ÍSIS DOS SANTOS DAL-BÓ

Estudo biomecânico comparativo da resistência de segmentos ósseos de rádios de cães autoclavados ou desvitalizados em nitrogênio líquido

São Paulo
2014

ÍSIS DOS SANTOS DAL-BÓ

Estudo biomecânico comparativo da resistência de segmentos ósseos de rádios de cães autoclavados ou desvitalizados em nitrogênio líquido

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Cássio Ricardo Auada Ferrigno

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3046 Dal-Bó, Ísis dos Santos
FMVZ Estudo biomecânico comparativo da resistência de segmentos ósseos de rádios de cães autoclavados ou desvitalizados em nitrogênio líquido / Ísis dos Santos Dal-Bó. -- 2014.
94 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Cássio Ricardo Auada Ferrigno.

1. Ensaio de flexão em quatro pontos. 2. Osteossarcoma. 3.Cirurgia de preservação do membro. 4. Ortopedia. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo biomecânico comparativo da resistência de segmentos ósseos de rádios de cães autoclavados e desvitalizados em nitrogênio líquido", protocolado sob o nº 2795/2012, utilizando 20 (vinte) cadáveres de cão, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Cássio Ricardo Auada Ferrigno, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/10/2012.

We certify that the Research "Comparative biomechanical study of resistance of segments autoclaved and devitalized boné in liquid nitrogen of canine rádios", protocol number 2795/2012, utilizing 20 (twenty) dogs, under the responsibility Prof. Dr. Cássio Ricardo Auada Ferrigno, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/17/2012.

São Paulo, 18 de outubro de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

NOME: DAL-BÓ, Ísis dos Santos

Título: Estudo biomecânico comparativo da resistência de segmentos ósseos de rádios de cães autoclavados ou desvitalizados em nitrogênio líquido

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ___/___/___

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição:_____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais

Joares Dal-Bó e

Eva dos Santos Dal-Bó.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Joares Dal-Bó e Eva dos Santos Dal-Bó, que sempre me apoiaram e entenderam minhas escolhas e, mesmo à distância estão sempre comigo. Amo vocês! Obrigada por estarem comigo em mais uma conquista.

Ao Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pela oportunidade e incentivo no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (HOVET) e ao Laboratório de Ortopedia e Traumatologia Comparada do Departamento de Cirurgia da (LOTC – FMVZ/USP).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.

Ao Prof. Dr. Cássio Ricardo Auada Ferrigno, pela oportunidade de mestrado, pela sua paciência e dedicação no ensino da ortopedia veterinária. E também por atender e entender os meus frequentes apelos para fazer cirurgias em gatos.

Ao Prof. Dr. Márcio Poletto Ferreira, meu grande amigo e colega, que me orienta desde que eu era estagiária, lá em 2004... Muito do que eu aprendi em ortopedia eu devo a ti. Obrigada pela paciência e dedicação em ensinar! Muito obrigada por toda ajuda durante a elaboração deste projeto e demais trabalhos no decorrer do mestrado.

Agradeço especialmente à Fernanda Nóbrega, que considero mais que amiga, que juntamente com o Márcio, me atura desde 2004! Muito obrigada por todo apoio profissional e pessoal aqui em São Paulo.

Agradeço imensamente ao César Augusto Martins Pereira, tecnólogo em saúde e especialista em biomecânica do aparelho locomotor do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que desenvolveu o programa de computador PMI especialmente para esse trabalho além de se tornar mais um amigo.

Aos amigos e colegas do LOTC–FMVZ/USP, Marcos Ishimoto Della Nina, Vanessa Couto de Magalhães Ferraz, Daniela Fabiana Izquierdo Caquías, Kelly Cristiane Ito Yamauchi, Jaqueline França dos Santos, Adriana Valente de Figueiredo,

Renato Albuquerque de Oliveira Cavalcanti, Fernanda Paes e Viviane Sanchez Galeazzi, pela amizade, auxílio e aprendizado. Por todos os momentos bons e ruins que passamos juntos. Mesmo as situações mais difíceis nos serviram de aprendizado. Em especial, agradeço à Dani, pelo auxílio ininterrupto durante a elaboração do projeto de mestrado. Não havia como fugir das minhas dúvidas porque dividíamos apartamento! Agradeço ao Renato e à Fernanda por todos os momentos de descontração proporcionados seja no ambulatório, centro cirúrgico, ou fora do HOVET.

Aos enfermeiros do Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET – FMVZ-USP, sempre de muito bom humor, Cledson Lelis dos Santos, Jesus dos Anjos Vieira, Otávio Rodrigues dos Santos e José Miron Oliveira da Silva pela amizade, dedicação e auxílio.

Aos técnicos do Serviço de Radiologia do HOVET–FMVZ/USP Benjamin Ribeiro de Souza, Marcio dos Santos Candido, Hugo Idalgo e Reginaldo Barboza da Silva, pela realização dos exames radiográficos deste trabalho. Agradeço à médica veterinária Silvana Maria Unruh, pela disponibilização das imagens radiográficas.

Aos secretários do Departamento de Cirurgia, Belarmino Ney Pereira, e Livia Gimenes pela ajuda e disponibilidade constante e imediata.

À Sra. Elza Maria Rosa B. Faquim, da Biblioteca da FMVZ-USP pela grande ajuda na formatação deste trabalho.

À Jenifer Santana Marques e Rafaela Zani Coeti que deixaram de ser apenas as “gurias que dividem apartamento comigo” e se tornaram amigas. Obrigada por todos os jantares mais felizes e com comida de verdade!

Aos animais, que são o verdadeiro estímulo para nossas pesquisas.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

DAL-BÓ, Í. S. **Estudo biomecânico comparativo da resistência de segmentos ósseos de rádios de cães autoclavados ou desvitalizados em nitrogênio líquido.** [Biomechanical comparative study of the strength of autoclaved and devitalized in liquid nitrogen bone segments from the radius of dogs]. 2014. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O presente estudo visa comparar biomecanicamente, por meio do ensaio de flexão em quatro pontos, a resistência de segmentos de rádios de cães autoclavados e desvitalizados em nitrogênio líquido. Foram utilizados 20 cadáveres de cães de mais de dois anos de idade e massa corporal superior a 20 kg, portanto 40 rádios, que foram divididos em quatro grupos: grupo autoclave (GA), grupo controle autoclave (GCA), grupo nitrogênio (GN) e grupo controle nitrogênio (GCN). Os corpos de prova dos grupos GCA e GCN pertenciam ao lado contralateral dos grupos GA e GN, respectivamente. Os ossos foram autoclavados a 121°C, por 20 min a 2 atm. A desvitalização em nitrogênio foi realizada por meio da imersão em nitrogênio líquido, por 20 min, seguida de descongelamento à temperatura ambiente, sendo finalizada por imersão em solução de NaCL a 0,9%, por mais 15 min. A avaliação da resistência biomecânica foi realizada pelo ensaio de flexão em quatro pontos. Foi utilizado o programa de computador PMI para calcular o momento de inércia após o ensaio biomecânico destrutivo. Foram comparadas as variáveis força máxima, rigidez, altura máxima à secção transversa do corpo de prova, deslocamento do baricentro em relação ao eixo x, flecha, tensão-tração, tensão compressão e tensão máxima. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos GN e GCN. Foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos GA e GCA somente na comparação da variável força máxima. A análise das variáveis tensão-tração, tensão-compressão e tensão máxima evidenciou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos GA e GN, sendo os valores maiores para o grupo GA. Também foi realizada comparação entre os deltas (GN menos GCN e GA menos GCA) em que não foram observadas diferenças estatísticas.

Palavras-chave: Ensaio de flexão em quarto pontos. Osteossarcoma. Cirurgia de preservação do membro. Ortopedia.

ABSTRACT

DAL-BÓ, Í. S. **Biomechanical comparative study of the strength of autoclaved and devitalized in liquid nitrogen bone segments from the radius of dogs**. [Estudo biomecânico comparativo da resistência de segmentos ósseos de rádios de cães autoclavados ou desvitalizados em nitrogênio líquido]. 2014. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The present study aim to, biomechanically compare through the four points bending test, the strenght of autoclaved and devitalized in liquid nitrogen radius segments. 20 corpses of dogs (>2 years of age and >20 kg of weight) were used. 40 radius were collected and divided into 4 groups, Autoclave Group (GA), Control Autoclave Group (GCA), Nitrogen Group (NG) and Control Nitrogen Group (GCN). Bone segments from groups GCA and GCN were contralateral to GA and NG. The segments were autoclaved at 121ºC and 2 atm for 20 minutes. Nitrogen devitalization of the bone segments was obtained by 20 minutes immersion, followed by thawing at room temperature and 15 minutes immersion in 0,9% NaCL solution. The biomechanical strenght evaluation was performed in the four points bending test; afterwards, PMI computer program calculated the moment of inertia after the destructive biomechanical assay. Variables compared were maximum strength, stiffness, maximum high trough the transverse section of the bone segment, centers of mass dislocation in relation to x axe, arrow, stress-tension, stress-compression and maximum stress. No statistically significant differences between the GN and GCN groups were found. Statistically significant differences were found between groups GA and GCA only in the comparison of the maximum force variable. The analysis of variable stress-tension, stress-compression and maximum stress showed statistically significant differences between the GA and GN groups, with higher values for the GA group. Comparison of the deltas (GN least GCN and GA least GCA) that no statistical differences were observed was also performed.

Keywords: Four points bending test. Osteosarcoma. Limb-sparing surgery. Orthopaedic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Figura 1 – Corpos de prova. A – Após a remoção dos tecidos moles. B – Segmentos diafisários de 12 cm – São Paulo – 2013 46

Figura 2 – Aspecto dos corpos de prova após os tratamentos. A – Amostras do grupo controle autoclave (GCA) e grupo autoclave (GA). B – Amostras do grupo nitrogênio (GN) e grupo controle nitrogênio (GCN) – São Paulo – 2013 48

Figura 3 – A – Cassete. B e C – Escala densitométrica (penetrômetro de alumínio) com 20 degraus, cada um deles com 1mm de espessura, vista frontal e de perfil, respectivamente – São Paulo – 2013 49

Figura 4 – Imagens radiográficas utilizadas para densitometria. A e B – Projeções CrCa e ML, respectivamente – São Paulo – 2013 51

Figura 5 – Esquema do corpo de prova posicionado no dispositivo para ensaio de flexão em quatro pontos. Em detalhe, os cortes longitudinal e transversal do osso na região de contato com o cutelo superior – São Paulo – 2014 52

Figura 6 – A – Posicionamento do corpo de prova no dispositivo do ensaio de flexão em 4 pontos. B – Aspecto dos corpos de prova após a realização do ensaio destrutivo. Da esquerda para direita: corpos de prova dos GA e GCA, respectivamente – São Paulo – 2013 54

Figura 7 – Dispositivo para fotografar a superfície transversa dos ossos (“mesa”) – São Paulo – 2014 55

Figura 8 – Osso marcado e fotografado com o gabarito (“mesa”). Notar quatro círculos dispostos proporcionalmente ao centro do dispositivo e que foram utilizados para calibrar o programa PMI – São Paulo – 2014.....56

Figura 9 – Imagem do programa PMI sendo calibrado a partir de uma fotografia realizada com auxílio do gabarito. Notar quatro círculos dispostos proporcionalmente ao centro do dispositivo e no centro dos mesmos um ponto de coloração vermelha, indicando que a cor já pode ser selecionada para o cálculo do momento de inércia – São Paulo – 2014 57

Figura 10 – Imagem do programa PMI em que a cor já foi selecionada (área vermelha representando a área da secção transversa do rádio) e já foi calculado o baricentro (ponto verde no centro da

imagem) e a partir dele o momento de inércia – São Paulo – 2014 58

Figura 11 – Foto do padrão circular fixado ao dispositivo de calibração – São Paulo – 2014.....59

Figura 12 – Tela do programa Corel Draw 9 com a imagem do padrão circular e do dispositivo de calibração. Evidenciando a elipse posicionada em torno do objeto amarelo – São Paulo – 2014 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distância entre os marcadores do dispositivo de calibração do programa PMI 56

Tabela 2 – Resultados do momento de inércia e da altura da elipse encontrados por meio dos programas PMI e Corel Draw 61

Tabela 3 – Idade, peso, comprimento total e diâmetros CrCa e ML dos grupos GA e GCA 64

Tabela 4 – Idade, peso, comprimento total e diâmetros CrCa e ML dos grupos GN e GCN 64

Tabela 5 - Comparação entre os grupos nitrogênio e grupo controle nitrogênio 67

Tabela 6 - Comparação entre os grupos grupo autoclave e grupo controle autoclave 69

Tabela 7 - Comparação entre os grupos grupo nitrogênio e grupo autoclave 71

Tabela 8 - Comparação dos deltas com respeito ao seu controle entre os grupos grupo nitrogênio e grupo autoclave 73

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

atm	atmosfera
cm	centímetro
CrCa	craniocaudal
GA	grupo autoclave
GCA	grupo controle autoclave
GCN	grupo controle nitrogênio
GN	grupo nitrogênio
Gy	gray
Hmáx	altura máxima
HOVET-FMVZ/USP	Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
Jx	deslocamento do baricentro em relação ao eixo “x”
kg	quilograma
kgf	quilograma-força
kv	quilovolt
mA	miliampère
mmAl	milímetros de alumínio
min	minuto
ML	mediolateral
mm	milímetro
mm^4	milímetro elevado à quarta potência
Mpa	megapascal
MV	megavolts
NaCl	cloreto de sódio
N.mm	newton milímetro
P	intervalo de confiança
RM	ressonância magnética
TC	tomografia computadorizada
”	polegada
%	percentual
° C	grau Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19

2 REVISÃO DE LITERATURA 21

2.1 NEOPLASIAS ÓSSEAS EM CÃES 21

2.2 CIRURGIA DE PRESERVAÇÃO DO MEMBRO (*LIMB-SPARING)* 23

2.2.1 Autoenxerto tratado por autoclavagem 24

2.2.2 Autoenxerto desvitalizado por nitrogênio líquido 25

2.2.3 Outros métodos de *limb-sparing* 26

2.2.3.1 Autoenxerto pasteurizado 26

2.2.3.2 Radiação intraoperatória 27

2.2.3.3 Transporte ósseo 28

2.2.3.4 Transposição da ulna ipsilateral 28

2.2.3.5 Aloenxerto 29

2.2.3.6 Endopróteses de metal 30

2.3 DENSITOMETRIA ÓSSEA 31

2.4 BIOMECÂNICA E ENSAIO DE FLEXÃO EM QUATRO PONTOS 31

3 OBJETIVOS 37

4 JUSTIFICATIVA 39

5 RELEVÂNCIA CLÍNICA 41

6 HIPÓTESE 43

7 MATERIAL E MÉTODO 45

7.1 CORPOS DE PROVA 45

7.1.1 Critérios de inclusão 45

7.1.2 Critérios de exclusão 45

7.2 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS 46

7.2.1 Delineamento experimental 47

7.2.2.1 Autoclavagem 47

7.2.2.2 Desvitalização em nitrogênio líquido 47

7.3 EXAMES RADIOGRÁFICOS 48

7.4 DENSITOMETRIA ÓPTICA RADIOGRÁFICA 49

7.5 TESTE DE FLEXÃO EM QUATRO PONTOS 51

7.6 CÁLCULO DO MOMENTO DE INÉRCIA 54

7.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA 61

8 RESULTADOS 64

8.1 CORPOS DE PROVA 64

8.2 DENSITOMETRIA ÓPTICA RADIOGRÁFICA 65

8.3 TESTE DE FLEXÃO EM QUATRO PONTOS E MOMENTO DE INÉRCIA 65

9 DISCUSSÃO 75

10 LIMITAÇÕES DO ESTUDO 82

11 CONCLUSÃO 84

REFERÊNCIAS 86

APÊNDICES 93

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O osteossarcoma apendicular é a neoplasia óssea de ocorrência mais comum em cães. O tratamento tradicional é baseado na excisão cirúrgica através da amputação do membro associada à quimioterapia (MACDONALD; SCHILLER, 2010).

Em casos em que a amputação não possa ser realizada ou quando o proprietário se mostre relutante a tal procedimento, a cirurgia de preservação do membro ou *limb-sparing* é indicada (LIPTAK et al., 2006).

Os princípios da cirurgia de preservação do membro incluem a ressecção em bloco do tumor e o tratamento do mesmo por meio de técnicas que utilizam o calor ou o frio para desvitalizar as células neoplásicas e, em seguida, esse segmento é reimplantado e fixado ao osso receptor (LIPTAK et al., 2006). Alguns dos métodos mais utilizados para o tratamento do autoenxerto são a autoclavagem (BÖHM et al., 1998) e a desvitalização em nitrogênio líquido (RAHMAN et al., 2009).

Esses métodos de “reciclagem” do osso neoplásico eliminam as células tumorais, entretanto podem alterar suas características biomecânicas. Os processos de autoclavagem e congelamento com nitrogênio líquido, ainda são frequentemente utilizados em medicina, principalmente nos países asiáticos, em que a orientação religiosa não permite a utilização de aloenxertos. Ambos apresentam a simplicidade, praticidade e disponibilidade imediata dos autoenxertos (YAMAMOTO et al., 2003; HAYASHI et al., 2005; SAKAYAMA et al., 2006; RAHMAN et al., 2009; TANZAWA et al., 2009; TSUCHIYA et al., 2010), contudo, o potencial osteoindutor e a matriz orgânica do autoenxerto são perdidos quando o osso é submetido a temperaturas superiores a 60°C. (YAMAMOTO et al., 2003; HAYASHI et al., 2005). Já o emprego do nitrogênio líquido preserva a resistência biomecânica e mantém as propriedades osteoindutivas e osteocondutivas além de permitir a reutilização de tecidos moles como tendões e ligamentos (SAKAYAMA et al., 2006; RAHMAN et al., 2009; TANZAWA et al., 2009; TSUCHIYA et al., 2010).

O presente trabalho visa comparar biomecanicamente, através do ensaio de flexão de quatro pontos, a resistência de segmentos de rádios caninos, tratados com os métodos de autoclavagem e desvitalização em nitrogênio líquido, após seleção das amostras por meio de densitometria óssea.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura encontra-se dividida como se segue:

2.1 NEOPLASIAS ÓSSEAS EM CÃES

O osteossarcoma é a principal neoplasia óssea primária maligna canina, sendo responsável por cerca de 80% dos tumores ósseos nessa espécie (ENDICOTT, 2003; LIPTAK et al., 2004a), seguida do condrossarcoma, fibrossarcoma e hemangiossarcoma (GARZOTTO; BERG, 2007). Essa neoplasia possui origem mesenquimal, etiologia desconhecida e apresenta comportamento invasivo nos tecidos adjacentes. Tem grande potencial metastático por via hematógena, principalmente para os pulmões e ossos e, por via linfática, para os linfonodos regionais (ROVESTI et al., 2002).

Aproximadamente 75% dos osteossarcomas acometem o esqueleto apendicular com predileção pela metáfise dos ossos longos, principalmente a região distal do rádio. A maioria dos pacientes acometidos apresenta massa corporal superior a 20 quilogramas (kg), pertence a raças grandes e gigantes e a média de idade observada é de 7 anos (ROVESTI et al., 2002; ENDICOTT, 2003; LIPTAK et al., 2006).

Cerca de 10% dos cães apresentam evidência radiológica de metástases pulmonares no momento do primeiro atendimento, entretanto, em torno de 90% já desenvolveu micrometástases (BURACCO et al., 2002).

Os sinais clínicos dessa neoplasia são claudicação e aumento de volume de consistência firme e doloroso à palpação. A claudicação inicialmente é de grau leve e intermitente, progredindo para o grau severo e persistente, podendo culminar em impotência funcional aguda que, geralmente, é associada a fraturas patológicas (MORELLO et al., 2010).

O diagnóstico é realizado com base na anamnese, exame físico e exames radiográficos. Os achados radiológicos incluem lesões ósseas líticas e/ou proliferativas, pobre definição da zona transicional entre cortical e medular ósseas,

acentuado aumento de volume de tecidos moles adjacentes, elevação periosteal (triângulo de Codman) e aspecto de “raios de sol” (*sunburst*) (ENDICOTT, 2003; GARZOTTO; BERG, 2007). Entretanto, os dois últimos sinais radiológicos não são patognomônicos para esse tipo de tumor. Em geral, o osteossarcoma não invade o espaço articular, mas pode provocar reação periosteal no osso adjacente. O diagnóstico diferencial inclui osteomielites bacteriana e fúngica (GARZOTTO; BERG, 2007). Para delimitação das áreas acometidas pelo tumor, tanto no tecido ósseo quanto nos tecidos moles e para identificação precoce de metástases pulmonares não visíveis radiograficamente, é indicada a realização de tomografia computadorizada (TC) ou ressonância magnética (RM). Esses exames complementares são fundamentais no planejamento cirúrgico. A presença de metástases pulmonares é um indicador de prognóstico (MORELLO et al., 2010).

O diagnóstico definitivo é realizado através de biópsia e histopatologia. O material deve ser colhido de maneira menos invasiva com auxílio da agulha de Jamshidi ou trefina de Michelle (ENDICOTT, 2003; MORELLO et al., 2010). Alguns autores, entretanto, referiram não realizar biópsia em alguns casos, a fim de evitar a disseminação de células tumorais nos tecidos moles. Outro motivo para terem optado pela não realização da biópsia é que esse procedimento pode favorecer a ocorrência de fraturas patológicas (LIPTAK et al., 2005; GASCH et al., 2013).

O padrão ouro para o tratamento do osteossarcoma consiste na excisão cirúrgica da neoplasia primária, através da amputação do membro e quimioterapia adjuvante, os quais promovem sobrevida média de 262 a 540 dias nos pacientes que apresentam osteossarcoma apendicular (LIPTAK et al., 2004a; MACDONALD; SCHILLER, 2010). A quimioterapia é baseada na administração das drogas cisplatina, carboplatina e doxorrubicina isoladamente ou em diferentes associações e visa minimizar o surgimento de metástases. O membro amputado deve ser encaminhado para histopatologia (LIPTAK et al., 2004a; GARZOTTO; BERG, 2007).

2.2 CIRURGIA DE PRESERVAÇÃO DO MEMBRO (*LIMB-SPARING)*

Embora a amputação seja o tratamento tradicional para o osteossarcoma e a maioria dos cães tolerem bem esse procedimento, a cirurgia de preservação do membro ou *limb-sparing* é indicada em casos de enfermidades concomitantes com a neoplasia, como obesidade, doença neurológica e doença articular degenerativa debilitante em outros membros. Há ainda possibilidade de realização de *limb-sparing* nos casos em que o proprietário é relutante à amputação e no qual o paciente se enquadra no perfil para ser submetido a tal intervenção cirúrgica (MORELLO et al., 2003; LIPTAK et al., 2006).

As características dos candidatos a esse procedimento incluem bom estado de saúde, ausência de metástases, presença de osteossarcoma que esteja clinicamente e radiograficamente confinado em um membro e acometendo menos que 50% do comprimento ósseo (determinado radiograficamente), ausência de fratura patológica e menos de 360 graus de envolvimento dos tecidos moles (DERNELL et al., 2007). A cirurgia de *limb-sparing* também pode ser realizada para tratamento de outras neoplasias ósseas como sarcoma histiocítico (LIPTAK et al., 2004b).

A preservação do membro não altera o tempo de sobrevida quando comparado à amputação e quimioterapia adjuvante, contudo, promove algumas vantagens sobre o tratamento tradicional, como o excelente retorno à função do membro em aproximadamente 80% dos cães e preservação do “estado de quadrúpede” em pacientes de raças grandes ou gigantes (LIPTAK et al., 2005; MACDONALD; SCHILLER, 2010).

O *limb-sparing* envolve a ressecção do tumor e a reconstrução da coluna óssea e, geralmente, artrodese da articulação adjacente. A cirurgia de preservação do membro tem sido descrita nas regiões distal de rádio, proximal de úmero, distal de tíbia e proximal de fêmur. A que promove melhores resultados, contudo, é a distal de rádio, uma vez que a artrodese pancarpal é bem tolerada pelos cães, contrastando com as demais áreas, em que o retorno à função não é satisfatório (LIPTAK et al., 2006).

Uma variedade de métodos de *limb-sparing* tem sido descrita. As técnicas mais comumente realizadas são autoenxerto autoclavado (BÖHM et al., 1998), autoenxerto desvitalizado em nitrogênio líquido (RAHMAN et al., 2009), autoenxerto pasteurizado

(JEON et al., 2008), utilização de radiação intraoperatória *in vivo* ou *ex vivo* (extracorpórea) (LIPTAK et al., 2004; BOSTON et al., 2007), osteogênese por transporte ósseo longitudinal (ROVESTI et al., 2002), transposição da ulna ipsilateral (SÉGUIN et al., 2003; POOYA et al., 2004; GASCH et al., 2013), utilização de aloenxerto (KUNTZ et al., 1998) e endopróteses de metal (LIPTAK et al., 2006; MACDONALD; SCHILLER, 2010).

Os autoenxertos podem ser contraindicados em cães com lesões tumorais primariamente líticas, em que a integridade estrutural do osso cortical pode fragilizar-se ainda mais após o processo de tratamento do enxerto, predispondo à falha no procedimento de preservação do membro (LIPTAK et al., 2004b).

2.2.1 Autoenxerto tratado por autoclavagem

A técnica de “reciclagem autógena” é baseada na imediata reimplantação do osso resseccionado após o tratamento extracorpóreo pelo calor, frio ou radiação. Os autoenxertos apresentam algumas vantagens em relação à reação imunológica, uma vez que não transmitem doenças, são economicamente viáveis, de fácil acesso e apresentam conformação anatômica compatível com o receptor (JEON et al., 2008).

As aplicações clínicas do osso autoclavado para reconstrução de defeitos ósseos após a ressecção de tumores têm sido relatadas em muitas pesquisas desde 1956. As vantagens do seu uso são facilidade técnica, disponibilidade imediata, baixo custo e ausência de risco de infecção para o doador (HAYASHI et al., 2005). Em contraste, os inconvenientes são o enfraquecimento da resistência dinâmica (fase elástica) após a autoclavagem, perda da matriz cartilaginosa e suscetibilidade à infecção pós-operatória por se tratar de um “osso morto” (HAYASHI et al., 2005; SAKAYAMA et al., 2006).

Durante o processo de autoclavagem, o potencial osteoindutor é perdido devido à desnaturação da proteína por calor e somente o potencial osteocondutor, ou seja, função de suporte estrutural permanece (ASADA et al., 1997; HAYASHI et al., 2005). Outra limitação da “reciclagem” dos autoenxertos é a dificuldade de redução perfeita em casos de lesões ósseas primárias líticas/proliferativas (JEON et al., 2008).

Quanto ao segmento ósseo que será autoclavado e, posteriormente reconstruído, há necessidade de garantir não apenas as margens de segurança, mas que todas as células tumorais daquele segmento serão destruídas através do tratamento extracorpóreo (BÖHM et al., 1998). É evidente que o tempo de aquecimento longo e altas temperaturas são desejáveis, contudo as capacidades biomecânicas ósseas podem ser reduzidas consideravelmente pelas altas temperaturas e longo tempo de aquecimento. O tempo mínimo de autoclavagem é 15 minutos (min) a 134°C ou 20 min a 120°C para ossos longos com a intenção de desvitalizar células tumorais (BÖHM et al., 1998; SAKAYAMA et al., 2004).

2.2.2 Autoenxerto desvitalizado por nitrogênio líquido

O congelamento ou criocirurgia foi primeiramente utilizado no tratamento de tumores em 1964 como procedimento paliativo. O uso do nitrogênio líquido para tratamento de osteossarcoma primário foi descrito pela primeira vez em 1984 (RAHMAN et al., 2009).

O nitrogénio líquido, armazenado a -197°C, é agente criogênico eficaz, que pode ser utilizado para preservação ou destruição tecidual. O congelamento lento e descongelamento rápido permitem a preservação dos tecidos, enquanto o rápido congelamento e descongelamento lento causam destruição celular (RAHMAN et al., 2009). O nitrogênio líquido entra em ebulição a -196°C e retorna às baixas temperaturas através de dois outros compostos, o óxido nitroso (ebulição a -89°C) e dióxido de carbono (ebulição a -78.5°C), portanto pode atingir o mais profundo efeito de congelamento. A morte celular ocorre pela combinação de danos diretos pela formação de cristais intra e extracelulares e distúrbios osmóticos e eletrolíticos (POGREL, 1993).

As vantagens da utilização do nitrogênio líquido são sua simplicidade, baixo custo, manutenção das propriedades osteoindutivas e osteocondutivas, possibilidade de redução anatômica perfeita entre o autoenxerto e o osso receptor, manutenção da resistência biomecânica, ausência de transmissão de doenças, ausência de rejeição imunológica e preservação da matriz cartilaginosa. Além disso, dispensa a formação de banco de ossos, não requer equipamentos especiais nem controle térmico restrito,

não desnatura proteínas e promove revitalização precoce e efeitos crioimunológicos (TSUCHIYA et al., 2005; TSUCHIYA et al., 2010).

O protocolo mais utilizado consiste em excisão em bloco da neoplasia, remoção dos tecidos moles adjacentes e congelamento imediato da peça em nitrogênio líquido por 20 min, sendo a mesma gradativamente descongelada e reimplantada através de fixação interna (NISHIDA et al., 2008).

A hipotermia não apenas induz a morte das células tumorais, mas também ativa a resposta imune antitumoral estimulada pelos antígenos tumorais liberados pelo tecido crionecrótico (NISHIDA et al., 2008). Para as lesões ósseas, a criocirurgia oferece algumas vantagens sobre outras modalidades de tratamentos porque mata as células dentro do osso, mas deixa a estrutura inorgânica intocada, fazendo com que a mesma permaneça como matriz para neoformação óssea (POGREL, 1993).

2.2.3 Outros métodos de *limb-sparing*

A seguir são descritos outros métodos de preservação do membro em cães.

2.2.3.1 Autoenxerto pasteurizado

Essa técnica consiste em realizar ostectomia com 3 a 4 centímetros (cm) de margem de segurança, remover o segmento ósseo e prepará-lo removendo os tecidos moles. Em seguida, o mesmo é colocado em recipiente impermeável à água, contendo solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9%, pré aquecido a 65°C em banho-maria. O recipiente permanece submerso no banho-maria por 40 min. Após essa etapa, o autoenxerto é reposicionado e fixado (BURACCO et al., 2002; MORELLO et al., 2003).

As vantagens dos autoenxertos pasteurizados incluem perfeito encaixe anatômico, fácil acesso, além de não haver necessidade de administração prolongada de antimicrobianos. Porém, essa técnica não pode ser utilizada quando há extensa destruição óssea (JEON et al., 2008).

2.2.3.2 Radiação intraoperatória

A maioria dos osteossarcomas acomete a região metafisária dos ossos longos, fazendo com a que durante a cirurgia de *limb-sparing* seja realizada artrodese da articulação adjacente para fixação do enxerto. Como alternativa, pode-se utilizar radiação intraoperatória como método de tratamento do autoenxerto (LIPTAK et al., 2004c). A radiação intraoperatória pode ser empregada *in vivo* ou *ex vivo*.

A técnica *in vivo* envolve osteotomia acima ou abaixo do local afetado, dependendo da localização do tumor, remoção dos tecidos moles, tendo cuidado especial com os nervos, proteção desses tecidos com compressas úmidas e aplicação da radiação – uma dose de 70 gray (Gy) e 6 megavolts (MV) de fótons – e imediato reposicionamento e fixação da porção submetida à radiação. A radiação causa neuropatia periférica, portanto, a proteção dos nervos durante esse procedimento é mandatória (LIPTAK et al., 2004c).

A técnica *ex vivo* ou radiação intraoperatória extracorpórea, contudo, é uma modificação da técnica *in vivo*. O segmento ósseo comprometido é removido, colocado em uma embalagem plástica estéril e tratado com radiação, na mesma dose de 70 Gy e 6 MV de fótons e, posteriormente reposicionado e fixado (LIPTAK et al., 2004c; DERNELL et al., 2007).

As vantagens da utilização da radiação *in vivo* são imediata recuperação da função do membro quando há preservação da mobilidade articular. Além disso, a radiação extracorpórea de autoenxertos permite a disponibilidade de enxertos corticais disponíveis rapidamente sem a necessidade de um banco de ossos, com excelente encaixe anatômico no defeito diafisário, sem possibilidade de transmissão de doenças ou indução de resposta imunológica (LIPTAK et al., 2004b; BOSTON et al., 2007).

A principal limitação da utilização da técnica *in vivo* é observada quando se trabalha com neoplasia localizadas em outros locais que não a porção distal do rádio (BOSTON et al., 2007).

As desvantagens relacionadas ao emprego da radiação incluem modificação dos elementos celulares e vasculares levando à osteopenia e diminuição da resistência mecânica aumentando o risco de fraturas patológicas e falhas de implantes (LIPTAK et al., 2004c; BOSTON et al., 2007). Alterações vasculares são

endoarterites e periarterites, edema e vacuolização endotelial que causam estreitamento da luz dos vasos e diminuição do volume sanguíneo e, consequentemente, hipóxia (LIPTAK et al., 2004c).

2.2.3.3 Transporte ósseo

O transporte ósseo é uma técnica de osteogênese por distração realizada com auxílio de fixador esquelético externo circular e distratores. Pode ser empregada em casos de não união ou neoplasias ósseas. Esse procedimento consiste em remover a porção óssea comprometida, descartá-la e realizar osteotomia proximal ou distal, dependendo da localização da lesão, criando assim uma falha no osso acometido, na região da neoplasia. Após o período de latência, de 2 a 7 dias, o segmento é distraído a uma velocidade pré estabelecida, de acordo com o defeito, formando novo osso. Quando o segmento alcança a extremidade óssea oposta estacionária, é iniciada compressão para facilitar a fusão dos dois fragmentos (ROVESTI et al., 2002).

O princípio da osteogênese por distração é o efeito tração-tensão, ou seja, o tecido é metabolicamente estimulado quando submetido à tração lenta e constante em condições apropriadas de fixação ocorrendo diferenciação e proliferação similar à ossificação intramembranosa (STALLINGS et al., 1998; ROVESTI et al., 2002).

As vantagens do transporte ósseo são baixo risco de infecção, manutenção da vascularização e substituição do defeito por osso novo. As desvantagens, entretanto, são necessidade de cooperação do proprietário na distração e manutenção do fixador por período prolongado (DERNELL et al., 2007).

2.2.3.4 Transposição da ulna ipsilateral

A transposição do enxerto ulnar vascularizado ipsilateral é uma técnica que permite a acomodação da porção distal da ulna no defeito ósseo radial criado pela ressecção tumoral enquanto o suprimento vascular e a viabilidade ulnar são mantidos (SÉGUIN et al., 2003).

As vantagens incluem a transferência imediata de enxerto autólogo, que completa circunferencialmente a coluna óssea sem causar morbidade cirúrgica em sítio distante da coleta, sem a necessidade de equipamento especial, banco de ossos ou exposição à radiação ionizante (POOYA et al., 2004; GASCH et al., 2013). Além disso, a transposição evita o processo demorado e tecnicamente desafiador de anastomose microvascular através da preservação da artéria e veia interóssea. O emprego de osso viável acelera o processo de consolidação e reduz a incidência de complicações quando comparado à utilização de aloenxertos no *limb-sparing*. O osso vascularizado é mais resistente à infecção e sofre menor reabsorção, porém maior hipertrofia em comparação ao osso não vascular. Essas características resultam em menor probabilidade de fraturas. (SÉGUIN et al., 2003; POOYA et al., 2004).

O autoenxerto proveniente da ulna também pode ser colhido da sua porção proximal. O comprimento do enxerto pode ser ajustado em função do defeito do rádio, porém, não é possível manter a vascularização. Essa é uma desvantagem, uma vez que o osso não vascularizado predispõe à infecção. Um ponto a ser ressaltado nessa técnica é que cães com diagnóstico de neoplasia em rádio distal e evidência pré ou intraoperatória de extensão tumoral na região de ulna, podem ser bons candidatos, desde que a técnica permita remoção em bloco da ulna distal (GASCH et al., 2013).

2.2.3.5 Aloenxerto

O uso de aloenxertos corticais requer manutenção periódica de um banco de ossos congelados estéreis, que precisam ser colhidos assepticamente de cães livres de doenças contagiosas ou neoplásicas. Durante o preparo do enxerto são removidos tecidos moles, periósteo e medula óssea (BURACCO et al., 2002; SÉGUIN et al.; 2003).

É necessário um tempo mínimo de congelamento dos enxertos (15 dias) antes de sua utilização, com a finalidade de diminuir sua imunogenicidade. Se armazenados a -20°C, os mesmos podem ser utilizados por até um ano. Após esse período, são descritas alterações nas suas propriedades biomecânicas (BURACCO et al., 2002).

Os aloenxertos submetidos ao congelamento, liofilização ou descalcificação não fornecem células vivas, ou seja, eles promovem suporte mecânico ao crescimento do novo osso (osteocondução) (BURACCO et al., 2002).

O emprego dos aloenxertos dispensa a fixação externa, portanto, requer pouco envolvimento do proprietário em comparação ao transporte ósseo (DERNELL et al., 2007). As desvantagens incluem manutenção de banco de ossos, transmissão de doenças, necessidade de adaptação de tamanho do enxerto ao osso receptor e possibilidade de infecção (LIPTAK et al., 2004b; LIPTAK et al., 2006). A taxa de infecção pós-operatória é, aproximadamente, 40 a 50%. A infecção pode ser bem controlada com administração prolongada de antimicrobianos, porém, raramente é resolvida (DERNELL et al., 2007).

2.2.3.6 Endopróteses de metal

A endoprótese de metal é um método alternativo aos enxertos ósseos corticais. É um implante confeccionado em aço cirúrgico 316L, disponível comercialmente a partir de 2006, desenvolvido para a região distal do rádio. É composto por um segmento cilíndrico sólido, com uma das extremidades alargada, com a finalidade de acomodar o osso radial do carpo. Esse componente possui orifícios para aplicação de parafusos para fixação de uma placa cortável veterinária larga (LIPTAK et al., 2006).

As vantagens desse método de *limb-sparing* incluem a disponibilidade de implante sem a necessidade de equipamento especial, exposição à radiação ionizante ou banco de ossos. Como os aloenxertos corticais não são requeridos, a cirurgia de preservação do membro passa a ser disponível para maior número de pacientes. (DERNELL et al., 2007). As endopróteses são superiores biomecanicamente aos enxertos ósseos corticais, sendo que a implantação de um material biologicamente inerte diminui a incidência e a severidade de infecção pós-operatória em comparação ao *limb-sparing* realizado com enxerto cortical (LIPTAK et al., 2006).

MacDonald e Schiller (2010) relataram a utilização de endoprótese de tântalo customizada em *limb-sparing* de rádio distal em um Leonberger e a fixação da mesma com placa de compressão dinâmica, obtendo como resultado bom apoio do membro até os 332 dias de pós-operatório.

2.3 DENSITOMETRIA ÓSSEA

A densitometria óptica radiográfica, também conhecida como fotodensitometria, é uma técnica radiológica não invasiva, precisa, de fácil execução e de baixo custo que avalia a variação da densidade mineral óssea por meio de imagens radiográficas (LOUZADA, 1994; MURAMOTO, 2003; LOUZADA et al., 2006). A mensuração da densidade óptica das imagens radiográficas consiste em um método relativo que fornece valores de densidade mineral em milímetros de alumínio, por meio da comparação da imagem radiográfica de uma região óssea de interesse à imagem de um penetrômetro de alumínio, escala graduada de características conhecidas que, por ser exposta a radiação simultaneamente ao osso, serve como padrão referencial. A utilização do alumínio como material para a confecção do penetrômetro padrão deve-se ao fato deste material possuir coeficiente de absorção à radiação semelhante ao do tecido ósseo (LOUZADA, 1994; LOUZADA et al., 1998b; MURAMOTO et al., 2005).

A avaliação radiográfica simples não é eficiente na detecção de alterações do processo de mineralização óssea quando há reabsorção inferior a 30% de seu conteúdo (GARTON et al., 1994; MURAMOTO et al., 2005). A densitometria óptica radiográfica, contudo, é indicada para transpor as limitações visuais e a subjetividade da interpretação radiográfica simples (LOUZADA et al., 1998b). A metodologia desse exame, entretanto, requer padronização precisa da técnica radiográfica e dos processos de digitalização das imagens para minimizar as variações dos valores obtidos (LOUZADA et al., 2006).

2.4 BIOMECÂNICA E ENSAIO DE FLEXÃO EM QUATRO PONTOS

Os ossos respondem dinamicamente à presença ou ausência de tensão com mudanças de tamanho, forma e densidade. A lei de Wolff define as relações entre estrutura e função, determinando que há correlação entre os padrões de alinhamento

trabecular e as direções das principais tensões que ocorrerem durante a função normal (LIRANI, 2004; ÖZKAYA; LEGER, 2006).

O osso cortical é um material heterogêneo e anisotrópico, ou seja, suas propriedades mecânicas variam de acordo com a direção das forças aplicadas. Sua composição e microestrutura incluindo densidade, porosidade, conteúdo mineral, orientação das fibras colágenas e tipo histológico definem sua resposta frente a esforços mecânicos e aos ensaios biomecânicos (ÖZKAYA; LEGER, 2006; DALMOLIN et al., 2013).

O tecido ósseo é mais resistente na orientação longitudinal do que nas direções tangenciais ou radiais, devido à orientação dos ósteons ao longo do eixo longitudinal. A orientação das direções anisotrópicas se relaciona com sua adaptação a cargas fisiológicas, caracterizando o feito da lei de Wolff no osso cortical (LIRANI, 2004; DALMOLIN et al., 2013).

O tecido ósseo é considerado um material viscoelástico, apresentando portanto, características mecânicas de deformação viscosa e elástica. A última ocorre quando há relação proporcional entre tensão e deformação e a deformação gerada não é permanente, uma vez que retirada a carga aplicada, o material retorna imediatamente à sua forma original. Já a deformação viscosa é caracterizada por retardos, ou seja, demora um certo tempo para iniciar após a aplicação da carga e igualmente para retornar ao formato original quando a carga é removida. Em função da imediata apresentação de comportamento elástico seguido pelo viscoso, o osso é considerado material viscoelástico (LIRANI, 2004; ÖZKAYA; LEGER, 2006; HULSE; HYMANN, 2007).

A aplicação de força externa (carga) em um material biológico gera feitos internos como a mudança na forma do corpo que, geralmente, está associada à produção de forças internas. A seguir estão definidos alguns fenômenos físicos que ocorrem em sólidos sob cargas (ÖZKAYA; LEGER, 2006).

Tensão: é definida como a força interna por unidade de área da secção transversal que uma parte de um corpo de um lado de um plano, exerce na outra parte oposta do plano. A tensão é intimamente associada com área ou plano. O conceito de tensão requer um plano específico sobre o qual a tensão é distribuída. A tensão não é uma carga, mas sim o resultado da aplicação da carga (LIRANI, 2004; ÖZKAYA; LEGER, 2006). Para que o material resista a qualquer tipo de carga, este deve desenvolver tensão interna. Há dois tipos de tensão: a normal e a de

cisalhamento. A primeira é a força por unidade de área paralela à área considerada. A tensão de cisalhamento é a força por unidade de área atuando perpendicularmente à área considerada (LIRANI, 2004; PENHA, 2004).

Deformação é a mudança da configuração geométrica que o corpo sofre após a aplicação de carga. A deformação pode ser longitudinal, quando há mudança no comprimento, ou de cisalhamento, quando ocorre deformação angular (em ângulo reto) (ÖZKAYA; LEGER, 2006; DALMOLIN et al., 2013).

A flexão é o efeito da força aplicada perpendicularmente ao eixo de uma viga. As tensões associadas às cargas de flexão são a combinação de compressão, tração e cisalhamento (LIRANI, 2004).

Com a finalidade de facilitar o entendimento da tensão causada pela flexão devemos considerar um corpo de prova de secção transversal uniforme. Em uma condição ideal, os resultados da reação interna da secção considerada devem ser iguais à tensão mecânica produzida pelo corpo. E a reação interna é atingida pela distribuição da tensão consistindo de tração e compressão. Há distribuição de compressão e tração na secção transversal de um material submetido a um ensaio de flexão em 4 pontos, por exemplo, com compressão máxima ocorrendo na superfície mais externa do lado côncavo e tração máxima na superfície mais externa do lado convexo do corpo de prova. A distribuição da tensão normal da flexão é linear e varia de zero a um máximo conforme as fibras do material externo são aproximadas. A tensão máxima sempre ocorre nas fibras da superfície (LIRANI, 2004). O corpo de prova, em geral, é mais sujeito à falha no lado oposto àquele em que a força está sendo aplicada, ou seja, é menos resistente à tração (HULSE; HYMANN, 2007; CAQUÍAS, 2010).

Para o cálculo da tensão são necessários os valores do momento fletor (M) na secção, distância do ponto de aplicação da carga até a linha neutra (Y) e o momento de inércia (I_a) (LIRANI, 2004).

O valor do momento fletor em qualquer secção é o produto de uma força e uma distância. Isso significa que para uma mesma força agindo em um ponto do corpo de prova, a tensão em qualquer secção distal à força varia com o comprimento, já que o momento fletor interno varia com o comprimento (LIRANI, 2004).

No centro de um corpo de prova cilíndrico se encontra a superfície neutra, que durante a flexão, não é deformada pela tração ou compressão. Não secção

transversal desse cilindro, essa superfície neutra é o eixo, ou linha neutra, que passa pelo centro da gravidade da secção transversa (LIRANI, 2004; CAQUÍAS, 2010).

O momento de inércia (I_a) é uma propriedade geométrica que expressa a distribuição de área em relação à linha neutra, ou seja, a soma dos infinitésimos de área que compõem a superfície e suas respectivas distâncias elevadas ao quadrado em relação ao eixo. O momento de inércia é dependente da forma da secção transversa, sendo portanto, o conceito mais importante quando se considera a resistência de uma amostra (LIRANI, 2004; MACIEL, 2008; BARBOSA et al., 2010).

O cálculo da tensão é realizado através da fórmula: tensão igual ao momento fletor (M) multiplicado pela distância do eixo ou linha neutra (Y), dividido pelo momento de inércia da área (I_a).

$$\sigma = \frac{M.Y}{I_a}$$

Considerando Y na fibra mais externa, a tensão será máxima nesse ponto. Geralmente a amostra fratura sob uma carga de flexão devido à ruptura da fibra mais externa, com subsequente ruptura das fibras adjacentes. Se uma secção transversal é simétrica em relação à linha neutra, a tensão máxima de compressão é igual à tensão máxima de tração. Se a secção transversal é assimétrica em relação à linha neutra, devido à forma anatômica e distribuição do material), a tensão compressiva máxima sob carga de flexão pode ser diferente da tensão máxima de tração (LIRANI, 2004; CAQUÍAS, 2010).

Os ensaios biomecânicos podem ser destrutivos quando promovem rupturas ou inutilização do material (ensaios de tração, compressão, flexão, torção, impacto e fadiga) ou não destrutivos (exames radiográficos e ultrassonográfico, e magna flux) (PENHA, 2004).

Em biomecânica, os estudos da força de flexão atuantes sobre a diáfise dos ossos longos podem ser realizados mediante o ensaio de três ou quatro pontos (ATHANASIOU et al., 2000; KUPCZIK, 2008). Esses ensaios consistem em apoiar o corpo de prova sob dois apoios (atuadores) com distância determinada, sendo a carga de flexão aplicada no centro do corpo de prova, a uma distância que corresponde à metade do apoio, no teste de 3 pontos. No teste de quatro pontos, entretanto, a carga é aplicada por meio de 2 atuadores (ATHANASIOU et al., 2000;

KUPCZIK, 2008). O ensaio de flexão em três pontos apresenta falhas que ocorrem no ponto central de contato da máquina com o corpo de prova, portanto, não é possível distinguir a tensão causada pela concentração da tensão (falha do corpo de prova) da tensão devida ao contato do atuador. O teste de quatro pontos, contudo, apresenta vantagens em relação ao anterior, uma vez que dispõe de uma região uniforme de distribuição da tensão entre os pontos de contato e os pontos de falha que residem ao longo dessa região, mas estão longe dos pontos de contato (atuadores) (DRAPER; GOODSHIP, 2003). O propósito dos testes de flexão é estabelecer a resistência do osso quando forças são aplicadas sobre um eixo. Para a maioria dos casos, o osso contralateral serve como controle. O osso quebra primeiro em tração e a fratura se propaga para o lado da compressão abrindo uma esquírola com formato de “asa de borboleta” (ATHANASIOU et al., 2000; KUPCZIK, 2008).

Para materiais biológicos ainda não se dispõe de normas específicas que determinem a dimensão e forma do corpo de prova (PENHA, 2004).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Comparar biomecanicamente, através do ensaio de flexão em quatro pontos, a resistência de segmentos ósseos de rádio de cães, após serem autoclavados ou desvitalizados em nitrogênio líquido.

JUSTIFICATIVA

4 JUSTIFICATIVA

O sucesso da cirurgia de preservação do membro depende intimamente da resistência biomecânica do autoenxerto reimplantado. Como alguns métodos de tratamento do osso neoplásico eliminam as células tumorais mas comprometem suas características biomecânicas, desenvolveu-se a comparação da resistência biomecânica entre os métodos de autoclavagem e desvitalização em nitrogênio líquido por meio do ensaio de flexão em quatro pontos.

RELEVÂNCIA CLÍNICA

5 RELEVÂNCIA CLÍNICA

A integridade do autoenxerto a ser reimplantado durante o procedimento cirúrgico de preservação do membro depende de suas características macroscópicas, radiológicas, bem como manutenção de suas propriedades biomecânicas, as quais podem ser comprometidas quando alguns métodos de tratamento extracorpóreos são utilizados. As mesmas são fundamentais tanto para a fixação do autoenxerto por meio de implantes ortopédicos – geralmente placas – ao osso receptor, como para o retorno à função do membro.

Visando comparar biomecanicamente, os tratamentos de autoclavagem e desvitalização em nitrogênio líquido, através do ensaio de flexão em quatro pontos, segmentos de rádios de cães, desenvolveu-se esta dissertação.

HIPÓTESE

6 HIPÓTESE

Os corpos de prova desvitalizados em nitrogênio líquido serão mais resistentes à flexão em 4 pontos do que os autoclavados.

MATERIAL E MÉTODO

7 MATERIAL E MÉTODO

Este trabalho foi desenvolvido após avaliação da Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), com protocolo n° 2795/2012. Os ensaios biomecânicos foram realizados no Setor de Biomecânica do Laboratório de Ortopedia e Traumatologia Comparada do Departamento de Cirurgia da FMVZ-USP.

7.1 CORPOS DE PROVA

Foram utilizados 20 cadáveres de cães provenientes do Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do Hospital Veterinário (HOVET) da FMVZ/USP, cujo óbito não esteve vinculado ao trabalho. Destes, foram colhidos 40 rádios.

7.1.1 Critérios de inclusão

Cães de raças de porte médio, grande ou gigantes, com massa corporal acima de 20 kg, machos ou fêmeas e com idade superior a 2 anos. Cães sem alterações ortopédicas (traumáticas ou neoplásicas) em membros torácicos.

7.1.2 Critérios de exclusão

Cães que apresentassem afecções ortopédicas macroscópicas (traumáticas ou neoplásicas) envolvendo os membros torácicos ou alterações radiográficas no rádio.

7.2 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS

Os rádios foram colhidos em até 3 horas após o óbito dos animais. Foi realizada desarticulação úmero-rádio-ulnar e carpo-rádio-ulnar. Em seguida, foi realizada separação do rádio e da ulna e remoção dos tecidos moles (esqueletização) (Figura 1A).

Após essa etapa, os corpos de prova foram radiografados e avaliados quanto à presença de osteopenia ou quaisquer alterações ósseas.

Foi realizada mensuração do comprimento total do corpo de prova bem como do diâmetro em sentido mediolateral (ML) e craniocaudal (CrCa) no ponto médio do seu comprimento. Logo após, foi calculada a diferença entre o comprimento total do osso e 12 centímetros (cm). O resultado foi dividido por 2 e valor obtido em cm foi o comprimento ósseo removido de cada epífise com a finalidade de preparar o segmento diafisário de 12 cm (Figura 1B).

Então foi realizada remoção do periósteo por meio de curetagem com lâmina de bisturi número 22.

Figura 1 - Figura 1 – Corpos de prova. A – Após a remoção dos tecidos moles. B – Segmentos diafisários de 12 cm – São Paulo – 2013

Fonte Dal-Bó, Í. S. (2013).

7.2.1 Delineamento experimental

Este estudo foi realizado de forma prospectiva, comparativa e aleatória. Os animais incluídos na pesquisa foram distribuídos aleatoriamente, em grupos da seguinte forma: para cada cadáver foi realizado sorteio que determinou o tratamento (autoclavagem ou desvitalização em nitrogênio líquido) e qual lado seria submetido ao mesmo. Cada par de rádios pertencia a um tratamento, sendo um lado tratado e o contralateral o seu controle. Obteve-se quatro grupos, cada um composto por 10 rádios:

- Grupo autoclave (GA)
- Grupo controle autoclave (GCA)
- Grupo nitrogênio (GN)
- Grupo controle nitrogênio (GCN)

7.2.2.1 Autoclavagem

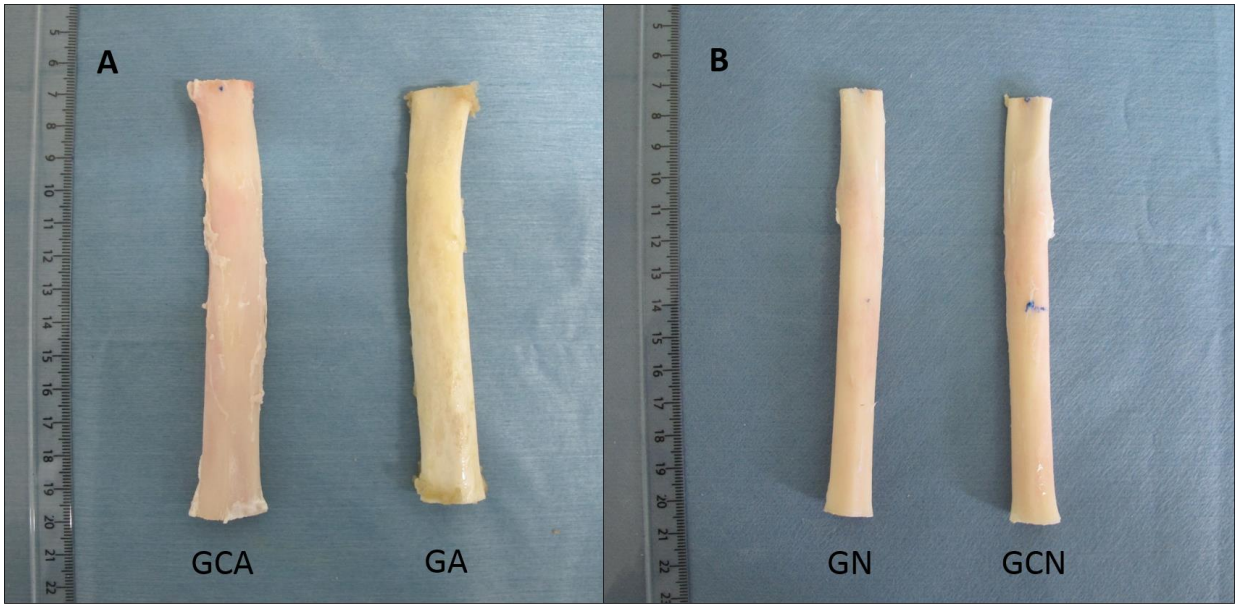
Os corpos de prova do (GA) foram embalados em papel grau cirúrgico[1] e durante a autoclavagem[2], foram submetidos à temperatura de 121°C por 20 minutos e à pressão de 2 atmosfera (atm) (Figura 2A).

7.2.2.2 Desvitalização em nitrogênio líquido

A desvitalização em nitrogênio líquido consistiu em submergir os segmentos ósseos do grupo nitrogênio (GN) em nitrogênio líquido por 20 minutos (min). Após, os mesmos passaram pelo processo de descongelamento em temperatura ambiente por 15 min e, em seguida, foram submersos em solução de NaCl a 0,9% também à temperatura ambiente por mais 15 min (Figura 2B).

[1] CIPAMED, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.
[2] SERCOM, Mogi das Cruzes, São Paulo, Brasil.

Figura 2 – Aspecto dos corpos de prova após os tratamentos. A – Amostras do grupo controle autoclave (GCA) e grupo autoclave (GA). B – Amostras do grupo nitrogênio (GN) e grupo controle nitrogênio (GCN) – São Paulo – 2013



Fonte: Dal-Bó, Í. S. (2013).

7.3 EXAMES RADIOGRÁFICOS

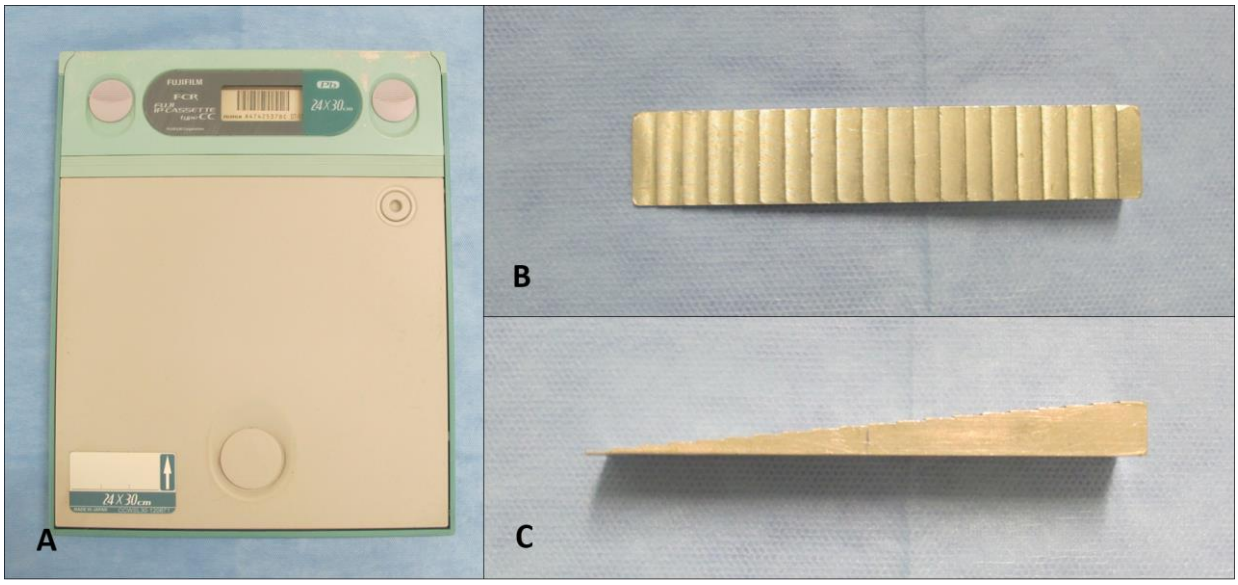
Todos os corpos de prova foram radiografados com tecnologia computadorizada no Setor de Diagnóstico por Imagem da FMVZ-USP. O aparelho utilizado foi de 500 miliamperes (mA) e 125 quilovolts (kV)[3], o regime utilizado foi de 100 mA e 45 kV (em média, dependendo das dimensões dos corpos de prova), foco grosso e tempo de exposição de 2 mAs. O cassete e IP tipo CC14” x17”[4] possuía dimensões de 18 x 24 cm (Figura 3A) e o exame foi realizado diretamente sobre a mesa, como o corpo de prova posicionado diretamente sobre o cassete/IP.

Foram realizados exames radiográficos de ambos os rádios de cada cadáver com a finalidade excluir os animais que apresentarem alterações ósseas que pudessem comprometer as propriedades biomecânicas. As radiografias foram realizadas nas projeções ML e CrCa.

[3] RAY TEC, Modelo RT 500/125, São Paulo, São Paulo Brasil
[4] FUJIFILM NDT, Sistemas Médicos Ltda, São Paulo, São Paulo Brasil

Junto ao cassete e paralelamente ao eixo maior do osso radiografado, foi fixado penetrômetro de alumínio (Figuras 3B e 3C), usado como referência densitométrica (LOUZADA et al., 1998a). A escala de referência é constituída de 20 degraus, o primeiro degrau com 1 milímetro (mm) de espessura, variando a seguir de 1 em 1 mm até o vigésimo degrau.

Figura 3 – A – Cassete. B e C – Escala densitométrica (penetrômetro de alumínio) com 20 degraus, cada um deles com 1mm de espessura, vista frontal e de perfil, respectivamente – São Paulo – 2013



Fonte: Dal-Bó, Í. S. (2013).

7.4 DENSITOMETRIA ÓPTICA RADIOGRÁFICA

A densitometria óptica radiográfica foi realizada conforme o método utilizado por Selim (2013). O mesmo está descrito a seguir.

As imagens radiográficas foram analisadas em computador com auxílio do programa ImageJ 1.47t®[5], a partir do qual foi determinada a densidade óptica óssea em milímetros de alumínio (mmAl). As regiões de interesse para a determinação da

[5] NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, ImageJ 1.47t®, USA.

densidade óssea foram a diafisária média e as metafisárias proximal e distal dos rádios. Esses três pontos foram analisados dentro de um segmento de 12 cm.

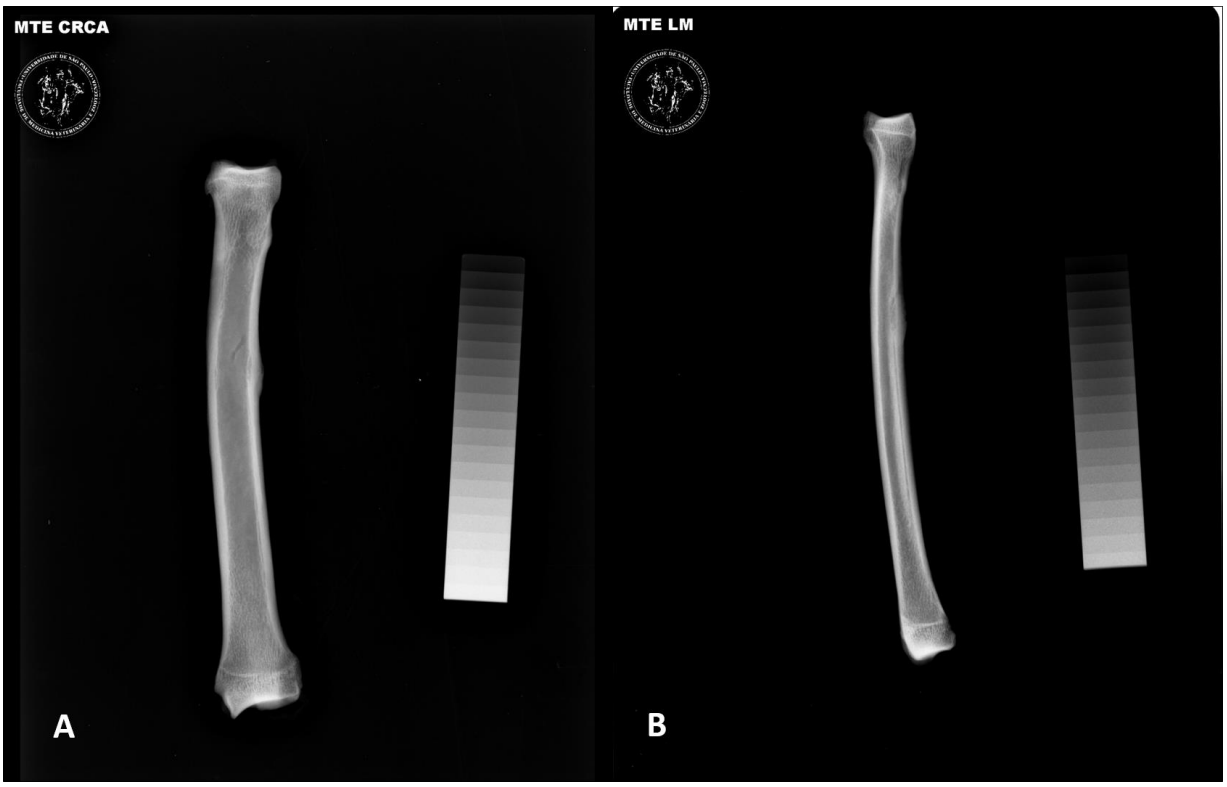
As imagens foram salvas em formato JPEG (Figura 4) para o processamento no *software*. Com a ferramenta de seleção de “ponto” do programa, selecionou-se um ponto na área central de cada degrau da escala de alumínio e foi aferida a sua tonalidade média de cinzas, que poderia variar de 0 (totalmente negro) a 235 (totalmente branco). A sequência de medidas seguiu do 1º degrau, mais fino (menos radiopaco), para o 20º, mais espesso (mais radiopaco).

Estes valores foram armazenados sob a forma de tabelas para cada imagem analisada, afim de que cada uma tivesse a sua própria escala padrão, evitando a utilização de uma escala única para todas as imagens. Sabe-se que apesar da rigorosa padronização da técnica radiográfica, não é possível a obtenção de imagens idênticas em relação a variação de tonalidades de cinza (MURAMOTO et al., 2005). Dessa forma, buscou-se eliminar possíveis erros de medida decorrentes da não uniformidade das radiografias utilizando-se as escalas individuais.

Posteriormente, a ferramenta de seleção de área “ponto” foi utilizada para selecionar as regiões diafisária e metafisárias de cada imagem radiográfica e medir a sua tonalidade de cinza. Foi realizada a média dos três valores obtidos.

Os valores médios de cada exame radiográfico foram registrados nas tabelas juntamente com as informações de suas respectivas escalas de alumínio, para então serem convertidos à unidade de mmAl, mediante à utilização da função “tendência” do *software* Microsoft Office Excel 2013®.

Figura 4 – Imagens radiográficas utilizadas para densitometria. A e B – Projeções CrCa e ML, respectivamente – São Paulo – 2013



Fonte: Setor de Diagnóstico por Imagem FMVZ-USP (2013).

7.5 TESTE DE FLEXÃO EM QUATRO PONTOS

A comparação da resistência dos segmentos ósseos dos grupos GA, GCA, GN e GCN foi realizada por meio do ensaio de flexão em quatro pontos na máquina de ensaios universal[6] utilizando célula de carga de 3000 kgf (quilograma-força) e velocidade de deslocamento de 5 mm/min.

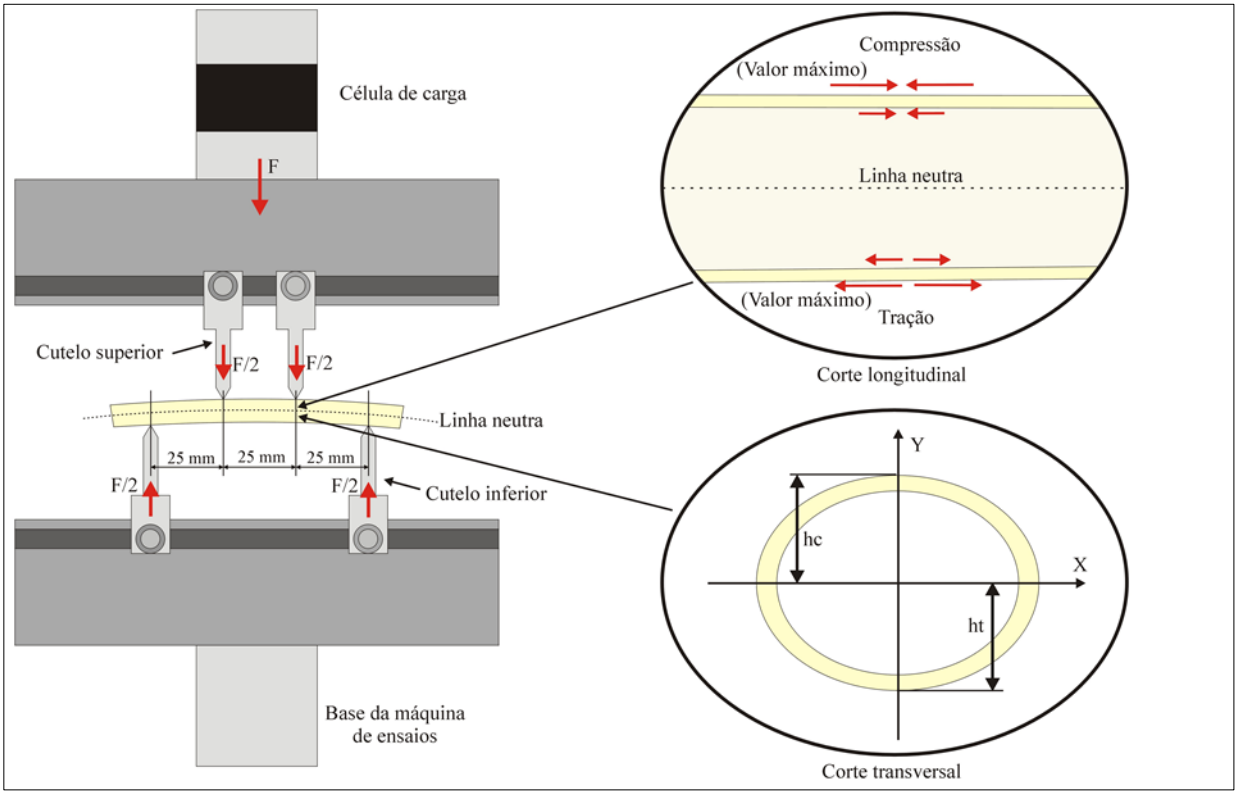
Os parâmetros de segurança definidos na máquina de ensaio foram: carga máxima prevista 3433,5 N (350 kgf), deslocamento máximo previsto de 16 mm, pré carga de 1% da carga máxima prevista (34,3 N) e término do ensaio caso a carga de ruptura ultrapasse 70% carga máxima prevista.

[6] KRATOS® modelo KE 3000, São Paulo, São Paulo, Brasil

Foi utilizado um dispositivo para ensaio de flexão em quatro pontos. Ele era composto por dois cutelos superiores presos à célula de carga (parte móvel da máquina de ensaios) e por dois cutelos inferiores presos à base da máquina. A distância entre os cutelos era de 25 mm (Figuras 5 e 6). Cada corpo de prova foi apoiado sobre os cutelos inferiores, com a sua região cranial voltada para cima e com a porção proximal à direita do dispositivo.

Para cada par de rádios, primeiramente, foi realizado o ensaio com o corpo de prova sorteado como controle, seguido pelo tratado.

Figura 5 – Esquema do corpo de prova posicionado no dispositivo para ensaio de flexão em quatro pontos. Em detalhe, os cortes longitudinal e transversal do osso na região de contato com o cutelo superior – São Paulo – 2014



Fonte: Pereira, C. A. M. (2014).

Foram calculadas as tensões máximas na superfície óssea referente à região submetida a esforços de tração e à compressão, segundo as equações 1 e 2.

$$\sigma_c = \frac{M.h_c}{J_x} \quad \text{(equação 1)}$$

$$\sigma_t = \frac{M.h_t}{J_x} \quad \text{(equação 2)}$$

(ref: Mecânica técnica e resistência dos materiais, Sarkis Melconian, 10.a edição, editora Erica, pg 241)

Onde:

σ_c = Tensão à compressão, em $N.mm^{-2}$

σ_t = Tensão à tração, em $N.mm^{-2}$

M = Momento à flexão na região de contato do cutelo superior, em N.mm

h_c = Distância entre a superfície submetida à compressão e a linha neutra, em mm

h_t = Distância entre a superfície submetida à tração e a linha neutra, em mm

J_x = Momento de inércia de uma superfície em relação ao eixo x.

O momento à flexão M foi determinado pela equação 3.

$$M = \frac{F}{2}.c \quad \text{(equação 3)}$$

Onde:

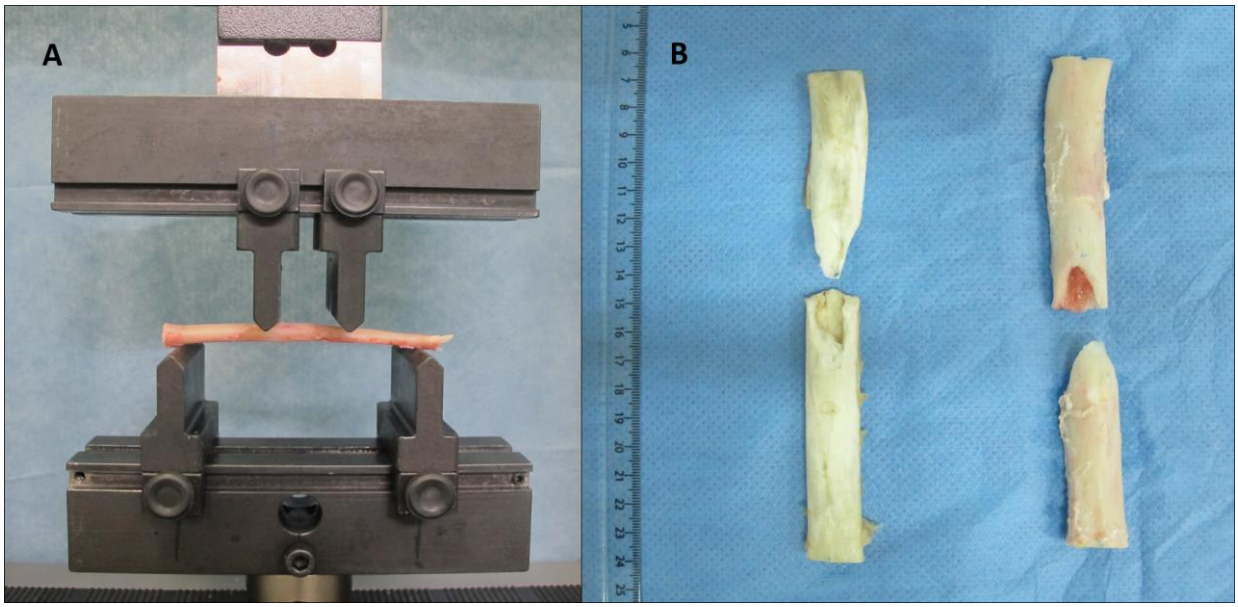
M = Momento à flexão, em N.mm

F = Força vertical medida pela célula de carga, em N

c = Distância entre os cutelos, correspondente a 25 mm

O momento de inércia foi determinado através de um método específico que será descrito no próximo capítulo.

Figura 6 – A – Posicionamento do corpo de prova no dispositivo do ensaio de flexão em 4 pontos. B – Aspecto dos corpos de prova após a realização do ensaio destrutivo. Da esquerda para direita: corpos de prova dos GA e GCA, respectivamente – São Paulo – 2013



Fonte: Dal-Bó, Í. S. (2013).

7.6 CÁLCULO DO MOMENTO DE INÉRCIA

Após os ensaios de flexão em quatro pontos, a porção distal dos rádios fraturados foi preservada. Procedeu-se ostectomia perpencicular ao eixo longitudinal do osso e a superfície ostectomizada foi desgastada com o intuito de promover área da secção transversal uniforme. As amostras foram congeladas em freezer a -20°C.

Em um segundo momento, as mesmas foram descongeladas à temperatura ambiente e sobre a superfície transversal preparada anteriormente foi aplicada uma camada de primer para metais[7]. No dia seguinte, foi aplicada uma camada de tinta para tecido[8]. Os corpos de prova do GA foram pintados de verde, os do GN de cor de rosa e os dos GCA e GCN de azul.

Quando a tinta secou, cada osso foi posicionado dentro de um dispositivo de calibração, de forma que a superfície pintada ficasse no mesmo plano do dispositivo. Foi utilizada uma câmera fotográfica digital (Câmera digital Canon Powershot G12, 10

[7] GATO PRETO, 7 em 1 primer, Sorocaba, São Paulo, Brasil.
[8] ACRILEX, tinta para tecido, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil.

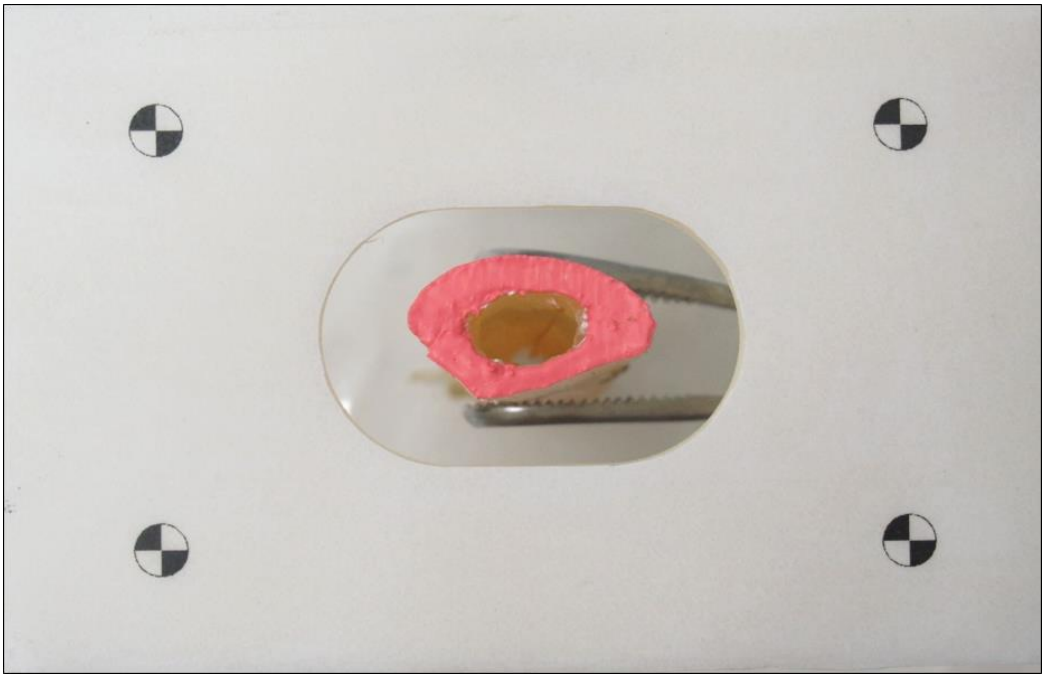
megapixels) para fotografar a superfície do osso juntamente com o dispositivo de calibração (Figuras 7 e 8).

O dispositivo de calibração consistia em uma "mesa" com um orifício elíptico em seu centro e quatro marcadores circulares dispostos nos quatro cantos do dispositivo (Figura 7). A distância entre os marcadores foi medida previamente através de um projetor de perfil Deltronic, modelo DV114, com resolução de 0,002 mm e estão descritos na tabela 1.

Figura 7 – Dispositivo para fotografar a superfície transversa dos ossos (“mesa”) – São Paulo – 2014

Fonte: Pereira, C. A. M. (2014)

Figura 8 – Osso marcado e fotografado com o gabarito ("mesa"). Notar quatro círculos dispostos proporcionalmente ao centro do dispositivo e que foram utilizados para calibrar o programa PMI – São Paulo – 2014



Fonte: Dal-Bó, Í. S. (2014)

Tabela 1 – Distância entre os marcadores do dispositivo de calibração do programa PMI

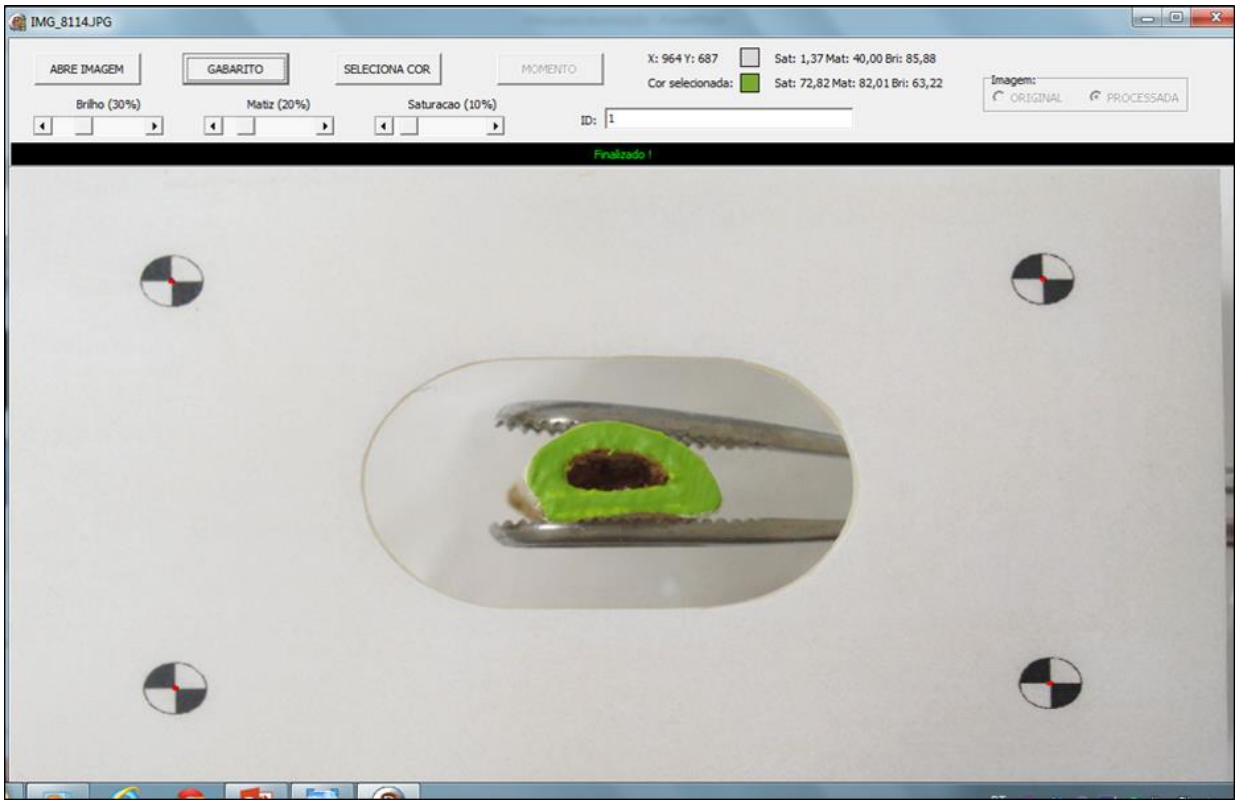
	Média (mm)	Desvio Padrão (mm)	Número de medidas
Distancia horizontal superior	69,875	0,013	3
Distancia vertical à esquerda	40,086	0,004	3
Distancia horizontal inferior	69,888	0,005	3
Distancia vertical à direita	40,021	0,001	3

Fonte: Pereira, C. A. M. (2014)

Foi desenvolvido um programa de computador na linguagem Delphi 2006 com o intuito de mensurar automaticamente o momento de inércia da superfície óssea pintada, o programa será chamado de PMI (desenvolvido por César Augusto Martins Pereira – *Musculoskeletal System Medical Research Laboratory (LIM-41), Orthopaedic and Traumatology Institute*, Hospital das Clínicas, Faculdade de

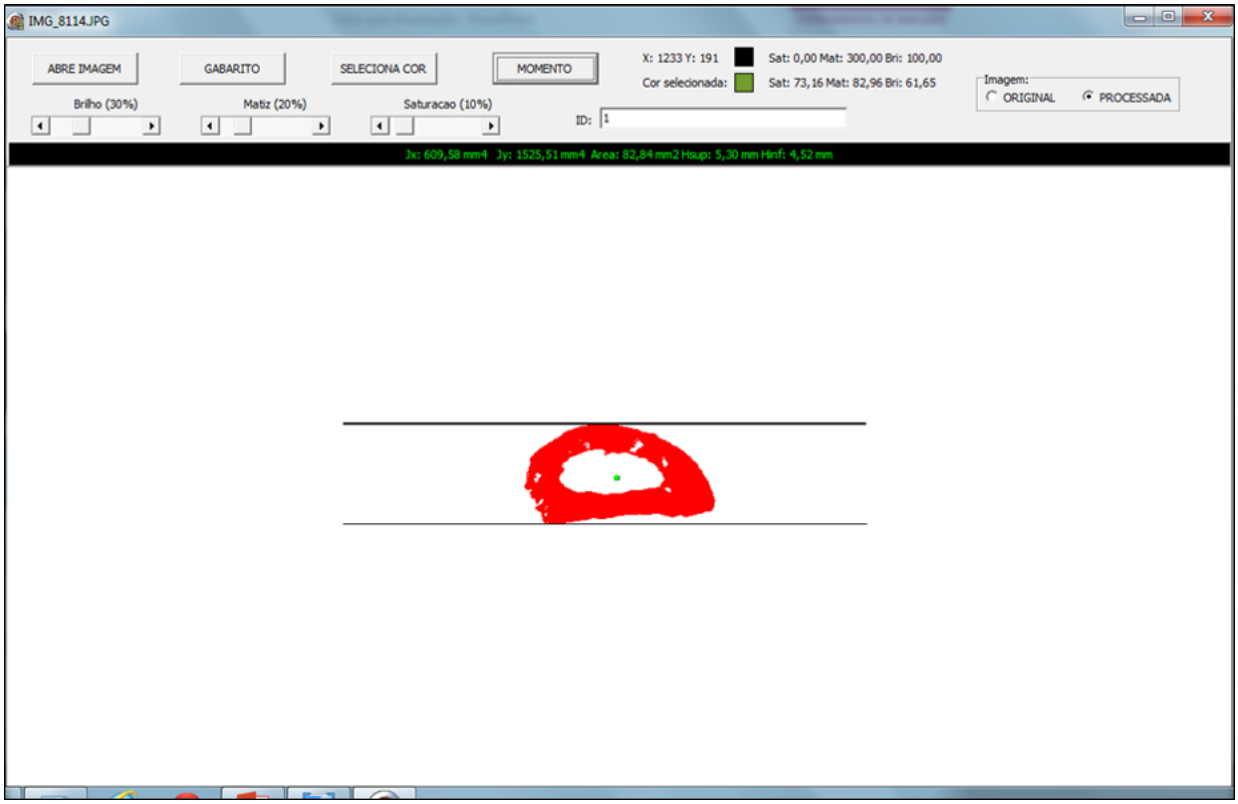
Medicina, Universidade de São Paulo, Brasil). Primeiramente, a fotografia digital era carregada e o programa encontrava automaticamente o centro dos quatro marcadores (Figura 9), depois o usuário do programa escolhia manualmente a região colorida de interesse e após essa etapa, o programa calculava o momento de inércia dos pontos da imagem com a mesma cor escolhida, utilizando as distancias conhecidas entre cada marcador como referência (Figura 10 e Tabela 1).

Figura 9 – Imagem do programa PMI sendo calibrado a partir de uma fotografia realizada com auxílio do gabarito. Notar quatro círculos dispostos proporcionalmente ao centro do dispositivo e no centro dos mesmos um ponto de coloração vermelha, indicando que a cor já pode ser selecionada para o cálculo do momento de inércia – São Paulo – 2014



Fonte: Pereira, C. A. M. (2014)

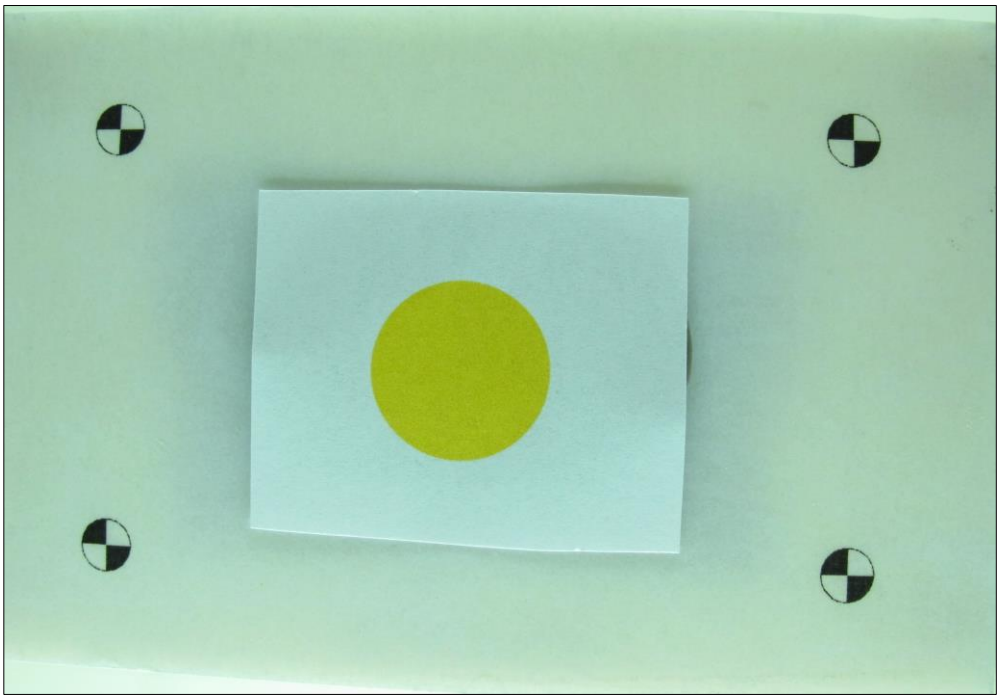
Figura 10 – Imagem do programa PMI em que a cor já foi selecionada (área vermelha representando a área da secção transversa do rádio) e já foi calculado o baricentro (ponto verde no centro da imagem) e a partir dele o momento de inércia – São Paulo – 2014



Fonte: Pereira, C. A. M. (2014)

A aferição dos resultados obtidos pelo programa desenvolvido foi feita comparando-se o momento de inércia e a altura da elipse com outro programa conhecido como Corel Draw 9. Para isso, foram tiradas nove fotografias digitais, com a mesma câmera utilizada nos experimentos, de nove padrões circulares coloridos fixados ao dispositivo de calibração (Figura 11). Os padrões circulares foram impressos (jato de tinta) em papel, onde três eram amarelos, três roxos e três verdes. Todos tinham um diâmetro em torno de 17 mm.

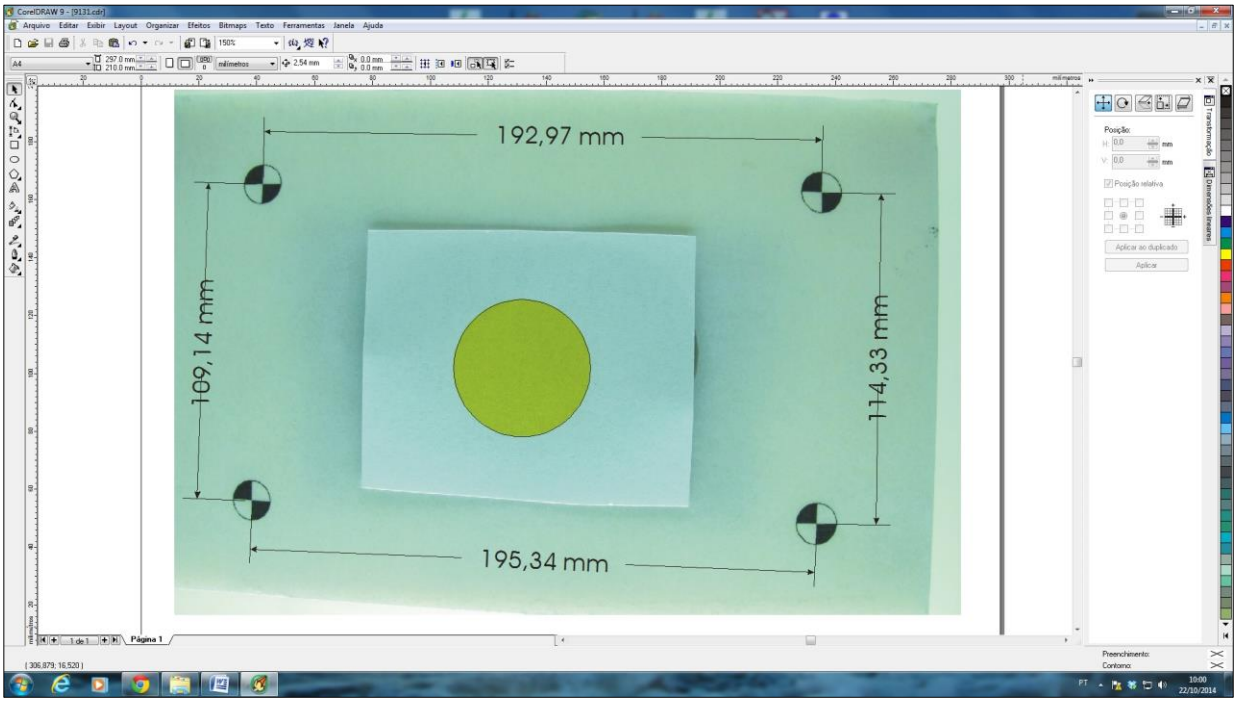
Figura 11 – Foto do padrão circular fixado ao dispositivo de calibração – São Paulo – 2014



Fonte: Pereira, C. A. M. (2014).

Primeiramente, todas as fotos foram analisadas pelo programa PMI utilizando o procedimento descrito anteriormente. Depois as mesmas fotos foram abertas no programa Corel Draw 9 onde o usuário, utilizando os recursos de ampliação, posicionou manualmente uma elipse, de forma que a sua largura e altura coincidisse como a imagem do padrão circular. Devido aos pequenos erros de alinhamento da câmera, o padrão circular podia ter a forma de uma elipse. O usuário também encontrava o centro dos quatro marcadores presentes no dispositivo calibrador (Figura 12).

Figura 12 – Tela do programa Corel Draw 9 com a imagem do padrão circular e do dispositivo de calibração. Evidenciando a elipse posicionada em torno do objeto amarelo – São Paulo – 2014



Fonte: Pereira, C. A. M. (2014).

Devido a imagem inserida no programa Corel não estar na escala real, as medidas feitas no Corel Draw foram convertidas para as medidas reais utilizando as distancias entre os marcadores do dispositivo de calibração (Tabela 1), posteriormente o momento de inércia da figura elíptica foi calculado utilizando a equação 3 e a altura da elipse foi exatamente a altura encontrada no Corel Draw.

$$J = \frac{\pi . b . h^3}{4} \quad \text{equação 3}$$

(ref: Manual de fórmulas técnicas, R. Gieck, 4.a edição, editora Hemus)

Onde:

J = momento de inércia de uma figura elíptica plana, em mm^4

π = número irracional 3,14159265...

b = metade da largura da elipse, em mm

h = metade da altura da elipse, em mm

Os resultados das medidas feitas pelos dois programas estão descritos na tabela 2, onde os erros foram calculados em relação ao programa Corel Draw 9.

Tabela 2 – Resultados do momento de inércia e da altura da elipse encontrados por meio dos programas PMI e Corel Draw

	Momento de inércia (mm^4)		Erro do momento de inercia		Altura da elipse (mm)		Erro da altura da elipse	
Foto	Programa PMI	Programa Corel Draw 9	Diferença (mm^4)	Diferença (%)	Programa PMI	Programa Corel Draw 9	Diferença (mm)	Diferença (%)
1	3864,3	3957,1	92,8	2,35	16,77	16,89	0,12	0,71
2	3836,8	4004,7	167,9	4,19	16,79	16,94	0,15	0,89
3	3876,3	3975,1	98,8	2,49	16,80	16,92	0,12	0,71
4	3926,2	4110,4	184,2	4,48	16,81	17,02	0,21	1,23
5	3905,1	4101,4	196,3	4,79	16,78	17,01	0,23	1,35
6	3892,9	4084,3	191,4	4,69	16,80	16,98	0,18	1,06
7	4288,7	4156,6	132,1	3,18	17,15	17,04	0,11	0,65
8	4282,0	4180,3	101,7	2,43	17,16	17,07	0,09	0,53
9	4244,2	4163,8	80,4	1,93	17,10	17,06	0,04	0,23
M	4012,9	4081,5	138,4	3,4	16,91	16,99	0,14	0,8
DP	196,0	83,7	46,8	1,1	0,17	0,06	0,06	0,4
Max	4288,7	4180,3	196,3	4,8	17,16	17,07	0,23	1,4
Min	3836,8	3957,1	80,4	1,9	16,77	16,89	0,04	0,2

Fonte: Pereira, C. A. M. (2014)

7.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores de idade foram avaliados entre os grupos GA e GN, uma vez que os controles pertenciam ao rádio contralateral do mesmo animal. Foi utilizado o teste T não pareado, considerando intervalo de confiança $P < 0,05$. Da mesma maneira, os valores de peso foram analisados entre os grupos GA e GN, sendo utilizado o mesmo teste estatístico e o mesmo P.

Os valores da densitometria óptica radiográfica foram analisados estatisticamente entre os grupos GN e GCN, GA e GCA através do teste T pareado, considerando $P < 0,05$. A comparação entre os grupos GN e GA foi realizada por meio do teste T não pareado considerando-se o mesmo intervalo de confiança.

Foram digitados os dados no programa Excel e posteriormente exportados para o programa SPSS v. 18.0 para análise estatística. Foram descritas as variáveis pela média, mediana, desvio padrão, mínimo e máximo. Foram comparados os grupos autoclave (GA) e controle (GCA), e nitrogênio (GN) e controle (GCN) pelo teste de Wilcoxon. Para a comparação da variação de cada grupo em relação ao seu controle calculamos os deltas das variáveis (autoclave – controle e nitrogênio – controle). Os grupos GA e GN, e GCA e GCN, foram comparados entre si pelo teste de Mann-Whitney. Foram ajustados os valores de P pela técnica de Bonferroni modificada por Finner devido às comparações múltiplas realizadas. Foi considerado um nível de significância de 5%.

RESULTADOS

8 RESULTADOS

Os resultados serão abordados conforme os tópicos abaixo.

8.1 CORPOS DE PROVA

Foram utilizados 40 rádios provenientes de 20 cadáveres de cães, sendo quatro fêmeas e 16 machos. As médias de idade, peso e medidas dos ossos serão apresentadas nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3 – Idade, peso, comprimento total e diâmetros CrCa e ML dos grupos GA e GCA

GA e GCA					
	Idade (anos)	Peso (kg)	Comprimento total do osso (cm)	Diâmetro CrCa (cm)	Diâmetro ML (cm)
Média	7,23	28,87	17,22	0,88	1,45
DP	4,47	7,22	1,80	0,18	0,29
Mínimo	1,30	20,70	15,10	0,50	0,90
Máximo	13,00	40,00	20,90	1,10	1,80

Fonte: Dal-Bó, Í. S. (2014)
Nota: A tabela com os dados de todos os animais encontra-se no apêndice A.

Tabela 4 – Idade, peso, comprimento total e diâmetros CrCa e ML dos grupos GN e GCN

GN e GCN					
	Idade (anos)	Peso (kg)	Comprimento total do osso (cm)	Diâmetro CrCa (cm)	Diâmetro ML (cm)
Média	11,00	34,10	18,41	1,07	1,71
DP	1,89	9,59	2,37	0,25	0,36
Mínimo	8,00	22,00	12,40	0,80	1,20
Máximo	14,00	48,00	21,00	1,50	2,20

Fonte: Dal-Bó, Í. S. (2014)
Nota: A tabela com os dados de todos os animais encontra-se no apêndice B.

Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas durante a comparação dos valores das idades entre os grupos GA e GN, sendo P = 0,0244. Já a análise estatística dos valores referentes aos pesos entre os mesmos grupos não revelou diferenças estatisticamente significativas, sendo P = 0,1851. Para ambas as análises foi utilizado teste T não pareado e P < 0,05.

8.2 DENSITOMETRIA ÓPTICA RADIOGRÁFICA

Não houve diferença estatística entre os grupos GA e GCA (P = 0,8119) e entre os grupos GN e GCN (P = 0,1829) analisados pelo teste T pareado. Igualmente, não foi verificada diferença estatística entre os grupos GA e GN (P = 0,7528), avaliados pelo teste T não pareado. Para os dois testes foi considerado intervalo de confiança de 5%.

8.3 TESTE DE FLEXÃO EM QUATRO PONTOS E MOMENTO DE INÉRCIA

A seguir os dados serão abordados no formato de tabelas e as variáveis analisadas foram:

- Força máxima: carga aplicada até o limite de escoamento, medida em kgf.
- Rigidez.
- Hmáx: altura máxima, à secção transversa do corpo de prova, medida em mm.
- Jx: deslocamento do baricentro em relação ao eixo “x”, medida em mm elevado à quarta potência (mm^4).
- Flecha: deslocamento dos atuadores do dispositivo de quatro pontos durante o ensaio de flexão, medida em mm.
- Tensão-tração: tensão gerada na face convexa, medida em megapascal (MPa).
- Tensão-compressão: tensão gerada na face côncava, medida em MPa.

- Tensão máxima: somatório da tensão-tração e tensão-compressão, igualmente medida em MPa.

Foram descritas as variáveis pela média, mediana, desvio padrão, mínimo e máximo. Foram comparados os grupos autoclave (GA) e controle (GCA), e nitrogênio (GN) e controle (GCN) pelo teste de Wilcoxon. Para a comparação da variação de cada grupo em relação ao seu controle calculamos os deltas das variáveis (autoclave – controle e nitrogênio – controle). Os grupos GA e GN, e GCA e GCN, foram comparados entre si pelo teste de Mann-Whitney. Foram ajustados os valores de P pela técnica de Bonferroni modificada por Finner devido às comparações múltiplas realizadas. Foi considerado um nível de significância de 5%.

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos GCA e GCN em nenhum dos parâmetros analisados.

Na tabela 5 foi realizada comparação entre os grupos GN e o GCN. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 5 - Comparação entre os grupos nitrogênio e grupo controle nitrogênio

	Grupo Nitrogênio					Grupo Controle Nitrogênio					
Variáveis	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	P
Força máxima (kgf)	144,48	149,10	55,99	60,60	237,60	140,76	135,00	52,24	67,80	241,50	0,816
Rigidez	45,67	43,15	23,79	17,22	92,70	50,88	47,97	21,63	29,02	102,77	0,811
Hmáx (mm)	6,12	6,32	1,32	4,12	8,20	6,03	6,05	1,33	4,25	8,54	0,811
Jx (mm4)	1182,32	1111,37	885,54	255,41	3073,83	1114,76	1017,12	884,80	217,35	3172,94	0,811
Flecha (mm)	5,21	5,19	0,47	4,29	6,07	5,20	5,01	0,79	4,40	6,66	0,957
Momento (N.mm)	1823,25	1863,75	676,13	757,50	2970,00	1714,72	1601,25	710,96	847,50	3018,75	0,811
Tensão-tração (Mpa)	10,98	10,64	2,73	7,92	17,28	11,19	11,06	3,27	7,87	16,25	0,980
Tensão-compressão (Mpa)	11,32	11,25	3,22	7,47	17,97	11,63	10,23	4,13	6,86	17,27	0,980
Tensão máxima (Mpa)	11,68	11,24	2,94	7,92	17,97	12,05	11,06	3,82	8,12	17,27	0,980

Dados comparados pelo teste de Wilcoxon e ajuste de Bonferroni modificado por Finner para os valores de P

Hmáx: altura máxima, à secção transversa do corpo de prova

Jx: deslocamento do baricentro em relação ao eixo "x"

Fonte: Dal-Bó, Í. S. (2014)

Na tabela 6 realizou-se comparação entre os grupos GA e GCA e foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos na variável força máxima, sendo mais altos os valores no grupo autoclave que no grupo controle (P=0,044).

Tabela 6 -Comparação entre os grupos grupo autoclave e grupo controle autoclave

	Grupo Autoclave					Grupo Controle Autoclave					
Variáveis	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	P
Força máxima (kgf)	141,21	151,65	43,66	70,50	222,60	125,31	132,15	45,68	66,30	213,00	**0,044**
Rigidez	39,36	37,07	16,43	18,59	68,67	43,39	46,65	16,38	18,09	65,47	0,238
Hmáx (mm)	5,13	5,05	0,87	3,94	6,92	4,97	5,02	0,76	3,80	5,93	0,422
Jx (mm4)	570,63	523,42	307,52	183,92	1115,60	532,93	521,21	240,37	215,28	912,12	0,445
Flecha (mm)	6,20	5,83	1,73	3,98	9,00	5,27	4,86	1,01	4,26	7,53	0,290
Momento (N.mm)	1765,13	1895,63	545,80	881,25	2782,50	1703,75	1743,75	508,50	851,25	2662,50	0,079
Tensão-tração (Mpa)	16,41	15,34	5,53	9,18	30,45	14,45	14,17	3,44	9,23	22,03	0,290
Tensão-compressão (Mpa)	17,24	17,28	4,80	10,16	26,89	15,97	15,88	3,59	10,04	22,95	0,290
Tensão máxima (Mpa)	17,87	17,28	5,40	10,16	30,45	16,06	15,88	3,50	10,04	22,95	0,236

Dados comparados pelo teste de Wilcoxon e ajuste de Bonferroni modificado por Finner para os valores de P

Hmáx: altura máxima, à secção transversa do corpo de prova

Jx: deslocamento do baricentro em relação ao eixo "x"

Fonte: Dal-Bó, Í. S. (2014)

Na tabela 7 foi realizada comparação entre os grupos GN e GA, onde houve diferença estatisticamente significativa para as variáveis tensão-tração, tensão–compressão e tensão máxima (P=0,027 para as três comparações). Os valores das três variáveis foram mais altos no GA.

Tabela 7 -Comparação entre os grupos grupo nitrogênio e grupo autoclave

	Grupo Nitrogênio					Grupo Autoclave					
Variáveis	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	P
Força máxima (kgf)	144,48	149,10	55,99	60,60	237,60	141,21	151,65	43,66	70,50	222,60	0,912
Rigidez	45,67	43,15	23,79	17,22	92,70	39,36	37,07	16,43	18,59	68,67	0,822
Hmáx(mm)	6,12	6,32	1,32	4,12	8,20	5,13	5,05	0,87	3,94	6,92	0,181
Jx (mm4)	1182,32	1111,37	885,54	255,41	3073,83	570,63	523,42	307,52	183,92	1115,60	0,161
Flecha (mm)	5,21	5,19	0,47	4,29	6,07	6,20	5,83	1,73	3,98	9,00	0,347
Momento (N.mm)	1823,25	1863,75	676,13	757,50	2970,00	1765,13	1895,63	545,80	881,25	2782,50	0,884
Tensão-tração (Mpa)	10,98	10,64	2,73	7,92	17,28	16,41	15,34	5,53	9,18	30,45	**0,027**
Tensão-compressão (Mpa)	11,32	11,25	3,22	7,47	17,97	17,24	17,28	4,80	10,16	26,89	**0,027**
Tensão máxima (Mpa)	11,68	11,24	2,94	7,92	17,97	17,87	17,28	5,40	10,16	30,45	**0,027**

Dados comparados pelo teste de Mann-Whitney e ajuste de Bonferroni modificado por Finner para os valores de P

Hmáx: altura máxima, à secção transversa do corpo de prova

Jx: deslocamento do baricentro em relação ao eixo "x"

Fonte: Dal-Bó, Í. S. (2014)

Durante a comparação realizada na tabela 8, os deltas (GN – GCN versus GA – GCA), foi observado que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos e os seus controles. Por exemplo a média de diferença de nitrogênio menos controle na força máxima foi de 3,72 kgf e no grupo autoclave menos controle foi de 15,90. Apesar de parecer que a diferença foi maior para o grupo autoclave com o seu controle esta diferença não foi estatisticamente significativa. Da mesma forma não houve diferença para o resto das variáveis.

Tabela 8 -Comparação dos deltas com respeito ao seu controle entre os grupos grupo nitrogênio e grupo autoclave

	Nitrogênio-Controle					Autoclave-Controle					
Variáveis	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	P
Força máxima (kgf)	3,72	-1,35	19,21	-21,90	36,00	15,90	14,85	8,60	2,40	30,90	0,732
Rigidez	-5,21	-5,72	9,60	-18,16	9,81	-4,03	-6,45	18,92	-30,55	43,16	0,971
Hmáx (mm)	0,10	0,13	0,29	-0,34	0,58	0,17	0,03	0,37	-0,23	1,00	0,833
Jx (mm4)	67,56	23,48	132,94	-99,11	327,04	37,70	18,42	118,99	-78,89	328,66	0,773
Flecha (mm)	0,01	-0,11	0,85	-1,12	1,67	0,93	0,04	1,75	-0,73	4,28	0,732
Momento (N.mm)	65,69	15,00	238,22	-273,75	450,00	130,83	146,25	103,90	0,00	303,75	0,732
Tensão - tração (Mpa)	-0,20	0,41	1,91	-3,74	1,83	1,82	0,97	3,10	-1,69	8,42	0,732
Tensão - compressão (Mpa)	-0,27	0,48	2,00	-3,75	1,89	1,05	1,26	2,62	-4,49	3,95	0,732
Tensão máxima (Mpa)	-0,28	0,41	1,99	-3,75	1,83	1,66	1,31	2,93	-2,79	7,50	0,732

Dados comparados pelo teste de Mann-Whitney e ajuste de Bonferroni modificado por Finner para os valores de P

Hmáx: altura máxima, à secção transversa do corpo de prova

Jx: deslocamento do baricentro em relação ao eixo "x"

Fonte: Dal-Bó, Í. S. (2014)

DISCUSSÃO

9 DISCUSSÃO

O tratamento tradicional do osteossarcoma apendicular é baseado na excisão cirúrgica através da amputação do membro associada à quimioterapia (BURACCO et al., 2002; ROVESTI et al., 2002; ENDICOTT, 2003; LIPTAK et al., 2004a; LIPTAK et al., 2005; GARZOTTO; BERG, 2007; MACDONALD; SCHILLER, 2010; MORELLO et al., 2010; GASCH et al., 2013). Em alternativa à amputação, há a cirurgia de preservação do membro (LIPTAK et al., 2004b; LIPTAK et al., 2005; DERNELL et al., 2007). Os princípios desse procedimento incluem ressecção em bloco do tumor e o tratamento do mesmo, por diversas técnicas visando desvitalização das células neoplásicas, seguido da reimplantação desse segmento e fixação do mesmo ao osso receptor. Além disso, existe a possibilidade de substituição do segmento ósseo por prótese ou aloenxerto (POGREL, 1993; ASADA et al., 1997; BÖHM et al., 1998; STALLINGS et al., 1998; MORELLO et al., 2003; SÉGUIN et al., 2003; POOYA et al., 2004; SAKAYAMA et al., 2004; LIPTAK et al., 2004c; HAYASHI et al., 2005; TSUCHIYA et al., 2005; LIPTAK et al., 2006; SAKAYAMA et al., 2006; BOSTON et al., 2007; JEON et al., 2008; NISHIDA et al.).

O intervalo estabelecido de, no máximo três horas, entre o óbito dos cães e a coleta dos rádios se mostrou satisfatório, uma vez que não foram observadas alterações macroscópicas de decomposição nos tecidos moles e ósseos. Além disso, não foram encontradas alterações biomecânicas nem diferenças estatisticamente significativas, com relação à comparação da resistência dos grupos GCN e GCA. Optou-se pela definição desse intervalo de tempo uma vez que o óbito dos cães utilizados não esteve vinculado a essa pesquisa, portanto, havia necessidade de padronizar o tipo de cadáver que serviria para coleta. Foram realizadas pesquisas semelhantes com cadáveres frescos, no entanto, foram utilizados animais experimentais que eram sacrificados e a coleta dos corpos de prova era realizada imediatamente após o óbito (VOGGENREITER et al., 1994; DOHTSU et al., 2001; NISHIDA et al., 2008), este tipo de padronização, contudo, não é viável quando são utilizados animais de rotina.

Os exames radiográficos foram utilizados como método de exclusão dos cães que apresentassem alterações radiográficas nos rádios, não sendo excluído nenhum animal por este motivo.

A avaliação do *status* do esqueleto pode ser feita por meio de medidas de densidade mineral óssea, as quais podem auxiliar na instituição do diagnóstico de osteopenia bem como na monitoração seriada do osso em resposta a afecções, a intervenções cirúrgicas e terapêuticas e em estratégias preventivas relacionadas ao metabolismo ósseo (MURAMOTO et al., 2005). Por ser um tecido constituído por uma porção mineral e outra orgânica, o osso pode ser avaliado não só por métodos de imagem, que quantificam indiretamente esse conteúdo mineral, como também por métodos que envolvam ensaios mecânicos (LOUZADA et al., 2006). Nesta dissertação, optou-se pela densitometria óptica radiográfica como método de homogeneizar e diminuir a possibilidade de manter corpos de prova osteopênicos na amostra. Sendo assim, a análise biomecânica foi realizada preocupando-se apenas com a resistência ao ensaio de flexão em quatro pontos e com os efeitos dos tratamentos a que os corpos de prova foram submetidos, uma vez que a densidade mineral óssea já havia sido analisada previamente.

A densitometria óptica radiográfica se mostrou ferramenta simples, prática com valor acessível e foi utilizada como método de comparação entre os grupos GN e GCN, GA e GCA e entre GN e GA. Muramoto et al. (2005), mencionaram que a variável peso pode influenciar a densidade mineral óssea apresentando correlação positiva quando analisaram e estabeleceram valores de densidade em rádios de cães da raça Poodle por meio da densitometria óptica radiográfica. Os mesmos autores encontraram fraca correlação entre a idade e densidade mineral óssea. No presente estudo, os valores absolutos, referentes ao peso, foram maiores nos grupos GN e GCN, porém, não houve diferença significativa entre os grupos GA e GN. A média de idade também foi maior no grupo nitrogênio, havendo diferença estatisticamente significativa entre os mesmos grupos. Mesmo diante desses achados, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os valores de densitometria, durante a análise dos grupos GN e GCN, GA e GCA e entre GN e GA, discordando de Muramoto et al. (2005) e mostrando que houve homogeneidade entre as amostras com relação à densidade mineral óssea.

Os grupos GN e GCN (mesmo animal) apresentaram maiores médias de peso e idade apesar do estudo ser realizado de forma aleatória em que o sorteio do tratamento e do lado em que a técnica iria ser procedida era feito antes da coleta das amostras. Não houve, todavia, diferenças estatisticamente significativas quanto a essas variáveis.

Pesquisas semelhantes ao trabalho descrito nesta dissertação, realizaram comparação da resistência óssea por meio de testes biomecânicos de compressão e torção (KÖHLER et al., 1986; DUARTE; SCHAEFFER, 2000; YAMAMOTO et al., 2003). Na presente pesquisa, optou-se pela utilização do teste de flexão em quatro pontos, por se tratar de um osso longo e para tentar mimetizar a aplicação de forças na superfície cranial dos rádios, como na cirurgia de *limb-sparing*, em que o implante, em geral uma placa, é aplicado nessa região (LIPTAK et al., 2006). Outra razão para que fosse escolhido o ensaio de flexão é que as placas menos resistentes e por conseguinte mais exigidas em forças de arqueamento. Também essa força é mais predominante do que as de torção ou compressão, quando aplicadas no rádio canino. Além disso, o teste de quatro pontos foi escolhido porque a aplicação da força é distribuída de maneira uniforme entre os pontos de contato. Os pontos de falha do corpo de prova tendem a residir ao longo dessa região, porém, longe dos pontos de contato permitindo avaliação mais fidedigna (DRAPER; GOODSHIP, 2003).

Em última análise foram feitos os cálculos do momento de inércia nos corpos de prova após o ensaio destrutivo de flexão. Estes valores permitem compreender e mesmo transferir parcialmente os dados do ensaio, como a resistência real do corpo em qualquer força aplicada na forma de arqueamento do radio do cão, permitindo supor que em diferentes regiões de aplicação de força no radio a resistência final do osso será muito semelhante ao encontrado no estudo. Portanto a pesquisa ligada não somente à resistência da força máxima, mas também o estudo da área e geometria do corpo de prova se mostrou importante ao nosso projeto, pois o osteossarcomas pode afetar diferentes áreas do rádio do cão, principalmente sua região distal.

A utilização do programa computacional PMI, desenvolvido especialmente para essa pesquisa, foi fundamental para facilitar o cálculo do momento de inércia, uma vez que a amostra utilizada, por motivos éticos, não era composta de cães experimentais. Portanto, havia rádios de diferentes conformações dependendo do porte e da raça dos animais, o que dificultou a padronização do tipo de cálculo dessa variável, uma vez que nem todos os rádios, à secção transversa, apresentavam formato elíptico. Barbosa et al. (2010) e Reis et al. (2011), contudo, usaram o método do cálculo do momento de inércia para uma elipse oca visando avaliação biomecânica de fêmures e tibiotarsos de frango respectivamente. Tal método de

cálculo do momento de inércia foi possível pois esses autores utilizaram uma amostra homogênea, composta por frangos de corte, do mesmo lote, com peso e idade semelhantes, portanto, com conformação óssea semelhante, o que facilitou o cálculo dessa variável.

Foi realizada comparação da resistência, através do ensaio de flexão em quatro pontos, de segmentos de rádios caninos autoclavados a 121°C por 20 minutos e desvitalizados em nitrogênio líquido sob o protocolo de 20 min de imersão em nitrogênio líquido, 15 min à temperatura ambiente seguido de imersão em solução de NaCl a 0,9% também à temperatura ambiente, por mais 15 minutos. Singh et al. (2010), entretanto, realizaram análise histopatológica e biomecânica, por meio do teste de compressão, de segmentos ósseos submetidos aos métodos de esterilização autoclavagem, fervura, pasteurização e irradiação, com a finalidade de determinar qual deles era capaz de destruir as células tumorais sem comprometer as propriedades biomecânicas. Eles observaram que apesar de todos os métodos terem sido eficazes em relação à eliminação das células neoplásicas, as propriedades mecânicas foram prejudicadas e a diminuição da resistência dos corpos de prova foi diretamente proporcional ao aumento da temperatura.

A hipótese do presente trabalho era de que o processo de autoclavagem diminuiria a resistência dos segmentos de rádio caninos, porém não foi comprovada, sendo esta técnica adequada para preservação dos segmentos ósseos quanto ao aspecto biomecânico, como afirmaram Köhler et al. (1986). Entretanto, de acordo com Sigh et al. (2010), a capacidade osteoindutiva do autoenxerto é perdida durante o processo de autoclavagem e a capacidade osteocondutiva também é reduzida. Os mesmos autores mencionaram que o calor modifica as propriedades do colágeno presente no tecido ósseo, fazendo com que essa proteína sofra desnaturação à temperatura de 100°C e causando diminuição da resistência biomecânica, contudo, a estrutura do colágeno permanece inalterada até a temperatura de 60°C (SIGH et al., 2010).

Köhler et al. (1986) avaliaram as propriedades biomecânicas, de ossos longos de ratos autoclavados através do teste de torção. Eles utilizaram os seguintes protocolos de autoclavagem: 110°C por 225 min, 121°C por 20 min e 131°C por 2 min e observaram diminuição acentuada da resistência e rigidez nos ossos autoclavados a baixas temperaturas e por tempo prolongado. Além disso, foi observada diminuição do peso dos ossos, possivelmente devido à perda de água e

desnaturação do colágeno. A escolha do protocolo de autoclavagem foi baseada nos achados de Köhler et al. (1986) e nos regimes disponíveis na autoclave do Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET-FMVZ/USP.

Dohtsu et al. (2001) compararam ossos a fresco aos que passaram pelo processo de pasteurização, fervura ou congelamento em nitrogênio líquido, em ratos, e observaram que as amostras tratadas com nitrogênio foram semelhantes às de osso frescos em termos de potencial osteogênico. O congelamento foi realizado em três imersões em nitrogênio líquido de três minutos com intervalo de cinco minutos à temperatura ambiente. Além disso, concluíram que o tratamento a 65°C por 1 hora é comparado ao congelamento em nitrogênio em termos de potencial regenerativo para reimplantação simultânea. Corroborando com os autores, igualmente não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos GN e GCN quanto à resistência biomecânica, mostrando que a desvitalização em nitrogênio líquido não compromete essa propriedade.

Voggenreiter et al. (1994) submeteram tíbias de ratos aos tratamentos de congelamento a –70°C, radiação gama, autoclavagem a 134°C por 3 e 5 min e liofilização. Eles observaram os corpos de prova ao microscópio eletrônico e encontraram alterações na microestrutura das amostras autoclavadas e liofilizadas. Sendo que as últimas apresentaram microfraturas e a primeira, engrossamento das fibras da matriz quando a autoclavagem durou 3 min e desnaturação da matéria orgânica aos 5 min de autoclavagem. Essa pode ser a razão da redução da estabilidade biomecânica e perda da capacidade osteocondutora. Não foi realizada análise microscópica em nosso estudo, contudo, o aspecto macroscópico dos corpos de prova autoclavados evidenciava alteração em sua estrutura, ou seja, os mesmos apresentavam aspecto “ressecado”. Da mesma maneira, mesmo não existindo diferença estatística entre os deltas, o comportamento “visual” do corpo de prova ao ensaio de flexão denotava perda da flexibilidade/maior fragilidade em comparação ao grupo nitrogênio. Os segmentos ósseos do grupo GN sofriam acentuada curvatura, em sentido craniocaudal, antes da falha, enquanto que os do grupo GA, não sofriam esse tipo de deformação e respondiam à aplicação da carga “explodindo” e sofrendo fraturas cominutivas. Apesar desses resultados foram observadas, durante a comparação entre os grupos GN e GA diferença estatisticamente significativas, em relação às variáveis tensão-tração, tensão-compressão e tensão máxima, sendo os valores superiores para o GA, contrariando

a hipótese do estudo. Não foi possível estabelecer uma justificativa para tais resultados, sugerindo-se novos estudos com número amostral superior.

As vantagens da utilização de autoenxertos desvitalizados em nitrogênio líquido incluem baixo custo, simplicidade da técnica, manutenção das propriedades osteoindutivas e osteocondutivas (preservação de proteínas, fatores de crescimento e citocinas que diminuem reações imunológicas), tempo de tratamento reduzido, preservação da matriz cartilaginosa, perfeito encaixe ao osso receptor, preservação da resistência biomecânica, possibilidade de reutilização de tecidos moles como tendões e ligamentos, ação crioimunológica, além de não haver necessidade de precaução em relação a controle de temperatura (SAKAYAMA et al., 2006; RAHMAN et al., 2009; TANZAWA et al., 2009; TSUCHIYA et al., 2010). Não foram encontradas dificuldades durante a realização da técnica de desvitalização óssea em nitrogênio líquido e o protocolo utilizado foi semelhante ao empregado por Yamamoto et al. (2003), ou seja, 20 minutos em imersão em nitrogênio líquido, 15 minutos à temperatura ambiente e mais 15 minutos em imersão em solução fisiológica a temperatura ambiente. Yamamoto et al. (2003), contudo, utilizaram imersão em solução fisiológica a temperatura a 30°C. O emprego de solução fisiológica à temperatura ambiente, segundo os autores, previne a formação de microfraturas que foram encontradas quando os mesmos retiravam os corpos de prova do nitrogênio e colocavam diretamente na solução fisiológica a 30°C.

No mesmo trabalho, foram comparados fragmentos ósseos de metacarpianos bovinos desvitalizados em nitrogênio (protocolo anteriormente citado) ou autoclavados a 134°C por 15 min, por meio do teste de compressão. Após a realização dos testes biomecânicos, a amostras foram avaliadas ao microscópio eletrônico e foi observado que os ossos autoclavados apresentaram superfície irregular e desigual com pequenos orifícios. Em contraste, a superfície dos ossos tratados com nitrogênio foi lisa e com granulação fina. Durante o teste de compressão, os ossos tratados com nitrogênio apresentaram maior resistência em comparação aos autoclavados.

LIMITAÇÕES DO ESTUDO

10 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Como limitações do estudo foram citadas:

- Não foi avaliada a resistência dos corpos de prova à torção e a testes de fadiga (ensaios cíclicos).
- Os dados biomecânicos *in vitro* podem não refletir o comportamento *in vivo*.

CONCLUSÃO

11 CONCLUSÃO

A comparação biomecânica, por meio do ensaio de flexão em quatro pontos, de segmentos de rádios caninos submetidos à autoclavagem e à desvitalização em nitrogênio líquido, não demonstrou diferenças estatisticamente significativas. Portanto, concluiu-se que ambos os métodos podem ser utilizados para o tratamento de autoenxertos para a cirurgia de preservação do membro sem prejuízo quanto à resistência biomecânica.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ASADA, N.; TSUCHIYA, H.; KITAOKA, K.; MORI, Y.; TOMITA, K. Massive autoclaved allografts and autografts for limb salvage surgery: a 1-8 follow-up of 23 patients. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 68, n. 4, p. 392-395, 1997.

ATHANASIOU, K. A.; ZHU, C. F.; LANCTOT, D. R.; AGRAWAL, C. M.; WANG, X. Fundamentals of biomechanics in tissue engineering of bone. **Tissue Engineering**, v. 6, n. 4, p. 361-381, 2000.

BARBOSA, A. A.; MORAES, G. H. K.; TORRES, R. A.; REIS, D. T. C.; RODRIGUES, C.S.; MÜLLER, E.S. Avaliação da qualidade óssea mediante parâmetros morfométricos, bioquímicos e biomecânicos em frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 4, p. 772-778, 2010

BÖHM, P.;·SPRINGFELD R.;·SPRINGER H. Re-implantation of autoclaved bone segments in musculoskeletal tumor surgery. Clinical experience in 9 patients followed for 1.1–8.4 years and review of the literature. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 118, p. 57-65, 1998.

BOSTON, S. E.; DUERR, F.; BACON, N.; LARUE, S.; EHRHART, E. J.; WITHROW, S. Intraoperative radiation for limb sparing of the distal aspect of the radius without transcarpal plating in five dogs. **Veterinary Surgery,** v. 36, p. 314-323, 2007.

BURACCO, P.; MORELLO, E.; MARTANO, M.; VASCONI, M. E. Pasteurized tumoral autograft as a novel procedure for a limb sparing in the dog: a clinical report. **Veterinary Surgery**, v. 31, p. 525-532, 2002.

CAQUÍAS, D. F. I. **Desenvolvimento e avaliação biomecânica da resistência à flexão de um novo modelo de osteossíntese de fêmur:** pinos intramedulares bloqueados. 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

DALMOLIN, F.; PINTO FILHO, S. T. L.; CORTES, A. M.; BRUN, M. V.; CAUDURO, C. R.; SCHOSSLER, J. E. W. Biomecânica óssea e ensaios biomecânicos – fundamentos teóricos. **Ciência rural**, v. 43, n. 9, p. 1675-1682, 2013.

DERNELL, W. S.; EHRHART, N. P.; STRAW, R. C.; VAIL, D. M. Tumors of the skeletal system. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. (Ed.). **Small animal clinical oncology**. 4. ed. Philadelphia: Saunders, 2007. p. 540-582.

DOHTSU, T.; INOKUCHI, T.; HIRONAKA, R.; IKEDA, H.; NINOMIYA, H.; SEKINE, J. Experimental study on healing of bone implants treated by heating or freezing. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 6, p. 43-50, 2001.

DRAPER, E. C.; GOODSHIP, A. E. A novel technique for four-point bending of small bone samples with semi-automatic analysis. **Journal of Biomechanics**, v. 36, p. 1497-1502, 2003.

DUARTE, L. S.; SCHAEFFER, L. Comparação da resistência à compressão de ossos bovinos congelados e liofilizados. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 16, n. 2, p. 89-93, 2000.

ENDICOTT, M. Principles of treatment for osteosarcoma. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 18, n. 2, p.110-114, 2003.

GARTON, M. J.; ROBERTSON, E. M.; GILBERT, F. J.; GOMERSSAL, L.; REID, D. M. Can radiologist detect osteopenia on plain radiographs? **Clinical Radiology**, v. 49, n. 2, p. 118-122, 1994.

GARZOTTO, C.; BERG, J. Sistema musculoesquelético. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais.** Barueri: Manole, 2007. p. 2460-2474.

GASCH, E. G.; RIVIER, P.; BARDET, J. F. Free proximal cortical ulnar autograft for the treatment of distal radial osteosarcoma in a dog. **Canadian Veterinary Journal**, v. 54, p. 162-166, 2013.

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

HULSE, D.; HYMAN, B. Biomecânica e biologia das fraturas. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais.** Barueri: Manole, 2007. p.1785-1792.

JEON, D.;·KIM, M. S.;·CHO, W. H.; SONG, W. S.;·LEE, S. Reconstruction with pasteurized autograft for distal tibial tumor. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 128, p. 159-165, 2008.

KÖHLER, P.; KREICBERGS, A.; STRÖMBERG, L. Physical properties of autoclaved bone. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 57, p. 141-145, 1986.

KUNTZ, C.; ASSELIN, T. L.; DERNELL, W. S.; POWERS, B. E.; STRAW, R. C.; WITHROW, S. J. Limb salvage surgery for osteosarcoma of the proximal humerus: outcome in 17 dogs. **Veterinary Surgery**, v. 27, p. 417-422, 1998.

KUPCZIK, F. **Influência da ciprofloxacina na resistência do calo ósseo de fraturas padronizadas em fêmures de ratos**. 2008. 61 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2008.

LIPTAK, J. M.; DERNELL, W. S.; EHRHART, N.; LAFFERTY, M. H.; MONTEITH, G. J.; WITHROW, S. J. Cortical allograft and endoprosthesis for limb-sparing surgery in dogs with distal radial osteosarcoma: a prospective clinical comparison of two different limb-sparing techniques. **Veterinary Surgery**, v. 35, p. 518-533, 2006.

LIPTAK, J. M.; DERNELL, W. S.; EHRHART, N.; WITHROW, S. J.; SÉGUIN, B.; WALSH, P. J.; KUNTZ, C. A. Management options for canine appendicular osteosarcoma: curative-intent treatment. **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian**, v. 26, p. 186-197, 2004a

LIPTAK, J. M.; DERNELL, W. S.; LASCELLES, B. D. X.;LARUE, S. M.; JAMESON, V. J.; POWERS, B. E.; HUBER, D. J.; WITHROW, S. J. Intraoperative extracorporeal irradiation for limb sparing in 13 dogs. **Veterinary Surgery**, v. 33, p.446-456, 2004c.

LIPTAK, J. M.; DERNELL, W. S.; STRAW, R. C.; JAMESON, V. J.; LAFFERTY, M. H.; RIZZO, S. A.; WITHROW, S. J. Intercalary bone grafts for joint and limb preservation in 17 dogs with high-grade malignant tumors of the diaphysis. **Veterinary Surgery**, v. 33, p. 457-467, 2004b.

LIPTAK, J. M.; PLUHAR, G. E.; DERNELL, W. S.; WITHROW, S. J. Limb-sparing surgery in a dog with osteossarcoma of the proximal femur. **Veterinary Surgery**, v. 34, p. 71-77, 2005.

LIRANI, A. P. R. **Estudo comparativo dos efeitos do ultra-som e do laser de baixa intensidade no reparo ósseo de tíbia de rato**. 2004. 94 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

LOUZADA, M. J. Q. **Otimização da técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas de peças ósseas. Estudo "in vitro"**. 1994. 191 f. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica) – Faculdade de Engenharia Elétrica, UNICAMP, Campinas, 1994.

LOUZADA, M. J. Q.; BELANGERO, W. D.; MARTINS, L. E. B. Avaliação de parâmetros biomecânicos pela densitometria radiográfica. Estudo "in vitro" em osso cortical de tíbias de carneiros. **Revista brasileira de Biomecânica**, v. 7, n. 12, p. 33-38, 2006.

LOUZADA, M. J. Q.; PELÁ, C. A.; BELANGERO, W. D.; SANTOS-PINTO, R. Metodologia para avaliação de densidade em imagem radiográfica. **RBE- Caderno de Engenharia Biomédica**, v. 14, n. 2, p. 37-47, 1998.

MACDONALD, T. L.; SCHILLER, T. D. Limb-sparing surgery using tantalum metal endoprosthesis in a dog with osteosarcoma of the distal radius. **Canadian Veterinary Journal,** v. 51, p. 497-500, 2010.

MACIEL, R. R. B. T. **Propriedades mecânicas e densidade mineral óssea de ratas Wistar submetidas a programas de exercícios físicos em roda e piscina**. 2008. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2008.

MORELLO, E.; MARTANO, M.; BURACCO, P. Biology, diagnosis and treatment of canine apendicular ostesarcoma: similarities and differences with human osteossarcoma. **The Veterinary Journal**, v. 189, p. 268-277, 2010.

MORELLO, E.; VASCONI, E.; MARTANO, M.; PEIRONE, B.; BURACCO, P. Pasteurized tumoral autograft and adjuvant chemotherapy for the treatment of canine distal radial osteosarcoma: 13 cases. **Veterinary Surgery**, v. 32, p. 539-544, 2003.

MURAMOTO, C. **Estabelecimento de valores de densidade mineral óssea (DMO) das regiões metafisárias e diafisárias do rádio em cães da raça Poodle por meio da densitometria óptica radiográfica.** 2003. 125 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MURAMOTO, C.; STERMAN, F. A.; PINTO, A. C. B. F. Estabelecimento de valores de densidade mineral óssea (DMO) das regiões metafisária e diafisária do rádio de cães da raça Poodle por meio da densitometria óptica radiográfica. **Brazilian Journal of Research and Animal Science**, v. 42, n. 2, p. 89-97, 2005.

NISHIDA, H.; TSUCHIYA, H.; TOMITA, K. Re-implantation of tumour tissue treated by cryotreatment with liquid nitrogen induces anti-tumour activity against murine osteossarcoma. **Journal of Bone and Joint Surgery,** [British volume], v. 90-B, p. 1249-1255, 2008.

ÖZKAYA, N.; LEGER, D. Introdução à biomecânica: terminologia básica e conceitos. In: NORDIN, M.; FRANKEL, V. H. **Biomecânica básica do sistema musculoesquelético**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 1-85.

PENHA, V. T. B. B. **Efeitos do congelamento e descongelamento sucessivos nas propriedades dos ossos corticais**. 2004. 127 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

POGREL, M. A. The use of liquid nitrogen cryotherapy in the management of locally aggressive bone lesions. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 51, p. 269-273, 1993.

POOYA, H. A.; SÉGUIN, B.; MASON, D. R.; WALSH, P. J.; TAYLOR, K. T.; KASS, P. H.; STOVER, S. M. Biomechanical comparison of cortical radial graft versus ulnar transposition graft limb-sparing techniques for the distal radial site in dogs. **Veterinary Surgery**, v. 33, p.301-308, 2004.

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

REIS, D. T. C.; TORRES, R. A.; BARBOSA, A. A.; RODRIGUES, C. S.; MORAES, G. H. K. Efeito de linhagem e sexo nas características geométricas e biomecânicas de tíbias de frangos de corte. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 33, n. 1, p. 101-108, 2011.

ROVESTI, G. L.; BASCUCCI, M.; SCHIMDT, K.; MARCELLIN-LITTLE, D. J. Limb sparing using a double bone-transport technique for treatment of a distal tibial osteosarcoma in a dog. **Veterinary Surgery**, v. 31, p. 70-77, 2002.

SAKAYAMA, K.; KIDANI, T.; FUJIBUCHI, T.; KAMOGAWA, J.; YAMAMOTO, H.;·SHIBATA, T. Reconstruction surgery for patients with musculoskeletal tumor, using a pasteurized autogenous bone graft. **International Journal of Clinical Oncology,** v. 9, p. 167-173, 2004.

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

SÉGUIN, B.; WALSH, P. J.; MASON, D. R.; WISNER, E. R.; PARMENTER, J. L.; DERNELL, W. S. Use of an ipsilateral vascularized ulnar transposition autograft for limb-sparing surgery of the distal radius in dogs: an anatomic and clinical study**.** **Veterinary Surgery**, v. 32, p. 69-79, 2003.

SELIM, M. B. **Avaliação estrutural do osso terceiro metacarpiano equino frente à implantação do biopolímero à base de mamona**. 2013. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

SINGH, V. A.; NAGALINGAM, J.; SAAD, M.; PAILOOR, J. Which is the best method of sterilization of tumor bone for reimplantation? A biomechanical and histopathological study. **BioMedical Engineering OnLine**, v. 9, n. 48, p. 1-15, 2010.

STALLINGS, J. L.; LEWIS D. D.; WELCH, R. D.; SAMCHUKOV, M.; MARCELLIN-LITTLE, D. J. An introduction to distraction osteogenesis and the principles of the Ilizarov method. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 11, n. 2, p. 59-67, 1998.

TANZAWA, Y.; TSUCHIYA, H.; SHIRAI, T.; HAYASHI, K.; YO, Z.; TOMITA, K. Histological examination of frozen autograft treated by liquid nitrogen removed after implantation. **Journal of Orthopaedic Science**, v. 14, p. 761-768, 2009.

TSUCHIYA, H.; NISHIDA, H.; SRISAWAT, P.; SHIRAI, T.; HAYASHI, K.; TAKEUCHI, A.; YAMAMOTO, N.; TOMITA, K. Pedicle frozen autograft reconstruction in malignant bone tumors. **Journal of Orthopaedic Science**, v. 15, p. 340-349, 2010.

TSUCHIYA, H.; WAN, S. L.; SAKAYAMA, K.; YAMAMOTO, N.; NISHIDA, H.; TOMITA, K. Reconstruction using an autograft containing tumor treated by liquid nitrogen. **Journal of Bone and Joint Surgery,** [British volume], v. 87-B, p. 218-25, 2005.

VOGGENREITER, G.; ASCHERL, R.; BLÜMEL, G.; SCHMIT-NEUERBURG, K. P. Effects of preservation and sterilization on cortical bones grafts. A scanning electron microscopic study. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 113, p. 294-296, 1994.

YAMAMOTO, N.; TSUCHIYA, H.; NOJIMA, T.; SUMIYA, H.; TOMITA, K. Histological and radiological analysis of autoclaved bone 2 years after extirpation. **Journal of Orthopaedic Science**, v. 8, p. 16-19, 2003.

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

APÊNDICES

APÊNDICE A

Valores de todas as variáveis para cada ensaio realizado nos grupos autoclave (GA) e crupo controle autoclave (GCA).

ENSAIO	Força máxima (kgf)	Limite de resistência (kgf/mm2)	RIGIDEZ	ÁREA (mm2)	Hsup (mm)	Hinf (mm)	Hmax (mm)	Jx (mm4)	Jy (mm4)	Pico	Flecha (mm)	Momento (N.mm)	Tensão - tração (Mpa)	Tensão - compressão (Mpa)	Tensão máxima (Mpa)	Comprimento total do osso (cm)	Diâmetro CrCa (cm)	Diâmetro ML (cm)	Raça	Sexo	Idade (anos)	Peso (kg)
ENS 2 DIR AUT	113,70	102,34	68,67	47,25	3,48	3,94	3,94	183,92	461,10	113,70	7,53	1421,25	30,45	26,89	30,45	15,10	0,50	0,90	SRD	F	4,00	23,00
ENS 4 DIR AUT	168,90	152,03	24,63	112,50	6,02	6,92	6,92	1115,60	2152,84	168,90	5,59	2111,25	13,10	11,39	13,10	17,50	0,80	1,30	Labrador	M	4,00	40,00
ENS 5 ESQ AUT	149,10	134,20	41,24	81,06	5,30	4,47	5,30	594,07	1483,63	149,10	6,73	1863,75	14,02	16,63	16,63	16,40	1,00	1,75	SRD	M	4,00	31,00
ENS 8 DIR AUT	154,20	138,79	28,80	75,84	4,94	4,35	4,94	467,38	1046,60	154,20	8,56	1927,50	17,94	20,37	20,37	16,40	0,80	1,50	SRD	M	5,00	21,00
ENS 9 DIR AUT	91,20	82,90	22,79	51,53	4,28	3,93	4,28	254,54	475,13	91,20	5,37	1140,00	17,60	19,17	19,17	15,20	0,75	1,10	SRD	F	13,00	20,70
ENS 11 DIR AUT	222,60	200,36	54,81	90,27	5,97	5,27	5,97	1000,59	2392,77	222,60	9,00	2782,50	14,66	16,60	16,60	20,90	1,10	1,80	Pastor Alemão	M	1,30	40,00
ENS 14 ESQ AUT	70,50	63,46	18,59	58,65	4,70	4,25	4,70	407,85	924,77	70,50	4,33	881,25	9,18	10,16	10,16	16,50	0,90	1,50	SRD	M	5,00	22,00
ENS 18 ESQ AUT	119,40	107,47	32,90	60,39	4,53	3,68	4,53	349,88	807,25	119,40	3,98	1492,50	15,70	19,32	19,32	17,40	0,90	1,40	SRD	M	11,00	30,00
ENS 19 ESQ AUT	161,10	145,00	50,51	90,73	5,20	5,60	5,60	753,01	1762,13	161,10	6,06	2013,75	14,98	13,91	14,98	17,30	1,10	1,60	Pit Bull	M	13,00	30,00
ENS 20 ESQ AUT	161,40	145,27	50,64	68,86	5,15	4,73	5,15	579,45	1134,80	161,40	4,82	2017,50	16,47	17,93	17,93	19,50	1,00	1,70	Sheepdog	M	12,00	31,00

ENSAIO	Força máxima (kgf)	Limite de resistência (kgf/mm2)	RIGIDEZ	ÁREA (mm2)	Hsup (mm)	Hinf (mm)	Hmax (mm)	Jx (mm4)	Jy (mm4)	Pico	Flecha (mm)	Momento (N.mm)	Tensão - tração (Mpa)	Tensão - compressão (Mpa)	Tensão máxima (Mpa)	Comprimento total do osso (cm)	Diâmetro CrCa (cm)	Diâmetro ML (cm)	Raça	Sexo	Idade (anos)	Peso (kg)
ENS 2 ESQ CONT	82,80	74,53	25,51	58,01	3,99	3,83	3,99	247,13	614,86	113,70	7,53	1421,25	22,03	22,95	22,95	15,00	0,50	1,00	SRD	F	4,00	23,00
ENS 4 ESQ CONT	159,90	143,92	55,18	91,36	5,92	5,51	5,92	786,94	1506,52	168,90	5,59	2111,25	14,78	15,88	15,88	18,00	0,90	1,30	Labrador	M	4,00	40,00
ENS 5 DIR CONT	124,80	112,33	56,95	79,03	4,87	4,15	4,87	496,14	1540,78	124,80	5,76	1560,00	13,05	15,31	15,31	16,40	0,80	1,60	SRD	M	4,00	31,00
ENS 8 ESQ CONT	139,50	125,56	36,03	75,96	5,17	4,44	5,17	546,27	1089,17	139,50	4,98	1743,75	14,17	16,50	16,50	16,20	0,90	1,50	SRD	M	5,00	21,00
ENS 9 ESQ CONT	66,30	59,68	18,09	51,61	3,66	3,80	3,80	215,28	596,35	66,30	6,10	828,75	17,62	14,08	14,62	15,20	0,75	1,20	SRD	F	13,00	20,70
ENS 11 ESQ CONT	213,00	191,72	65,47	90,60	5,93	5,02	5,93	912,12	2212,70	213,00	4,72	2662,50	14,65	17,31	17,31	21,10	1,10	1,80	Pastor Alemão	M	1,30	40,00
ENS 14 DIR CONT	68,10	61,30	27,07	58,22	4,68	4,30	4,68	396,66	1058,15	68,10	4,73	851,25	9,23	10,04	10,04	16,30	0,90	1,50	SRD	M	5,00	22,00
ENS 18 DIR CONT	107,70	96,94	38,42	58,76	4,37	3,89	4,37	324,24	956,56	107,70	4,27	1346,25	16,15	18,14	18,14	17,40	0,80	1,40	SRD	M	11,00	30,00
ENS 19 DIR CONT	144,60	130,15	54,88	86,08	5,36	5,71	5,71	765,92	1633,63	144,60	4,26	1807,50	13,48	12,65	13,48	17,30	1,10	1,60	Pit Bull	M	13,00	30,00
ENS 20 DIR CONT	146,40	131,77	56,30	82,42	5,22	4,37	5,22	638,56	1732,14	146,40	4,74	1830,00	12,52	14,96	14,96	19,40	1,00	1,60	Sheepdog	M	12,00	31,00

Hmáx: altura maxima à secção transversa do corpo de prova

Hsup: altura superior

Hinf: altura inferior

Jx: deslocamento do baricentro em relação ao eixo x

Jy: deslocamento do baricentro em relação ao eixo y

APÊNDICE B

Valores de todas as variáveis para cada ensaio realizado nos grupos nitrogênio (GN) e crupo controle nitrogênio (GCN).

ENSAIO	Força máxima (kgf)	Limite de resistência (kgf/mm2)	RIGIDEZ	ÁREA (mm2)	Hsup (mm)	Hinf (mm)	Hmáx (mm)	Jx (mm4)	Jy (mm4)	Pico	Flecha (mm)	Momento (N.mm)	Tensão - tração (Mpa)	Tensão - compressão (Mpa)	Tensão máxima (Mpa)	Comprimento total do osso (cm)	Diâmetro CrCa (cm)	Diâmetro ML (cm)	Raça	Sexo	Idade (anos)	Peso (kg)
ENS 1 ESQ N2	198,00	178,22	31,98	155,43	6,26	7,47	7,47	2075,32	6428,24	198,00	5,02	2475,00	8,91	7,47	8,91	18,00	1,30	2,10	Rottweiler	M	12,00	48,00
ENS 3 DIR N2	148,20	133,39	25,21	107,78	6,40	6,67	6,67	1366,64	2185,67	148,20	5,41	1852,50	9,04	8,68	9,04	19,70	0,80	1,30	SRD	M	14,00	22,00
ENS 6 ESQ N2	60,60	54,55	20,62	47,66	4,52	3,57	4,52	255,41	579,50	60,60	6,07	757,50	10,59	13,41	13,41	12,40	0,80	1,20	Cocker	M	14,00	22,00
ENS 7 DIR N2	101,10	91,00	17,22	59,02	4,12	3,96	4,12	289,67	718,69	101,10	5,14	1263,75	17,28	17,97	17,97	17,20	0,80	1,35	SRD	M	10,00	25,00
ENS 10 DIR N2	176,70	159,05	59,94	98,48	6,10	6,70	6,70	1355,20	3755,38	176,70	4,29	2208,75	10,92	10,94	10,92	21,00	1,20	2,10	Rottweiler	M	11,00	32,00
ENS 12 DIR N2	128,10	115,30	47,47	87,23	5,35	4,95	5,35	633,63	1587,99	128,10	4,92	1601,25	12,51	13,52	13,52	20,00	1,00	1,60	Labrador	M	10,00	35,00
ENS 13 ESQ N2	174,30	156,89	68,21	114,82	6,13	7,02	7,02	1431,12	3116,57	174,30	5,65	2178,75	10,69	9,33	10,69	19,00	1,20	1,80	Rottweiler	M	8,00	47,00
ENS 15 DIR N2	70,20	63,19	38,83	59,98	5,23	4,10	5,23	474,88	1224,89	84,00	5,23	1050,00	9,07	11,56	11,56	18,60	0,90	1,60	SRD	M	10,00	30,00
ENS 16 ESQ N2	150,00	135,01	54,48	81,72	5,80	5,96	5,96	867,54	2107,12	150,00	5,35	1875,00	12,88	12,54	12,88	18,60	1,20	1,80	Rottweiler	F	11,00	40,00
ENS 17 ESQ N2	237,60	213,86	92,70	136,69	8,07	8,20	8,20	3073,83	6189,86	237,60	5,04	2970,00	7,92	7,80	7,92	19,60	1,50	2,20	Mastim Napolitano	F	10,00	40,00

ENSAIO	Força máxima (kgf)	Limite de resistência (kgf/mm2)	RIGIDEZ	ÁREA (mm2)	Hsup (mm)	Hinf (mm)	Hmáx (mm)	Jx (mm4)	Jy (mm4)	Pico	Flecha (mm)	Momento (N.mm)	Tensão - tração (Mpa)	Tensão - compressão (Mpa)	Tensão máxima (Mpa)	Comprimento total do osso (cm)	Diâmetro CrCa (cm)	Diâmetro ML (cm)	Raça	Sexo	Idade (anos)	Peso (kg)
ENS 1 DIR CONT	162,00	145,81	47,10	138,74	5,92	7,13	7,13	1748,28	5021,51	162,00	6,14	2025,00	8,26	6,86	8,26	18,00	1,30	2,10	Rottweiler	M	12,00	48,00
ENS 3 ESQ CONT	127,20	114,49	37,27	104,46	6,09	6,41	6,41	1179,63	1819,90	127,00	4,57	1587,50	8,63	8,20	8,63	19,70	1,00	1,20	SRD	M	14,00	22,00
ENS 6 DIR CONT	67,80	61,03	38,78	44,07	4,25	3,39	4,25	217,35	510,71	67,80	4,40	847,50	13,22	16,57	16,57	12,30	0,80	1,20	Cocker	M	14,00	22,00
ENS 7 ESQ CONT	99,90	89,90	30,44	60,52	4,36	4,07	4,36	323,74	695,87	99,90	5,25	1248,75	15,70	16,82	16,82	17,50	0,90	1,20	SRD	M	10,00	25,00
ENS 10 ESQ CONT	159,00	143,11	57,33	103,48	5,88	6,12	6,12	1168,10	4233,26	159,00	4,40	1987,50	10,41	10,00	10,41	21,20	1,20	2,10	Rottweiler	M	11,00	32,00
ENS 12 ESQ CONT	141,90	127,72	48,84	73,82	5,08	4,78	5,08	521,83	1313,02	141,90	4,58	1773,75	16,25	17,27	17,27	19,60	1,00	1,60	Labrador	M	10,00	35,00
ENS 13 DIR CONT	196,20	176,60	66,10	118,94	6,19	7,02	7,02	1483,61	3230,10	196,20	6,66	2452,50	11,60	10,23	11,60	19,00	1,20	1,80	Rottweiler	M	8,00	47,00
ENS 15 ESQ CONT	84,00	75,61	29,02	55,96	5,36	4,18	5,36	465,99	1103,61	70,20	4,76	877,50	7,87	10,09	10,09	18,60	0,90	1,60	SRD	M	10,00	30,00
ENS 16 DIR CONT	128,10	115,30	51,12	83,55	5,76	5,98	5,98	866,14	1989,26	128,10	5,72	1601,25	11,06	10,65	11,06	18,60	1,20	1,80	Rottweiler	F	11,00	40,00
ENS 17 DIR CONT	241,50	217,37	102,77	136,61	8,38	8,54	8,54	3172,94	6036,69	241,50	5,49	3018,75	8,12	7,97	8,12	19,60	1,60	2,20	Mastim Napolitano	F	10,00	40,00

Hmáx: altura maxima à secção transversa do corpo de prova

Hsup: altura superior

Hinf: altura inferior

Jx: deslocamento do baricentro em relação ao eixo x

Jy: deslocamento do baricentro em relação ao eixo