ortopédica dos animais de companhia

*Recebido em 21 de agosto de 2012.

Aceito para publicação em 5 de setembro de 2013.

¹ Médico-veterinário. *PhD*. Instituto de Ciências da Vida e Saúde (ICVS) / Grupo de Investigação em Biomateriais, Biodegradáveis e Biomiméticos (3B's); Departamento de Ciências Veterinárias, Escola das Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Apartado 1013, 5001-801 Vila Real, Trás-os-Montes. *Autora para correspondência. E-mail: idias@utad.pt; E-mail: cviegas@utad.pt

² Médico-veterinário. *DVM*. ICVS/3B's, Departamento de Engenharia de Polímeros, Universidade do Minho, AvePark - Zona Industrial da Gandra, S. Cláudio do Barco, 4806-909 Caldas das Taipas, Guimarães, Minho. E-mails: cristinamariapsousa@gmail.com; pedro.carvalho@dep.uminho.pt

³ Curso de Medicina Veterinária. Centro de Ciências Agroveterinárias; Universidade do Estado de Santa Catarina, Av. Luiz de Camões, 2090, Conta Dinheiro, SC 88520-000, Brasil. E-mail: marthinrl@hotmail.com

⁴ Engenheiro Zootécnico. *PhD*. Centro de Estudos em Ciências Agrárias e Veterinárias, Departamento de Zootecnia, Escola das Ciências Agrárias e Veterinárias, UTAD, Apartado 1013, 5001-801 Vila Real, Trás-os-Montes. E-mail: jazevedo@utad.pt

com vista à resolução cirúrgica de situações clínicas do foro da traumatologia e ortopedia de etiologia congénita, traumática, tumoral ou em implantações artroplásticas. Abordam-se assim os conceitos gerais sobre a terminologia, definições e classificação dos enxertos e substitutos ósseos com base nas suas funções e composição, o processo de incorporação dos enxertos e substitutos ósseos, os principais locais de obtenção e a correta técnica de transplante de enxertos ósseos autógenos, os principais tipos de enxertos e substitutos ósseos comercializados e os enxertos compostos, outras abordagens autógenas acessíveis em animais de companhia com potencial osteogénico e/ou osteoindutor (ex. obtenção e utilização de medula óssea autógena ou plasma enriquecido em plaquetas), as principais situações clínicas e técnicas cirúrgicas em que se recomenda a utilização de enxertos e/ou substitutos ósseos e como selecionar em cada caso clínico a melhor opção disponível. Por fim, são também abordadas as perspectivas futuras em cirurgia ortopédica reconstrutiva, nomeadamente a engenharia do tecido ósseo e cartilagem e a biomodelação tridimensional médica.

PALAVRAS-CHAVE. Cirurgia ortopédica, traumatologia, autoenxerto, aloenxerto, substituto ósseo, animais de companhia.

INTRODUÇÃO

Em Medicina Veterinária, tal como em Medicina Humana, surgem inúmeras situações do foro da cirurgia ortopédica e neurocirurgia que exigem a utilização de enxertos ou substitutos ósseos na sua resolução. De uma forma geral, os auto- e aloenxertos ósseos são utilizados no preenchimento de descontinuidades e defeitos ósseos após a redução e estabilização de fraturas diafisárias cominutivas e no estímulo à cicatrização óssea em fraturas em doentes geriátricos, na resolução de processos de atrasos da união ou de não união, após a realização de osteotomias corretivas e artrodeses, no preenchimento de defeitos quísticos ou após a remoção de sequestros ósseos, após a excisão de tumores ósseos e, no caso particular do autoenxerto enxerto de osso esponjoso, no estímulo da cicatrização óssea após o tratamento de fraturas infetadas (Golberg & Stevenson 1987).

O enxerto de osso esponjoso ou trabecular autógeno tem constituído o enxerto ósseo de eleição pela sua rápida incorporação no local recetor devido às suas propriedades osteogénica e osteoindutiva, uma

vez que fornece os componentes celulares e proteínas da matriz extracelular (ECM) óssea capazes de acelerar a regeneração óssea e a propriedade osteocondutora pelas trabéculas ósseas transplantadas, para além de possuir histocompatibilidade e ausência de risco de transmissão de doenças infecciosas (Leunig et al. 1994, Martinez & Walker 1999). O facto do enxerto de osso esponjoso não possuir propriedades mecânicas, ou seja, de suporte, é compensado pela sua grande capacidade osteogénica responsável por uma rápida neoformação de tecido ósseo no foco de fratura, contribuindo assim para a sua rápida estabilização. No entanto, o autoenxerto de osso esponjoso possui alguns inconvenientes: morbilidade significativa associada à sua obtenção no local dador e limitado do volume de enxerto possível de obter (Younger & Chapman 1989, Hu & Bohlman 1994, Banwart 1995, Fleming Jr et al. 2000).

Os aloenxertos de osso esponjoso têm a vantagem de poderem aumentar as reduzidas quantidades de osso esponjoso autógeno possível de obter para enxerto, estando o seu uso aconselhado principalmente para o incremento da cicatrização de fraturas ósseas, preenchimento de pequenos defeitos ósseos e nas técnicas de artrodese. Os aloenxertos de osso cortical têm a grande vantagem de providenciar uma estrutura com propriedade osteocondutora que permite a neoformação de tecido ósseo a partir do osso do local recetor para o interior da matriz do aloenxerto e simultaneamente suporte mecânico imediato com o restabelecimento da função do membro afetado. Os aloenxertos de osso cortical são muito utilizados no tratamento de processos de não união atrófica e após a remoção de tumores ósseos, mas não fornecem a associação das propriedades osteogénica e osteoindutiva características do autoenxerto de osso esponjoso (Martinez & Walker 1999). A utilização dos aloenxertos pode conter, no entanto, o potencial risco de transmissão de doenças infetocontagiosas (Tomford 2000) e a inconveniência do recurso e dependência obrigatória aos bancos de osso.

Terminologia e definições

Os enxertos e/ou implantes ósseos podem ser classificados segundo vários aspetos, nomeadamente, a sua origem em autoenxerto (enxerto autógeno ou autógeno) que resulta da transferência de um enxerto de um local para outro num mesmo indivíduo, em aloenxerto (homoenxerto) que define a transfe-

rência de tecido viável entre dois indivíduos geneticamente diferentes mas da mesma espécie (Stevenson 1999) e em xenoenxerto (heteroenxerto) que corresponde à transferência de tecido viável de um dador de uma espécie diferente (Gorer et al. 1961). Os enxertos ósseos podem também ser classificados em ortotópicos quando aplicado num local anatomicamente idêntico, ou seja, junto ou no interior de um osso, ou em heterotópicos quando o enxerto não é colocado num local anatomicamente apropriado, ou seja, não está em contato com tecido ósseo, ou ainda segundo a sua organização estrutural em enxertos de osso esponjoso, corticoesponjoso, cortical ou osteocartilágneo. Podem ainda ser classificados segundo o método utilizado no seu processamento em calcificados ou descalcificados ou na sua conservação em enxertos ósseos frescos, congelados ou liofilizados ou ainda quanto à sua vascularização em vascularizados ou não vascularizados.

O termo transplante tem implícito a transferência de tecido vivo (Urist 1980, Burwell 1994) e o termo implante a implantação de material biológico não viável que não contém fração celular (ex. aloenxerto de osso cortical congelado ou liofilizado) ou para designar materiais não biológicos, como sejam, os implantes metálicos utilizados na osteossíntese de fraturas ou próteses de cerâmica (Urist 1980, Burwell 1994). Assim, a maioria dos alo- e xenoenxertos são na verdade alo- e xenoinplantes (Fitch et al. 1997).

Biologia e/ou funções dos enxertos e substitutos ósseos

Osteogénese de uma forma geral define a regeneração óssea primária pelo transplante de células vivas (Mulliken et al. 1984, Fitch et al., 1997). No caso particular do autoenxerto de osso esponjoso, a propriedade osteogénica advém da sua extensa área de trabéculas ósseas cuja superfície se encontra coberta por células de revestimento do tecido ósseo quiescentes e por osteoblastos ativos com grande capacidade de neoformação de tecido ósseo transplantadas em associação com células da medula óssea (Burwell 1969, Friendlaender 1987), apesar de osteoblastos com origem no local recetor poderem contribuir também para a osteogénese (Burchardt 1983). De referir, no entanto, que na melhor das hipóteses só cerca de 10% das células transplantadas sobrevivem a este processo quando um autoenxerto de osso esponjoso fresco é utilizado e manipulado nas condições ideais (Piermattei et al. 2006).

Osteoindução define a capacidade de promoção de um estímulo biológico capaz de promover o recrutamento e diferenciação de células mesenquimatosas multipotenciais (MSCs) em células das linhas condrogénica e osteogénica após o contacto com vários fatores de crescimento, nomeadamente, o fator de crescimento de transformação β (TGF- β), as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e citoquinas presentes ao nível da ECM óssea (Urist 1980, Burchardt 1987, Canalis et al. 1988, Mohan & Baylink 1991, Kale & DiCesare 1995, Lind 1998, Stevenson 1999) por quimiotaxia, mitose e diferenciação celular (Reddi et al. 1987).

Osteocondução define um processo tridimensional em que suporte micro- e macroscópico é fornecido para que a migração de elementos celulares envolvidos na neoformação de tecido ósseo (ex. MSCs, osteoblastos, osteoclastos e extensão de capilares sanguíneos) possa ocorrer do local recetor para a estrutura transplantada que exerce uma função de suporte para este crescimento (Burchardt 1987, Fitch et al. 1997).

Suporte mecânico é particularmente importante em circunstâncias em que é fundamental a formação de um calo ósseo que una os fragmentos ósseos com relativa rapidez (ex. situações clínicas de fragmentação de fraturas após a sua osteossíntese, excisão de tumores ósseos), de forma a reduzir as forças que se exercem sobre os implantes de osteossíntese aquando do apoio do membro, minimizando a possibilidade de falha dos referidos implantes, sendo geralmente obtido através de aloenxertos de tecido ósseo cortical congelados (Stevenson 1993, 1998, Piermattei et al. 2006).

Os substitutos do tecido ósseo não alógenos geralmente possuem apenas as funções biológicas de osteocondução e osteointegração, associada a alguma resistência mecânica necessária para o desempenho das funções de suporte (Fleming Jr et al. 2000).

Na Tabela 1 encontram-se expressas as funções biológicas presentes nos vários tipos de enxertos/implantes e substitutos ósseos.

Processo de incorporação dos enxerto e substitutos ósseos e principais fatores de influência no processo de integração

O primeiro estágio da incorporação comum a todos os enxertos ósseos não vascularizados é constituído pela formação do hematoma seguido de reação inflamatória e a sua reorganização em tecido de granulação que infiltra o enxerto de forma idêntica

à primeira fase da cicatrização das fraturas ósseas (Loty 1992, Bauer & Muschler 2000). Os estádios seguintes apresentarão ligeiras modificações conforme o enxerto utilizado.

No que se refere à incorporação do autoenxerto de osso esponjoso no local recetor, os estudos de Stevenson (1999) e Bauer & Muschler (2000) subdividem-na em cinco estágios sucessivos que se podem sobrepor em parte e que ocorrem numa sequência contínua de eventos biológicos: (a) aplicação do enxerto - formação do hematoma com libertação local de citoquinas e fatores de crescimento, (b) vascularização do enxerto - inflamação, migração e proliferação de MSCs e formação de tecido conjuntivo fibrovascular no interior e ao redor do enxerto, (c) fase de osteoindução – revascularização pela infiltração de vasos sanguíneos no tecido ósseo enxertado, (d) fase de osteocondução – substituição, em extensão variável, por reabsorção osteoclástica das trabéculas ósseas enxertadas simultaneamente com a formação de tecido ósseo não lamelar sobre as trabéculas ósseas em necrose por osteoblastos com origem no local recetor e (e) fase de remodelação - conversão em osso lamelar influenciada pelas forças mecânicas que se exercem sobre o local recetor do enxerto.

A incorporação do aloenxerto de osso esponjoso conservado é idêntica à anteriormente descrita mas mais prolongada e com um resultado por vezes ligeiramente inferior ao do autoenxerto. Factos justificados essencialmente pelo processo inflamatório mais intenso e pelas células da linha osteoblástica terem de provir totalmente do local recetor (Friedlaender

1988, Aronson & Cornell 1999, Bauer & Muschler 2000, Fleming Jr et al. 2000). No aloenxerto ósseo esponjoso, a formação de osteoide sobre a superfície das trabéculas ósseas transplantadas, simultânea à reabsorção osteoclástica destas últimas, promove um aumento da resistência mecânica até se atingir a resistência original no final do processo de remodelação (Palmer et al. 1999).

A incorporação de um auto- ou aloenxerto ósseo cortical é mais longa e incompleta do que a anteriormente descrita sendo que, após a estabilização da interface do enxerto com o tecido ósseo do local recetor, num estágio inicial ocorre o preenchimento da interface entre o osso recetor e o enxerto assim como o envolvimento exterior por tecido fibrovascular, sendo a sua revascularização muito mais prolongada do que a de um enxerto de osso esponjoso (Fleming Jr et al. 2000). Este tipo de enxerto é incorporado a partir da sua periferia pela ocorrência de reabsorção osteoclástica promovida por cones de reabsorção e subsequente deposição de osteoide pelos osteoblastos e sua mineralização (Friedlaender 1987, Gallwitz et al. 1993, Athanasou 1996). A formação de osteoide sobre a superfície do enxerto inicia-se cerca da 12ª semana pós-operatória, assim como a formação de um calo ósseo periosteal nos locais de contacto entre o enxerto e o tecido ósseo do local recetor, sendo o processo de vascularização e incorporação, por reabsorção progressiva com substituição por tecido ósseo do hospedeiro, muito longo e quase sempre incompleto nos enxertos de grandes dimensões pelo facto de ocorrer geralmente apenas na zona periférica, fator impeditivo da subs-

Tabela 1. Tipos de enxertos/implantes ou substitutos ósseos e suas funções [adaptado de Fitch et al. (1997) e de Giannoudis et al. (2005)].

Tipos de Enxerto/Implante	Funções*			
	Osteogénese	Osteoindução	Osteocondução	Apoio estrutural
Autoenxertos				
Esponjoso	+++	+++	+++	-
Cortical	++	++	++	+++
Aloenxertos				
Esponjoso				
Congelado	-	+	++	-
Liofilizado	-	+	++	-
Cortical				
Congelado	-	-	+	+++
Liofilizado	-	-	-	+
Descalcificado	-	+++	+	-
Cerâmicas				
TCP, HA, CPC	-	-	+	+ / ++
Enxertos compostos				
β-TCP/MO	++	++	+++	+
BMP/compósito sintético	-	+++	-	-

*Funções: - = fraco, + = moderado, ++ = bom, +++ = muito bom, ++++ = excelente.

TCP: fosfato tricálcico, HA: hidroxiapatite, CPC: cimento de fosfato de cálcio, MO: medula óssea, BMP: proteína morfogenética óssea.

tuição do osso necrótico subjacente, incrementando o risco de fraturas por reabsorção, fadiga e infecção (Wilson & Hoefle 1990, Friedlaender 1995, Poitout 1998).

A incorporação dos aloenxertos ósseos poderá ter um tempo de revascularização ligeiramente superior à dos autógenos pela fase de inflamação mais prolongada sendo que nestes últimos, apesar de não ocorrer o risco de reação imunológica, existem os inconvenientes da morbidade no local dador. Nos aloenxertos ósseos corticais, a intensa atividade de reabsorção osteoclástica na fase inicial de incorporação deste tipo de enxertos ósseos promove uma diminuição da sua resistência mecânica. Assim, cerca de 12 meses após o transplante a resistência do enxerto ósseo pode ser apenas de 50% a 60% da original e, por vezes, apenas recuperada 2 a 3 anos após a sua aplicação, o que exige uma correta estabilização do enxerto ósseo durante este período de tempo (Poitout 1998, Fleming Jr et al. 2000).

Quanto à resposta biológica após a implantação de um biomaterial de substituição óssea, esta geralmente inicia-se pela formação de um hematoma e por uma resposta de tipo inflamatório com chamada de água e glicoproteínas aos tecidos orgânicos que revestem o implante. De seguida, várias células são mobilizadas para o local, especialmente os leucócitos, e também macrófagos por reação de corpo estranho, sendo que estes últimos exercem ação fagocítica e estimulam a atividade dos linfócitos, fibroblastos, osteoclastos e outras células polimorfonucleares (Gutierrez et al. 2006). Após esta fase segue-se a angiogénese com migração e proliferação de células endoteliais formando-se uma rede de capilares sanguíneos que irriga a área fornecendo oxigénio e nutrientes (Davies 2000). Por fim, por ação de citocinas, nomeadamente a IL-1 e IL-2, e de vários fatores de crescimento [ex. TGF- β , BMPs, fatores de crescimento tipo insulina (IGF)-I e IGF-II, fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF)] ocorre a diferenciação das MSCs na linha osteoblástica com formação de osteoide e ECM óssea, sendo que a maturação e remodelação óssea constituem as últimas fases deste processo, de forma idêntica à biologia da formação do calo ósseo após fratura (Anderson 2001).

Enxertos ósseos disponíveis para aplicação clínica em animais de companhia

Os principais locais de obtenção de osso esponjoso fresco para autoenxerto são ao nível do trocânter

maior do úmero, a crista ilíaca, a região medial da epífise proximal da tibia, a região sob o grande trocânter do fêmur ou ainda o côndilo medial do fêmur, e para a obtenção de auto- ou aloenxerto corticoesponjoso a crista ilíaca dorsal ou costela (Piermattei et al. 2006, Fossum 2007). Os enxertos de osso cortical são geralmente utilizados sob a forma de aloenxertos congelados (Piermattei et al. 2006, Fossum 2007). Na obtenção de autoenxerto de osso esponjoso, os locais de colheita devem ser preparados no período pré-operatório de forma a permitir a sua recolha no mesmo momento cirúrgico que a da realização da osteossíntese da fratura óssea no qual se irá aplicar, de seguida realiza-se uma incisão cutânea de 2 a 3 cm para acesso cirúrgico à área do osso selecionado para a referida colheita, realiza-se um orifício unicortical com uma broca ou a ponta em troca de uma cavilha de Steinmann (4.5 a 6.5 mm) e o osso esponjoso é removido por meio de uma cureta cirúrgica oval. O enxerto pode ser colocado num pequeno recipiente coberto por uma compressa embebida em soro fisiológico ou lactato de Ringer, mas não imerso em soro fisiológico nem sujeito à aplicação de antibióticos, enquanto aguarda a sua aplicação ou transplantado imediatamente após a colheita (Piermattei et al. 2006). A obtenção de autoenxerto de osso corticoesponjoso pode ser efetuada ao nível das costelas, sendo que o periosteio envolvente deve ser cuidadosamente incidido e elevado de forma a evitar a abertura da cavidade pleural e uma secção de costela recolhida por osteotomias, ou então ao nível da crista ilíaca dorsal pela remoção de um bloco uni- ou bicortical utilizando um osteótomo ou uma serra oscilante (Piermattei et al. 2006).

Nos autoenxertos podem ainda referir-se os enxertos ósseos vascularizados livres obtidos ao nível da ulna (Szentimrey & Fowler 1994, Szentimrey et al. 1995), vértebras coccígeas (Yeh & Hou 1994), fibula ou córtex medial da tibia (Levitt et al. 1988, Bebchuck et al. 2000) o que requer, no entanto, a utilização de técnicas de microcirurgia para a anastomose do pedículo vascular aos vasos sanguíneos do local recetor. Enxertos autólogos vascularizados da ulna distal têm sido utilizados em reconstruções de defeitos diafisários da tibia (Szentimrey & Fowler 1994, Szentimrey et al. 1995) e do córtex medial da tibia na reconstrução de defeitos ósseos mandibulares contaminados (Bebchuck et al. 2000).

No que se refere às formas comercializadas de tecido ósseo para enxerto, a empresa *Veterinary Tis-*

sue Bank, sediada no Reino Unido, tem disponíveis produtos liofilizados e sujeitos a esterilização por irradiação ionizante por raios δ obtidos a partir de tecido ósseo esponjoso com várias granulometrias para utilização no cão e gato, que providenciam a propriedade da osteocondução, e sob a forma de cubos para preenchimento de pequenos defeitos ósseos ou espaços vazios em áreas não sujeitas a carga. Blocos de osso esponjoso denso são utilizados no preenchimento de defeitos ósseos com dimensões razoáveis em áreas sujeitas a carga ou para suporte estrutural. Tiras de tecido ósseo cortical diafisário obtido a partir de fêmur ou tíbia são geralmente utilizadas para realizar compressão ou serem associadas a osso cortical fragilizado, como seja, na revisão da componente femoral aquando de colocação de próteses de anca ou quando se prevê um processo demorado de cicatrização de uma fratura óssea. Em todas estas apresentações comerciais, os tecidos moles, os elementos celulares do tecido ósseo e a medula óssea são removidos pelo que apenas estão presentes as propriedades de osteocondução e mecânica no caso das apresentações de tecido ósseo esponjoso sob a forma de cubos, blocos ou das tiras de tecido ósseo cortical diafisário.

A matriz óssea desmineralizada (DBM) é outro produto disponibilizado pelo *Veterinary Tissue Bank* sendo composto por tecido ósseo processado com vista à remoção da sua componente mineral permanecendo apenas a componente orgânica da ECM óssea composta por colagénio e fatores de crescimento endógenos (BMPs), fragmentado e liofilizado. A DBM é muito utilizada em áreas onde se pretende acelerar a regeneração óssea (ex. tratamento de processos de não união, artrodeses do carpo e tarso e fusão de vértebras, fraturas diafisárias cominutivas) devido às suas propriedades osteoindutoras. A DBM utiliza-se assim com muita frequência associada a auto- e aloenxertos de osso esponjoso de forma a associar a osteoindução às propriedades da osteogénese e osteocondução.

A empresa congénere americana *Veterinary Transplant Services* apresenta também uma grande variedade de produtos disponíveis para enxerto ósseo, sendo de referir o *Osteoallograft® Orthomix®* composto por uma associação de DBM e partículas osteocondutoras de aloenxerto de osso esponjoso liofilizado ou congelado para utilização em cirurgia traumatológica e ortopédica no cão e gato, associando-se assim as propriedades de osteoindução e osteocondução num mesmo produto indicado para

acelerar o processo de cicatrização das fraturas e em processos de atraso de união ou não união, nas técnicas de artrodese e em todas as situações clínicas em que existe perda de tecido ósseo. Também apenas DBM liofilizada ou congelada está disponível para utilização no cão e gato para correção de situações de má-união, reabsorção óssea ou para aumento do volume do enxerto de osso esponjoso autólogo. O produto *Osteoallograft® Periomix®* é idêntico ao anterior na sua composição mas está vocacionado para aplicação em medicina dentária veterinária no cão e gato, nomeadamente para restauro do periodonto com vista a salvar o dente evitando a extração dentária, reposição do tecido ósseo nos locais de extração de forma a manter uma melhor saúde oral e sistémica, prevenindo possíveis fraturas da mandíbula. O produto *Ossiflex™ Bone Membranes*, constituído por tecido ósseo mineralizado liofilizado sob a forma de lâminas finas e flexíveis, está disponível em várias dimensões para utilização no cão com indicação em medicina dentária e ortopédica na Regeneração Tecidual Guiada, no tratamento de fistulas oronasais, fendas do palato e defeitos ósseos ao nível do crânio e face, proteção do canal mandibular e apoio ao processo de cicatrização de fraturas da mandíbula ou para o envolvimento de zonas de fraturas ósseas. Para além destes produtos, são comercializados também aloenxertos de osso esponjoso congelado sob a forma de blocos para o cão em medicina dentária e ortopédica e de osso cortical sob a forma de tiras ou segmentos de fêmur, tíbia ou rádio congelados para o cão com vista ao preenchimento de espaços e defeitos ósseos, fusão de vértebras, aplicação em periodontologia e para realizar compressão e reforçar estruturas ósseas fragilizadas. Enxertos osteocondrais, ossos completos (rádio - cão) e seções diafisárias (rádio, ulna, úmero, fêmur, tíbia, metacarpos/metatarsos) congeladas são também possíveis de obter à empresa *Veterinary Transplant Services* através de encomenda com vista à substituição de áreas onde é necessário substituir grandes extensões de tecido ósseo, que exigem apoio de carga e suporte estrutural, por traumatismos causados por atropelamento ou arma de fogo, no tratamento de processos de não união com reabsorção óssea massiva e na cirurgia de conservação do membro após a remoção de seções ósseas afetadas por tumores ósseos (ex. osteosarcomas).

De referir ainda a possibilidade de aquisição através do *Veterinary Tissue Bank* ou do *Veterinary*

Transplant Services de tendões e fásia nomeadamente com vista à substituição do ligamento cruzado cranial (LCCr) aquando da sua lesão ou rutura através de aloenxerto de osso-ligamento patelar-osso, e aloenxertos de tendão de Aquiles e de tendão flexor digital superficial com ou sem uma porção de osso calcâneo para tratamento de situações de rutura dos referidos tendões.

Substitutos ósseos compatíveis para utilização em animais de companhia

Os substitutos do tecido ósseo não alógenos possuem geralmente apenas as funções biológicas de osteocondução e osteointegração devendo ser idealmente biocompatíveis, promoverem reação inflamatória mínima, possuírem uma estrutura semelhante à do tecido ósseo (natureza química, estrutura e macroporosidade), serem passíveis de remodelação, permitirem a neoformação de tecido ósseo, possuírem uma resistência mecânica semelhante à do tecido ósseo cortical ou esponjoso, serem fáceis de aplicar e efetivos em termos de custo (Cornell 1999, Moore et al. 2001, Bucholtz 2002).

Os substitutos ósseos são geralmente classificados segundo o seu comportamento biológico baseado na resposta do tecido hospedeiro em: (a) bioinertes quando não provocam reação de corpo estranho no organismo formando uma interface direta entre o implante e osso [ex. materiais cerâmicos bionertes densos (alumínio, zircónia), carbono, titânio e suas ligas]; (b) biotolerados quando são moderadamente aceites pelo tecido recetor e sendo geralmente envolvidos por uma cápsula de tecido fibroso (ex. aços inoxidáveis, ligas de cobalto-crómio, polimetilmetacrilato ou cimento ósseo acrílico); (c) bioativos em que ocorre osteocoalescência com forte ligação química entre o implante e o osso devido à composição do substituto ósseo por íões de cálcio e/ou fósforo [ex. hidroxiapatite (HA) e seus compósitos com o fosfato β -tricálcico (β -TCP), vidros bioativos] e (d) reabsorvíveis quando são lentamente degradáveis e simultaneamente substituídos pelo tecido onde foram aplicados (ex. β -TCP, vidros bioativos) (Bauer & Muschler 2000, Gutierrez et al. 2006).

Os principais substitutos ósseos comercializados utilizados em cirurgia maxilofacial, neurológica, ortopédica, traumatológica e dentisteria são materiais cerâmicos, como sejam, a HA, o β -TCP e o sulfato de cálcio (“gesso de Paris”), sendo que para além destes materiais cerâmicos podem referir-se tam-

bém os vidros bioativos e ionoméricos, as pastas de cimento e os materiais compósitos (Cornell 1999, Giannoudis et al. 2005). Estes substitutos ósseos, na larga maioria das situações clínicas, são utilizados no reforço de estruturas ósseas com funções não estruturais por serem frágeis e apresentarem uma elevada rigidez relativamente à do tecido ósseo, no preenchimento de perdas de tecido ósseo e como veículos de difusão lenta de fatores de crescimento e antibióticos (Cornell 1999).

A HA é um fosfato de cálcio que apresenta uma resistência à compressão idêntica à do osso esponjoso e reabsorção e remodelação óssea lenta ou inexistente, podendo ser de origem coralífera (ex. ProOsteon[®], Interpore International) ou sintética (ex. Calcitite[®], Calcitek Inc.), sendo utilizada frequentemente associada a medula óssea (MO) autógena (Giannoudis et al. 2005, Gutierrez et al. 2006, Judas et al. 2009). O β -TCP é um fosfato de cálcio que também apresenta uma resistência à compressão idêntica à do osso esponjoso mas inferior relativamente à HA, sofre uma rápida reabsorção (6 a 12 meses), sendo a sua porosidade ideal de 150-500 μ m (Giannoudis et al. 2005, Gutierrez et al. 2006, Judas et al. 2009). Está comercializado especialmente sob a forma de biocompósitos pela sua associação à HA, sendo a combinação ideal a de 60% HA com 40% β -TCP (ex. Orthograft[™], SynthoGraft[™]) ou sob a forma de compósitos de β -TCP-colagénio (ex. Collagraft[®], Zimmer[™]) que se utilizam associados a MO autógena. O sulfato de cálcio apresenta uma resistência à compressão idêntica à do osso esponjoso mas tem uma reabsorção muito rápida (4 a 12 semanas), aplicando-se geralmente em áreas não sujeitas a carga e como veículo de libertação lenta de antibióticos (ex. Osteoset[®] da Wright Med. Tech. Inc.[™], Bone Plast[®] da Biomet Inc.) (Giannoudis et al. 2005, Gutierrez et al. 2006, Judas et al. 2009). Por fim os fosfatos de cálcio ou cimentos de cerâmica injetáveis, aplicados na forma líquida e em contato com a temperatura corporal endurecem por uma reação endotérmica, apresentam uma resistência à compressão 4 a 10 vezes superior à do osso esponjoso e uma reabsorção lenta (30-60% ao ano) (Giannoudis et al. 2005, Gutierrez et al. 2006, Judas et al. 2009). Permitem apoio precoce em cerca de 2 semanas e são utilizados no tratamento de fraturas ósseas, no preenchimento de cavidades e na fixação complementar de parafusos (Cementek[®] da Teknimed S.A., Norian SRS da DePuy Synthes, Bio cement D[®] e Biobone[®] da Merck Biomaterial).

Outras opções acessíveis em animais de companhia

Entre as outras abordagens possíveis com vista ao estímulo da regeneração óssea refere-se o isolamento de células estaminais autólogas a partir de aspirado de MO autógena obtido ao nível do úmero ou crista ilíaca e a sua injeção intralesional imediata (2 ml) ao nível do foco de fratura após a sua estabilização por técnica de osteossíntese ou após a sua centrifugação com vista à obtenção da fração rica em MSCs, ou ainda associada a uma matriz osteocondutora (Pountos et al. 2007). Pode também proceder-se à expansão *in vitro* e diferenciação das MSCs na linha osteoblástica, neste último caso podendo também o isolamento e expansão das MSCs realizar-se a partir de amostras de tecido adiposo autólogo (Connolly 1998). A empresa *Veterinary Tissue Bank* disponibiliza o serviço de isolamento e expansão em cultura *ex vivo* durante 1 a 2 semanas de MSCs obtidas a partir de uma amostra de tecido adiposo ou de aspirado de MO autógena, reimplantadas posteriormente por injeção intralesional no cão (Orthostem-c) ou gato (Orthostem-f). Esta técnica é muito utilizada na aceleração do processo de cicatrização das fraturas ósseas (Jang et al. 2008, Liao et al. 2011), ou no tratamento de processos de atraso de união e não união dos ossos longos (Boyan et al. 1999) ou de lesões de tendões e ligamentos (ex. tendão patelar, tendão de Aquiles, ligamentos do ombro) e artrites (ex. cotovelo, anca, joelho).

Outra opção acessível consiste na obtenção de uma amostra sanguínea para a preparação e aplicação de plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo, com vista a incrementar o processo de cicatrização de fraturas ósseas e a integração dos enxertos ósseos, muito especialmente em cirurgia oral e maxilofacial (Cancedda et al. 2007, Liao et al. 2011) e na realização de artrodeses (Hauschild et al. 2005). O PRP resulta do processamento de uma amostra de sangue total com vista a conseguir a fração sanguínea que possui maior concentração de plaquetas, constituindo uma fonte autógena de fácil aquisição e baixo custo que contém, principalmente, importantes fatores de crescimento na reparação tecidual, nomeadamente o PDGF, TGF- β 1, TGF- β 2 e IGF-I, identificados nos grânulos α das plaquetas e com reconhecida ação mitogénica, de síntese da ECM, quimiotática e angiogénica (Marx 1999). Para a obtenção do PRP a partir de um determinado volume de sangue autólogo pode recorrer-se a um separador de células, que promove a repartição das células

sanguíneas segundo o seu gradiente de densidade quando são necessários grandes volumes de PRP, ou apenas a uma centrifuga quando são necessários reduzidos volumes de PRP segundo o protocolo de Marx et al. (1998) ou por uma das várias adaptações descritas na literatura científica deste protocolo. O PRP aplica-se geralmente em combinação com autoenxerto de osso esponjoso, MSCs e/ou em osteogénese guiada (Marx et al. 1998, Yamada et al. 2004, Liao et al. 2011) ou associado a uma matriz osteocondutora, como seja, uma esponja de colagénio ou β -TCP, em cirurgia maxilofacial (Hauschild et al. 2005) e ortopédica de forma a incrementar o volume e/ou associar a propriedade osteoindutora ao enxerto ou substitutos ósseos.

Outras opções são as já referidas esponjas de colagénio absorvíveis (ACS) geralmente de origem bovina (ex. Helistat[®] da Integra ou revestida por hidroxiapatite – Healos[®] Bone Graft Replacement da DePuy Orthopaedics, Inc.) para a difusão de princípios ativos, como seja, MO autógena, PRP ou fatores de crescimento ósseo sintéticos [rhBMP2 da INFUSE[™] Bone Graft, Genetics Institute / Medtronic-Sofamor Danek / Integra, USA, e rhBMP7 (OP-1) da Creative BioMolecules, Inc., USA] (Kirker-Head 1995, Itoh et al. 1998a,b, Milovancev et al. 2007).

Outra abordagem muito utilizada é a dos enxertos compósitos que visa a associação das propriedades de osteogénese, osteoindução e osteocondução muito especialmente no tratamento de fraturas e pseudoartroses dos ossos longos, como seja, pela associação de MO autógena, DBM e aloenxerto de osso corticoesponjoso ou a associação de Collagraft[®] (Zimmer[™]), constituído por 65% de HA e β -TCP com colagénio de origem bovina, a MO ou sangue autógeno.

Aplicações clínicas de enxertos e substitutos ósseos em animais de companhia

A aplicação clínica de auto- ou aloenxerto de osso esponjoso e/ou DBM nos animais de companhia está indicada particularmente no tratamento de fraturas diafisárias, muito especialmente quando são cominutivas, e se o doente é um animal adulto ou geriátrico com vista a estimular a cicatrização óssea (Hoffer et al. 2008, Segal & Shani 2010). Nestas situações, após a estabilização da fratura por meio de implantes de placas e parafusos ósseos, cavilhas aparafusadas, fixadores externos ou encavilhamento intramedular e cerclages, aplicam-se auto- ou aloenxerto de osso esponjoso e/ou DBM nas linhas

de fratura e/ou outras áreas, comprimindo o enxerto ligeiramente. Outros fatores indicativos da utilização de enxerto ósseo são a localização da fratura em zonas reconhecidas como tendo fraca vascularização sanguínea, como sejam nas fraturas do rádio ou da tíbia distal, muito particularmente nos cães de raças *toy*, e ainda aquando da presença de outras situações que possam incrementar a morbilidade ou extensa lesão dos tecidos moles envolventes do foco de fratura. O autoenxerto de osso esponjoso tem também a grande vantagem de ser o único tipo de enxerto que se pode utilizar com segurança em fraturas infetadas, sendo os aloenxertos de osso cortical ou a DBM contraindicadas em situações de infeção ou osteomielite por serem muito sujeitos a formar sequestros ósseos (Piermattei et al. 2006). Nas fraturas ósseas diafisárias com perda de tecido ósseo pode recorrer-se também a enxertos ósseos *inlay* de osso cortical utilizado como estabilizador para substituir uma porção em falta do córtex na face oposta à da colocação da placa óssea, com o enxerto fixado preferencialmente por meio de parafusos ósseos aplicados através da placa, sendo os espaços vazios existentes preenchidos com auto- ou aloenxerto de osso esponjoso (Piermattei et al. 2006). Nas fraturas diafisárias múltiplas ou cominutivas altamente instáveis, com perda de segmentos ósseos ou ainda na substituição de tecido ósseo tumoral pode recorrer-se a um enxerto diafisário intercalar tubular (Wadsworth & Henry 1976, Henry & Wadsworth 1981, Johnson 1988, Sinibaldi, 1989), apesar de nas fraturas ósseas complexas atualmente se aconselhar a osteossíntese biológica pela combinação de placa e cavilha intramedular (Piermattei et al. 2006). Para a aplicação de um aloenxerto ósseo para substituição de um defeito ósseo diafisário segmentar devem seccionar-se os extremos dos segmentos ósseos viáveis de forma a adaptar-se o enxerto cortical cilíndrico com o diâmetro e o comprimento correto, fixado através de placa óssea em função de compressão dinâmica, associado ou não a autoenxerto de osso esponjoso aplicado nos extremos do enxerto em contacto com o osso hospedeiro, devendo também este tipo de aloenxerto diafisário ser perfurado com pequenos orifícios, antes de aplicado, para estimular a neovascularização do canal medular (Piermattei et al. 2006, Fossum 2007).

Nos atrasos de união ou de não união óssea ocorre-se com frequência ao aloenxerto de osso esponjoso associado a DBM ou ao aloenxerto de osso cortical em presença de defeitos segmentares muito

extensos. A aplicação clínica de aloenxerto de osso esponjoso associado a DBM aconselha-se no tratamento de processos de não união atrofica do rádio e ulna em cães de raça de porte pequeno ou *toy* e nos gatos, uma vez que a quantidade de enxerto de osso esponjoso autólogo possível de obter nestes casos é extremamente diminuta, associado ao potencial risco de complicações possíveis de ocorrerem aquando da obtenção deste tipo de enxerto ósseo (ex. fraturas iatrogénicas) (Hoffer et al. 2008). Nos processos de não união hipertrófica, nomeadamente nas pseudoartroses da diáfise média do fémur devido a instabilidade e nos processos de atraso de união ou não união da tíbia, pode recorrer-se também à aplicação de um aloenxerto de osso esponjoso associado a DBM (Hoffer et al. 2008), ou a um aloenxerto de osso cortical (blocos de osso esponjoso, segmentos corticais ou seções de diáfises ósseas) se em presença de defeitos ósseos segmentares de grandes dimensões e/ou apenas a um autoenxerto de osso esponjoso nas pseudoartroses hipertróficas do fémur e nos processos de atraso de união da tíbia em cães de raças de porte médio, grande ou gigante (Fossum 2007). Nos processos de atraso da união e de não união óssea em que se pretende recorrer à aplicação de auto- ou aloenxerto de osso esponjoso, deve primeiro remover-se todo o tecido esclerótico e perióstio ao nível do local de fratura com recurso a um elevador do perióstio ou osteótomo, procedendo de seguida à estabilização dos segmentos ósseos através de placa de compressão e só depois ser aplicado o enxerto ósseo ao redor do local da fratura, entre o perióstio elevado e o córtex (Piermattei et al. 2006). Nestas situações de atraso da união ou não união óssea pode recorrer-se também a enxertos ósseos *onlay*, constituídos geralmente por porções longitudinais de costela seccionada ao meio e fixadas por meio de parafusos ósseos, arame ortopédico em cerclage ou pela sutura aos tecidos moles envolventes, seguida de fixação rígida das extremidades ósseas associando-se auto- ou aloenxerto de osso esponjoso (Piermattei et al. 2006).

Nas artrodeses do carpo e tarso (ex. rutura traumática ou degenerativa dos ligamentos palmares ou plantares, fraturas articulares, processos de má união e nas formas graves de artrite) recorre-se com frequência ao auto- ou aloenxerto de osso esponjoso para acelerar a fusão entre as superfícies do tecido ósseo subcondral, após remoção da cartilagem articular, associado ou não a DBM (Li et al. 2000, Hoffer et al. 2008). Quando a artrodese do carpo é

efetuada como parte de técnica cirúrgica de conservação do membro torácico, devido a osteosarcoma da extremidade distal do rádio e ulna, tem de se recorrer necessariamente à aplicação de um aloenxerto osteocondral maciço diáfiso-metáfiso-epifisário para substituição da área do osso afetada.

Na técnica cirúrgica de avanço da tuberosidade tibial, para o tratamento de cães com rutura parcial ou total do LCCr, utiliza-se também com frequência o auto- ou aloenxerto de osso esponjoso associado ou não a DBM para acelerar a regeneração óssea do local da osteotomia da tuberosidade da tibia (Lafaver et al. 2007, Hoffer et al. 2008, Boudrieau 2011).

Conclusões e perspectivas futuras

A necessidade do recurso aos enxertos ósseos em cirurgia ortopédica reconstrutiva e em neurocirurgia é ainda absolutamente fundamental em várias situações clínicas de etiologia congênita, traumática, tumoral ou em implantações artroplásticas, especialmente quando é necessário reconstruir áreas que sofreram grandes perdas de tecido ósseo e na fusão de vértebras. Para além destes aspetos, a velocidade de cicatrização óssea incrementada pela aplicação de enxertos ósseos permite que os doentes recuperem uma normal atividade física com maior rapidez e aumenta as hipóteses de sucesso do processo de cicatrização óssea (DeVries et al. 1996, Kesemenli et al. 2004, Hoffer et al. 2008).

Os avanços científicos na Engenharia do Tecido Ósseo e Cartilagem com a síntese e produção de novos substitutos ósseos osteocondutores e a introdução de técnicas inovadoras na sua preparação que têm permitido melhorar as suas propriedades mecânicas e físico-químicas produzindo materiais compostos com características e propriedades biológicas cada vez mais próximas do tecido ósseo e aos quais se tenta agora associar a componente celular de forma a atribuir-lhe as propriedades osteogénicas ausentes. No futuro aspira-se à possibilidade de conseguir pela cirurgia reconstrutiva a substituição do tecido ósseo perdido com recurso à biomodelação tridimensional médica em que biomateriais osteocondutores com propriedades mecânicas idênticas às do osso serão utilizados na produção de estruturas com a forma exata do defeito ósseo adaptado a cada caso clínico particular, estruturas essas passíveis de serem colonizadas previamente em laboratório com células autólogas do doente, obtidas através de MO autógena ou outra fonte de MSCs adultas (ex. tecido adiposo) e diferenciadas nas linhas osteoblástica

e/ou condroblástica antes de serem transplantadas para o local recetor. No entanto, apesar dos resultados muito promissores obtidos até à data em estudos pré-clínicos com modelos animais e estudos clínicos piloto com abordagens que recorrem à Engenharia do Tecido Ósseo e Cartilagem, são necessárias novas validações antes de se generalizar a sua aplicação clínica, sendo o aspeto mais complexo de resolver o do fornecimento de oxigénio e nutrientes às células das zonas mais internas dos biomateriais substitutos ósseos implantados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson J.M. Biological responses to materials. *Annu. Rev. Mater. Res.*, 31:81-110, 2001.
- Aronson J. & Cornell C.N. Bone healing and grafting, p.25-35. In: Beaty J.H. (Ed.), *Orthopaedic Knowledge Update*. American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1999.
- Athanasou A. Current concepts review cellular biology of bone-resorbing cells. *J. Bone Joint Surg. Am.*, 78:1096-1113, 1996.
- Banwart J.C. Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. *Spine*, 20:1055-1060, 1995.
- Bauer T.W. & Muschler G.F. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 371:10-27, 2000.
- Bebchuk T.N., Degner D.A., Walshaw R., Brouman J.D., Arnoczky S.P., Stickle R.L. & Probst C.W. Evaluation of a free vascularized medial tibial bone graft in dogs. *Vet. Surg.*, 29:128-144, 2000.
- Boyan B.D., Caplan A.I., Heckman J.D., Lennon D.P., Ehler W. & Schwartz Z. Osteochondral progenitor cells in acute and chronic canine nonunions. *J. Orthop. Res.*, 17:246-255, 1999.
- Bucholtz R.W. Nonallograft osteoconductive bone graft substitutes. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 395:44-52, 2002.
- Boudrieau R.J. Bone grafting and tibial tuberosity advancement. *Vet. Surg.*, 40:641-642, 2011.
- Burchardt H. Biology of bone transplantation. *Orthop. Clin. North. Am.*, 18:187-196, 1987.
- Burchardt H. The biology of bone graft repair. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 174:28-42, 1983.
- Burwell R.G. The fate of bone grafts, p.115-207. In: Apley A.G. (Ed.), *Recent Advances in Orthopaedics*. Churchill Livingstone, London, 1969.
- Burwell R.G. History of bone grafting and bone substitutes with special reference to osteogenic induction, p.1-102. In: Urist M.R., O'Connor B.T. & Burwell R.G. (Eds), *Bone Grafts, Derivatives and Substitutes*. Butterworth-Heinemann Ltd, Cambridge, 1994.
- Canalis E., McCarthy T.L. & Centrella M. Growth factors and regulation of bone remodeling. *J. Clin. Invest.*, 81:277-281, 1988.
- Cancedda R., Giannoni P. & Mastrogiacomo M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. *Biomaterials*, 28:4240-4250, 2007.
- Connolly J.F. Clinical use of marrow osteoprogenitor cells

- to stimulate osteogenesis. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 355(Suppl):S257-S266, 1998.
- Cornell C.N. Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts. *Orthop. Clin. North Am.*, 30:591-598, 1999.
- Davies J.E. Histodynamics and endosseous wound healing, p.1-11. In: Davies J.E. (Ed.), *Bone Engineering*. EM2, Canada, 2000.
- DeVries W.J., Runyon C.L., Martinez S.A. & Ireland W.P. Effect of volume variations on osteogenic capabilities of autogenous cancellous bone graft in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 57:1501-1505, 1996.
- Fitch R., Kerwin S., Newman-Gauge H. & Sinibaldi K.R. Bone autografts and allografts in dogs. *Compend. Contin. Educ. Vet.*, 19:558-578, 1997.
- Fleming Jr J.E., Cornell C.N. & Muschler G.F. Bone cells and matrices in orthopaedic tissue engineering. *Orthop. Clin. North Am.*, 31:357-374, 2000.
- Fossum T.W. Fundamentals of orthopedic surgery and fracture management, p.930-1014. In: *Small Animal Surgery*. 3rd ed. Mosby, St. Louis, MO, 2007.
- Friedlaender G.E. Bone banking in revision surgery, p.189-195. In: *Total Hip Revision Surgery*. Raven Press Ltd, New York, NY, 1995.
- Friedlaender G.E. Bone grafting, p.79-84. In: Roger D., Mango E. & Hurst L.C. (Eds), *Principles of Orthopaedic Practice*. International Edition McGraw-Hill, New York, NY, 1988.
- Friedlaender G.E. Current concepts review: Bone grafts. *J. Bone Joint Surg. Am.*, 69:786-790, 1987.
- Gallwitz W.E., Mundy G.R., Lee C.H., Qiao M., Roodman G.D., Raftery M., Gaskell S.J. & Bonewald L.F. 5-Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid stimulate isolated osteoclasts to resorb calcified matrices. *J. Biol. Chem.*, 268:10087-10094, 1993.
- Giannoudis P.V., Dinopoulos H. & Tsiridis E. Bone substitutes: An update. *Injury*, 36S:S20-S27, 2005.
- Goldberg V.M. & Stevenson S. Natural history of autografts and allografts. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 225:7-16, 1987.
- Gorer P.A., Loutit J.F. & Micklem H.S. Proposed revisions of "transplantase". *Nature*, 189:1024-1031, 1961.
- Gutierrez M., Lopes M.A., Hussain N.S., Cabral A.T., Almeida L. & Santos J.D. Substitutos ósseos: Conceitos gerais e estado actual. *Arquivos de Medicina*, 19:153-162, 2006.
- Hauschild G., Merten H.A., Bader A., Uhr G., Deivick A., Meyelindenberg A. & Fehr M. Bioartificial bone grafting: Tarsal joint fusion in a dog using a bioartificial composite bone graft consisting of beta-tricalcium phosphate and platelet rich plasma – A case report. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.*, 18:52-54, 2005.
- Henry W.B. & Wadsworth P.L. Retrospective analysis of failures in the repair of severely comminuted long bone fractures using large diaphyseal allografts. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 17:535-546, 1981.
- Hoffer M.J., Griffon D.J., Schaeffer D.J., Johnson A.L. & Thomas M.W. Clinical applications of demineralized bone matrix: a retrospective and case-matched study of seventy-five dogs. *Vet. Surg.*, 37:639-647, 2008.
- Hu R. & Bohlman H. Fracture at the iliac bone graft harvest site after fusion of the spine. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 309:208-213, 1994.
- Itoh T., Mochizuki M., Fuda K., Nishimura R., Matsunaga S., Kadosawa T. & Sasaki N. Femoral nonunion fracture treated with recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a dog. *J. Vet. Med. Sci.*, 60:535-538, 1998a.
- Itoh T., Mochizuki M., Nishimura R., Matsunaga S., Kadosawa T., Kokubo S., Yokota S. & Sasaki N. Repair of ulnar segmental defect by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, 60:451-458, 1998b.
- Jang B.J., Byeon Y.E., Lim J.H., Ryu H.H., Kim W.H., Koyama Y., Kikuchi M., Kang K.S. & Kweon O.K. Implantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells mixed with beta-tricalcium phosphate enhances osteogenesis in bone defect model dogs. *J. Vet. Sci.*, 9:387-393, 2008.
- Johnson A.L. Principles and practical application of cortical-bone grafting techniques. *Compend. Contin. Educ. Vet.*, 10:906-913, 1988.
- Judas F., Figueiredo H. & Dias R. *Biomateriais em cirurgia ortopédica reconstrutiva*. Relatório. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2009, 33p. (Disponível em: <http://hdl.handle.net/10400.4/1203>).
- Kale A.A. & DiCesare P.E. Osteoinductive agents: Basic science and clinical applications. *Am. J. Orthop.*, 24:752-761, 1995.
- Khan S.N. Clinical applications of bone graft substitutes. *Orthop. Clin. North Am.*, 31:389-398, 2000.
- Kesemenli C.C., Kapukaya A., Subaşı M., Arslan H., Necmioglu S. & Kayıkçı C. Early prophylactic autogenous bone grafting in type III open tibial fractures. *Acta Orthop. Belg.*, 70:327-331, 2004.
- Kirker-Head C.A. Recombinant bone morphogenetic protein: novel substances for enhancing bone healing. *Vet. Surg.*, 24:408-419, 1995.
- Lafaver S., Miller N.A., Stubbs W.P., Taylor R.A. & Boudrieau R.J. Tibial tuberosity advancement for stabilization of the canine cranial cruciate ligament-deficient stifle joint: surgical technique, early results, and complications in 101 dogs. *Vet. Surg.*, 36:573-586, 2007.
- Leunig M., Yuan F., Berk D.A., Gerweck L.E. & Jain R.K. Angiogenesis and growth of isografted bone: Quantitative *in vivo* assay in nude mice. *Lab. Invest.*, 71:300-307, 1994.
- Levitt L., Fowler D., Longley M., Bowen V. & Wilkinson A. A developmental model for free vascularized bone transfers in the dog. *Vet. Surg.*, 17:194-202, 1988.
- Li A., Bennett D., Gibbs C., Carmichael S., Gibson N., Owen M., Butterworth S.J. & Denny H.R. Radial carpal bone fractures in 15 dogs. *J. Small Anim. Pract.*, 41:74-79, 2000.
- Liao H.T., Chen C.T., Chen C.H., Chen J.P. & Tsai J.C. Combination of guided osteogenesis with autologous platelet-rich fibrin glue and mesenchymal stem cell for mandibular reconstruction. *J. Trauma*, 70:228-237, 2011.
- Lind M. Growth factor stimulation of bone healing: Effects on osteoblasts, osteotomies and implants fixation. *Acta Orthop. Scand.*, 69(Suppl 283):5-37, 1998.
- Loty B. Allogreffes osseuses: Aspects fondamentaux et techniques de conservation en 1992, p.211-237. In: *Cahiers d'Enseignement de la SOFCOT*. Conférences d'enseignement, 1992.
- Mainard D. *Les Substituts Osseux en 2001*. Mainard D. (Ed.), GESTO (Association pour L'étude des Greffes et Substi-

- tutes Tissulaires en Orthopédie). Edition Romillat, Paris, 2001.
- Martinez S.A. & Walker T. Bone grafts. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, 29:1207-1219, 1999.
- Marx R.E. Platelet-rich plasma: A source of multiple autologous growth factors for bone grafts, p.71-82. In: Lynch S.E., Genco R.J. & Marx R.E. (Eds), *Tissue Engineering. Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics*. Quintessence Publishing Co, Inc., Chicago, IL, 1999.
- Marx R.E., Carlson E.R., Eichstaedt R.M., Schimmele S.R., Strauss J.E. & Georgeff K.R. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 85:638-646, 1998.
- Milovancev M., Muir P., Manley P.A., Seeherman H.J. & Schaefer S. Clinical application of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in 4 dogs. *Vet. Surg.*, 36:132-140, 2007.
- Mohan S. & Baylink D.J. Bone growth factors. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 263:30-48, 1991.
- Moore W.R., Graves S.E. & Bain G.I. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J. Surg.*, 71:354-361, 2001.
- Mulliken J.B., Kaban L.B. & Glowacki J. Current research review - Induced osteogenesis - The biological concept and clinical application. *J. Surg. Res.*, 37:487-496, 1984.
- Palmer S.H., Gibbons C.L. & Athanasou N.A. The pathology of bone allograft. *J. Bone Joint Surg. Br.*, 81B:333-335, 1999.
- Piermattei D.L., Flo G.L. & DeCamp C.E. Bone grafting, p.160-167. In: Brinker W.O., Piermattei D.L. & Flo G.L. (Eds.), *Handbook of Small Animal Orthopedics and Fracture Repair*. 4th ed. Saunders Elsevier, St. Louis, MO, 2006.
- Poitout D.G. Biologie des allogreffes osseuses. Banques d'Os (allogreffes). *Revue de Chirurgie Orthopédique et Réparatrice de l'Appareil Moteur*, 74:112-114, 1998.
- Pountos I., Corscadden D., Emery P. & Giannoudis P.V. Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application. *Injury*, 38(Suppl4):S23-S33, 2007.
- Reddi A.H., Wientroub S. & Muthukumar N. Biologic principles of bone induction. *Orthop. Clin. North Am.*, 18:207-212, 1987.
- Segal U. & Shani J. Surgical management of large segmental femoral and radial bone defects in a dog: through use of a cylindrical titanium mesh cage and a cancellous bone graft. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.*, 23:66-70, 2010.
- Sinibaldi K.R. Evaluation of full cortical allografts in 25 dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 194:1570-1577, 1989.
- Stevenson S. Biology of bone grafts. *Orthop. Clin. North Am.*, 30:543-552, 1999.
- Stevenson S. Bone grafting, p.1694-1703. In: Slatter D.H. (Ed.), *Textbook of Small Animal Surgery*, Vol. II, 2nd ed. Saunders, Philadelphia, PA, 1993.
- Stevenson S. Enhancement of fracture healing with autogenous and allogeneic bone grafts. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 355(Suppl):S239-S246, 1998.
- Szentimrey D. & Fowler D. The anatomic basis of a free vascularized bone graft based on the canine distal ulna. *Vet. Surg.*, 23:529-533, 1994.
- Szentimrey D., Fowler D., Johnston G. & Wilkinson A. Transplantation of the canine distal ulna as a free vascularized bone graft. *Vet. Surg.*, 24:215-225, 1995.
- Tomford W.W. Bone allografts: Past, present and future. *Cell Tissue Bank.*, 1:105-109, 2000.
- Urist M.R. Bone transplants and implants, p.331-368. In: Urist M.R. (Ed.), *Fundamental and Clinical Bone Physiology*. Lippincott, Philadelphia, PA, 1980.
- Wadsworth P.L. & Henry W.B. Entire segmental cortical bone transplant. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 12:741-745, 1976.
- Wilson J.W. & Hoeffle W.D. Diaphyseal allograft: Eight year evaluation in a dog. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.*, 3:78-81, 1990.
- Yamada Y., Ueda M., Hibi H. & Nagasaka T. Translational research for injectable tissue-engineered bone regeneration using mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: from basic research to clinical case study. *Cell Transplant.*, 13:343-355, 2004.
- Yeh L.S. & Hou S.M. Repair of a mandibular defect with a free vascularized coccygeal vertebra transfer in a dog. *Vet. Surg.*, 23:281-285, 1994.
- Younger E.M. & Chapman M.W. Morbidity at bone graft donor sites. *J. Orthop. Trauma*, 3:192-195, 1989.