

MATHEUS LEMOS AZI

**Estudo da regeneração óssea guiada com espaçador de polimetilmetacrilato e antibiótico
em falhas ósseas previamente infectadas no coelho**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de doutor em ciências médicas
pelo departamento de Medicina, Biomecânica e
Reabilitação do Aparelho Locomotor.

Área de concentração: Ortopedia e Traumatologia

Orientador: Prof. Dr. Cleber Antonio Jansen Paccola

Ribeirão Preto

2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRONICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Azi, Matheus Lemos

Estudo da regeneração óssea guiada com espaçador de polimetilmetacrilato e antibiótico em falhas ósseas previamente infectadas no coelho. Ribeirão Preto, 2008.

154 f.: il. Color; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ USP. Área de concentração: Ortopedia e Traumatologia.

Orientador: Cleber Antonio Jansen Paccola

1. Falha óssea 2. Infecção 3. Periosteo

FOLHA DE APROVAÇÃO

Matheus Lemos Azi

Estudo da regeneração óssea guiada com
espaçador de polimetilmetacrilato e
antibiótico em falhas ósseas previamente
infectadas no coelho.

Tese apresentada a Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de doutor em ciências médicas
pelo departamento de Medicina, Biomecânica e
Reabilitação do Aparelho Locomotor.
Área de concentração: Ortopedia e Traumatologia
Orientador: Prof. Dr. Cleber Antonio Jansen Paccola

Aprovada em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Vitae via virtus.

A virtude é o caminho da vida.

Ao **Prof. Cleber Paccola** por ter acreditado no meu potencial, e por seu exemplo de caráter e dedicação que marcou a minha formação pessoal e profissional.

Ao **Prof. Mauricio Kfuri** que muito me ajudou a superar os percalços desta trilha. Que este agradecimento faça a justiça que a burocracia não permitiu.

Cui puer assuescit, maior dimittere nescit.

Aquilo a que o menino se acostuma, não consegue abandonar quando cresce.

Aos meus pais, **Mauro** e **Carolina**, que sempre acreditaram em mim. Mostraram-me o caminho e não tiveram medo de me deixar segui-lo. Obrigado.

“E desde então, sou porque tu és

E desde então, és, sou e somos...

E por amor

Serei... Serás...Seremos...”

Pablo Neruda

A **Liana**, minha esposa, por estar ao meu lado, mesmo após residências, teses e plantões.

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino. ”

Leonardo da Vinci

Ao **Prof. José Batista Volpon**, do Departamento de Medicina, Biomecânica e Reabilitação do Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto por me despertar o interesse pela pesquisa e por seu trabalho à frente do Laboratório de Bioengenharia.

Ao **Prof. Roberto Martinez** do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pelo auxílio no planejamento deste estudo e por ter permitido o uso do laboratório de Microbiologia do HÇ-FMRP-USP.

Ao **Prof. Luiz Antonio Salata** do Departamento de Cirurgia, Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto pelo auxílio com a realização dos estudos de histologia e imunofluorescência.

Ao **Prof. José Barbieri Neto** do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pelo auxílio com a análise histológica.

Ao **Prof. Helton L. A. Defino**, Coordenador da Comissão de Pós-graduação do Departamento de Medicina, Biomecânica e Reabilitação do Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Ao **Prof. Erich Schneider** do AO Research Institute por suas colaborações na elaboração deste projeto.

Ao **Prof. Geoff Richards** do AO Research Institute, pelas suas observações acerca deste estudo.

Ao **Prof. Plauto Christopher Aranha Watanabe** do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto pelo auxílio com os estudos de radiologia.

A **Profa Ângela Delete Belluci** do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pelo uso do Setor de radiologia do HC-FMRP.

A toda a equipe do laboratório de Bioengenharia da FMRP-USP, em especial aos técnicos de laboratório **Francisco Carlos Mazzocato, Luis Henrique A. Pereira**, a técnica administrativa **Maria Terezinha de Moraes** e o cientista de computação **Reginaldo Trevilato Silva**.

A toda a equipe do Laboratório de Microbiologia do HC-FMRP, em especial a **Maria Helena Borges Malta**, a **Adriana Targa Bernardes**, a **Josélia Fátima Solano** e a **Marcelle Cristina Jorgeto de Oliveira** pelo auxílio nas técnicas de microbiologia.

Ao **Otávio** da oficina de Precisão do Campus de Ribeirão Preto da USP pelo auxílio inestimável no desenvolvimento dos equipamentos utilizados neste estudo.

A **Auristela de Mello Martins** do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pelo auxílio no preparo das lâminas.

Ao **Sebastião Carlos Bianco** do Laboratório de Histologia do Departamento de Cirurgia, Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto pelo auxílio no preparo das lâminas.

A **Maria Jose Leite da Silva** bioquímica responsável pelo laboratório de toxicologia do HC-FMRP.

Ao **Tarcísio José Rodrigues Junior**, técnico de radiologia do Departamento de Morfologia, estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto.

Ao **Hermes** do laboratório de Cirurgia experimental do Departamento de Cirurgia e anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

A **FAPESP**, Fundação de Amparo a pesquisa do Estado de São Paulo que financiou este estudo. (Projeto **05/02885-3**).

Arbeit macht frei

(O trabalho liberta)

RESUMO

AZI, M. L. Estudo da regeneração óssea guiada com espaçador de polimetilmetacrilato e antibiótico em falhas ósseas previamente infectadas no coelho. 2008, 151f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

O tratamento da falha óssea diafisária associada à infecção é um dos mais importantes desafios terapêutico da atualidade. No intuito de avaliar os efeitos do uso de um espaçador de PMMA com gentamicina sobre a regeneração de falhas ósseas pelo perióstio, foi conduzido este estudo experimental, prospectivo e randomizado. O modelo utilizado para a realização do experimento foi a falha óssea de 15 mm na ulna de coelhos, sendo o estudo conduzido em duas etapas: na primeira foram utilizadas falhas sem infecção, e na segunda foi produzida a infecção utilizando um inóculo de 5×10^8 *S. aureus*, visando avaliar a regeneração do defeito após a infecção. Foram formados 5 grupos levando-se em consideração a presença de infecção, o uso do espaçador de PMMA com antibiótico e a preservação do perióstio no defeito ósseo. Grupo 1, falha óssea tratada com espaçador de PMMA com antibiótico; grupo 2, falha óssea sem preenchimento; grupo 3, falha óssea infectada tratada com espaçador de PMMA com antibiótico; grupo 4, falha osteoperiosteal infectada tratada com espaçador de PMMA com antibiótico; grupo 5, falha óssea infectada sem preenchimento. As falhas ósseas sem infecção apresentaram regeneração significativamente maior do que as falhas ósseas infectadas. O uso do espaçador de polimetilmetacrilato com gentamicina produziu resultados melhores na regeneração óssea porém estes não foram significativos. Concluiu-se que uso do espaçador de PMMA como preenchedor temporário de falhas ósseas é um método efetivo de tratamento, e que além de promover um controle efetivo do processo infeccioso, tem um impacto positivo sobre a regeneração espontânea de falhas ósseas pelo perióstio.

Palavras-chave: Falha óssea, Infecção, Perióstio.

ABSTRACT

AZI, M. L. Treatment of large diaphyseal bone defects in rabbits with the use of PMMA with gentamicin. 2008, 151f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

The treatment of diaphyseal bone defects associated with infection is one of the most important therapeutic challenges nowadays. To evaluate the effects of the use of a PMMA spacer with gentamicin on the regeneration of bone defects by the periosteum, this prospective, randomized experimental study was conducted. The model used was a 15 mm defect in the rabbit ulna. The study was conducted in two stages: first without infection, and second with infection of the defect using an inoculum of 5×10^8 *S. aureus*, to assess the regeneration of the defect after infection. Five groups were formed taking into consideration the presence of infection, the use of spacers of PMMA with antibiotic and preservation of the periosteum. Group 1, defect filled with PMMA with gentamicin spacer; group 2, defect left empty ; group 3, infected defect filled with PMMA with gentamicin spacer; Group 4, infected osteoperiosteal defect filled with PMMA with gentamicin spacer; group 5, infected defect left empty. The bone defects without infection showed significantly higher bone regeneration than the infected bone defects. The use of the spacer improves the regeneration results but these were not significant. It was concluded that use of the spacer of PMMA as a temporary filling of the defects is an effective method of treatment, promoting a more effective control of the infectious process, and has a positive impact on the spontaneous regeneration of bone failures.

Keywords: Segmental bone defect, Infection, Periosteum.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Alojamento dos animais no Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.....	35
Figura 2 – Método SNOSE para randomização. A - Papel carbono, cartão de alocação e capa de alumínio. B - Envelope lacrado, onde foi escrito o número do animal.....	37
Figura 3 – Diagrama esquemático do seguimento no estudo.....	38
Figura 4 – Modelo esquemático do molde e do espaçador.....	40
Figura 5 – Aspecto final do molde para os espaçadores. A - Vista superior. B - Vista inferior...	40
Figura 6 – Preparo do espaçador. Da esquerda para a direita: A - Cuba e colher estéreis, monômero, polímero e gentamicina em pó. B - Mistura sendo colocada no molde....	41
Figura 7 – Espaçadores de PMMA com gentamicina.....	41
Figura 8 – Fórmula para cálculo da área de superfície do espaçador.....	41
Figura 9 – Amostras do estudo de eluição congeladas para armazenamento.....	42
Figura 10 – A - Abbott TDx fluorescence polarization analyzer. B - Carrossel de amostras do TDx onde são depositadas as amostras para o teste. C - Componentes do carrossel de amostras.....	43
Figura 11 – A - Complexo antígeno-anticorpo-traçador. B - Traçador ligado ao anticorpo tem alto peso molecular e baixa rotação, causando pouco desvio da luz. C - Traçador livre com baixo peso molecular apresenta alta rotação, causando desvio da luz polarizada.....	44
Figura 12 – A – Cepa de <i>S. aureus</i> armazenada em tripticase. B – Aspecto da placa de cultura no momento de preparar a solução.....	46
Figura 13 – A – Turbidímetro. B – Escala de Mc Farland. C – Câmara de Neubauer.....	46
Figura 14 – A - Inóculo pronto para uso. B - Crescimento das colônias no meio CLED.....	47
Figura 15 – Anatomia da face dorsal do antebraço do coelho.....	49

Figura 16 – A - Medida intra-operatória da falha óssea. B - Aspecto da falha óssea após a ressecção do fragmento. Notar a ressecção do periósteo do rádio em sua face ulnar que foi realizada para os animais do grupo 4.....	50
Figura 17 – A- Sutura do plano profundo. B - Sutura da pele.....	51
Figura 18 – A - Fragmento ósseo recolocado no leito da ferida. B - Canal medular do fragmento sendo inoculado.....	52
Figura 19 – A - Fragmento ósseo e swab coletados no desbridamento. B - Espaçador de PMMA + ATB colocado na falha óssea após o desbridamento.....	54
Figura 20 – Microscan Walkaway TM 40/96.....	55
Figura 21 – Aspecto da ferida após a retirada do espaçador (animal do grupo 3), onde se observa o leito da ferida formado por membrana intensamente vascularizada, com consistência firme ao toque	56
Figura 22 – A - Posição do animal para a radiografia. B - Vista ampliada mostrando a posição do antebraço para o exame.....	58
Figura 23 – A - Demonstração da posição para radiografia. B e C - Penetrômetro, vista lateral e superior. D - Vista ampliada do posicionamento da peça para a radiografia.....	59
Figura 24 – Porcentagem de preenchimento do defeito ósseo.....	62
Figura 25 – O modo tons de cinza transforma a imagem em escala de cinza, fornecendo apenas um canal de cor passível de ser mensurado.....	63
Figura 26 – Imagem em tons de cinza, com as guias do programa, facilitando a medida do tamanho da falha e a utilização da ferramenta régua.....	64
Figura 27 – Retângulo de 15 x 5 mm colocado na região central da falha para a medida do percentual de preenchimento e a ferramenta histograma medindo a densidade do cinza na área selecionada.....	64
Figura 28 – Posição do corte na ulna para a histologia.....	66
Figura 29 – A e B - Peça mais radiografia mostrando a localização e os limites do bloco delimitado para a histologia. C - Aspecto final de uma lamina histológica cortada do modo descrito.....	66

Figura 30 – Animal excluído devido a recidiva da infecção. A - Aspecto clínico com 12 semanas. B - Peça dissecada com 12 semanas mostrando calo ósseo abundante no local da falha. C - Radiografia mostrando destruição intensa da arquitetura óssea. D - Histologia mostrando fusão radio-ulnar associada a intenso processo inflamatório acometendo principalmente o radio (Hematoxilina-Eosina, aumento 2 vezes).....	73
Figura 31 – Animal excluído devido a infecção, mostrando intenso processo inflamatório, associado a neoformação óssea.....	73
Figura 32 – Resultado final da regeneração óssea nos grupos sem infecção.....	83
Figura 33 – Regeneração de partes moles em animal do grupo 4. A - No momento do desbridamento. B - Com 4 semanas antes da retirada do espaçador. C - Com 12 semanas ao final do estudo regeneração completa das partes moles e não-regeneração óssea.....	84
Figura 34 – Radiografia de animal do grupo 3. A – Segmento infectado antes do desbridamento. B – Radiografia com o espaçador no lugar. C – Radiografia com 8 semanas. D – Radiografia final 12 semanas.....	85
Figura 35 – Radiografia de animal do grupo 4. A – Antes do desbridamento. B – Espaçador colocado na falha óssea. C – Radiografia com 8 semanas. D – Radiografia final com 12 semanas.....	85
Figura 36 – Radiografia de animal do grupo 5. A – Falha após o desbridamento. B – Radiografia com 4 semanas. C – Radiografia com 8 semanas. D – Radiografia final com 12 semanas.....	86
Figura 37 – Resultado final de alguns dos animais dos grupos com infecção. Nota-se que apenas em alguns animais do grupo 3 pode ser vista a imagem do periósteo calcificado sobre a falha.....	86
Figura 38 – Radiografia de animal do grupo 1. A - Espaçador no lugar preenchendo a falha óssea. B - Radiografia com 4 semanas após a retirada do espaçador mostrando ossificação do periósteo sobre o espaçador. C - Radiografia com 12 semanas.....	87
Figura 39 – Formação óssea em grande quantidade pela borda livre do periósteo na margem da falha com duas semanas de evolução, em animal do grupo 1 que morreu durante a anestesia. Coloração Hematoxilina-eosina, 2,5x.....	92
Figura 40 – Deposição óssea pela periósteo. Coloração Levailaczko, 20x.....	92

Figura 41 – Falha óssea vazia após o desbridamento em animal do grupo 1 que morreu durante a anestesia. Hematoxilina-eosina, 2,5x.....	93
Figura 42 – Recanalização do canal medular com 12 semanas em falha óssea que não regenerou.....	93
Figura 43 – Deposição óssea pelo perióstio sobre a falha e reconstituição completa da diáfise ulnar em contato com o radio. Grupo 3, Coloração Levailacvzko, 2,5x.....	93
Figura 44 – Falha óssea completamente preenchida pela regeneração óssea. Grupo 1, Coloração Levailacvzko, 2,5x.....	94
Figura 45 – Fluorescência mostrando que a maior parte da deposição óssea se deu no primeiro mês. A esquerda coloração com calceína administrada com 4 semanas do experimento. A direita oxitetraciclina administrada as 12 semanas. Calceína e oxitetraciclina, aumento 2,5x.....	94
Figura 46 – Fluorescência mostrando a diferença entre a deposição ossea com 4 semanas em verde e 8 semanas em vermelho. Calceína e Alisarina, aumento 2,5x.....	95
Figura 47 – Fluorescência mostrando estreitamento da região central da falha com 8 semanas em animal que não utilizou espaçador. Alisarina, aumento 2,5x.....	95
Figura 48 – Fluorescência com 4 semanas demonstrando a diferença entre o osso organizado formado por aposição abaixo do perióstio (esquerda) e o osso desorganizado, formado por ossificação endocondral (direita). Calceína, aumento 20x.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição dos grupos do estudo.....	37
Tabela 2 – Antibiograma da cepa de <i>S. aureus</i> selecionada para o estudo.....	45
Tabela 3 – Parâmetros estudados na avaliação radiográfica no decorrer do estudo.....	60
Tabela 4 – Classificação de Calhoun e Mader (1997), para avaliação radiográfica de infecção óssea.....	60
Tabela 5 – Classificação de Ambrose et al (2004), para regeneração óssea no antebraço de coelhos.....	61
Tabela 6 – Classificação de Lane e Sandhu (1987), para avaliação radiográfica da regeneração óssea no antebraço de coelhos.....	61
Tabela 7 – Classificação histopatológica de Ambrose et al. (2004).....	67
Tabela 8 – Classificação histopatológica de Lane e Sandhu (1987).....	67
Tabela 9 – Número de animais e tamanho da falha óssea no estudo.....	72
Tabela 10 – Avaliação clínica da infecção induzida	74
Tabela 11 – Tamanho da falha medida no intra-operatório. Teste t pareado.....	75
Tabela 12 – Perfil de sensibilidade a antibióticos das bactérias recuperadas durante o desbridamento da infecção. Em vermelho as diferenças em relação a cepa original. R - Resistente, S - Sensível, I - Indeterminado, Blac - Não testado.....	77
Tabela 13 – Avaliação do tamanho da falha óssea no decorrer do estudo.....	79
Tabela 14 – Percentual de preenchimento da falha e resultados da avaliação pelos critérios de Lane e Sandhu (1987), Ambrose et al. (2004), e análise da densidade do regenerado.....	81
Tabela 15 – Avaliação da ação da infecção e do uso do espaçador de PMMA com antibiótico sobre a regeneração óssea.....	84

Tabela 16 – Avaliação da ação do periósteo na regeneração da falha óssea infectada com espaçador de PMMA com antibiótico.....	88
---	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Gentamicina eluída x tempo (média + desvio padrão).....	71
Gráfico 2 – Quantidade estimada de gentamicina liberada pelo espaçador por dia (escala logarítmica) em relação a MIC da bactéria utilizada no estudo.....	71
Gráfico 3 – Tamanho da falha inicial e após desbridamento.....	75
Gráfico 4 – Peso dos animais durante o estudo em gramas.....	76
Gráfico 5 – Avaliação radiográfica da infecção óssea durante o seguimento.....	78
Gráfico 6 – Tamanho da falha óssea em mm no decorrer do estudo.....	80
Gráfico 7 – Percentual de preenchimento da falha durante o estudo.....	81
Gráfico 8 – Resultado da avaliação radiográfica pela classificação de Lane e Sandhu, (1987), média + desvio padrão.....	82
Gráfico 9 – Resultado da avaliação radiográfica pela classificação de Ambrose et al. (2004), média + desvio padrão.....	82
Gráfico 10 –Análise da interação infecção x espaçador levando-se em consideração o critério percentual de preenchimento da falha com 12 semanas.....	88
Gráfico 11 –Resultado dos critérios avaliados pela classificação de Lane e Sandhu (1987).....	90
Gráfico 12 –Resultado final da avaliação histológica pela classificação de Lane e Sandhu (1987).....	90
Gráfico 13 –Resultado dos critérios avaliados pela classificação de Ambrose et al (2004).....	91
Gráfico 14 - Resultado da avaliação histológica pela classificação de Ambrose et al. (2004).....	91

LISTA DE SIGLAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

ANOVA - Analysis of Variance (Análise de variância)

BMP - Bone Morphogenetic Protein (Proteína morfogenética óssea)

CLED - Cistina Lactose Eletrólito Deficiente

DNA - deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico)

EUA - Estados Unidos da América

EMIT - Enzyme Multiplied Immunoassay Technique (Imunoensaio enzimático de multiplicação)

FAD-AS - Polianidro P

FGF - Fibroblast Growth Factor (Fator de crescimento de fibroblastos)

FMRP - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

FPIA - Fluorescence Polarization Immunoassay (Imunoensaio de fluorescência por polarização)

HC-FMRP - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

HIV - Human Immunodeficiency Virus (Vírus da imunodeficiência humana)

IL-1 - Interleukin 1 (Interleucina 1)

IL-6 - Interleukin 6 (Interleucina 6)

MIC - Minimal Inhibitory Concentration (Concentração inibitória mínima)

MSCs - Mesenchymal Stem Cells (Células-tronco mesenquimais)

NI - Ágar-Naito

PDGF - Platelet derived growth factor (Fator de crescimento derivado das plaquetas)

PFGE - pulsed-field electrophoresis (Eletroforese em campo pulsante)

PGA - Poliglicolideo

PLA - Polilactideo

PMMA - Polimetilmetacrilato

PCR – Polimerase chain reaction (Reação em cadeia da polimerase)

RIA – Radioimmunoassay (Radioimunoensaio)

SLFIA - Substrate-labeled Fluorescent Immunoassay (Imunofluorescencia com substrato fluorescente)

TGF- β - Transforming growth factor beta (Fator de transformação beta)

TIFF - Tagged Image File Format

TNF- α - Tumor Necrosis Factor-alpha (Fator de necrose tumoral alfa)

USP - Universidade de São Paulo

VEGF - Vascular Endothelial Growth Factor (Fator de crescimento endotelial)

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE SIGLAS

1. INTRODUÇÃO	página 1
1.1 – Falha óssea	página 2
1.2 – Etiologia da falha óssea	página 3
1.3 – Falha óssea associada à infecção	página 4
1.4 – Tratamento da falha óssea	página 5
1.5 – Tratamento da infecção	página 10
1.6 – Tratamento da falha óssea infectada	página 19
1.7 – Membrana biológica associada ao uso de PMMA	página 21
1.8 – O perióstio na regeneração óssea	página 22
1.9 – Regeneração da falha óssea pelo tubo periosteal	página 27

2. HIPÓTESE	página 29
3. OBJETIVOS DA PESQUISA	página 31
3.1 – Objetivo primário	página 32
3.2 – Objetivos secundários	página 32
4. MATERIAL E MÉTODOS	página 33
4.1 – Desenho do experimento	página 34
4.2 – Animais de experimentação	página 34
4.2.1 – Amostra	página 34
4.2.2 – Aprovação comitê de ética	página 35
4.2.3 – Modelo experimental	página 35
4.3 – Grupos do experimento	página 36
4.4 – Cronologia do seguimento	página 37
4.5 – Espaçador de PMMA com antibiótico	página 38
4.5.1 – Preparo dos espaçadores de PMMA com antibiótico	página 38
4.5.2 – Estudo de eluição do espaçador	página 41
4.6 – Preparo da suspensão de <i>Staphylococcus aureus</i>	página 45
4.7 – Descrição das cirurgias	página 47
4.7.1 – Cirurgia inicial	página 47
4.7.2 – Falha óssea sem infecção	página 50
4.7.3 – Falha óssea com infecção	página 51
4.8 – Seguimento pós-operatório	página 52
4.8.1 – Seguimento dos animais sem infecção	página 52

4.8.2 – Seguimento dos animais com infecção	página 53
4.8.2.1 – Desbridamento da infecção	página 53
4.8.2.2 – Antibioticoterapia sistêmica	página 54
4.8.2.3 – Identificação bacteriana	página 54
4.8.3 – Retirada do espaçador de PMMA com antibiótico	página 55
4.8.4 – Administração de fluorocromos	página 56
4.9 – Avaliação radiográfica	página 57
4.9.1 – Estudo radiográfico com os animais vivos	página 57
4.9.2 – Estudo radiográfico das peças	página 58
4.9.3 – Avaliação das imagens radiográficas	página 60
4.9.3.1 – Avaliação visual	página 60
4.9.3.2 – Avaliação digital	página 62
4.10 – Estudo anatomopatológico	página 65
4.10.1 – Preparo das lâminas para histologia.....	página 65
4.10.2 – Avaliação histológica	página 66
4.11 – Análise estatística	página 68
5. RESULTADOS	página 69
5.1 – Teste de eluição do espaçador	página 70
5.2 – Avaliação clínica	página 72
5.2.1 – Avaliação clínica da infecção da falha óssea	página 74
5.2.2 – Peso dos animais durante o seguimento.	página 75
5.3 – Avaliação microbiológica da infecção	página 76

5.4 – Avaliação radiográfica	página 78
5.4.1 – Infecção óssea.	página 78
5.4.2 – Regeneração da falha óssea.	página 79
5.4.3 – Infecção na regeneração da falha óssea.	página 83
5.4.4 – Espaçador de PMMA na regeneração da falha óssea.	página 87
5.4.5 – Ação do periósteo sobre a regeneração da falha óssea	página 88
5.5 – Avaliação histológica	página 89
6. DISCUSSÃO	página 96
6.1 – Falha óssea experimental	página 97
6.2 – Infecção experimental	página 99
6.3 – Tratamento da falha ossea infectada	página 103
6.4 – Avaliação do controle da infecção	página 109
6.5 – Avaliação da regeneração óssea	página 112
6.6 – Relevância experimental	página 117
6.7 – Relevância clínica	página 117
7. CONCLUSÃO	página 119
8. REFERÊNCIAS	página 121
9. APÊNDICE	página 136
9.1 – Tabelas de cálculos estatísticos	página 137
9.2 – Certificado comissão de ética	página 152
9.2 – Laudo de análise da gentamicina em pó	página 153
9.2 – Laudo de análise da solução salina tamponada com fosfato	página 154

1. Introdução

1.1 Falha óssea

A perda de um segmento dos ossos longos denominada de defeito ósseo segmentar, perda óssea segmentar ou falha óssea, permanece até hoje como um dos mais desafiadores problemas da cirurgia ortopédica. Múltiplos procedimentos freqüentemente são necessários para recuperar a função e alguns destes podem envolver considerável morbidade (MASQUELET, 2003; MOORE et al., 2004; RASCHKE et al., 2001). Ao contrário do reparo nos tecidos moles, onde a reconstrução com retalhos musculares pediculados ou revascularizados tem sido aceita por mais de 20 anos, a reconstrução óssea permanece uma questão controversa. Defeitos limitados são usualmente tratados por auto-enxertia óssea, embora a maioria dos autores não advogue este procedimento quando o defeito excede 4 a 6 cm (FINKEMEIER, 2002; GOLDSTROHM; MEARS; SWARTZ, 1984; JOHNSON; URIST; FINERMAN, 1988; MASQUELET et al., 2000; MASQUELET, 2003; PELISSIER et al., 2002).

Estima-se que no ano de 2003, somente nos Estados Unidos, foram realizados 1 milhão e 300 mil procedimentos para enxertia óssea, dos quais aproximadamente 250 mil foram para o tratamento da falha óssea (SEEHERMAN; WOZNEY; LI, 2002; TRANSPLANT FOUNDATION, INC., 2006). No Japão, entre 1985 e 1989, foram 87.994 procedimentos, dos quais 94,3% foram de enxertos autólogos (IWAMOTO et al., 1997). Além das técnicas tradicionais como a enxertia, o transporte ósseo e o encurtamento do membro, estratégias alternativas têm sido numerosas e variadas e incluem o uso de aloenxerto, matriz óssea desmineralizada, biocerâmicas, fatores de crescimento e mais recentemente a terapia genética (MOORE et al., 2004). Devido à importância do problema, a procura por alternativas tem sido foco de intensa pesquisa. Uma busca no MEDLINE com os

termos “bone substitute” mostra que nos últimos 10 anos mais de 3.300 artigos foram catalogados nesta base de dados.

1.2 Etiologia da falha óssea

Lesões traumáticas são as principais responsáveis pelas falhas ósseas. Em geral estão associadas a graves lesões das partes moles, comprometendo a resistência à infecção e a capacidade de regeneração. O avanço nas técnicas de reconstrução tem permitido o salvamento de membros antes considerados perdidos, porém a preservação da extremidade traz consigo problemas de partes moles e infecção (JOHNSON; URIST; FINERMAN, 1988; MAURER; DILLIN, 1987). As perdas ósseas pós-traumáticas podem ser divididas em duas categorias: as agudas, nas quais o defeito ósseo é decorrente do trauma inicial, e as crônicas, nas quais o defeito geralmente resulta do desbridamento cirúrgico de um processo infeccioso ou pseudartrose (GOLDSTROHM; MEARS; SWARTZ, 1984).

A osteomielite hematogênica ainda é em muitas partes do mundo uma doença destrutiva e incapacitante. A infecção pode se estender por todo o osso e com o desbridamento da infecção e a remoção do sequestro, acaba resultando um grande defeito ósseo. Antes da era dos antibióticos a sequestrectomia extensa e, muitas vezes, a diafisectomia eram realizadas como medidas salvadoras, e apesar das formas graves da doença serem mais comuns nos países em desenvolvimento podem ser vistas de forma esporádica em qualquer parte do mundo (DAOUD; SAIGHI-BOUAOUINA, 1989; FOWLES et al., 1979; GRIFFITHS, 1968; NICHOLS, 1904; PHEMISTER, 1915;).

As mudanças ocorridas no tratamento dos tumores ósseos promovidas pela quimioterapia adjuvante, também trouxeram um grande desafio para o cirurgião ortopédico.

Além do aumento da sobrevida, a preservação da extremidade é uma meta cada vez mais tangível, sem levar ao comprometimento nos resultados de cura da neoplasia. Porém, essa nova realidade vem acompanhada do difícil problema da reconstrução óssea (BURCHARDT, 1987; ENNEKING; EADY; BURCHARDT, 1980; ENNEKING; SPANIER; GOODMAN, 1980). Causas menos usuais de falhas ósseas têm sido as doenças congênitas. A não-união da tíbia, considerada a mais freqüentemente das não-uniões congênitas, pode ser complicada pela presença de infecção e perda óssea (PALEY et al., 1989).

1.3 Falha óssea associada à infecção

A perda óssea segmentar por si só já se constitui em um problema de difícil solução, porém a sua associação à infecção, ocorre com freqüência. Nas fraturas expostas do tipo III de Gustilo, que são aquelas mais propensas a apresentarem falhas ósseas, os índices de infecção variam de 13,7 a 41% (OSTERMANN; HENRY; SELIGSON, 1993). Nas fraturas do tipo IIIB esta taxa pode chegar a 52% (GUSTILO; MENDOZA; WILLIAMS, 1984). Nas falhas resultantes de fraturas fechadas, a infecção geralmente surge como complicação do tratamento cirúrgico e Goldstrohm, Mears e Swartz (1984), avaliaram o tratamento de falhas ósseas pós-traumáticas em 39 pacientes, estando a infecção da extremidade presente em algum momento do tratamento em 95% dos casos.

Se nas falhas pós-traumáticas a infecção é freqüente, nas perdas ósseas resultantes da osteomielite hematogênica aguda ou crônica a infecção está na própria gênese do problema, estando sempre presente desde o início do tratamento. Obter o controle da infecção e a reconstrução óssea continua a ser um formidável problema terapêutico nestes pacientes (DAOUD; SAIGHI-BOUAQUINA, 1989). O controle do processo infeccioso em geral

envolve múltiplas cirurgias, acompanhadas de desbridamentos extensos e do uso prolongado de antibióticos. A recrudescência do processo infeccioso é considerada a maior ameaça isolada para o sucesso em cada estágio da reconstrução. Além disto, ela impõe restrições à utilização de determinados implantes metálicos, da mesma forma que a utilização de enxerto ósseo ou outros materiais de preenchimento da falha (MAURER; DILLIN, 1987).

1.4 Tratamento da falha óssea

Para seleção da terapêutica adequada deve-se levar em consideração inúmeros fatores, entretanto alguns como o tamanho da falha, a presença de infecção ativa, a condição das partes moles, o encurtamento do membro e as particularidades do segmento acometido, são essenciais para que a escolha do método possa levar aos melhores resultados. O tratamento ideal da falha óssea deve apresentar propriedades de osteogênese, osteoindução e osteocondução, associado a baixo custo e baixa morbidade, sendo a enxertia óssea autóloga o método que mais facilmente preenche estes requisitos (FINKEMEIER, 2002; LANE; SANDHU, 1987).

Excetuando-se o sangue, o osso é o tecido mais freqüentemente transplantado, sendo a enxertia óssea o procedimento ortopédico mais comumente realizado (LANE; SANDHU, 1987). Desde o primeiro relato do uso de osso como enxerto pelo cirurgião holandês Job Van Meek'ren em 1668, até o pioneirismo de Macewen na sua aplicação clínica em 1881, o interesse pelo método vem crescendo, apesar da biologia e da fisiologia dos eventos cruciais envolvidos na incorporação do enxerto permanecerem apenas parcialmente conhecidas (FRIEDLAENDER, 1987; LANE; SANDHU, 1987).

O enxerto ósseo autólogo cortical ou esponjoso obtido da crista ilíaca ainda é a linha de base com a qual todos os outros métodos são julgados. Apresenta propriedades osteogênicas, osteoindutoras e osteocondutoras, podendo ser disponibilizado de várias formas: cortical vascularizado, cortical não vascularizado, esponjoso e enxerto da medula óssea. Ele não suscita resposta imunológica e é facilmente incorporado na área receptora (FINKEMEIER, 2002).

O enxerto esponjoso autólogo é facilmente revascularizado, porém, só apresenta resistência similar a do osso cortical após 6 a 12 meses de implantação. É uma excelente alternativa para o preenchimento de defeitos contidos, cavidades e para estimular a consolidação. Os enxertos corticais não vascularizados apresentam boa resistência inicial, contudo tornam-se mais fracos nas primeiras seis semanas, e só entre 6 a 12 meses é que vão apresentar a mesma resistência do osso normal. Pelo fato de apenas os osteoblastos e as células do endóstio na superfície do enxerto sobreviverem ao transplante, sua função é osteocondutora, fornecendo suporte para o crescimento dos vasos e das células precursoras dos osteoblastos e osteoclastos. Tem sido levantada a hipótese de que existe também um componente osteoindutor envolvido, durante a fase de reabsorção do enxerto, porém esta teoria carece de mais evidências (FINKEMEIER, 2002).

Enxertos corticais vascularizados são integrados rapidamente e a sua remodelação é similar a do osso normal. Apesar deste benefício inicial, não dispensa a fixação interna e a restrição da carga, pois necessita de um longo período para sofrer integração e hipertrofia, adaptando-se à função na região transplantada (FINKEMEIER, 2002).

Células osteogênicas da medula óssea são outra importante fonte de tecido autólogo e produzem um enxerto com potencial osteogênico e osteoindutor, que pode ser facilmente obtido por aspiração da crista ilíaca. O aspirado pode ser centrifugado para maximizar o

potencial osteogênico. Um inconveniente é a tendência do material a se dispersar na falha, e uma para isso tem sido a sua incorporação do centrifugado a um carreador (FINKEMEIER, 2002; PALEY et al., 1986).

Apesar de ser considerado o enxerto de escolha, o enxerto autólogo apresenta desvantagens. A quantidade de osso é limitada, principalmente na criança e, apesar de haver renovação com o tempo, geralmente esta é insuficiente para suprir as necessidades nas grandes reconstruções. Fornece pouca estabilidade sendo freqüente a necessidade de fixação interna ou externa, e a retirada do enxerto tem sido associada a complicações menores (infecção superficial, dor e parestesia) em 20,6% dos casos e complicações maiores (infecção profunda, grandes hematomas, re-operação e dor por mais de seis meses) em 8,6% dos casos (SUMMERS; EISENSTEIN, 1989; YOUNGER; CHAPMAN, 1989).

O enxerto homólogo apresenta soluções para muitos dos problemas dos auto-enxertos. Não está associado à morbidade do sítio doador e o seu estoque é virtualmente ilimitado, podendo ser preparado em uma grande variedade de formas e tipos. Apesar disso seu uso tem sido limitado, representando menos de 2,5% dos enxertos realizados (IWAMOTO et al., 1997). O homoenxerto esponjoso ou cortical morcelizado tem apenas propriedades osteocondutoras e pode apresentar alguma resistência à compressão. É normalmente disponível congelado ou liofilizado e está associado a baixo risco de transmissão de doenças.

O homoenxerto cortical é normalmente utilizado para a reconstrução de grandes falhas, e pode estar disponível para a substituição de todo o osso ou parte deste. Este enxerto tem a capacidade de prover alguma estabilidade estrutural, porém necessita de fixação interna rígida e proteção da extremidade durante a remodelação (ENNEKING; EADY; BURCHARDT, 1980; FINKEMEIER, 2002). Pode ser acondicionado congelado ou liofilizado; o osso liofilizado pode ser friável e pouco resistente, já o congelamento retém as

propriedades mecânicas, porém existe o risco de transmissão de doenças, havendo relatos de transmissão do HIV associada ao uso de homoenxerto congelado não-processado (FINKEMEIER, 2002; SCHRATT et al., 1996).

Quanto à sua incorporação os homoenxertos são diferentes do receptor no locus do complexo maior de histocompatibilidade e esta é uma questão ainda não resolvida. Parece razoável que quanto maior a disparidade genética entre o doador e o receptor, mais substancial é o impacto sobre a incorporação (FRIEDLAENDER, 1987). Da mesma forma, por causa da baixa tolerância do hospedeiro os enxertos heterólogos são no geral altamente ineficazes e pouco utilizados (BURCHARDT, 1987; HEIPLE et al., 1967; LANE; SANDHU, 1987).

A matriz óssea desmineralizada age como material osteocondutor e possivelmente osteoindutor. Não tem rigidez estrutural, porém é um ótimo material para o preenchimento de cavidades. Apresenta rápida revascularização e pode agir como carreador para outras substâncias como medula óssea ou fatores de crescimento. Sua atividade biológica é devida à ação de suas proteínas e aos fatores de crescimento presentes na matriz extracelular (FINKEMEIER, 2002), e é considerada um excelente substituto para defeitos contidos (cavidades e cistos), tendo sido usada também em não-união e falhas agudas resultantes de fraturas. Apresenta os melhores resultados quando associada a fatores osteogênicos e osteoindutores, e por ser um material alogênico apresenta potencial para transmitir HIV (EINHORN et al., 1984; FINKEMEIER, 2002; LANE; SANDHU, 1987).

Os compostos cerâmicos como o fosfato de cálcio, o fosfato tricálcico, a hidroxiapatita e as combinações de cálcio com colágeno ou sulfato são considerados materiais osteocondutores. Apresentam baixa resistência mecânica e são disponibilizados em diferentes apresentações. Os compostos cerâmicos não induzem reação de corpo estranho sendo bem

tolerados pelo hospedeiro, mas são contra-indicados na presença de osteomielite. Concorrem pelas mesmas indicações da matriz desmineralizada e também apresentam melhores resultados quando associados à medula óssea autóloga (FINKEMEIER, 2002; HAK, 2007; LANE; SANDHU, 1987).

Outras estratégias têm sido o uso de fatores de crescimento ou proteínas osteogênicas, e a terapia genética regional com células produtoras de BMP-2 (MOORE et al., 2004; FRIEDLANDER et al., 2001). Estes métodos de tratamento também necessitam de carreadores, tendo sido usado para tal materiais inorgânicos (compostos cerâmicos), polímeros naturais (colágeno, fibrina, quitosana, alginato, hialuronatos, polissacarídeos vegetais, entre outros), polímeros sintéticos (polilactídeo, poliglicolídeo e seus copolímeros) além da associação destes carreadores (SEEHERMAN; WOZNEY; LI, 2002).

Em geral os métodos de preenchimento são indicados para falhas menores que 4 a 6cm e que apresentam estabilidade local, ou quando esta é produzida por meio de fixação interna ou externa (FINKEMEIER, 2002; GOLDSTROHM; MEARS; SWARTZ, 1984; JOHNSON; URIST; FINERMAN, 1988; MASQUELET et al., 2000; MASQUELET, 2003; PELISSIER et al., 2002). Para os defeitos maiores as opções utilizadas atualmente são o transplante ósseo vascularizado e o transporte progressivo de um segmento pelo princípio de Ilizarov (CATTANEO; CATAGNI; JOHNSON, 1992; CIERNY III; ZORN, 1994; MASQUELET, 2003).

O uso da fibula vascularizada como enxerto é um procedimento com resultados superiores à transferência não vascularizada, porém é tecnicamente exigente e além da necessidade de equipe especializada para sua realização, carrega consigo a morbidade da área doadora. Para se alcançar a estabilidade do enxerto transportado é preciso fazer uso de fixação interna ou externa (AGIZA, 1981; DECOSTER et al., 2004).

O transporte ósseo pode ser realizado por meio de vários equipamentos, sendo o mais utilizado o aparelho de Ilizarov. Apresenta como principal vantagem em relação aos outros métodos a possibilidade de promover o alongamento, caso a falha tenha levado ao encurtamento do membro. Por outro lado, é tratamento dependente da colaboração do paciente. Apresenta as complicações inerentes à fixação externa, como a infecção de pinos e as aderências musculares, com perda do arco de movimento das articulações adjacentes ao segmento acometido (MAY et al., 1989).

1.5 Tratamento da infecção

O tratamento da infecção óssea é um grande dilema terapêutico, além disso as recorrências são comuns reduzindo o índice de sucesso (STENGEL et al., 2001). A estratégia utilizada é uma combinação de cirurgia associada ao uso de antibióticos. A cirurgia inclui o desbridamento agressivo de todo o osso desvitalizado, assim como das partes moles envolvidas. Associa-se a isso a remoção dos implantes ortopédicos e a cobertura com retalhos musculares permitindo a melhora da vascularização no local. Outros objetivos desejáveis são obter estabilidade e evitar o espaço morto na ferida que leva ao acúmulo de secreções (LAZZARINI; MADER; CALHOUN, 2004; MADER; LANDON; CALHOUN, 1993; STENGEL et al., 2001; PATZAKIS et al., 1993; KLEMM, 1983).

Os antibióticos são administrados para o controle da infecção e uma grande variedade está disponível para uso, não havendo um consenso quanto ao melhor método de tratamento (LAZZARINI; MADER; CALHOUN, 2004; MADER; LANDON; CALHOUN, 1993; STENGEL et al., 2001). O controle da infecção se dá em 78% dos pacientes no primeiro ano do tratamento e a erradicação da doença é alcançada em 77% dos casos. Complicações

menores relacionadas ao uso dos antibióticos estão presentes em 19,2% dos pacientes, e alguns apresentam reações mais intensas necessitando fazer a troca do medicamento (STENGEL et al., 2001). A penetração dos agentes antimicrobianos no osso depende de suas características farmacológicas e pode ser dramaticamente alterada pelas condições locais de vascularização, cobertura dos tecidos moles e presença de implantes. O aumento das doses do antibiótico para superar estas dificuldades pode levar a toxicidade em órgãos não acometidos (KLEMM, 1983).

Se a bactéria está isolada no osso avascular não é possível alcançar concentrações terapêuticas por via sistêmica, além disso quando aderida ao osso ou a biomateriais ela se torna menos ativa e recoberta por um glicocálice polimérico extracelular que a protege contra antibióticos, opsonização e fagocitose (NELSON, 2004). Para eliminar microorganismos cobertos por biofilme o antibiótico precisa alcançar concentrações 10 a 100 vezes superiores as usuais, tornando muitas vezes o tratamento das bactérias sésseis com antibióticos sistêmicos impossível (GRISTINA; COSTERTON, 1985; NELSON, 2004).

Um dos principais avanços no tratamento da osteomielite foi o uso de antibióticos locais. Este método permite alcançar altas concentrações do antibiótico na ferida, com baixos níveis séricos e conseqüentemente com baixa toxicidade sistêmica. Na cirurgia tradicional as feridas eram deixadas abertas para evitar a formação de abscesso e prevenir a sepse. Willenegger (1970), refinou o tratamento através do método de irrigação-aspiração de anti-séptico local para a osteomielite. Apesar de ser considerado um método aberto, a ferida era fechada sobre drenos facilitando os cuidados e diminuindo a internação.

Antibióticos locais como a sulfanilamida eram utilizados como adjuvantes no tratamento de fraturas expostas desde a segunda guerra mundial, porém para Klemm (1993), o início da era atual dos antibióticos locais no tratamento da infecção óssea, teve origem com a

prática de adicionar antibióticos na solução dos sistemas de irrigação-aspiração. No tratamento moderno com antibiótico local este é liberado no hematoma e secreções da ferida, e altas concentrações podem ser obtidas apenas através do fechamento primário. Por isso esta forma de tratamento é incompatível com o uso de irrigação aspiração ou do tratamento aberto das feridas (KLEMM, 1993).

Em 1969 Buchholz et al. (1981), começaram a adicionar antibiótico ao cimento ósseo nas artroplastias totais do quadril com fins profiláticos. Iniciaram em 1969 adicionando 500 mg de gentamicina ao cimento, em 1970 aumentaram a dose para 1 g, em 1971 passaram a utilizar 2 g e em 1972 3 g de gentamicina em 40 g de Palacos[®]. Relataram que doses tão altas quanto 6 g foram adicionadas sem evidências de alterações nos resultados clínicos. Após experimentarem diversos antibióticos com diferentes concentrações escolheram a combinação de gentamicina com Palacos[®] como padrão e em 1981 já haviam realizado mais de 10.000 artroplastias com esta mistura para profilaxia da infecção. Simultaneamente passaram a utilizar o método no tratamento da infecção após artroplastias, com taxas de sucesso que variavam de 77% na primeira revisão a 90% após a segunda revisão (BUCHHOLZ et al., 1981; BUCHHOLZ; ELSON, 1984). Carlsson, Josefsson e Lindberg (1978), validaram estes resultados obtendo taxas de sucesso semelhantes na revisão de próteses infectadas, utilizando 500 mg de gentamicina no cimento associado a antibiótico sistêmico.

Em 1973 Voorhoeve e Stoehr (VOORHOEVE; STOEHR, 1973 apud KLEMM, 1993)¹ em Duisburg e Klemm em Frankfurt, separadamente iniciaram o uso de um tampão sólido de polimetilmetacrilato (PMMA) com gentamicina para preencher as extremidades da falha geradas após o desbridamento radical da osteomielite. Este método não foi efetivo, primeiro porque a massa de cimento empurrava a infecção para os planos teciduais onde a

¹ VOORHOEVE, A.; STOEHR, C. Ergebnisse bei der behandlung der chronisch-eitrigen osteomyelitis mit einem palacos-gentamicin-gemisch. Muench. Med. Wschr., v.115, p. 924. 1973.

concentração do antibiótico era baixa, e segundo porque o tampão impedia a drenagem da infecção (KLEMM, 1993).

Klemm (1993), desenvolveu então o conceito das pérolas de gentamicina que eram inseridas na cavidade após o desbridamento. As pérolas inicialmente eram colocadas soltas, porém causavam problemas na remoção, por isso passaram a ser fixadas a um fio de aço, facilitando a sua extração. Em 1976 as cadeias de pérolas de gentamicina passaram a ser comercializadas com o nome de Septopal[®]. As vantagens atribuídas a este método são o fechamento primário da ferida, que facilita o cuidado e não restringe o paciente ao leito como no caso da irrigação, a diminuição do risco de infecção por bactérias Gram negativas associada ao uso de drenos e a diminuição no uso de antibióticos sistêmicos por longos períodos (KLEMM, 1993).

Diversos materiais têm sido pesquisados como agentes carreadores para antibióticos, apesar disso o PMMA além de ser o pioneiro é sem dúvida o material mais amplamente usado para esta função (HENDRIKS et al., 2004; NELSON, 2004; ZALAVRAS; PATZAKIS; HOLTOM, 2004). O polimetilmetacrilato é um polímero de alta densidade resultado da mistura formada por um polímero e um monômero. Quando o antibiótico é adicionado, este fica incorporado ao cimento, e muitos fatores estão envolvidos na sua liberação. Propriedades do cimento como a sua composição e a quantidade de monômero na mistura, interagem com fatores ambientais como temperatura, umidade e pressão afetando as características físicas. O tipo de cimento ósseo, o tipo de antibiótico adicionado, a concentração do antibiótico, a área de superfície do cimento, a superfície do cimento (porosidade), a troca de fluidos no local e o meio ambiente da ferida, agem em conjunto para determinar a quantidade de antibiótico liberada (HAAS; BRAUER; DICKSON, 1975; SEELEY et al., 2004).

A forma dada ao cimento tem grande influência e a eluição máxima é obtida através do uso de numerosas pequenas pérolas com aspecto alongado para fornecer maior área de superfície (SEELEY et al., 2004; WROBLEWSKI, 1977). Uma característica curiosa e pouco entendida da associação do PMMA com o antibiótico é a variação que ocorre entre marcas diferentes de cimento. Por exemplo, o Palacos[®] libera a gentamicina por um período mais longo que o CMW[®]. A clindamicina e a cefalotina têm melhores características no Simplex[®] do que a gentamicina, metecilina ou a tetraciclina (TRIPPEL, 1986).

O antibiótico é liberado através da superfície do cimento ósseo, dos poros e de lacunas e rachaduras. A difusão passiva através da superfície e da matriz também pode estar envolvida. Estas controvérsias advêm do fato de não existir um método padrão para avaliar a difusão do antibiótico no PMMA e os numerosos fatores envolvidos neste processo (SEELEY et al., 2004; ZALAVRAS; PATZAKIS; HOLTOM, 2004). A liberação do antibiótico pode ser qualificada como bimodal, sendo que nas primeiras horas é rapidamente dispersado, presumidamente por dissolução na superfície exposta do cimento e após este período ocorre uma liberação bem mais lenta que se dá pela difusão na massa do cimento. Neste padrão bifásico típico primeiro ocorre um pico, sendo a eluição máxima nas primeiras 24 horas, seguido por um longo período de liberação de baixas doses que pode durar de dias a meses, e traços do antibiótico podem ser encontrados após cinco anos de implantação (HENDRIKS et al., 2004; SCHURMAN et al., 1978; ZALAVRAS; PATZAKIS; HOLTOM, 2004).

O antibiótico a ser adicionado deve ser disponível em pó, pois a solução aquosa tem incorporação limitada. A adição de qualquer quantidade de antibiótico altera as propriedades mecânicas do cimento e doses acima de 0,5 g de gentamicina em pó introduzem mudanças significativas (BUCHHOLZ et al., 1981; BUCHHOLZ; ELSON; HEINERT, 1984; MORAN; GREENWALD; MATEJCZYK, 1979). A gentamicina líquida na dose de 480 mg diminui a resistência à compressão em 49% e à tensão em 46% (SELDES et al., 2005). O agente deve

ser estável a altas temperaturas, pois a massa de cimento pode alcançar 107 °C durante a polimerização (LEESON; STEVEN, 1993). O antibiótico também deve ser ativo contra os agentes envolvidos na infecção e apresentar baixo risco de reações alérgicas (ZALAVRAS; PATZAKIS; HOLTOM, 2004).

A vancomicina e os aminoglicosídeos são os antibióticos que melhor se aproximam destas características. Possuem amplo espectro de ação, além disso têm excelente solubilidade em água, são termoestáveis, possuem baixo potencial alergênico e baixo custo. A gentamicina é um antibiótico aminoglicosídeo de ocorrência natural produzido por um actinomiceto, a *Micromonospora purpurea* que ao longo da história tem sido considerado como o antibiótico padrão para a adição ao PMMA (HENDRIKS et al., 2004; SELDES et al., 2005; WELTON, 1984). Foi descoberta em 1963 e na clínica é empregada na forma de sulfato de gentamicina, sendo bastante estável podendo inclusive ser autoclavada por curtos períodos.

A gentamicina interfere na síntese protéica bacteriana porque se fixa ao ribossomo da célula, em particular a subunidade 30S, desta forma é considerada um antibiótico bactericida. Apesar de muito ser conhecido sobre sua capacidade em inibir a síntese protéica não existe ainda uma explicação óbvia para o seu efeito rapidamente letal nas bactérias. A ação bactericida é concentração-dependente e um efeito pós-antibiótico persiste mesmo após os níveis estarem abaixo da concentração inibitória mínima (**MIC**) (HENDRIKS et al., 2004; WELTON, 1984). Possui atividade contra Gram-positivos e Gram-negativos, e em infecções complexas como a osteomielite freqüentemente é a escolha para associação com outro antibiótico (WELTON, 1984). É estimado que com a administração parenteral nas doses terapêuticas são alcançados níveis de 1 a 4 mcg/ml nos tecidos, e se a bactéria tem uma MIC superior a 4 mcg/ml é considerada resistente. A gentamicina penetra rapidamente no tecido ósseo com o pico ocorrendo em torno de 20 minutos após a administração venosa, sendo sua concentração similar no osso esponjoso e cortical (WIGGINS et al., 1967).

Na artroplastia do quadril com PMMA associado a gentamicina, os picos séricos ocorrem logo após a implantação variando de 1 a 3 mcg/ml, sua duração é curta e os níveis caem para menos de 1 mcg/ml após seis horas, para geralmente tornarem-se indetectáveis entre uma e três semanas. Concentrações da ordem de 100 a 300 mcg/ml podem ser detectadas nas secreções da ferida, e a presença do antibiótico pode ser notada por meses após a implantação (WAHLING et al., 1984).

Walenkamp, Vree e van Rens (1986), estudaram os efeitos do uso do Septopal em humanos e o consideraram seguro o uso em quantidades tão altas quanto 360 pérolas de uma vez. *In vitro* a gentamicina em doses superiores a 100 mcg/ml tem ação deletéria sobre células semelhantes a osteoblastos, sugerindo que a administração local em doses muito elevadas poderia prejudicar a osteogênese. No entanto, não existem dados acerca da capacidade de recuperação celular quando cessada esta exposição (ISEFUKU; JOYNER; SIMPSON, 2003).

Os aminoglicosídeos como a gentamicina apresentam menor atividade em condições de anaerobiose, acidose ou hipercapnia, e fatores locais como o Ph, a presença de material purulento e a diminuição do fluxo sangüíneo podem levar a uma menor atividade do antibiótico (MADER; LANDON; CALHOUN, 1993; WELTON, 1984). Apesar disso o uso local da gentamicina no tratamento da infecção óssea é um método efetivo e apresenta resultados consistentes.

A utilização do cimento com antibiótico no tratamento da infecção óssea levou a uma redução no tempo de internação, nos custos e na incidência de recidiva, quando comparado com o uso de irrigação-aspiração (ASCHE, 1978 apud KLEMM, 1993)². Klemm (1993), relatou uma taxa de recorrência de apenas 9,6% em 405 casos tratados com a implantação temporária de pérolas de gentamicina. Nelson et al. (1993), compararam o uso de cimento

² ASCHE, G. Spuelsaugdrainage oder gentamicin-PMMA kugeln in der therapie infizierter osteosynthesen – Eine retrospektive vergleichende analyse. Unfallheilkunde, Berlin, n. 81, v. 6, p. 463-468, jun. 1978.

com antibiótico associado a antibiótico sistêmico por cinco dias versus antibiótico sistêmico por seis semanas no tratamento da infecção em próteses de quadril e joelho. A revisão foi realizada seis semanas após e houve uma menor taxa de re-infecção com o uso de antibiótico local (15% versus 30%). Patzakis et al. (1993), avaliaram 35 pacientes com falhas ósseas infectadas com tamanho médio de 6 cm, todos tratados com enxerto ósseo. Doze destes pacientes foram tratados com septopal[®] associado a antibiótico por cinco dias e o restante com antibiótico venoso por seis semanas e oral até o 3º mês. Todas as falhas consolidaram, o tempo médio para a incorporação do enxerto foi de seis meses e nenhuma recidiva da infecção ocorreu no grupo do antibiótico local. Calhoun et al. (1993), avaliaram o tratamento da pseudartrose infectada e obtiveram controle da infecção em 89,3% com o uso de perolas de gentamicina associado a antibiótico por cinco dias em relação a 83,3% com o uso de antibiótico por seis semanas.

Ostermann, Henry e Seligson (1993), avaliaram o uso de antibiótico sistêmico associado a pérolas de gentamicina no tratamento de fraturas expostas e concluíram que houve uma diminuição significativa na incidência de infecção da ferida e de osteomielite crônica. O cimento com antibiótico também tem sido utilizado no preparo para enxertia óssea em falhas infectadas, não havendo recorrência da infecção (CHRISTIAN; BOSSE; ROBB, 1989; MASQUELET et al., 2000; MASQUELET 2003; PATZAKIS et al., 1993).

Existem problemas relacionados ao uso da associação de PMMA com antibiótico, pois inicialmente grandes quantidades são liberadas, porém com o tempo gradualmente caem para níveis sub-terapêuticos o que pode estimular o desenvolvimento de cepas resistentes (MCLAREN, 2004). A bio-atividade dos antibióticos diminui gradativamente. Este fato não ocorre com os aminoglicosídeos, porém é importante com as cefalosporinas. Se o paciente desenvolver hipersensibilidade ao antibiótico a remoção pode ser difícil. O PMMA tem demonstrado diminuir a habilidade dos leucócitos polimorfonucleares em fagocitar bactérias e

além disso existe a necessidade da realização de um segundo procedimento cirúrgico para a remoção (MC LAREN, 2004; VADAUX et al., 1985).

O PMMA na ferida favorece a adesão bacteriana, e estas infecções associadas a implantes se caracterizam por um alto poder de infecção com inóculos pequenos, reposta pobre a antibióticos, disseminação limitada para os tecidos e cura espontânea após a remoção do implante. Outra característica é o crescimento extensivo das microcolônias bacterianas altamente aderentes ao implante e freqüentemente embebidas em uma espessa matriz de polissacarídeos ou glicoproteínas (VAUDAUX et al., 1985). Neut et al. 2001 com o uso de culturas estendidas encontrou colonização em 90% das pérolas de gentamicina retiradas de feridas infectadas após duas semanas de uso.

Para evitar as dificuldades associadas ao uso do PMMA materiais alternativos têm sido avaliados. Estes materiais podem ser divididos em três grandes grupos: proteínas, enxertos ósseos e polímeros sintéticos (MCLAREN, 2004; NELSON, 2004).

Os materiais protéicos são derivados de tecidos biológicos, sendo os mais utilizados o colágeno fibrilar tipo 1 (bovino ou porcino), esponja de colágeno liofilizada, gelatina, fibrinogênio humano, trombina, albumina e o coágulo autólogo. Deste grupo a esponja de colágeno é a que tem maior suporte na literatura, porém a eluição do antibiótico tende a ser rápida sendo efetiva por apenas 48 horas (MCLAREN, 2004).

Os enxertos ósseos e substitutos incluem o sulfato de cálcio, trifosfato de cálcio, hidroxiapatita e o enxerto morcelizado. No caso do sulfato de cálcio em torno de 60% do antibiótico é liberado nas primeiras 24 horas e problemas com seroma e drenagem excessiva da ferida são esperados com o uso deste material (MCLAREN, 2004).

Os polímeros sintéticos têm sido estudados pela sua capacidade de serem absorvidos dispensando uma segunda abordagem, os mais estudados são o polianidro P (FAD-AS), o

polilactídeo (PLA) e o poliglicolídeo (PGA). A mistura destes materiais com antibiótico só é feita industrialmente, a liberação do antibiótico e a duração da ação bactericida ainda é incerta, além de ser freqüente a ocorrência de drenagem asséptica provocada pela reação inflamatória ao material (BURD et al., 2001; HENDRICKS, et al., 2001; MCLAREN, 2004).

Não existe carreador biodegradável liberado para uso no EUA por serem considerados de performance inadequada, e estes materiais devem ser usados com cautela, apenas naquelas situações em que o PMMA não for indicado, pois ainda carecem de mais estudos sobre a sua eficácia (MCLAREN, 2004; NELSON, 2004).

1.6 Tratamento da falha óssea infectada

A infecção tem sobre a regeneração efeito variável de acordo com a sua extensão; se grave normalmente inibe a regeneração do segmento perdido, porém se moderada freqüentemente estimula uma resposta óssea exuberante (PHEMISTER, 1915), e o tratamento da falha óssea é mais difícil após infecção do que na falha asséptica. Historicamente o enxerto ósseo autólogo tem sido o método mais utilizado (BOSWORTH et al., 1966; DAOUD; SAIGHI-BOUAOUINA, 1989; GRIFFTHS, 1968; PHEMISTER, 1915), embora o leito infectado não seja considerado um bom receptor, e perdas da ordem de 20 a 40% do volume enxertado possam ocorrer em pacientes com condições ruins da ferida (MATAVA; ZORN; CIERNY III, 1990 apud CIERNY III; ZORN, 1994)³.

Apesar destas condições adversas Lack, Bösch e Arnes (1987), relataram a incorporação completa do enxerto em 29 pacientes tratados com desbridamento e

³ MATAVA, M.; ZORN, K. E.; CIERNY III, G. Cancellous bone grafting in the presence of bacterial contamination: Indications, methods, and long-term results. Presented at the American Academy of Orthopaedics Surgeons Annual Meeting. New Orleans, Louisiana, 1990.

homoenxerto associado a antibiótico e selante de fibrina, havendo apenas dois casos de recorrência da infecção. Johnson, Urist e Finerman (1988), trataram seis pacientes com falhas de 3 a 17 cm utilizando enxerto esponjoso associado a BMP, e obtiveram a consolidação em um tempo médio de seis meses. Christian, Bosse e Robb (1989), trataram falhas ósseas pós-traumáticas com tamanho médio de 10 cm (mínimo de 6 cm) utilizando perlas de gentamicina associadas a retalho local e enxerto autólogo. O tempo médio de uso do fixador externo foi de 5,5 meses, todas as falhas consolidaram e não ocorreu deformidade no tornozelo. Masquelet et al. (2003), trataram 35 pacientes com falhas variando de 4 a 25 cm, das quais 70% eram maiores do que 10 cm com a técnica de preencher a falha com espaçador de PMMA com antibiótico. O espaçador ficou em média dois meses no local sendo então removido e preenchido com enxerto. União óssea foi alcançada com quatro meses e carga total com 8,5 meses, todas as infecções curaram e não houve recidivas. Schöttle; Werner e Dumont (2005), trataram seis pacientes com falhas ósseas previamente infectadas com o mesmo método, o tamanho da falha variou de 5 a 8 cm, e o fixador externo foi removido em média após sete a dez meses. Nenhum caso apresentou recidiva da infecção.

Procedimentos clássicos como o enxerto ósseo aberto (técnica de Papineau) e a sinostose tibio-fibular têm sido menos utilizados, em detrimento de tratamentos mais sofisticados, como o transporte vascularizado da fíbula e a osteogênese de tração pelo método de Ilizarov (MAY et al., 1989). Cierny III e Zorn (1994), compararam retrospectivamente o método de Ilizarov com o tratamento convencional (enxerto ósseo associado a cobertura de partes moles) em pacientes com falhas ósseas infectadas da tibia. Concluíram que os dois tratamentos apresentavam resultados similares, porém considerou o método de Ilizarov mais barato, rápido e seguro. Uma análise cuidadosa dos seus dados, porém, revela que os pacientes tratados com enxerto ósseo possuíam falhas maiores e um grande número de perdas de retalho (CIERNY III; ZORN, 1994). Green et al. (1992), obteve um tempo de uso do

fixador de Ilizarov de 9,6 meses e Paley et al. (1989), de 10,6 meses. Em média, mais de duas cirurgias foram necessárias por paciente para correções no fixador e ao final uma alta incidência de parestesia do nervo fibular, contratura do quadril, do joelho e equino do pé foram observadas (GREEN et al, 1992). Para May et al. (1989), a técnica de Ilizarov consome tempo e muitos meses de uso do aparelho são necessários. O aparato é desconfortável e difícil de aplicar, além de necessitar de uma curva de aprendizado substancial (MAY et al., 1989; PICADO; PACCOLA; FILHO, 2000).

1.7 Membrana biológica associada ao uso de PMMA

Fitzgerald (1983), estudando a infecção óssea induzida em cães, observou que na zona de contato do PMMA com o osso formava-se uma membrana fibrosa altamente vascularizada e com uma rica matriz celular de leucócitos e linfócitos polimorfonucleares. Por volta da segunda semana ocorria o espessamento da membrana e formação óssea, que foram considerados como representando a tentativa do hospedeiro em isolar o processo infeccioso (FITZGERALD, 1983). Christian, Bosse e Robb (1989), também observaram a formação de osso pelo perióstio em torno das pérolas de gentamicina e ponderaram que além do seu uso como carreador de antibiótico o cimento era um excelente espaçador para os tecidos moles, permitindo que os retalhos musculares fossem moldados sobre ele, e após a retirada permanecia um espaço para ser preenchido com enxerto.

A reação de corpo estranho desencadeada pela presença do cimento na região da falha óssea causa a formação de uma membrana em torno deste. A parte central desta membrana é formada por um epitélio semelhante ao da membrana sinovial. A parte externa é constituída por fibroblastos, miofibroblastos e colágeno, sendo que todas as camadas são altamente

vascularizadas. A análise imuno-histoquímica mostrou que esta membrana é rica em fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fatores de crescimento de transformação β (TGF β), que são observados já com duas semanas. As concentrações de proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2) apresentam os seus maiores níveis com quatro semanas, e a adição *in vitro* de um extrato da membrana estimulou de forma significativa a proliferação e a diferenciação de células da medula óssea (PELISSIER et al., 2004). Esta membrana induzida age protegendo o enxerto ósseo e ajudando na sua vascularização, além disso pode agir como um agente *in situ* na liberação de fatores de crescimento capazes de estimular a reparação óssea (MASQUELET et al., 2000; MASQUELET, 2003; PELISSIER et al., 2002; PELISSIER et al., 2004).

Desta forma, a primeira ação do espaçador de PMMA preenchendo a falha óssea infectada seria mecânica, impedindo a invasão do sítio pelo tecido fibroso. A segunda seria biológica, pela indução de uma membrana altamente vascularizada e rica em fatores de crescimento, que pode produzir tecido ósseo e facilitar a revascularização do enxerto depositado no seu interior (MASQUELET et al., 2000; MASQUELET, 2003; PELISSIER et al., 2002; PELISSIER et al., 2004; SCHÖTTLE; WERNER; DUMONT, 2005).

1.8 O perióstio na regeneração óssea

O papel do perióstio na regeneração óssea tem sido objeto de controvérsias e de muitos estudos famosos. Desde o tempo de Galeno é sabido que após a remoção de uma parte da diáfise pode ocorrer a regeneração. Scultetus relatou um exemplo clássico em 1634, porém nenhum esforço foi feito no sentido de explicar a origem deste fenômeno (LOOSEN, 1894

apud PHEMISTER, 1915)⁴ até que Duhamel em 1739 chamou a atenção para o papel do perióstio na formação do calo ósseo (DUHAMEL, 1739 apud EYRE-BROOK, 1984)⁵.

Na primeira metade do século XIX Heine praticou ressecções sub-periosteais em animais que foram seguidas pela regeneração espontânea (LOOSEN, 1894 apud PHEMISTER, 1915)⁶. Ollier entre 1858 e 1867 realizou uma série de experimentos no campo da regeneração óssea, mostrando que, mesmo quando toda a diáfise de um osso era ressecada poderia ocorrer regeneração e nos primeiros anos da microscopia ao observar a presença de células na camada profunda do perióstio, acreditou que este era o achado definitivo para provar suas idéias de que este tecido poderia produzir osso (OLLIER, 1867 apud PHEMISTER, 1915)⁷. Seus resultados foram reforçados em 1909 por Axhausen e aceitos por mais de 40 anos (AXHAUSEN, 1909 apud HALDEMAN, 1933)⁸, até que em 1912 a publicação de “The growth of bone” escrito por Macewen colocou em dúvida a teoria corrente (MACEWEN, 1912 apud HALDEMAN, 1933)⁹. Em um de seus experimentos clássicos ressecou uma parte da diáfise do rádio em cães jovens deixando o perióstio intacto, o que resultou na ausência completa de formação óssea. Reproduziu também o experimento de Duhamel envolvendo a diáfise do rádio com um fio de prata que após 12 semanas ficou recoberto com osso mesmo na ausência do perióstio. Baseado nestas evidências concluiu que o osso não era formado pelo perióstio, mas pelo próprio osso (EYRE-BROOK, 1984; HALDEMAN, 1933; PHEMISTER, 1915).

Hey Groves em 1917 comparou os estudos de Ollier e Macewen com as suas próprias observações para concluir que o perióstio era apenas uma membrana delimitadora (

⁴ LOOSEN. Die Resection der Knochen und Gelenke. 1894.

⁵ DUHAMEL, H. L. Sur une racine qui a la faculté de tendre em rouge lès os des animaux vivant. Mem. Acad. Roy. Sci., n.52, v.1. 1739

⁶ LOOSEN. Die Resection der Knochen und Gelenke. 1894.

⁷ OLLIER, L. Traité experimental et clinique de la régén des os. 1867.

⁸ AXHAUSEN, G. Die histologischen und klinischen Gesetze der freien Osteoplastik auf Grund von Thiersuchen. Arch. f. Klin. Chir. n.28, v. 23, 1909.

⁹ MACEWEN, W. The growth of bone. 1912.

GROVES, 1917 apud HALDEMAN, 1933)¹⁰. Leriche e Policard em 1928 reproduziram os experimentos de Ollier e observaram que o perióstio só produzia osso quando haviam fragmentos ósseos aderidos, por isso acreditavam que Ollier havia errado na interpretação dos resultados e atribuíram a neoformação óssea às lascas de osso aderidas ao perióstio (LERICHE; POLICARD, 1928 apud HALDEMAN, 1933)¹¹.

Trueta e Cavadias (1955), e Trueta (1963), enfatizaram a relação entre a circulação periosteal e suas propriedades osteogênicas. Observaram que a proliferação vascular era acompanhada de formação óssea e que *flaps* vascularizados de perióstio produziam osso em abundância. O suprimento sanguíneo do perióstio deriva de quatro conjuntos de vasos: sistema periosteal intrínseco (vasos dispostos dentro da camada fibrosa); sistema músculo-periosteal (conexões entre a circulação do músculo e do perióstio); sistema fásio-periosteal (artérias que correm entre os planos musculares e suprem o perióstio) e as anastomose com os capilares corticais (SIMPSON, 1995).

Burman e Umansky (1930), Haldeman (1933), e Cohen e Lacroix (1955), mostraram o poder osteogênico do perióstio. Zucman, Maurer e Berbesson (1968), demonstraram que a ressecção do perióstio atrasava a consolidação das fraturas e defenderam que ele mantinha suas propriedades osteogênicas mesmo após ficar temporariamente avascular. King (1976), demonstrou a capacidade de *flaps* periosteais vascularizados produzirem pontes ósseas, e McKinbbon (1978), encontrou células progenitoras nas superfícies endosteais e periosteais, e concluiu que teria havido muito menos confusão se as idéias de Macewen não tivessem prevalecido. À luz do conhecimento atual, a ausência completa de formação óssea abaixo do perióstio nos experimento de Macewen é resultado da obliteração completa da cavidade subjacente, o que inevitavelmente ocorre nas ressecções extensas (EYRE-BROOK, 1984).

¹⁰ GROVES. E. W. H. Methods and results of transplantation of bone in the repair of defects caused by injury or disease. *British J. Surgery*, v. 685. 1917.

¹¹ LERICHE, R.; POLICARD, A. The normal and pathological physiology of bone. 1928.

O potencial osteogênico do periósteo está relacionado a vários fatores como perfusão, solicitação mecânica, sítio doador e sítio receptor (BURMAN; UMANSKY, 1930; HERTEL et al., 1994). O periósteo justa-epifisário produz mais osso que o da diáfise, e retalhos implantados na calvária tem produção óssea cinco vezes menor que os implantados na tíbia (RITSILÄ et al., 1994).

A presença de periósteo no enxerto leva ao fechamento mais rápido do defeito (HALDEMAN, 1933) e um leito periosteal bem perfundido propicia uma melhor incorporação do enxerto do que o leito muscular (HERTEL et al., 1994). Emulsões da camada de câmbio aceleram a regeneração de pseudartroses, e a BMP é capaz de estimular a resposta periosteal indicando a presença de células responsivas (NAKAHARA et al., 1989). Além disso pode atuar como membrana semipermeável regulando o meio na região da falha e agir como fonte de células progenitoras e de fatores osteoindutores (KARAOGLU et al., 2002; ZUCMAN; MAURER; BERBESSON, 1968), e o primeiro enxerto ósseo obtido através da engenharia de tecidos comercialmente disponível, o BioSeed[®], foi produzido utilizando células periosteais (HUTMACHER; SITTINGER, 2003; PERKA, 2000).

A resposta mais importante na reparação óssea é a do periósteo. Células osteoprogenitoras e mesenquimais indiferenciadas contribuem para a regeneração através de uma recapitulação da embriogênese, em que ocorre ossificação intramembranosa e formação óssea endocondral. A regeneração óssea tem início mediante a indução de uma resposta imune, onde um hematoma é formado e se torna foco de moléculas sinalizadoras com capacidade de iniciar a cascata de eventos envolvidos. Os maiores responsáveis pela resposta inflamatória inicial são citocinas, plaquetas, BMPs e MSCs. Células inflamatórias secretam IL-1, IL-6 e TNF- α , plaquetas liberam TGF- β e PDGF responsáveis pela regulação, mediação, proliferação e diferenciação das células mesenquimais (DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNOUDIS, 2005; EINHORN, 1998; YOO; JOHNSTONE, 1998).

Nesta fase inicial ocorre a angiogênese, e o crescimento vascular para dentro do calo é regulado pelo FGF, VEGF e pela angiopoietina 1 e 2. Em torno do terceiro dia, osteoblastos oriundos do córtex e células osteoprogenitoras derivadas do periósteo alguns milímetros distante da lesão se dividem e se diferenciam dando origem a formação de osso. Este processo, conhecido como ossificação intramembranosa, atinge seu pico entre o sétimo e o décimo dia, e provavelmente cessa no décimo quarto, a partir do qual apenas a atividade osteoblástica continua. Nesta fase são encontrados níveis aumentados de BMP-2, -4 e -7, provavelmente envolvidos na sua modulação (DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNOUDIS, 2005; EINHORN, 1998; URIST; JOHNSON, 1943).

No periósteo adjacente ao foco de fratura a ossificação predominante é a endocondral, e este processo é auxiliado por células derivadas dos tecidos moles. MSCs são recrutadas e começam a proliferar a partir do terceiro dia, até se diferenciarem em condroblastos. A proliferação de novos condrócitos predomina entre o sétimo e o vigésimo - primeiro dia e resulta na formação do calo mole. Estas células secretam matriz rica em colágeno tipo II e proteoglicanos que fornecem estabilidade mecânica à lesão. Após duas semanas, a produção celular começa a declinar e os condrócitos hipertróficos tornam-se as células predominantes no calo. A partir de então a cartilagem sofre hipertrofia e mineralização de uma maneira organizada, sendo alvo da invasão vascular, que traz consigo células perivasculares progenitoras dos osteoblastos (DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNOUDIS, 2005; EINHORN, 1998).

1.9 Regeneração da falha óssea pelo tubo periosteal

A capacidade para regeneração de grandes falhas pelo periósteeo tem sido um achado freqüente na literatura que aborda o tratamento da osteomielite. Em alguns casos a regeneração da diáfise sem o uso de enxerto ósseo pode ser esperada após sequestrectomia e controle da infecção. Esta reconstituição geralmente dá origem a um segmento afilado no centro e que freqüentemente resulta numa pseudartrose em ampulheta na região central (BOSWORTH et al., 1966; DAOUD; SAIGHI-BOUAOUINA, 1989; FOWLES et al, 1979; GRIFFITHS, 1968, PHEMISTER, 1915).

Inicialmente acreditava-se que a incapacidade de obter a regeneração da diáfise estava ligada à época em que o seqüestro era removido, pois ele deveria funcionar como sustentação para as partes moles até que o periósteeo ficasse espessado, formando um tubo rígido que evitasse o colapso na região da falha. Se fosse removido precocemente ocorria a interrupção da regeneração, porém sua permanência protelava a cura do processo infeccioso (GRIFFITHS, 1968). Segundo Nichols (1904), o periósteeo envolvido na infecção apresenta-se muito mais espessado que o normal, e a camada profunda se torna rígida à medida que o processo progride, até finalmente formar uma concha que envolve o seqüestro. Histologicamente este processo se caracteriza pela extensa formação de osso novo periosteal altamente vascularizado que se torna mais denso com o tempo. Se o periósteeo fosse abordado cirurgicamente em uma fase muito precoce quando ainda não estivesse firme, não se conseguiria manipulá-lo adequadamente para formar o tubo periosteal, levando ao estreitamento da diáfise ou a não regeneração (NICHOLS, 1904).

No âmbito experimental o tubo periosteal deixado intacto após a ressecção óssea é capaz de regenerar a diáfise (KNOTHE et al. 2007; KNOTHE; SPRINGFIELD, 2005),

porém, nas falhas deixadas sem preenchimento, a formação óssea é predominantemente advinda do endóstio e do canal medular, e freqüentemente ocorre o afinamento da região central e a não regeneração (EYRE-BROOK, 1984; PALEY et al., 1986; VOLPON, 1980).

Com alternativa para este problema Bartolomeu Bartolomei (Informação pessoal)¹², propôs que ao se elevar o perióstio do osso infectado deve-se manter finas lascas de osso aderidas. Assim seria possível formar-se um tubo rígido, que não cedesse com a retração ulterior e produzisse um regenerado com características mais anatômicas, que levaria a regeneração do segmento perdido. Knothe et al. (2007), demonstraram que o tubo periosteal contendo lascas de osso vascularizadas aderidas no seu interior foi capaz de produzir um regenerado superior ao obtido com a enxertia óssea da falha.

¹² Informação verbal fornecida a Cleber Antonio Jansen Paccola no ano de 1970 em São Paulo.

2. Hipótese

A hipótese deste estudo é a de que ao se utilizar um preenchedor para a falha resultante da ressecção óssea, este poderia fornecer um suporte para a regeneração óssea advinda do periósteo. Este “molde” quando retirado após um certo tempo, deixaria uma cavidade de paredes firmes que não sofreria colapso, e o espaço remanescente na região central facilitaria a re-canalização medular ou poderia receber enxerto ósseo quando necessário.

A escolha da associação do polimetilmetacrilato com antibiótico como material para a confecção deste preenchedor, adicionaria os benefícios de um combate mais efetivo do processo infeccioso, devido à liberação local do antibiótico. Associado a isto a reação tecidual ao polimetilmetacrilato, levaria à formação de uma cápsula com potencial osteogênico, facilitando a regeneração da falha.

Comprovados estes benefícios, essa abordagem poderia ser utilizada isoladamente ou como "medida primária" no tratamento dos defeitos ósseos com infecção, podendo ser suplementada ulteriormente por outras técnicas de tratamento, quando houvesse o controle do processo séptico.

3. Objetivos da pesquisa

3.1 Objetivo primário

O objetivo do estudo proposto é avaliar se o uso do espaçador de PMMA agindo como um guia para a neoformação óssea pode estimular o perióstio, ou induzir a formação de uma membrana potencialmente osteogênica, levando à regeneração do defeito ósseo.

3.2 Objetivos secundários

Produzir um modelo experimental de falha óssea infectada.

Desenvolver um espaçador de PMMA com antibiótico dimensionado segundo a falha óssea utilizada no estudo.

Promover o controle da infecção óssea.

Caracterizar o padrão da regeneração induzida pelo uso do espaçador de PMMA com antibiótico.

4. Material e métodos

4.1 Desenho do experimento

Para a realização deste estudo foram utilizados trinta e cinco coelhos divididos em cinco grupos levando-se em consideração a presença de infecção, o uso do espaçador de PMMA com antibiótico e a preservação do periósteo no defeito ósseo. Os grupos formados foram: grupo 1, falha óssea tratada com espaçador de PMMA com antibiótico; grupo 2, falha óssea sem preenchimento; grupo 3, falha óssea infectada tratada com espaçador de PMMA com antibiótico; grupo 4, falha osteoperiosteal infectada tratada com espaçador de PMMA com antibiótico; grupo 5, falha óssea infectada sem preenchimento.

O modelo utilizado para a realização do experimento foi a falha óssea de 15mm na ulna, sendo o estudo conduzido em duas etapas: a primeira, da qual fazem parte os grupos 1 e 2, foram utilizadas falhas sem infecção, preenchidas ou não com o espaçador de PMMA com antibiótico. Esta primeira etapa teve por objetivo avaliar a influência do espaçador na regeneração óssea. Na segunda etapa do experimento foi produzida a infecção no defeito, visando avaliar a regeneração nesta condição.

4.2 Animais de experimentação

4.2.1 Amostra

Foram utilizados trinta e cinco coelhos da raça Nova Zelândia, do gênero feminino, com peso inicial compreendido entre 2,5 e 3,5 Kg, fornecidos pelo biotério central da USP campus de Ribeirão Preto. Durante o estudo os animais ficaram alojados no biotério do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Figura 1). Os

animais foram obtidos com duas semanas de antecedência para adaptação ao meio e avaliação quanto a possíveis problemas de saúde, e mantidos em gaiolas contendo um ou dois animais. Água e ração balanceada para coelhos (Fri-coelho R.L., Fri-Ribe S.A., Pitangueiras, Brasil) foram oferecidas sem restrição durante o experimento.



Figura 1 – Alojamento dos animais no Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

4.2.2 Aprovação comitê de ética

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em 31 de Janeiro de 2006, com o número 162/2005.

4.2.3 Modelo experimental

O modelo utilizado para realização do estudo foi a falha óssea no antebraço de coelhos. A falha estava localizada na junção da diáfise com a metáfise da ulna distal e

representava uma perda segmentar que abrangia todo o diâmetro do osso por 15 mm de extensão. Nos grupos 1 e 2 o defeito foi realizado bilateralmente. Para os grupos 3, 4 e 5 foi utilizado apenas o antebraço direito, pois se considerou que a infecção nos dois antebraços poderia comprometer a saúde dos animais e levar a sepse.

4.3 Grupos do experimento

Os animais foram divididos em cinco grupos (Tabela 1). Para a formação dos grupos 1 e 2 foram utilizados cinco coelhos com defeitos ósseos bilaterais, resultando num total de cinco peças por grupo ao final do estudo (cada peça era constituída pelo antebraço dissecado das partes moles, deixando apenas o perióstio aderido. O rádio e a ulna permaneciam ligados pela membrana interóssea dando estabilidade à zona de regeneração). O grupo 1 foi formado por falhas ósseas tratadas com espaçador de PMMA com antibiótico, e o grupo 2 por falhas ósseas deixadas sem preenchimento.

Para os grupos 3, 4 e 5 foram utilizados dez animais por grupo com falhas ósseas na ulna direita. O grupo 3 foi constituído por falhas ósseas infectadas tratadas com espaçador de PMMA com antibiótico. No grupo 4 foram realizadas falhas osteoperiosteais infectadas, e tratadas com espaçador de PMMA com antibiótico. No grupo 5 as falhas ósseas infectadas foram deixadas sem preenchimento.

A distribuição dos animais pelos grupos deu-se randomicamente utilizando-se o método SNOSE (Sequentially numbered opaque sealed envelopes). Cartões de papel contendo os grupos foram colocados junto com papel carbono, cobertos com papel alumínio e colocados em envelopes que foram lacrados em seguida. Após serem embaralhados

manualmente, foi escrito com caneta sobre o envelope o número correspondente ao animal, de tal forma que, pela ação do carbono, o número ficava marcado sobre o cartão (Figura 2) (DOIG; SIMPSON, 2005). Os envelopes foram abertos apenas no momento da cirurgia.

Grupo	Descrição	Peças	Lado	Espaçador	Infeção	Periosteó
1	Falha + espaçador	5	Bilateral	Sim	Não	Sim
2	Falha sem espaçador	5	Bilateral	Não	Não	Sim
3	Falha infectada + espaçador	10	Unilateral	Sim	Sim	Sim
4	Falha osteoperiosteal infectada + espaçador	10	Unilateral	Sim	Sim	Não
5	Falha infectada sem espaçador	10	Unilateral	Não	Sim	Sim

Tabela 1 – Descrição dos grupos do estudo.



Figura 2 – Método SNOSE para randomização. A - Papel carbono, cartão de alocação e capa de alumínio. B - Envelope lacrado, onde foi escrito o número do animal.

4.4 Cronologia do seguimento

Devido ao fato do experimento ter sido conduzido em duas etapas com metodologias distintas, houve diferença no tempo de seguimento entre os grupos. Para os animais dos grupos 1 e 2 o marco zero de início do seguimento foi a cirurgia para produzir a falha óssea.

Para os animais que tiveram as falhas ósseas infectadas, o seguimento se iniciou duas semanas mais tarde no momento da cirurgia para o desbridamento da ferida (Figura 3).

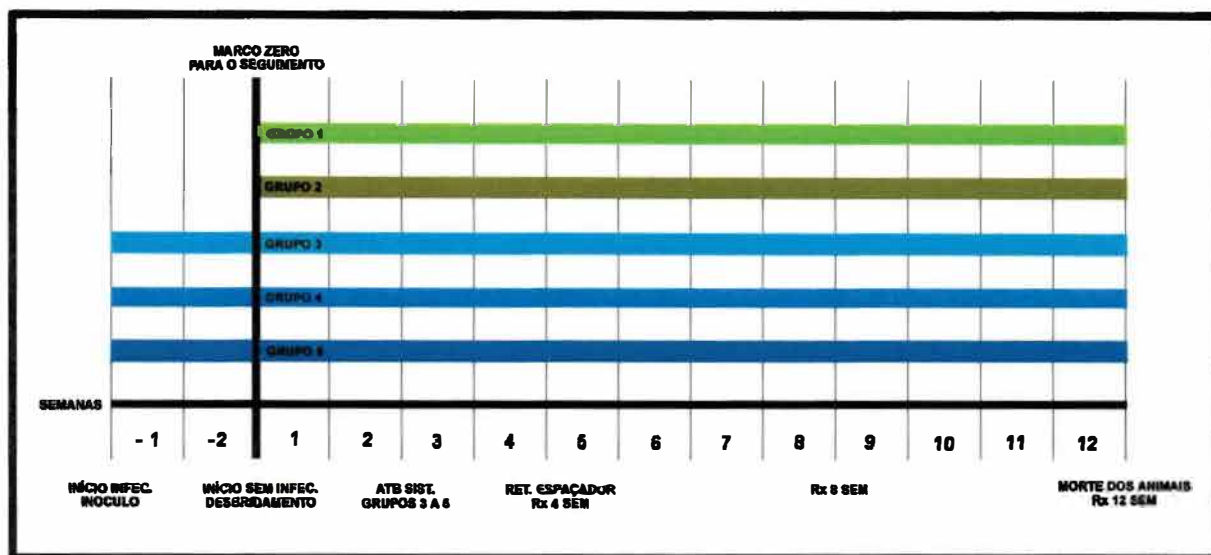


Figura 3 - Diagrama esquemático do seguimento no estudo.

4.5 Espaçadores de PMMA com antibiótico

4.5.1 Preparo dos espaçadores de PMMA com antibiótico

Para a confecção dos espaçadores de PMMA com antibiótico foi desenvolvido junto à oficina de precisão da USP campus Ribeirão Preto, um molde que permitisse ao cimento ósseo assumir a forma desejada durante a sua polimerização. O material escolhido para tal foi o teflon[®], devido às suas características antiaderentes e por apresentar resistência as altas temperaturas produzidas pela polimerização do cimento e à esterilização em autoclave. Foi utilizada uma placa retangular de resina de teflon[®] (resina de teflon[®] 100% pura, prensada por Ultraray do Brasil, São Paulo, Brasil) com medidas de 93 x 61 mm e 18 mm de largura. A placa foi presa a um tornilho e com o uso de uma fresadora foram feitos 36 furos com 15 mm de profundidade utilizando uma broca metálica de 6mm. Em seguida no fundo destes orifícios

foi perfurado um segundo furo com 3 mm de profundidade que se estendia até a outra face da placa (Figuras 4 e 5).

O cimento ósseo utilizado no preparo do espaçador foi o Surgical Simplex P[®] (Howmedica, Limerick, Irlanda). A apresentação do produto utilizado é constituída de uma ampola de 20 ml contendo o monômero (Metacrilato de metila 19,5 ml; N,N dimetil-paratoluidina 0,5 ml e hidroquinona 1,5 mg), e um pacote de 40 g contendo o polímero (Metacrilato de metila - copolímero do estileno 30 g; metacrilato de polimetilo 6 g e sulfato de bário 4 g). O preparo do cimento com antibiótico foi realizado à temperatura ambiente sob técnica asséptica. O polímero foi colocado em uma cuba cirúrgica estéril junto com 480 mg de sulfato de gentamicina em pó (produzido na China e importado por Purifarma laboratórios, São Paulo, São Paulo).

Ambos foram misturados com uma colher de metal para formar uma mistura homogênea. Em seguida o monômero foi adicionado e novamente misturado. Ainda em seu estado fluido o cimento foi despejado sobre o molde para que penetrasse nos orifícios. Após alguns minutos quando adquiriu uma consistência mais firme, foi introduzido manualmente sobre pressão nos orifícios maiores do molde até sair pelo outro lado, evitando a formação de bolhas de ar no espaçador (Figura 6), o excedente foi removido com uma espátula e o cimento deixado curar por trinta minutos. Após este período os espaçadores foram então retirados do molde através de um pino metálico introduzido pelo orifício menor.

Os espaçadores produzidos apresentavam a forma de dois cilindros montados, no qual o menor estava alinhado com o maior. As dimensões do cilindro maior foram de 15 mm de altura por 6 mm de diâmetro. O cilindro menor por sua vez apresentava 3 mm de comprimento por 3 mm de diâmetro (Figura 6), fornecendo uma área total de superfície de 367 mm² (Figura 7). Vinte espaçadores aleatoriamente escolhidos foram pesados em uma

balança de precisão (Marte AS 2000C, São Paulo, Brasil) para que fosse estimada a quantidade aproximada de gentamicina em cada espaçador.

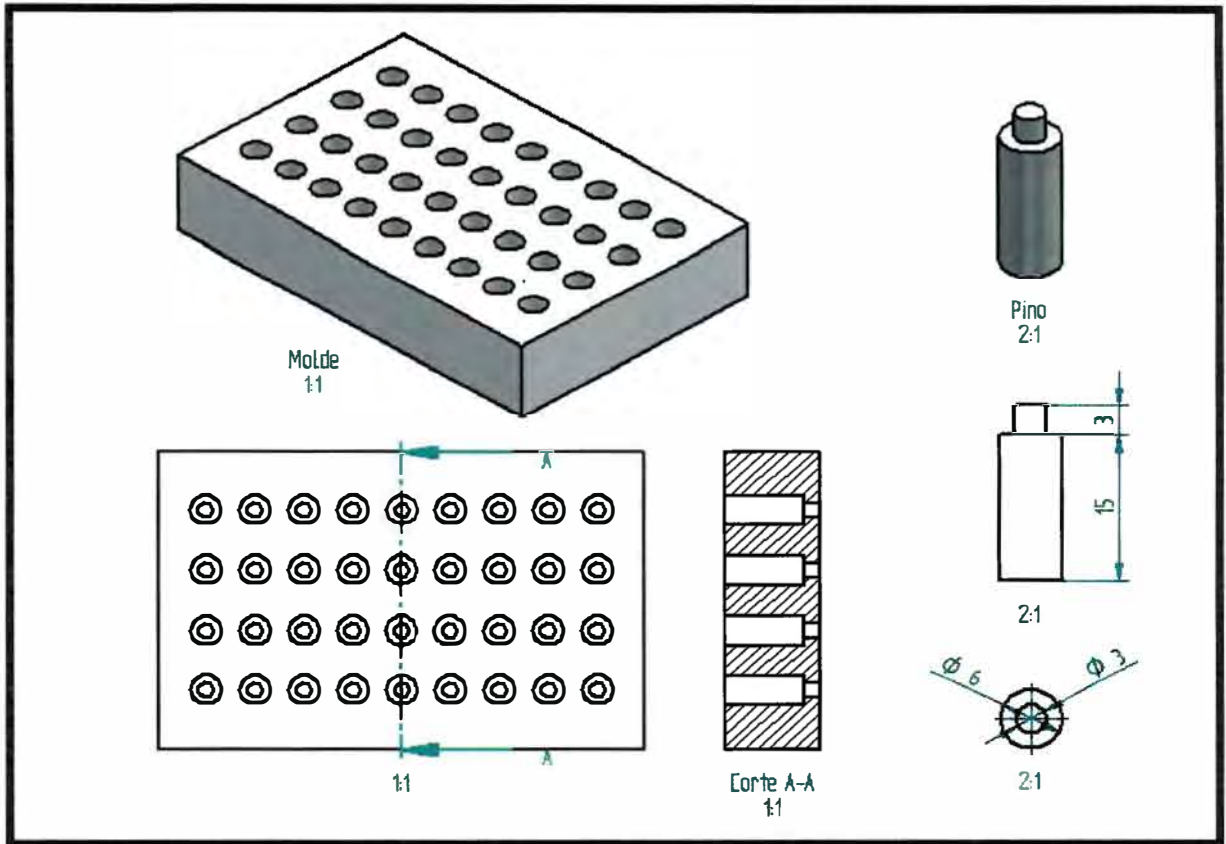


Figura 4 - Modelo esquemático do molde e do espaçador.

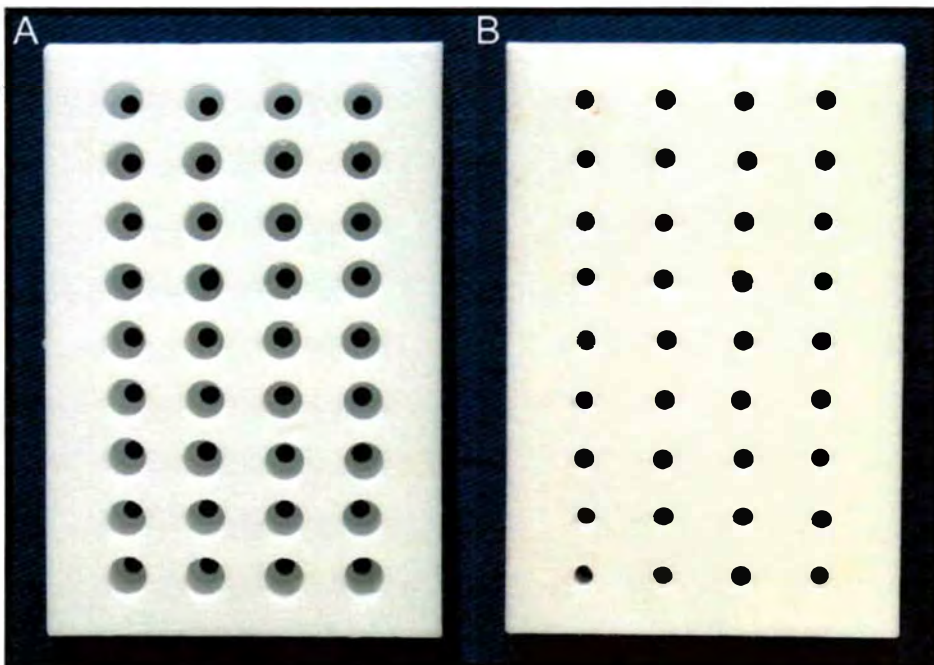


Figura 5 - Aspecto final do molde para os espaçadores. A - Vista superior. B - Vista inferior.

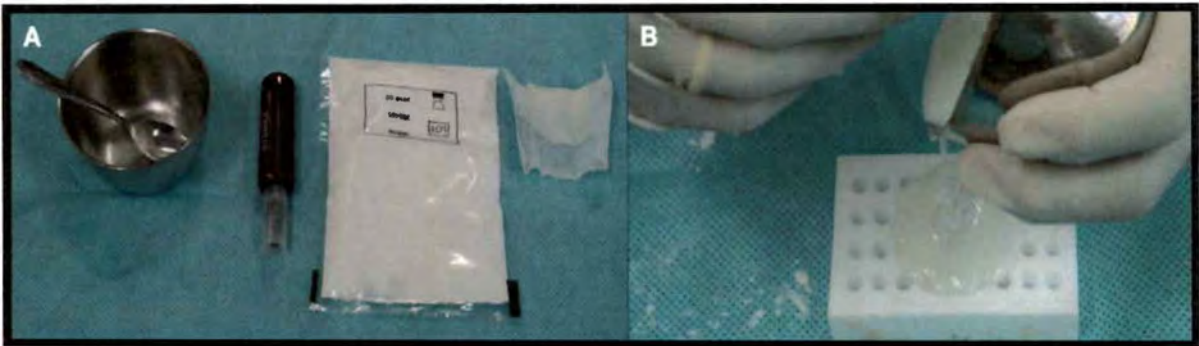


Figura 6 - Preparo do espaçador. Da esquerda para a direita: A - Cuba e colher estéreis, monômero, polímero e gentamicina em pó. B - Mistura sendo colocada no molde.



Figura 7 - Espaçadores de PMMA com gentamicina.

ÁREA DE SUPERFÍCIE DO ESPAÇADOR =

$$S_{\text{cilindro maior}} + S_{\text{cilindro menor}} - 2(\text{área da base do cilindro menor}) = 367 \text{ mm}^2$$

$$S = 2\pi R(R + h)$$

$$S = \pi r^2$$

Figura 8 - Fórmula para cálculo da área de superfície do espaçador.

4.5.2 Estudo de eluição do espaçador

Para estimar o padrão de liberação da gentamicina pelo espaçador foi conduzido um estudo de eluição. Dez espaçadores aleatoriamente escolhidos foram pesados e medidos, e em

seguida colocados individualmente em tubos de ensaio estéreis, contendo 10 ml de solução fisiológica 0,9% tamponada com fosfato (pH = 7,4). Os tubos foram identificados de acordo com o número do espaçador e o dia correspondente do estudo.

O experimento foi conduzido à temperatura ambiente e, a cada 24 horas, os espaçadores eram retirados da solução, lavados com solução salina e imersos em novos tubos. Após a retirada do espaçador, as amostras foram estocadas e congeladas a -20 °C até o momento de realizar a dosagem da gentamicina (Figura 9). Vinte e oito amostras foram produzidas para cada espaçador, e a dosagem foi realizada nas soluções correspondentes aos dias 1, 7, 14, 21 e 28.

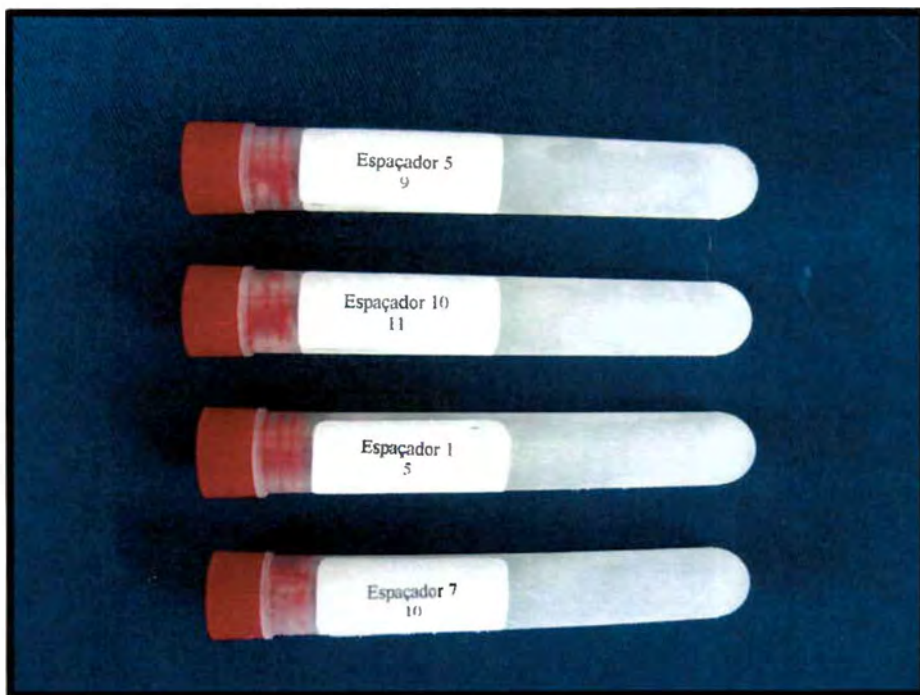


Figura 9 – Amostras do estudo de eluição congeladas para armazenamento.

Para estimar a quantidade de gentamicina liberada na solução foi utilizado o método de imunoensaio de competição FPIA (Fluorescence polarization immunoassay) com o aparelho “Abbott TDx fluorescence polarization analyzer” (Abbott Diagnostics, North Chicago, IL, USA) (Figura 10). Por este método, a concentração mais baixa que pode ser distinguida de zero com 95% de confiança (sensibilidade) é de 0,27 µg de gentamicina por mililitro.

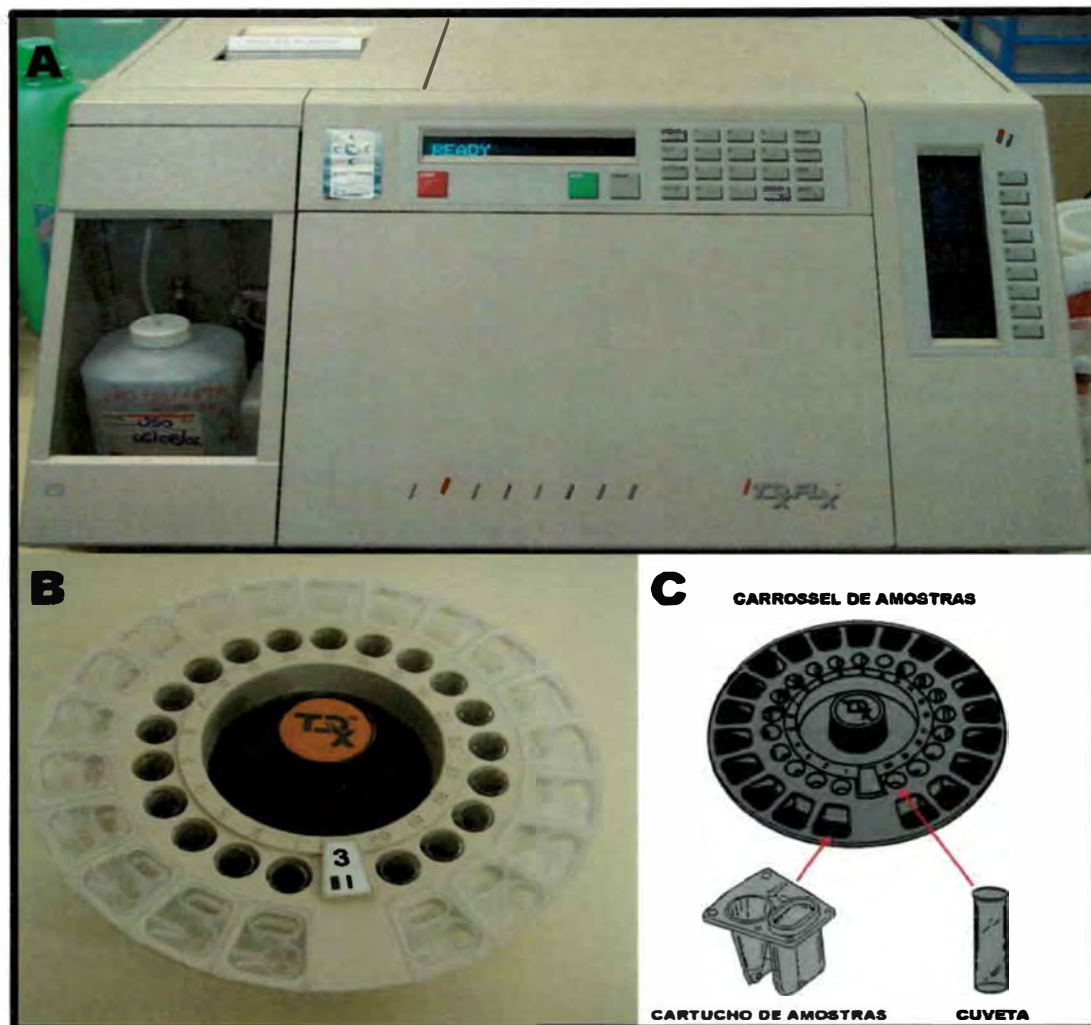


Figura 10 – A - Abbott TDx fluorescence polarization analyzer. B - Carrossel de amostras do TDx onde são depositadas as amostras para o teste. C - Componentes do carrossel de amostras.

A tecnologia FPIA incorpora três conceitos: a fluorescência (materiais fluorescentes absorvem energia luminosa e liberam uma de menor nível. No TDx esta substância é a fluoresceína); a rotação molecular (a velocidade de rotação na solução está relacionada ao tamanho da molécula) e a luz polarizada monocromática (a luz polarizada percorre um único plano, ao passo que a monocromática possui comprimento de onda e cor determinados).

Nesta técnica um anticorpo para a gentamicina e um traçador (antígeno marcado com fluoresceína) são acrescentados na solução a ser testada, e a mistura submetida à luz polarizada monocromática. O complexo anticorpo-gentamicina possui alto peso molecular e baixa rotação, ao passo que o traçador livre com baixo peso molecular, gira rapidamente e

causa grande dispersão da luz. Quanto maior a quantidade de gentamicina na solução maior a competição pelo sítio de ligação no anticorpo, e conseqüentemente maior quantidade de traçador livre. A fluoresceína do traçador é excitada pela luz polarizada e emite uma luz verde com comprimento de onda diferente. O aparelho é capaz de captar estas variações e a energia luminosa é transformada em elétrica, para ser analisada por um computador e estimar a quantidade de gentamicina na solução (Figura 11).

Para a realização do experimento foram utilizados dois kits de teste pertencentes ao mesmo lote de fabricação. Antes do início do experimento o aparelho foi calibrado conforme as orientações do fabricante. As amostras foram descongeladas à temperatura ambiente no momento do uso, e cada amostra foi testada duas vezes.

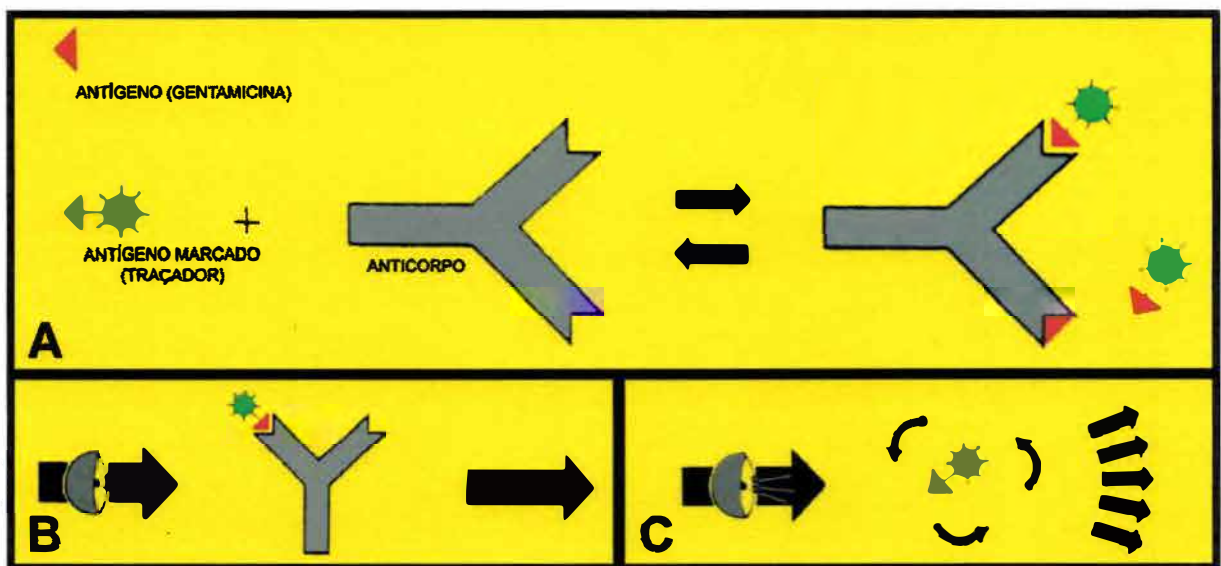


Figura 11 – A - Complexo antígeno-anticorpo-traçador. B - Traçador ligado ao anticorpo tem alto peso molecular e baixa rotação, causando pouco desvio da luz. C - Traçador livre com baixo peso molecular apresenta alta rotação, causando desvio da luz polarizada.

4.6 Preparo da suspensão de *Staphylococcus aureus*

A cepa de *Staphylococcus aureus* utilizada neste estudo foi isolada em nove de setembro de 2005 em uma amostra de hemocultura obtida de um paciente com 9 meses de idade acometido de septicemia. Esta cepa identificada como número 175 da microbiologia do laboratório central do HC-FMRP, foi escolhida devido ao seu perfil de sensibilidade a antibióticos, particularmente à gentamicina (Tabela 2). A bactéria foi armazenada em tripticase onde foi mantida à temperatura ambiente até o momento de ser utilizada no estudo.

Antibiótico	Sensibilidade
Amoxicilina / Clavulanato	Sensível
Ampicilina / Sulbactama	Sensível
Ampicilina	Resistente
Cefazolina	Sensível
Ceftriaxona	Sensível
Ciprofloxacino	Sensível
Clindamicina	Sensível
Eritromicina	Resistente
Gatifloxacino	Sensível
Gentamicina - MIC 1mcg/ml	Sensível
Levofloxacino	Sensível
Linezolid	Sensível
Oxacilina	Sensível
Penicilina	Resistente
Rifampicina	Sensível
Synercid	Sensível
Tetraciclina	Sensível
Sulfametoxazol / Trimetoprima	Sensível
Vancomicina	Sensível

Tabela 2 - Antibiograma da cepa de *S. aureus* selecionada para o estudo.

No dia anterior ao preparo da solução parte do material armazenado foi repicado em uma placa de cultura contendo o meio ágar-sangue e colocado na estufa à temperatura de 35 °C por aproximadamente vinte e quatro horas (Figura 12). Após este período foi colhido um raspado da placa e diluído em 6 ml de salina estéril. O raspado da placa foi sendo progressivamente acrescentado à solução para criar uma suspensão com turbidância de 1,60 UNT medida com aparelho turbidímetro (Micro Scan Turbidity Meter, Baxter Diagnostics Inc., Deerfield, USA). Este valor utilizado como parâmetro corresponde a turbidância

aproximada produzida por uma solução contendo 10^{10} bactérias por mililitro. Para determinar este valor foi realizado um experimento em separado produzindo-se uma solução com 1×10^{10} bactérias através do uso da escala de Mc Farland e da contagem de bactérias na câmara de Neubauer (Neubauer Improved, Herka intercolor, West Germany). Confirmada a quantidade desejada de bactérias por mililitro, foi feita a leitura no turbidímetro e estabelecido o valor a ser usado como parâmetro para o preparo das demais (Figura 13).

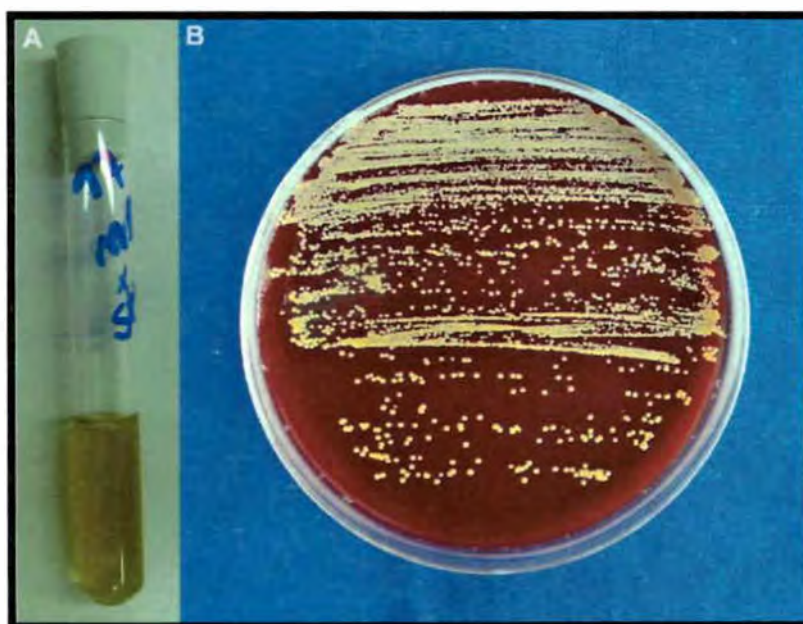


Figura 12 - A – Cepa de *S. aureus* armazenada em tripticase. B – Aspecto da placa de cultura no momento de preparar a solução.

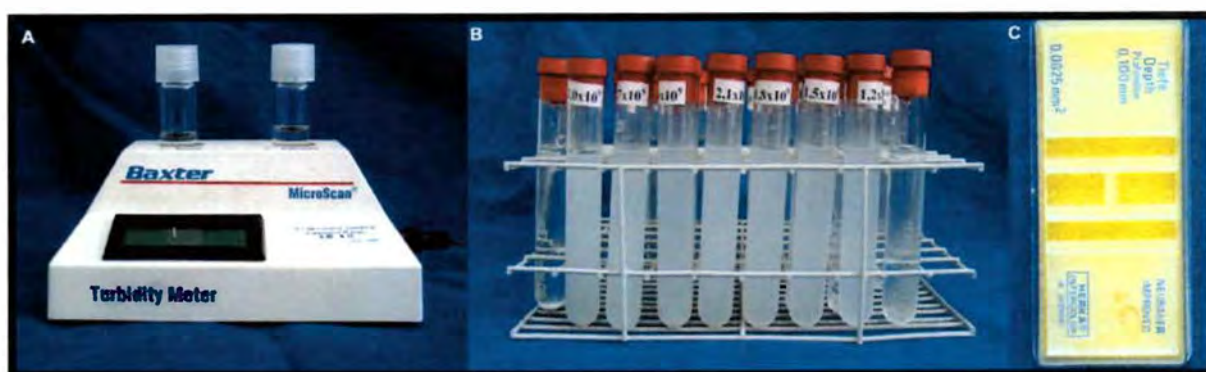


Figura 13 - A – Turbidímetro. B – Escala de Mc Farland. C – Câmara de Neubauer.

Após a solução alcançar a turbidez desejada, 100 µl da mesma foram retirados e diluídos em 900 µl de salina estéril. Diluições progressivas foram feitas da mesma maneira até alcançar uma diluição de 10^{15} . Amostras das diluições 10^4 e 10^5 foram então lidas na câmara de Neubauer utilizando microscopia óptica para confirmar o número de bactérias viáveis na solução. Amostras das diluições 10^{11} a 10^{15} foram semeadas em ágar-cled para avaliar o crescimento das colônias e confirmar a viabilidade do inóculo. A solução contendo aproximadamente 10^{10} bactérias foi então mantida a temperatura ambiente e protegida da luz até o momento do uso no experimento (Figura 14).

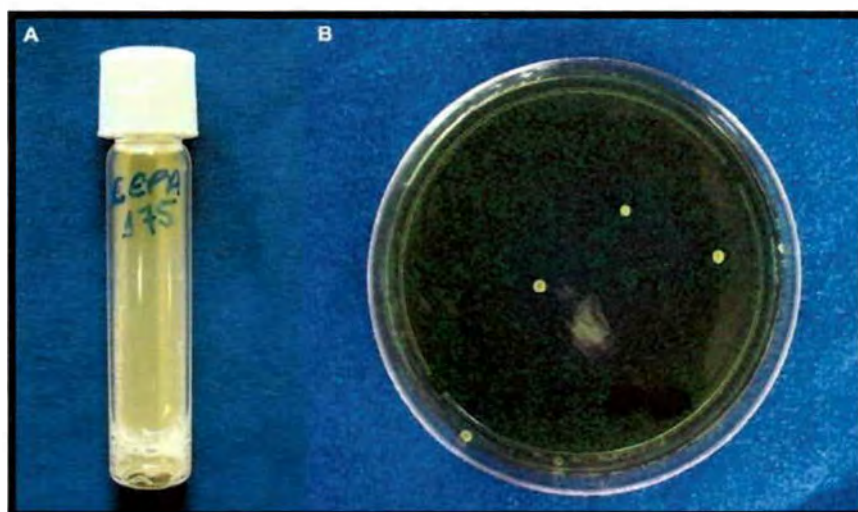


Figura 14 – A - Inóculo pronto para uso. B - Crescimento das colônias no meio CLED.

4.7 Descrição das cirurgias

4.7.1 Cirurgia inicial

No dia anterior à cirurgia, os animais foram aleatoriamente escolhidos, pesados e numerados de forma crescente, sendo também realizada a tricotomia do terço distal do braço e de todo o antebraço. Cada animal foi identificado em dois locais, tendo o número

correspondente tatuado na orelha direita com tinta nanquim e também desenhado no dorso com ácido pícrico. No dia da cirurgia foram selecionados de acordo com a numeração recebida previamente e anestesiados utilizando-se cloridrato de cetamina (Ketamina Agener[®], Agener União, Embu-Guaçu, São Paulo) 40 mg/Kg associado a xylazina (Dopaser[®], Calier, Osasco, São Paulo) na dose de 8 mg/Kg administrados por via intramuscular. Foi então estabelecido acesso venoso em veia periférica da orelha com a utilização de dispositivo para infusão intravenosa (BD Assept[®] 21 G, Becton Dickinson, Juiz de Fora, Brasil) e feita infusão de uma solução de cloridrato de cetamina a 1% (10mg/ml) conforme o necessário para aprofundar o estado anestésico. Após a anestesia os animais foram então randomizados.

O membro superior do animal foi exsangüinado com a utilização de faixa elástica e garroteado ao nível do braço. A degermação foi feita com solução de polivinilpirrolidona-iodo a 10% (Betadine, indústria farmacêutica Rioquímica, São Jose do Rio Preto, Brasil), seguida da preparação com solução alcoólica de iodo a 2% (Tintura de iodo, indústria farmacêutica Rioquímica, São José do Rio Preto, Brasil) e a colocação dos campos estéreis.

O acesso cirúrgico foi realizado na face lateral do antebraço, estando a parte distal da incisão a 1,5 cm da articulação radio-cárpica e se estendendo proximalmente por 3 cm. Após a incisão da pele a crista lateral da ulna foi identificada e a fáscia superficial incisada a este nível. Em seguida foi realizada a separação da musculatura no plano intermuscular entre os músculos extensor lateral dos dedos e o extensor ulnar do carpo, seguido da incisão do perióstio (Figura 15). Com um osteótomo o perióstio foi elevado do osso aderido à musculatura para expor a diáfise. Nos animais em que foi realizada a ressecção do perióstio (grupo 4), inicialmente foi identificado o plano entre o perióstio e a musculatura, separando-os, deixando o perióstio aderido ao osso.

A margem do corte ósseo distal do segmento a ser ressecado estava localizada a 1,5 cm da articulação rádio-cárpica e foi realizada com uma serra circular elétrica, perpendicular

à diáfise da ulna chegando até bem próximo da membrana interóssea. O corte foi então completado com a utilização de um osteótomo para evitar que houvesse dano ao rádio. O corte ósseo proximal foi feito da mesma forma, porém a 15 mm do corte distal. O segmento delimitado foi retirado do seu leito e liberado das partes moles aderidas a este. O tamanho da falha óssea foi confirmado com o uso de um paquímetro tomando como referência para a medida o centro das extremidades da falha (Figura 16).

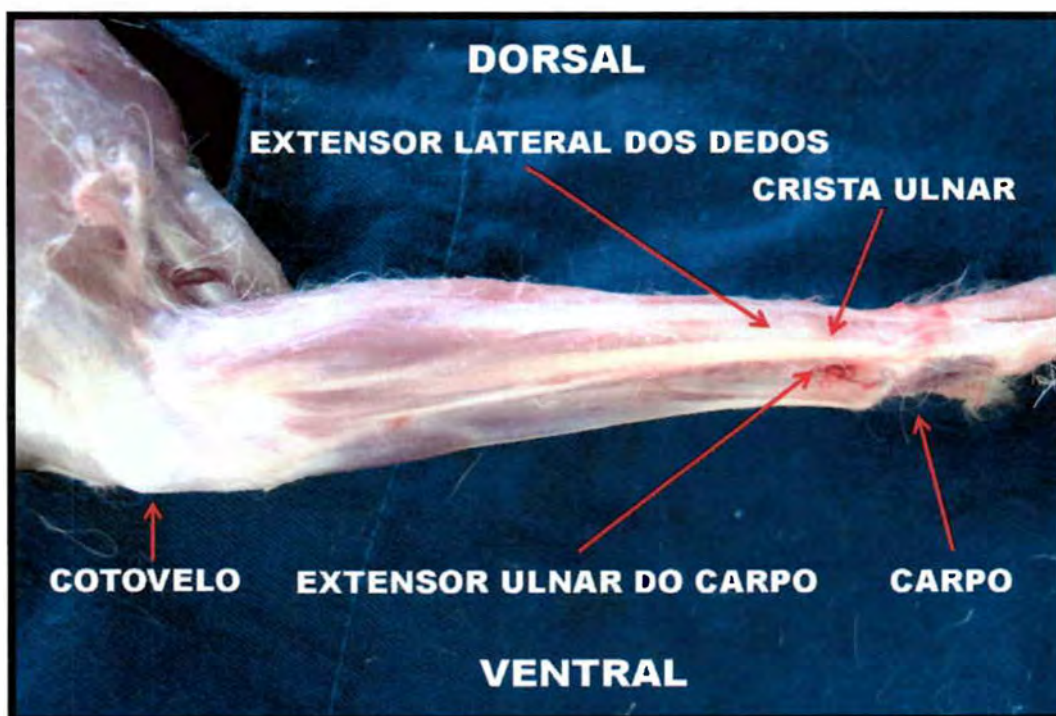


Figura 15 – Anatomia da face dorsal do antebraço do coelho.

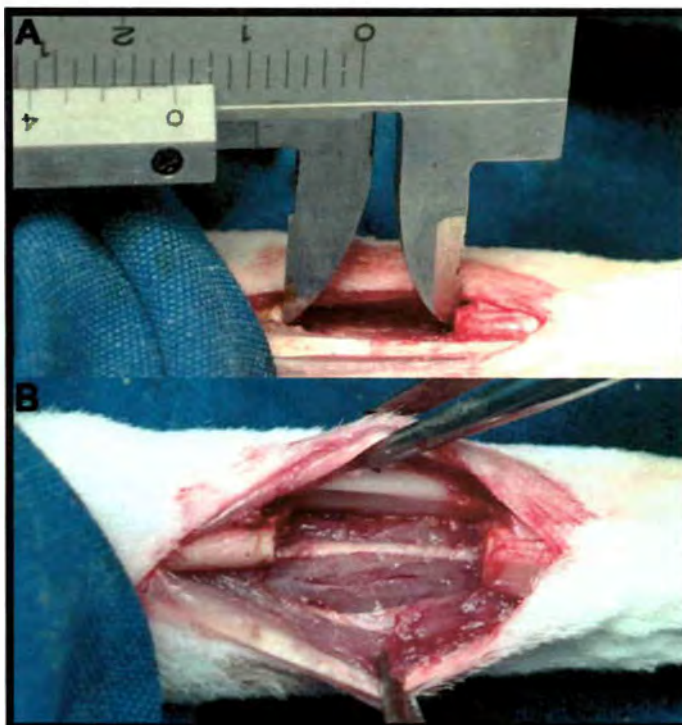


Figura 16 – A - Medida intra-operatória da falha óssea. B - Aspecto da falha óssea após a ressecção do fragmento. Notar a ressecção do perióstio do rádio em sua face ulnar que foi realizada para os animais do grupo 4.

4.7.2 Falha óssea sem infecção

Nas falhas ósseas do grupo 1 após a retirada do fragmento foi colocado o espaçador de PMMA com gentamicina. O cilindro menor do espaçador foi encravado dentro do canal medular para que o espaçador encaixasse firmemente e se mantivesse estável. O plano profundo da ferida foi suturado com pontos simples usando nylon 5.0 (Brasuture industria e comercio, São Sebastião da Grama, São Paulo). A pele foi então fechada com sutura contínua utilizando fio nylon 3.0 (Brasuture indústria e comércio, São Sebastião da Grama, São Paulo) (Figura 17).



Figura 17 – A- Sutura do plano profundo. B - Sutura da pele.

4.7.3 Falha óssea com infecção

Para produzir a falha óssea infectada o fragmento ósseo foi ressecado e o conteúdo do seu canal medular removido assim como os tecidos moles aderidos. Foi então recolocado e o canal medular inoculado com 0,05 cc da solução contendo as bactérias, por meio de uma seringa estéril de 0,3 ml (BD Plastipak, 0,3 cc, Beckton Dickinson indústria cirúrgica Ltda., Curitiba, Brasil), correspondendo a 5×10^8 bactérias (Figura 18). Antes da utilização a solução era agitada manualmente para homogeneização e o tempo máximo entre a produção e a utilização nunca foi superior a seis horas evitando assim variações no número de bactérias viáveis. Após o inóculo a ferida era suturada da mesma forma que nos animais sem infecção.

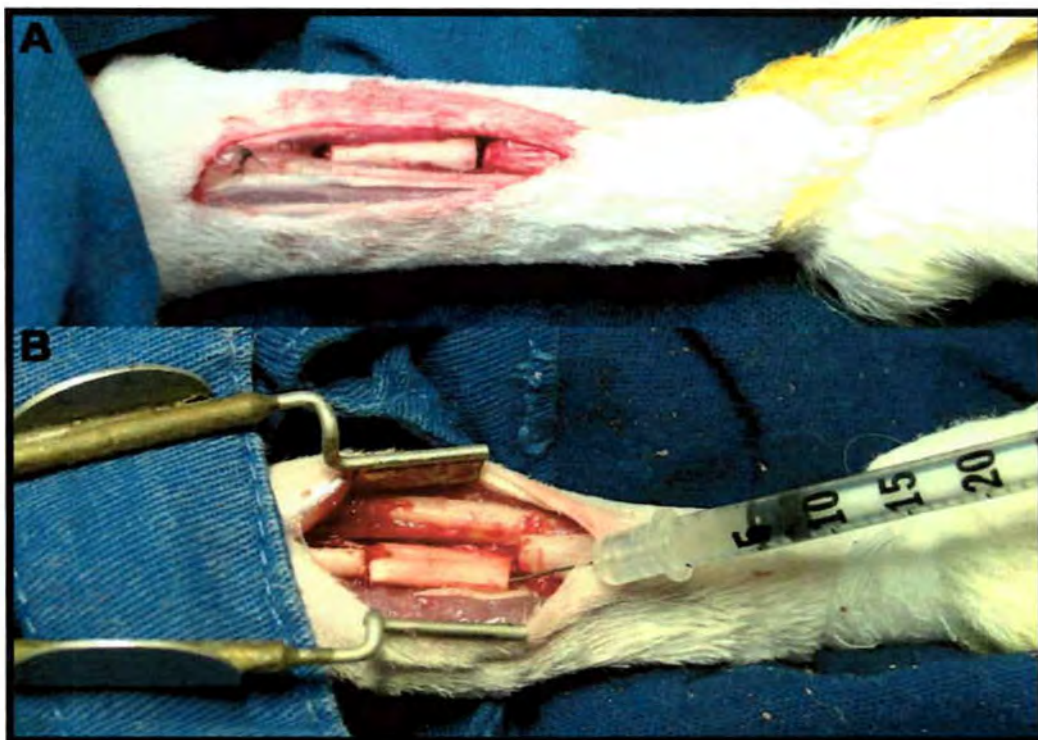


Figura 18 – A - Fragmento ósseo recolocado no leito da ferida. B - Canal medular do fragmento sendo inoculado.

4.8 Seguimento pós-operatório

4.8.1 Seguimento dos animais sem infecção

Ao final da cirurgia um curativo com gaze e esparadrapo envolvendo todo o membro foi realizado e os animais recolocados na gaiola para recuperação da anestesia. Foi utilizado cetoprofeno (Profenid[®], Rhodia Farma Ltda., São Paulo, Brasil) 2 mg/Kg a cada 12 horas por via intramuscular para analgesia durante os três primeiros dias de pós-operatório, e os animais foram inspecionados diariamente e pesados semanalmente, sendo a troca dos curativos realizada quando necessário.

4.8.2 Seguimento dos animais com infecção

4.8.2.1 Desbridamento da infecção

Após duas semanas os animais inoculados foram novamente anestesiados e o membro preparado para a cirurgia conforme descrito anteriormente. A incisão foi realizada no mesmo local da cirurgia anterior e após dissecação romba, o fragmento ósseo infectado foi removido e imediatamente colocado em tubo de ensaio estéril. Após a retirada do fragmento, um swab (Bac-swab, DME, São Paulo, Brasil) foi colhido do fundo da ferida.

Todos os tecidos desvitalizados foram removidos e a ferida lavada com 40 ml de solução fisiológica 0,9%. O tamanho da falha óssea foi medido com um paquímetro, e de acordo com o grupo do estudo ao qual pertencia o animal foi colocado o espaçador de PMMA associado à gentamicina (Figura 19). A ferida foi suturada com pontos simples espaçados utilizando nylon 5.0 no plano profundo e nylon 3.0 na pele, deixando espaço suficiente para a drenagem espontânea.

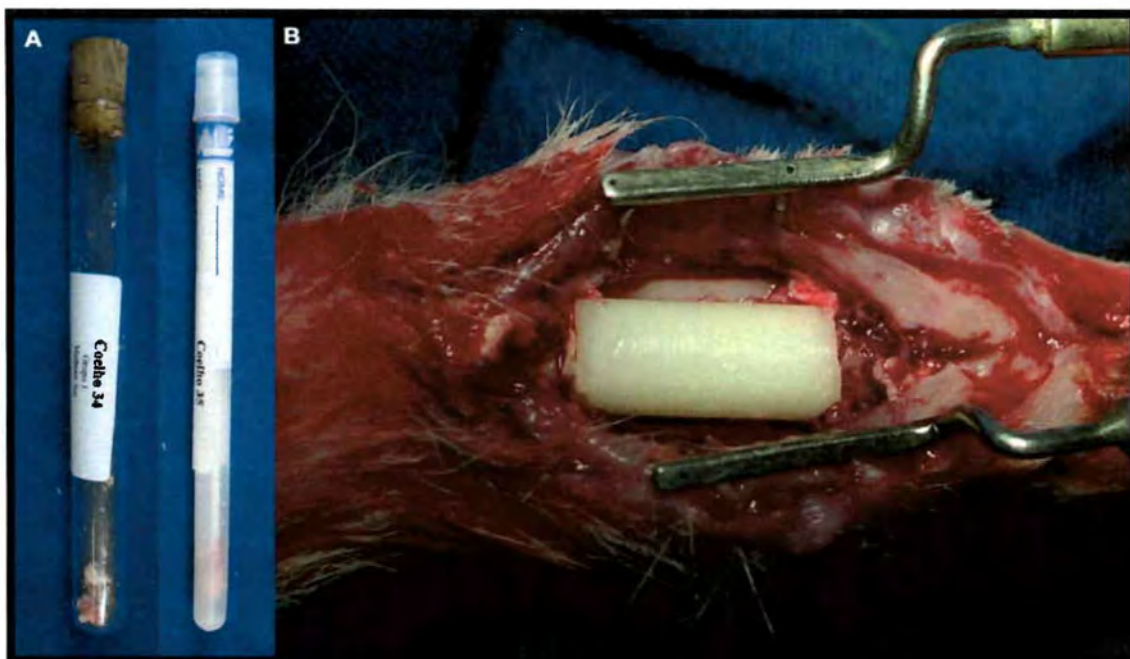


Figura 19 – A - Fragmento ósseo e swab coletados no desbridamento. B - Espaçador de PMMA + ATB colocado na falha óssea após o desbridamento.

4.8.2.2 Antibioticoterapia sistêmica

Logo após o desbridamento foi iniciada a antibioticoterapia sistêmica com sulfato de gentamicina (Gentaron[®], Ariston indústrias farmacêuticas, São Paulo, Brasil) 6 mg/Kg administrada por via intramuscular em dose única diária, e mantida por 4 semanas. A analgesia pós-operatória foi realizada da mesma forma que no primeiro procedimento.

4.8.2.3 Identificação bacteriana

O material coletado durante o desbridamento foi encaminhado no mesmo dia ao laboratório central de microbiologia do HC-FMRP. Inicialmente as amostras foram semeadas

nos meios ágar-sangue e Naito (NI) e colocadas na estufa por um período de 24 horas a 35 °C. Para a identificação bacteriana foi utilizada apenas a amostra proveniente do fragmento ósseo, ficando a do swab como reserva. A placa contendo as colônias foi colocada no aparelho Microscan (Walkaway™ 40/96, Baxter Diagnostics Inc., Deerfield, USA) (Figura 20) para identificação e antibiograma utilizando a placa PC 21 (Positive combo 21, Baxter Diagnostics Inc., Deerfield, USA).



Figura 20 - Microscan Walkaway™ 40/96.

4.8.3 Retirada do espaçador de PMMA com antibiótico

Após quatro semanas de utilização do espaçador os animais foram anestesiados e por meio de um acesso de 1cm sobre a parte distal da falha, o espaçador foi removido. A ferida foi suturada com pontos simples de nylon 3.0 e o pós-operatório conduzido da mesma forma que nos procedimentos anteriores (Figura 21).



Figura 21 – Aspecto da ferida após a retirada do espaçador (animal do grupo 3), onde se observa o leito da ferida formado por membrana intensamente vascularizada, com consistência firme ao toque.

4.8.4 Administração de fluorocromos

Nos dois últimos animais de cada grupo foi realizada a administração de fluorocromos. A calceína e a alisarina foram dissolvidas em uma solução de bicarbonato de sódio até a concentração de 10%. A oxitetraciclina foi dissolvida em solução salina também na concentração de 10%. Todos os fluorocromos foram administrados por via venosa utilizando-se uma veia periférica da orelha.

Calceína azul na dose de 10 mg/kg foi administrada na quarta semana. Alisarina também na dose de 10 mg/Kg foi administrada na oitava semana, e oxitetraciclina na dose de 10 mg/Kg foi administrada 48 horas antes da morte dos animais com 12 semanas.

4.9 Avaliação radiográfica

Foram realizadas Radiografias do antebraço dos animais antes e depois do desbridamento da ferida para os grupos 3 a 5, e com quatro, oito e doze semanas de seguimento para todos os grupos. Todas as radiografias realizadas foram identificadas e após a revelação, receberam uma etiqueta contendo o grupo e a data.

4.9.1 Estudo radiográfico com os animais vivos

A técnica descrita foi utilizada em todas as radiografias exceto para aquelas com 12 semanas de seguimento. Foram realizadas utilizando filme 18 x 24 cm (Kodak MXG/Plus, São José dos Campos, São Paulo, Brasil) e aparelho portátil de radiografia (Siemens, São Paulo, Brasil) regulado para 44 Kv, 30 mA e tempo de exposição de 0,10 s, com a ampola posicionada perpendicularmente a 90 cm do filme. O antebraço foi posicionado em supinação e fixado ao filme com esparadrapo. Esta posição colocava a face lateral da ulna perpendicular ao feixe de raios x, evitando a sobreposição com o rádio (Figura 22). Foi testado o fator de ampliação produzido por esta técnica que se mostrou desprezível, portanto as imagens obtidas representavam o tamanho real.

4.9.2 Estudo radiográfico das peças.

Após a morte dos animais foi retirado o antebraço para realizar a radiografia final, utilizando filme dental (Kodak Insight[®], Oclussal, Kodak company, New York, USA). Para realização destas radiografias foi utilizado aparelho de radiologia odontológica de 70 kv e 8 mA (Pro dental[®], Pro 70 – Intra, Ribeirão Preto, São Paulo) regulado para um tempo de exposição de 0,3 s. A distância do foco ao filme era de 40 cm e a peça foi posicionada de forma que a falha óssea ficasse perpendicular ao feixe de Raios-X e paralela ao filme. Junto à peça foi colocado um penetrômetro para avaliar a técnica radiográfica utilizada (Figura 23).

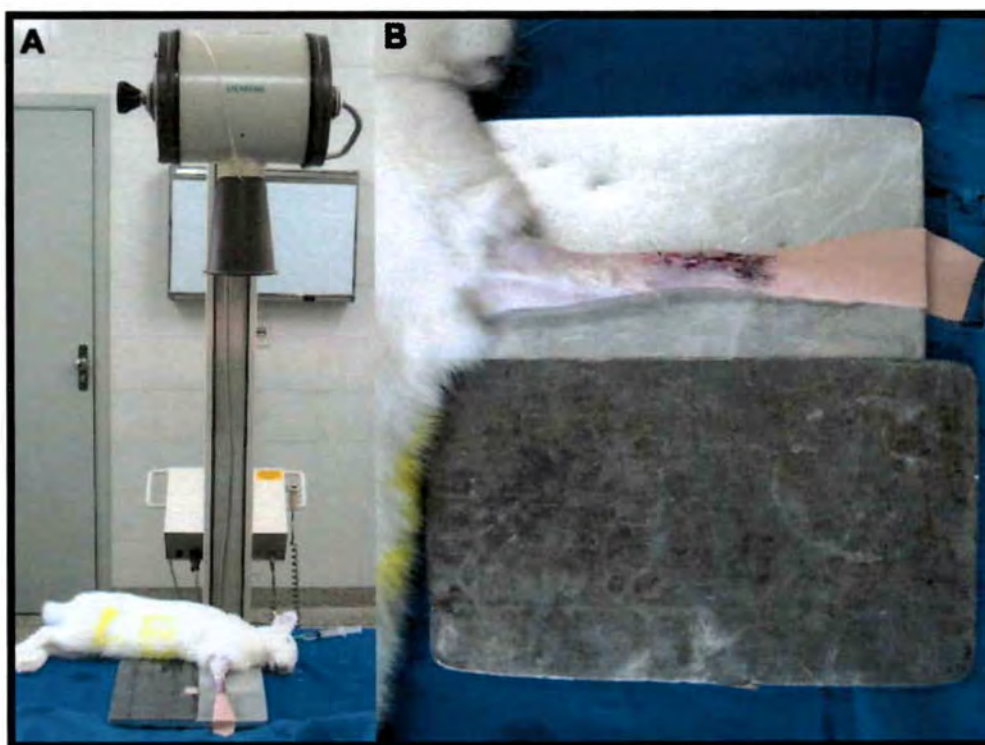


Figura 22 – A - Posição do animal para a radiografia. B - Vista ampliada mostrando a posição do antebraço para o exame.

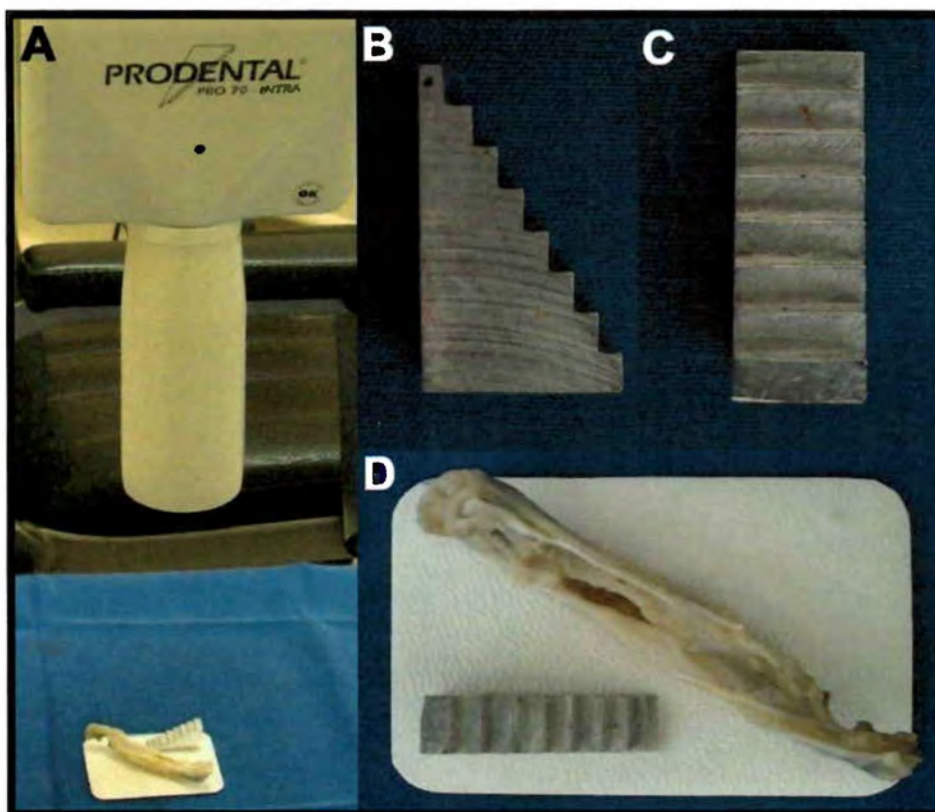


Figura 23 – A - Demonstração da posição para radiografia. B e C - Penetrômetro, vista lateral e superior. D - Vista ampliada do posicionamento da peça para a radiografia.

A revelação foi realizada manualmente em câmara escura com temperatura do tanque de 26 °C, usando um tempo de revelação de 2 minutos e 30 segundos (Kodak GBX, Revelador e reforçador, Eastman Kodak Company, Rochester, USA) e um tempo de fixação de 5 minutos (Kodak GBX, Fixador e reforçador, Eastman Kodak Company, Rochester, USA), seguido da lavagem por 10 minutos e secagem em estufa. Esta técnica radiográfica não apresentou também um fator de ampliação significativo.

4.9.3 Avaliação das imagens radiográficas

4.9.3.1 Avaliação visual

Todas as radiografias foram avaliadas pelo mesmo examinador, utilizando os parâmetros descritos na tabela 3 e também classificações descritas para o modelo de falha óssea. Os achados radiográficos sugestivos de infecção foram mensurados através da classificação descrita por Calhoun e Mader (1997), (Tabela 4). Como avaliação adicional no estudo da regeneração óssea foram utilizadas as classificações de Ambrose et al. (2004), (Tabela 5) e Lane e Sandhu (1987), (Tabela 6 e Figura 24). A falha óssea foi considerada consolidada apenas quando uma ponte óssea ligava as extremidades e ocupava mais de 25% do defeito.

Parâmetro avaliados	Inicial / Pré-desbrid.	Pós-desbrid.	4 Sem	8 Sem	12 Sem
Distancia carpo-falha	X	---	---	---	---
Classificação de Calhoun e Mader	X	---	X	X	X
Tamanho da falha	X	X	X	X	X
União óssea	---	---	---	---	X
Percentual de preenchimento da falha	---	---	X	X	X
Classificação de Lane	---	---	---	---	X
Classificação de Ambrose	---	---	---	---	X
Histograma	---	---	---	---	X

Tabela 3 - Parâmetros estudados na avaliação radiográfica no decorrer do estudo.

Achados radiográficos	Pontos
Normal	0
Elevação ou destruição do periósteeo, ou ambos. Edema de partes moles	1
Destruição do periósteeo ou da arquitetura óssea < 10%	2
Destruição da arquitetura óssea normal entre 10 e 40%	3
Destruição da arquitetura óssea > 40%	4

Tabela 4 – Classificação de Calhoun e Mader (1997), para avaliação radiográfica de infecção óssea.

Achados radiográficos	Pontos
Tamanho do defeito em mm	0 - 15
Neoformação óssea	
Completa (2 cortex + matriz)	0
Moderada (2 cortex, sem matriz)	1
Pouca (1 cortex)	2
Nenhuma	3

Tabela 5 – Classificação de Ambrose et al (2004), para regeneração óssea no antebraço de coelhos.

Formação óssea	
Sem evidência de formação óssea	0
Preenchimento de 25% do defeito	1
Preenchimento de 50% do defeito	2
Preenchimento de 75% do defeito	3
Preenchimento de todo o defeito	4
União proximal	
Não-união	0
Possível união	1
União radiográfica	2
União distal	
Não-união	0
Possível união	1
União radiográfica	2
Remodelação	
Sem evidência de remodelação	0
Remodelação do canal medular	1
Remodelação completa do córtex	2

Tabela 6 – Classificação de Lane e Sandhu (1987), para avaliação radiográfica da regeneração óssea no antebraço de coelhos.



Figura 24 - Porcentagem de preenchimento do defeito ósseo.

4.9.3.2 Avaliação digital

Para a digitalização das radiografias de alta resolução realizadas no final do estudo foi utilizado um escaneador com filtro para negativos (HP Scanjet G4050[®], Hewlett-Packard Development Company). As radiografias foram digitalizadas com uma resolução de 1200 dpi mantendo o tamanho original da imagem e salvas no formato TIFF. Em seguida foram inseridas no programa Adobe Photoshop 7.0[®] (Adobe Systems incorporated, San Jose, California). O software foi inicialmente restaurado as suas configurações padrão, e após a imagem digitalizada ser aberta esta era girada para que o antebraço do animal ficasse paralelo às guias.

A imagem foi então transformada em tons de cinza, através do comando: **Imagem** ➤ **Modo** ➤ **Tons de cinza** (Figura 25 e 26), deixando apenas um canal de cor. A medida do

tamanho da falha foi realizada através da ferramenta **Régua**, e o resultado mensurado em milímetros. Para avaliar o percentual de preenchimento da falha e a densidade do regenerado, foi utilizada a ferramenta **Marca de seleção retangular**, com a qual foi delimitado um retângulo de 15 x 5 mm que foi colocado centralizado sobre a zona de regeneração, sendo então mensurado a porcentagem de preenchimento do retângulo pelo regenerado. Para avaliar a densidade no interior deste retângulo foi utilizada a ferramenta histograma através do comando: **Imagem** ➤ **Histograma**. Esta ferramenta calcula a densidade da cor cinza na região selecionada, fornecendo a densidade na região do regenerado (Figura 27).

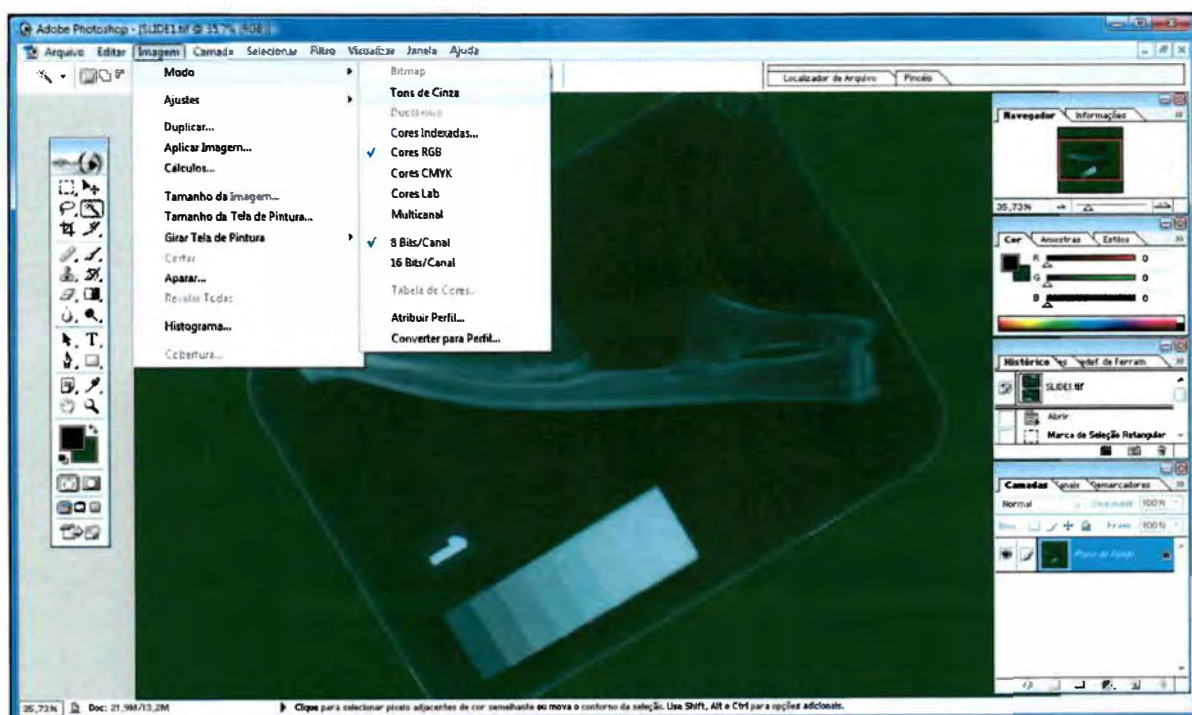


Figura 25 - O modo tons de cinza transforma a imagem em escala de cinza, fornecendo apenas um canal de cor passível de ser mensurado.

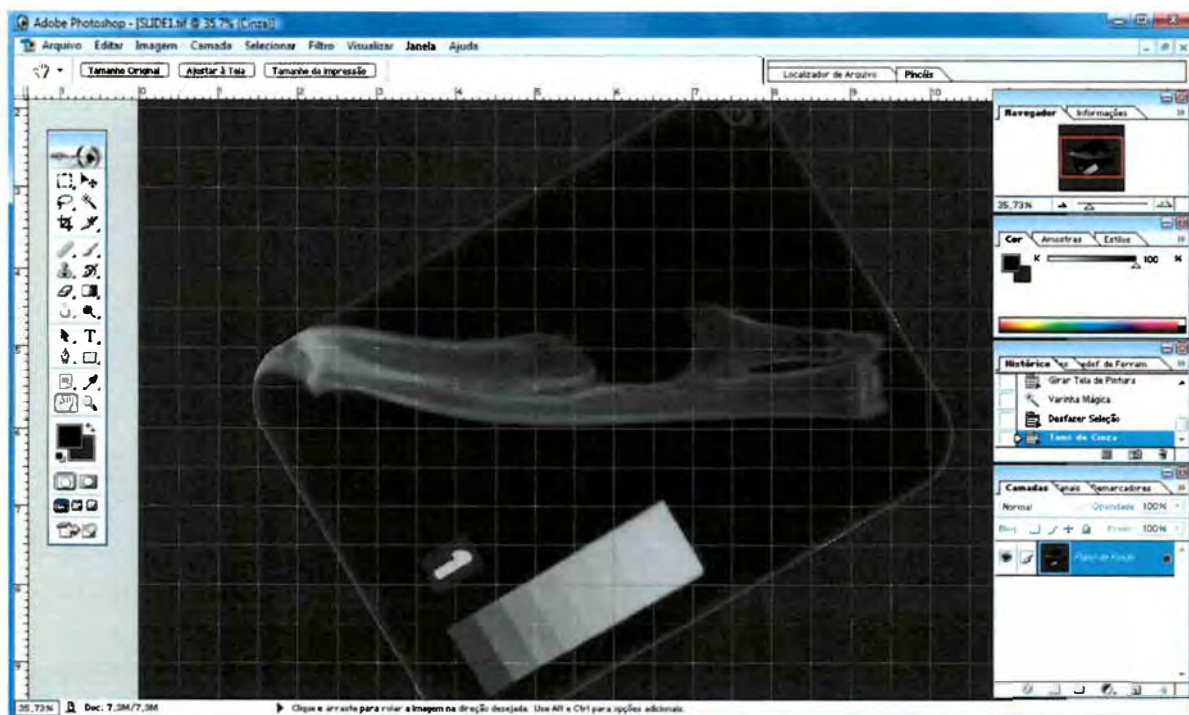


Figura 26 - Imagem em tons de cinza, com as guias do programa, facilitando a medida do tamanho da falha e a utilização da ferramenta régua.

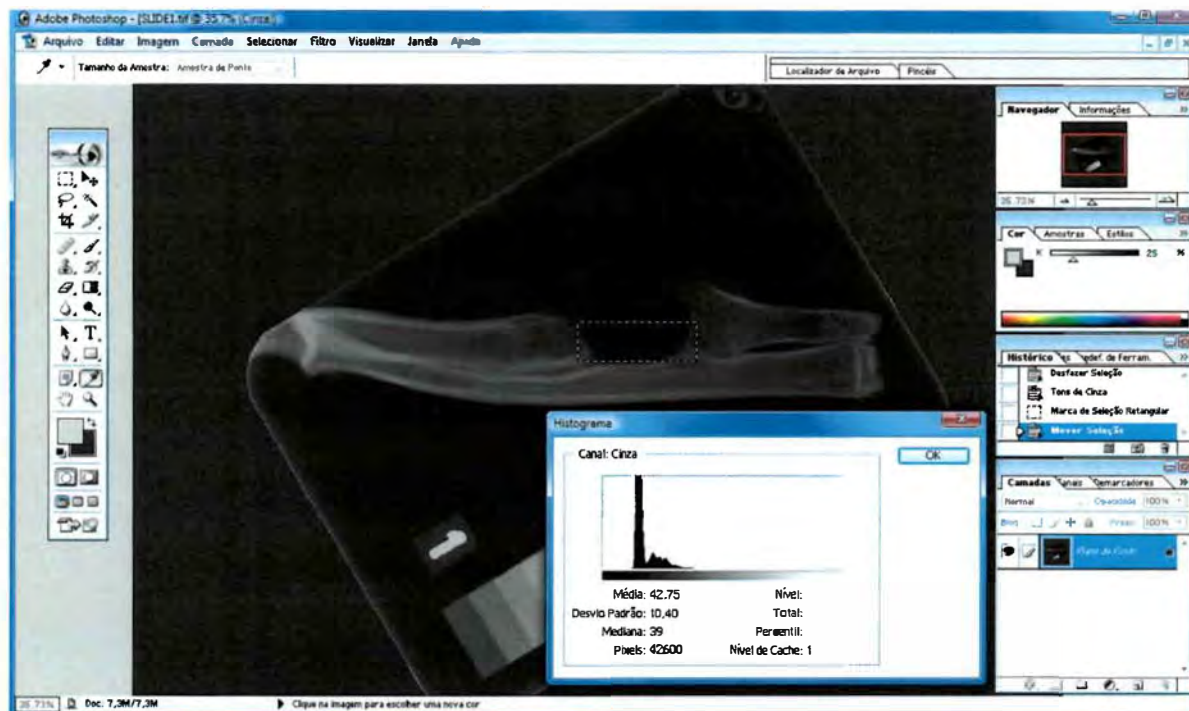


Figura 27 - Retângulo de 15 x 5 mm colocado na região central da falha para a medida do percentual de preenchimento e a ferramenta histograma medindo a densidade do cinza na área selecionada.

4.10 Estudo anatomopatológico

4.10.1 Preparo das lâminas para histologia

Os animais foram mortos utilizando Ketamina[®] 40mg /Kg associado a Dopaser[®] 8 mg/Kg por via intramuscular, seguido de uma dose de 50 mg/Kg de thiopental sódico (Thionembatal[®], Abbott laboratórios, Rio de Janeiro, Brasil) por via venosa. Os ossos do antebraço foram removidos unidos deixando apenas o perióstio aderido. A peça ressecada foi então mantida conservada em formol a 10%. A descalcificação foi realizada em ácido nítrico a 7,5% por 3 a 5 dias. Após completar a descalcificação as peças foram cortadas no sentido longitudinal dividindo a falha em duas metades (Figura 28) e as extremidades removidas, restando um bloco de 25 mm de comprimento com a falha óssea no centro (Figura 29). Após serem imersas em parafina e cortadas no micrótomo as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina e Tricrômico de Gomori.

Nos animais que receberam a injeção de fluorocromos, o preparo das lâminas seguiu uma rotina diferente. Após ser removido o antebraço a peça foi cortada sem descalcificação e para tal foi utilizada uma serra de ourives, permitindo o corte com o mínimo de perda de substância. O bloco foi então seccionado ao meio sendo que uma das metades foi preparada como descrito no parágrafo anterior. A outra metade do bloco foi submetida à desidratação em soluções com gradações crescentes de álcool durante uma semana, e depois imersa em resina de acrílico. Deste pedaço foram cortadas duas lâminas consecutivas, uma para o estudo de fluorescência e a outra para coloração com Levailacvzko (Azul de metileno + Azur II + Pararosanilin).

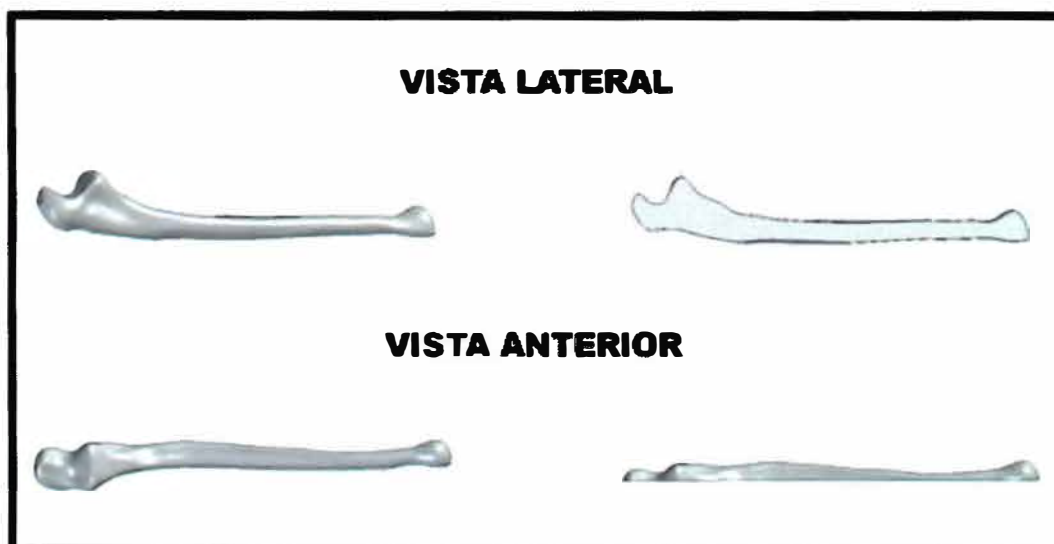


Figura 28 – Posição do corte na ulna para a histologia.



Figura 29 - A e B - Peça mais radiografia mostrando a localização e os limites do bloco delimitado para a histologia. C - Aspecto final de uma lamina histológica cortada do modo descrito.

4.10.2 Avaliação histológica

A avaliação histopatológica foi realizada por um patologista experiente que desconhecia os grupos do estudo, e avaliou as lâminas utilizando os critérios de Ambrose et al. (2004), (Tabela 7) e Lane e Sandhu (1987) (Tabela 8).

Presença de bactéria	
Acentuada	3
Moderada	2
Pouca	1
Nenhuma	0
Inflamação intra-óssea	
Severa, abscesso com fibrose	3
Moderada, com fibrose	2
Pouca, com fibrose	1
Nenhuma, apenas fibrose	0
Neo-formação óssea	
Mínima: < 25%	3
Pouca: 25 – 50%	2
Moderada: 50 – 75%	1
Completa: 75 – 100%	0

Tabela 7 – Classificação histopatológica de Ambrose et al. (2004).

União proximal	
Sem evidencia de união	0
União fibrosa	1
União osteocondral	2
União óssea	3
Organização completa da diáfise	4
União distal	
Sem evidencia de união	0
União fibrosa	1
União osteocondral	2
União óssea	3
Organização completa da diáfise	4
Ossos esponjosos	
Sem atividade de células ósseas	0
Aposição inicial de osso novo	1
Aposição ativa de osso novo	2
Ossos esponjosos organizados	3
Reorganização completa do osso esponjoso	4
Ossos corticais	
Nenhum	0
Início da formação	1
Formação em curso	2
Mais organizado	3
Completamente formado	4
Medula	
Nenhuma na área da ressecção	0
Começando a aparecer	1
Presente em mais da metade do defeito	2
Colonização completa por medula vermelha	3
Medula gordurosa madura	4

Tabela 8 – Classificação histopatológica de Lane e Sandhu (1987).

4.11 Análise estatística

Todos os dados coletados durante o estudo foram armazenados em um banco de dados do Microsoft Office Access 2007[®] (Microsoft Corporation). Para análise os dados foram transportados para o programa estatístico GraphPad Prism 3.02 (GraphPad Software, San Diego, Estados Unidos).

A análise da normalidade dos dados foi feita através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Para avaliações entre apenas dois grupos foi utilizado o teste t de Student pareado ou não pareado, ou o teste exato de Fisher. Para avaliações entre mais de dois grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey. A variância entre os dados foi previamente avaliada pelo teste de Bartlett, e quando os requisitos básicos estavam comprometidos, foi utilizado o teste não-paramétrico de Kuskal-Wallis com pós-teste de Dunn. O nível de significância estabelecido foi de $\alpha = 5\%$ (VIEIRA, 1980, 2004, 2006; PETRIE, 2006; PETRIE; SAVIN, 2007)

5. Resultados

5.1 Teste de eluição do espaçador

O peso médio dos espaçadores foi de 0,58 gramas (variando de 55 a 60 g) podendo-se deduzir que cada um possuía em média 6,8 mg de gentamicina em sua composição. O estudo foi conduzido a uma temperatura média de 25 °C (variando de 23 a 28 °C). Não houve diferença estatística na avaliação entre os espaçadores mostrando que o antibiótico se distribuiu de forma homogênea entre as amostras.

A quantidade de gentamicina liberada nas primeiras 24 horas foi significativamente maior ($p < 0,001$) que nos dias 7, 14, 21 e 28. Uma queda abrupta ocorreu entre o primeiro e o segundo dia, seguida de uma diminuição gradual entre o segundo e o décimo quarto. Entre o décimo quarto e o vigésimo primeiro dia ocorreu nova queda, e aproximadamente no meio deste período a quantidade total de gentamicina liberada pelo espaçador já não era mais superior a MIC da bactéria utilizada no estudo. No vigésimo oitavo dia apenas 20% das amostras apresentavam traços de gentamicina detectáveis pelo método (Gráfico 1 e Gráfico 2).

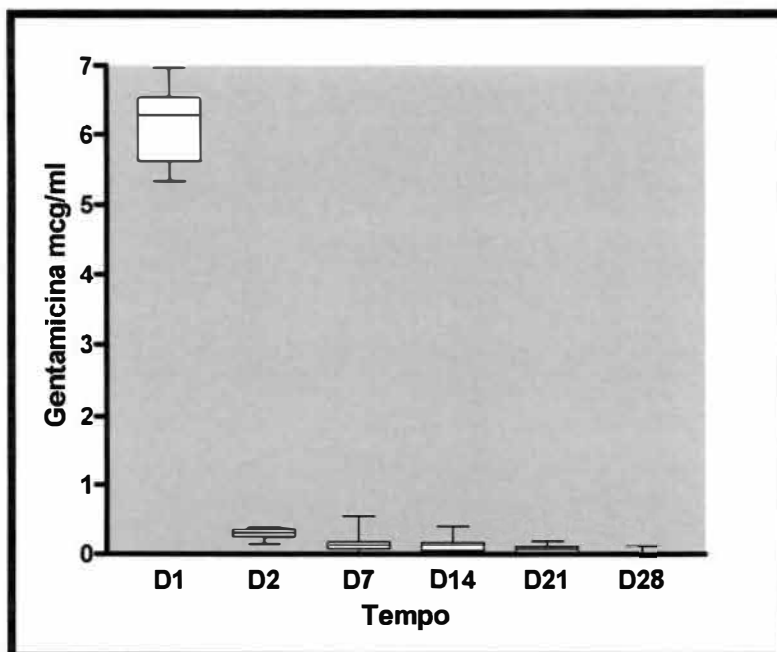


Gráfico 1 – Gentamicina eluída x tempo (média + desvio padrão). D1 > D7, D14, D21 e D28 ($p < 0,001$). D2 > D21, D28 ($p < 0,01$). D7 > D28 ($p < 0,05$). D14 > D28 ($p < 0,05$). Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn.

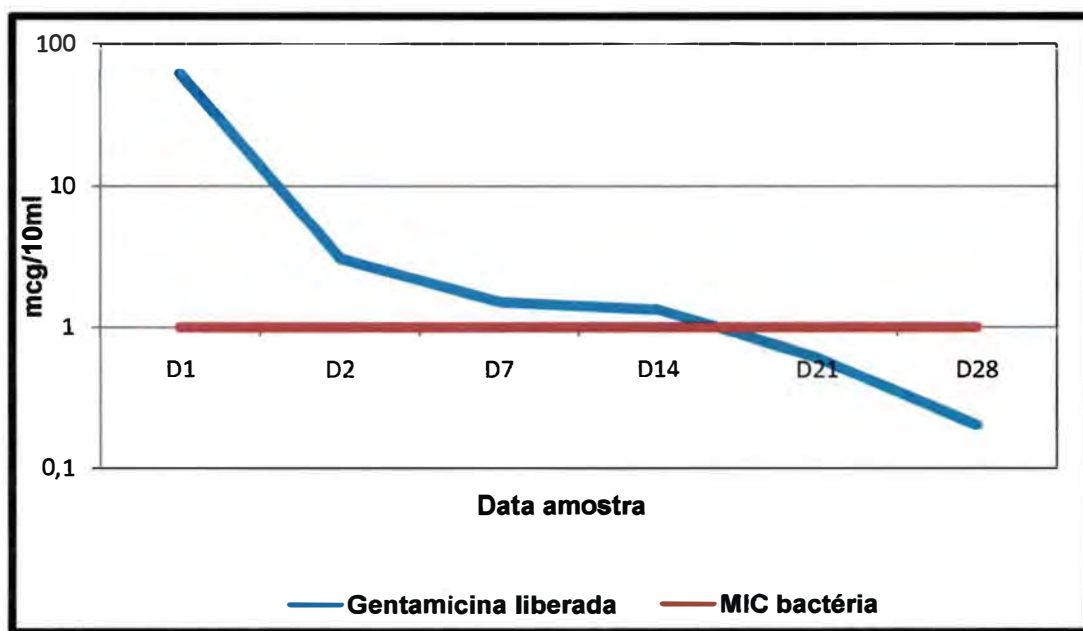


Gráfico 2 – Quantidade estimada de gentamicina liberada pelo espaçador por dia (escala logarítmica) em relação a MIC da bactéria utilizada no estudo.

5.2 Avaliação clínica

Dos trinta e cinco animais utilizados no estudo sete foram a óbito antes de completarem o seguimento sendo a taxa de mortalidade de 20%. Todos os animais que morreram pertenciam aos grupos submetidos à infecção, sendo a mortalidade entre estes animais de 25%. Três morreram de causa desconhecida e dois durante o ato anestésico. Um animal evoluiu com uma escara crônica na pata traseira e, apesar do tratamento, foi a óbito. Um dos animais apresentou uma fratura da quinta vértebra lombar, ficando paraplégico e morrendo quatro dias depois do ocorrido. Desta maneira o número final de peças por grupo e o tamanho da falha medida no intra-operatório da primeira cirurgia podem ser apreciados na Tabela 9.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Infecção da Falha	Sem Infecção		Com Infecção		
Número de Animais por grupo	5	5	10	10	10
Óbitos	0	0	4	1	2
Número Final de Peças	5	5	6	9	8
Tamanho Falha Inicial (mm) - Média	15,0	15,0	14,8	15,1	15,3

Tabela 9 – Número de animais e tamanho da falha óssea no estudo.

Apenas um animal dentre os infectados (grupo 4) apresentou sinais clínicos e radiográficos de recidiva da infecção após o tratamento, evoluindo para osteomielite crônica com fistula produtiva na ferida. Os dados deste animal foram mantidos para as avaliações referentes ao tratamento da infecção, porém excluídos na avaliação para regeneração óssea, pois a infecção causou destruição óssea intensa e um padrão de regeneração diverso dos outros animais (Figuras 30 e 31).

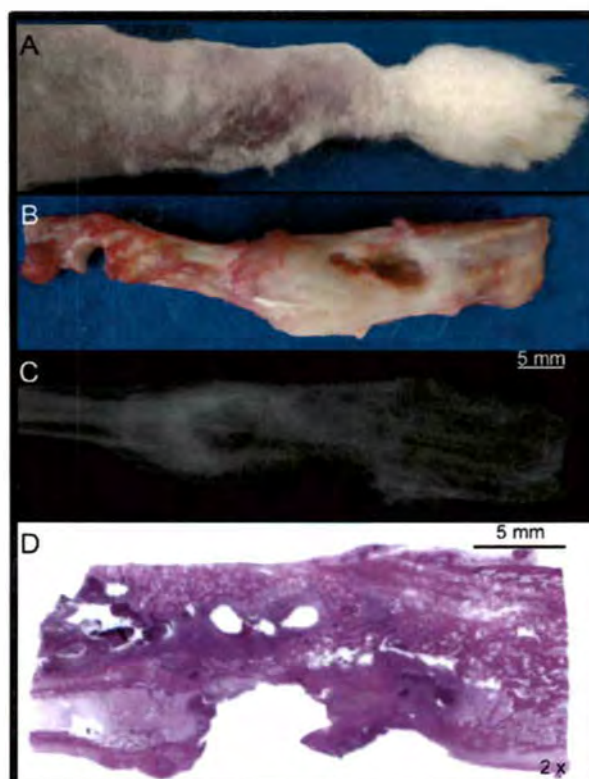


Figura 30 – Animal excluído devido a recidiva da infecção. A - Aspecto clínico com 12 semanas. B - Peça dissecada com 12 semanas mostrando calo ósseo abundante no local da falha. C - Radiografia mostrando destruição intensa da arquitetura óssea. D - Histologia mostrando fusão radio-ulnar associada a intenso processo inflamatório acometendo principalmente o rádio (Hematoxilina-Eosina, aumento 2 vezes).

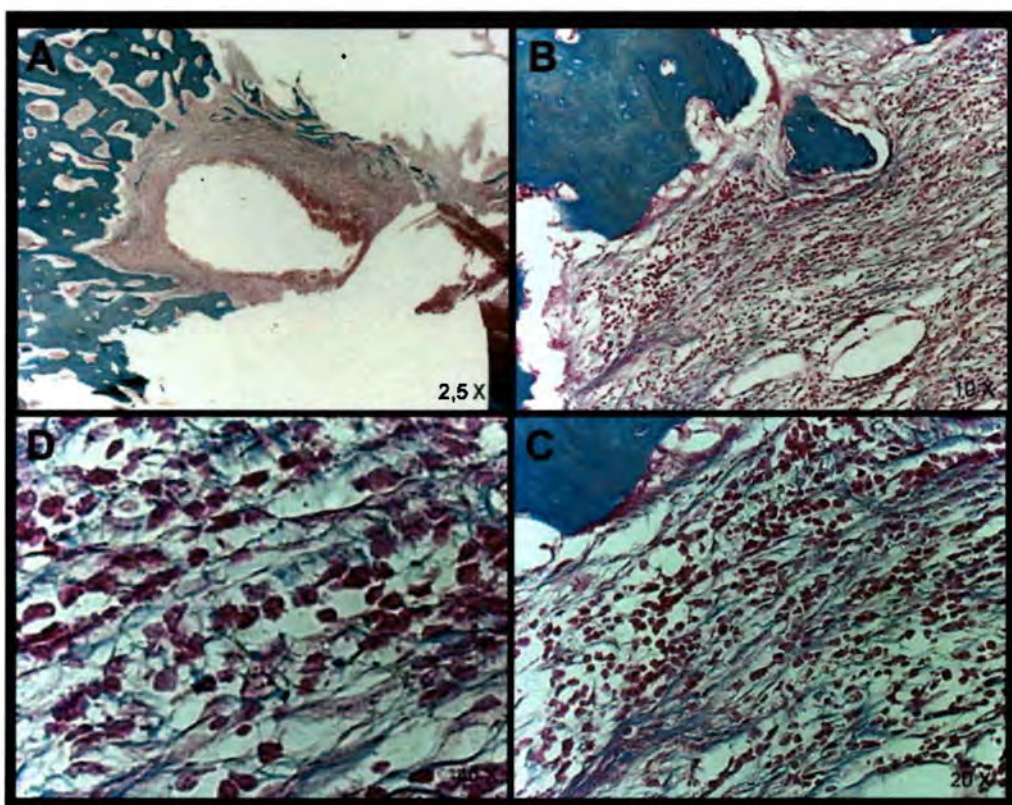


Figura 31 - Animal excluído devido a infecção, mostrando intenso processo inflamatório, associado a neof ormación óssea.

5.2.1 Avaliação clínica da infecção da falha óssea

Dos trinta animais inoculados vinte e oito resistiram às duas semanas iniciais de infecção (80%), sendo então submetidos ao desbridamento da ferida. Depois das primeiras quatro semanas de tratamento, quando foi realizada a retirada do espaçador, em dois dos animais foi percebido que junto a uma das extremidades, havia o acúmulo de uma pequena quantidade de pus. Na avaliação com 12 semanas apenas um (4,3%) animal apresentou sinais clínicos de recidiva da infecção com uma fístula produtiva. Um dos animais, que durante a fase de infecção havia desenvolvido uma tenossinovite dos tendões extensores, apresentou um abscesso dentro da bainha tendinea, sem contato com a falha óssea. O resultado da avaliação clínica durante o estudo está sumarizado na tabela 10.

Aspecto clínico da ferida	n	%
Normal	0	0
Inflamado	8	29
Infectado	20	71
Deiscência	0	0
Necrose	0	0
Achados intra-operatórios		
Sem alterações	0	0
Inflamação	3	11
Infectado	25	89
Aspecto clínico da ferida após o tratamento (4ª semana)		
Cicatrizada	14	61
Abscesso	2	9
Fístula produtiva	0	0
Deiscência	7	30
Aspecto clínico da ferida ao final do estudo (12ª semana)		
Cicatrizada	21	92
Abscesso	1	4
Fístula Produtiva	1	4
Deiscência	0	0

Tabela 10 – Avaliação clínica da infecção induzida

O tamanho médio da falha medida no intra-operatório dos animais com infecção aumentou após o desbridamento, passando de 15 mm para 16,3 mm ($p < 0,0001$)

demonstrando que a infecção e o desbridamento aumentaram o tamanho da falha inicial de forma significativa (Tabela 11 e Gráfico 3).

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Infecção da falha	Sem Infecção		Com Infecção		
Tamanho falha inicial (mm)	15,0	15,0	14,8	15,1	15,3
Tamanho da falha pós (mm)	---	---	16,7	16,3	16,0
<i>p</i>	---	---	0,04	0,00	0,01

Tabela 11 – Tamanho da falha medida no intra-operatório. Teste t pareado.

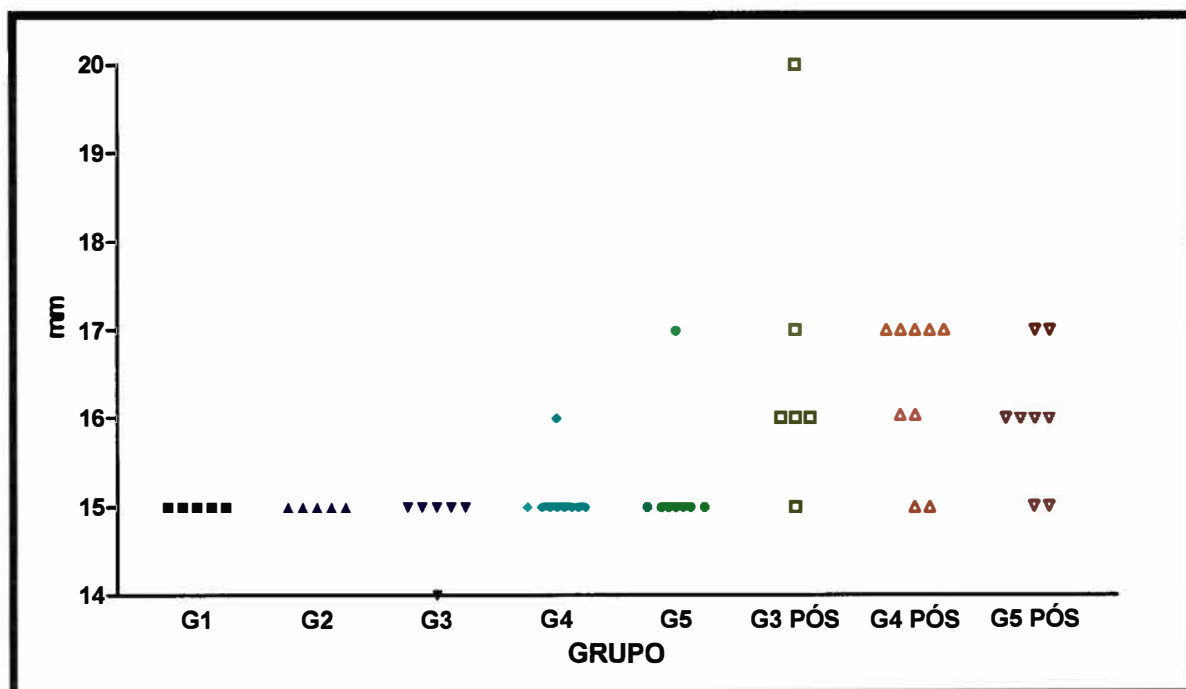


Gráfico 3 – Tamanho da falha inicial e após desbridamento.

5.2.2 Peso dos animais durante o seguimento.

Tanto os animais sem infecção quanto os com infecção apresentaram perda ponderal nas primeiras duas semanas. Em seguida esta perda foi acompanhada da recuperação progressiva do peso, mais acelerada nos animais previamente infectados (Gráfico 4).

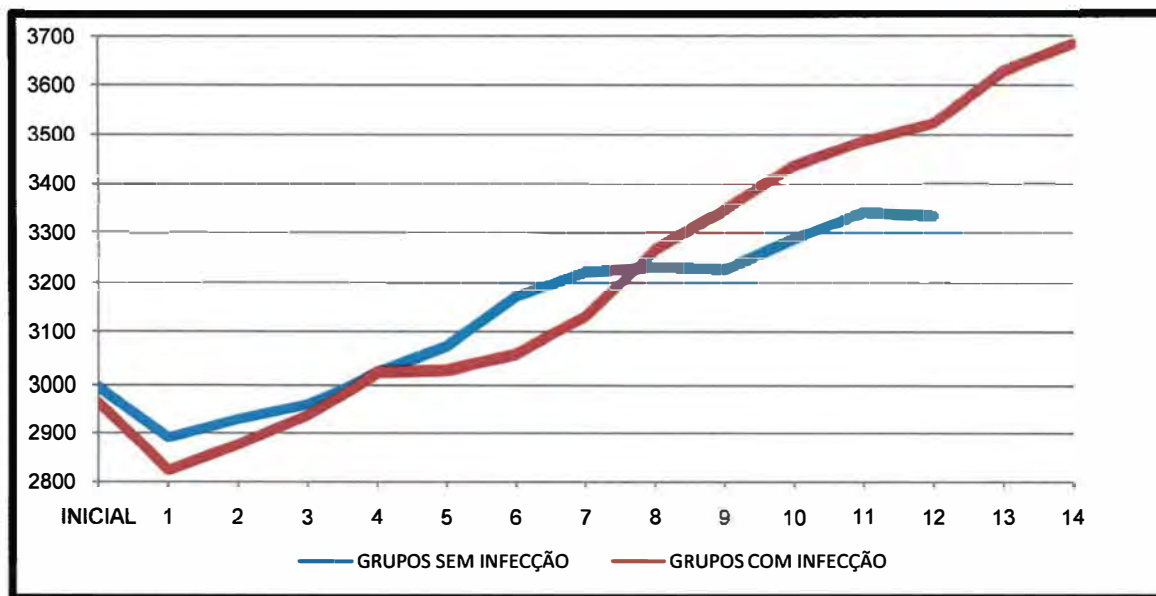


Gráfico 4 – Peso dos animais durante o estudo em gramas.

5.3 Avaliação microbiológica da infecção

A identificação bacteriana em Ágar-sangue e no MicroScan apresentaram positividade para o crescimento de *S. aureus*, confirmando a infecção. Apenas duas das amostras apresentaram crescimento adicional de outros germes, porém estes foram avaliados e considerados como contaminantes habituais das amostras do laboratório. O antibiograma confirmou que todas as bactérias eram sensíveis à gentamicina com 96% delas apresentando MIC semelhante ao da bactéria inoculada, e as restantes com MIC igual a dois. A comparação entre o perfil de sensibilidade da bactéria inoculada e das recuperadas não mostrou diferença estatística ($p = 0,1$). Duas cepas demonstraram antibiograma diferente do da bactéria inoculada, sendo um beta-lactamase sensível e o outro metilina-resistente (Tabela 12).

Amox/Clev	Ampicilubactam	Cefazolina	Ceftriaxona	Ciprofloxacina	Clindamicina	Eritromicina	Gatifloxacina	Gentamicina	Levofloxacina	Linezolid	Oxacilina	Rifampicina	Synercid	Tetraciclina	Trimetropina/Sulfa	Vancomicina	MIC
S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	2
S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
S	I	S	S	S	I	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	1
S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
S	S	S	S	S	S	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	1
S	I	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
S	I	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
S	S	Blac	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	2
S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	2
S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	1

Tabela 12 – Perfil de sensibilidade a antibióticos das bactérias recuperadas durante o desbridamento da infecção. Em laranja cepa original, em vermelho as diferenças em relação a cepa original. R - Resistente, S - Sensível, I - Indeterminado, Blac - Não testado.

5.4 Avaliação radiográfica

5.4.1 Infecção óssea.

Não houve diferença estatística entre os grupos 3, 4 e 5 na avaliação da infecção óssea pelos critérios de Calhoun e Mader (1997), em nenhum dos tempos avaliados. Os resultados podem ser avaliados no gráfico 5, e como descrito anteriormente apenas um animal apresentou recidiva da infecção após o tratamento, o que explica os valores mais altos obtidos pelo grupo 4.

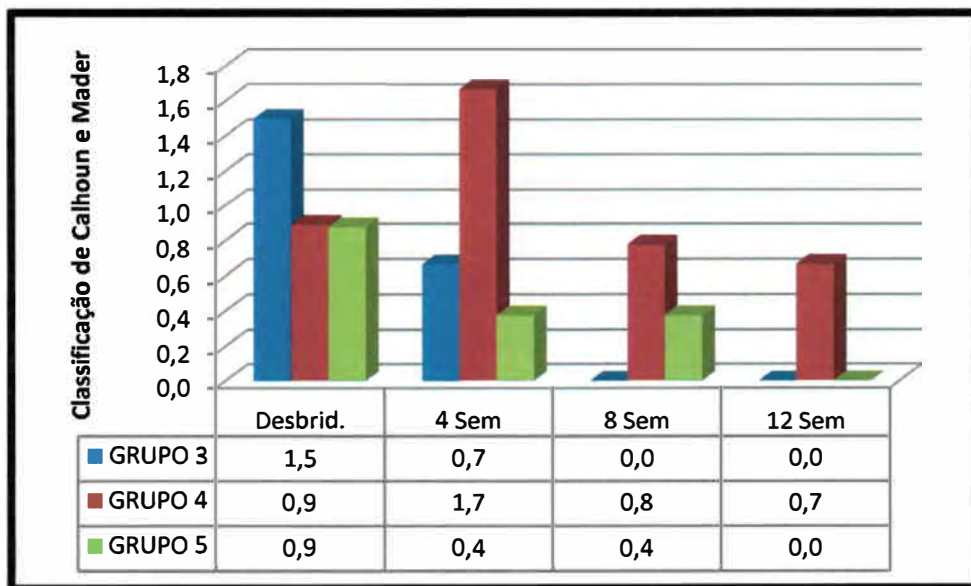


Gráfico 5 – Avaliação radiográfica da infecção óssea durante o seguimento.

5.4.2 Regeneração da falha óssea.

A distância carpo-falha, dos animais não infectados, foi em média 4 mm menor do que a dos com infecção ($p < 0,0001$). Este achado sugere que as falhas estavam localizadas mais próximas da região metafisária, porém a comparação entre os grupos isoladamente não mostrou diferença estatística. O tamanho inicial da falha na avaliação radiográfica foi significativamente menor para os grupos 1 e 2 em relação aos grupos 3, 4 e 5 ($p < 0,001$), porém não houve diferença estatística entre os grupos do estudo. Com quatro semanas o grupo 2 apresentava o menor tamanho médio da falha (1,6 mm) e o grupo 4 o maior tamanho médio (16,3 mm) e apenas entre estes houve diferença estatística ($p < 0,001$) (Tabela 11). Não houve diferença entre os grupos com 8 semanas, e na avaliação final com 12 semanas houve diferença apenas entre os grupos 1 e 2 versus o grupo 5 ($p < 0,05$).

Todas as falhas não infectadas estavam regeneradas ao final do estudo, porém algumas falhas infectadas não regeneraram ($p < 0,05$) (Tabela 11). Desta forma os animais infectados iniciaram e terminaram o estudo com um tamanho médio da falha significativamente maior. O percentual de falhas com união óssea foi de 100% nos grupos 1 e 2, caiu para 67% no grupo 3 e no grupo 5 apenas 25% das falhas apresentavam união entre as extremidades (Tabela 13).

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Infecção da Falha	Sem Infecção		Com Infecção		
Distância carpo-falha	14,0	14,4	18,1	18,6	17,7
Tamanho da falha inicial (mm)+	14,8⁺	14,2⁺	16,3	16,2	16,0
Tamanho da falha 4 semanas	10,4	1,6	9,8	16,3	9,0
Tamanho da falha 8 semanas \emptyset	3,4	1,0 ^{\emptyset}	7,6	5,8	5,5
Tamanho da falha 12 semanas \neq	0,0^{\neq}	0,0^{\neq}	2,6	4,3	8,1
União óssea %	100	100	67	56	25

Tabela 13 – Avaliação do tamanho da falha óssea no decorrer do estudo. + G1 > G3, G4 ($p < 0,05$). G2 > G3, G4 e G5 ($p < 0,01$). \emptyset G2 > G4 ($p < 0,001$). \neq G1 > G5 ($p < 0,05$), G2 > G5 ($p < 0,05$). ANOVA com pós-teste de Tykey.

Ao avaliar a regeneração óssea através do percentual de preenchimento da falha não houve diferença com quatro semanas de seguimento. Na avaliação com 8 semanas os grupos 1 e 2 apresentaram preenchimento ósseo do defeito significativamente maior do que os grupos 3, 4 e 5 isoladamente, porém, com 12 semanas, apenas o grupo 1 manteve a diferença significativa (Tabela 14 e Gráfico 7). Os animais que fizeram uso do espaçador de PMMA apresentaram os melhores resultados quanto ao preenchimento da falha óssea, tanto na ausência de infecção ($p = 0,07$) quanto na sua presença ($p = 0,09$), porém estes resultados não foram significativos. A avaliação radiográfica através dos critérios de Lane e Sandhu (1987), mostrou que o grupo 1 teve os melhores resultados finais principalmente quando comparado ao animais infectados (Tabela 14).

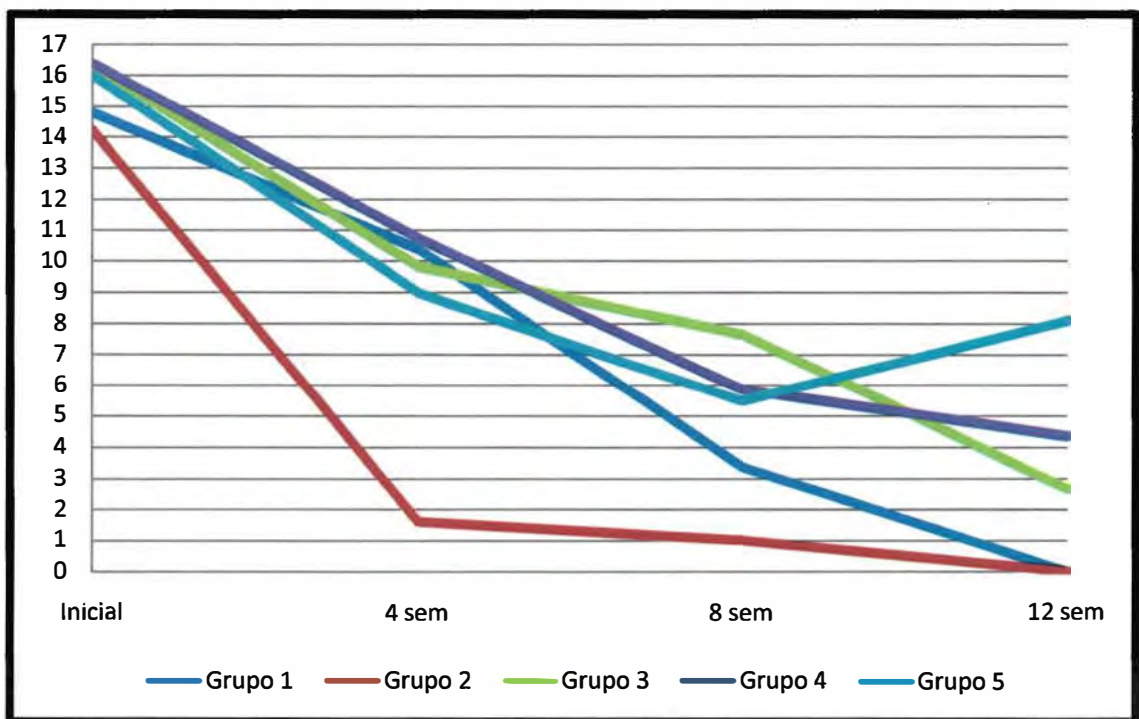


Gráfico 6 – Tamanho da falha óssea em mm no decorrer do estudo.

Na classificação de Ambrose et al. (2004), valores menores significam um resultado superior, e novamente o grupo 1 apresentou diferença estatística em relação ao grupo 5 ($p < 0.01$) (Tabela 14, Figura 32 e Gráficos 7, 8 e 9). A análise da densidade do regenerado

demonstrou que os grupos 1 e 2 apresentaram resultados significativamente superiores aos dos grupos 3, 4 e 5 isoladamente (Tabela 14).

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Infecção da Falha	Sem Infecção		Com Infecção		
Preenchimento da falha 4 sem %	20	50	29	19	16
Preenchimento da falha 8 sem % +	75 ⁺	70 ⁺	33	31	28
Preenchimento da falha 12 sem % *	90 [*]	75 [*]	46	34	31
Classificação de Lane 12 sem ‡	8,6 [‡]	6,4	4,3	3,3	2,8
Classificação de Ambrose 12 sem ≠	0,60 [≠]	1,6 [≠]	4,6	7,5	10,6
Histograma ¥	80,9 [¥]	80,7 [¥]	57,9	60,5	58,8

Tabela 14 – Percentual de preenchimento da falha e resultados da avaliação pelos critérios de Lane e Sandhu (1987), Ambrose et al. (2004), e análise da densidade do regenerado. + G1 > G5 ($p < 0,05$). *G1 > G3, G4, G5 ($p < 0,001$), G2 > G3 ($p < 0,05$), G2 > G4, G5 ($p > 0,001$). ‡ G1 > G3 ($p < 0,01$), G1 > G4, G5 ($p < 0,001$). ≠ G1 > G5 ($p < 0,01$), G2 > G5 ($p < 0,05$). ¥ G1 > G3, G5 ($p < 0,001$), G1 > G4 ($p < 0,01$), G2 > G3, G5 ($p < 0,001$), G2 > G4 ($p < 0,01$). ANOVA com pós-teste de Tykey.

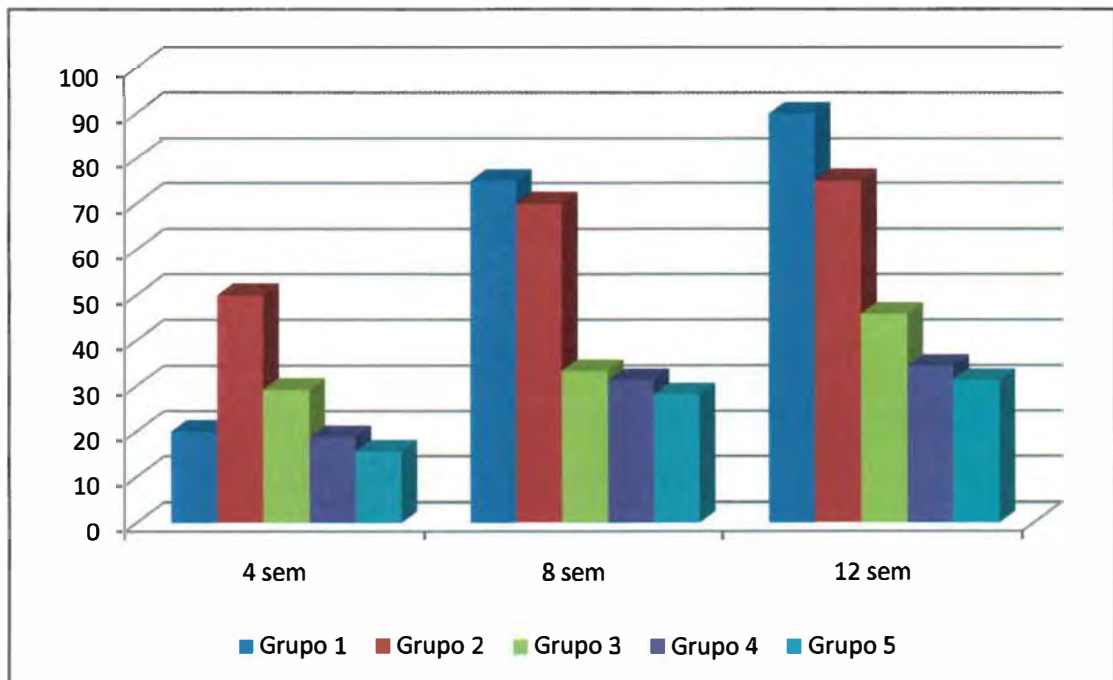


Gráfico 7 – Percentual de preenchimento da falha durante o estudo.

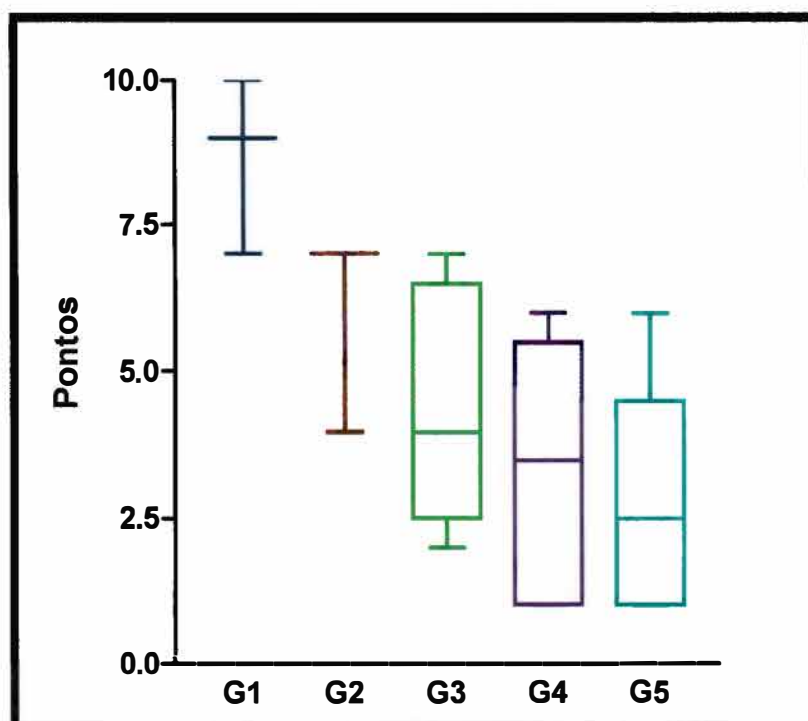


Gráfico 8 - Resultado da avaliação radiográfica pela classificação de Lane e Sandhu, (1987), média + desvio padrão

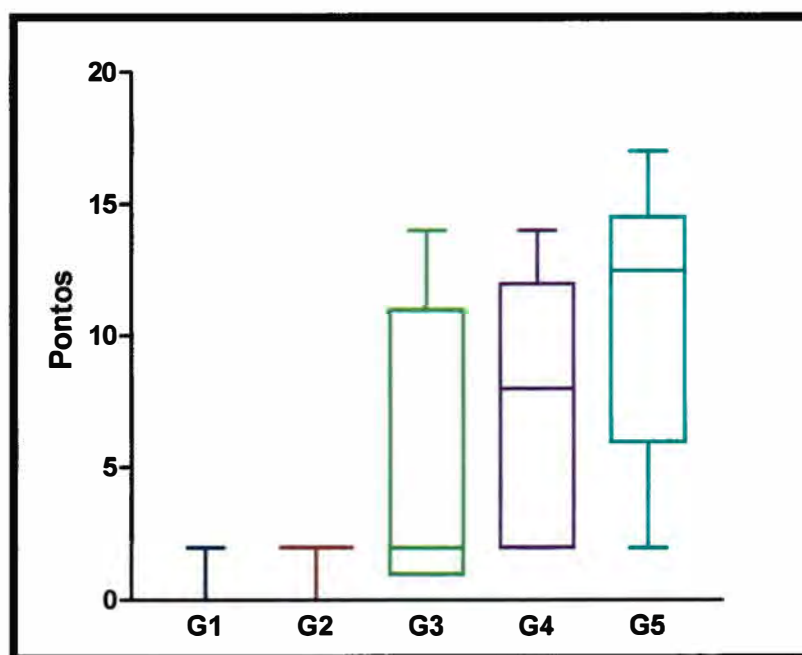


Gráfico 9 - Resultado da avaliação radiográfica pela classificação de Ambrose et al. (2004), média + desvio padrão

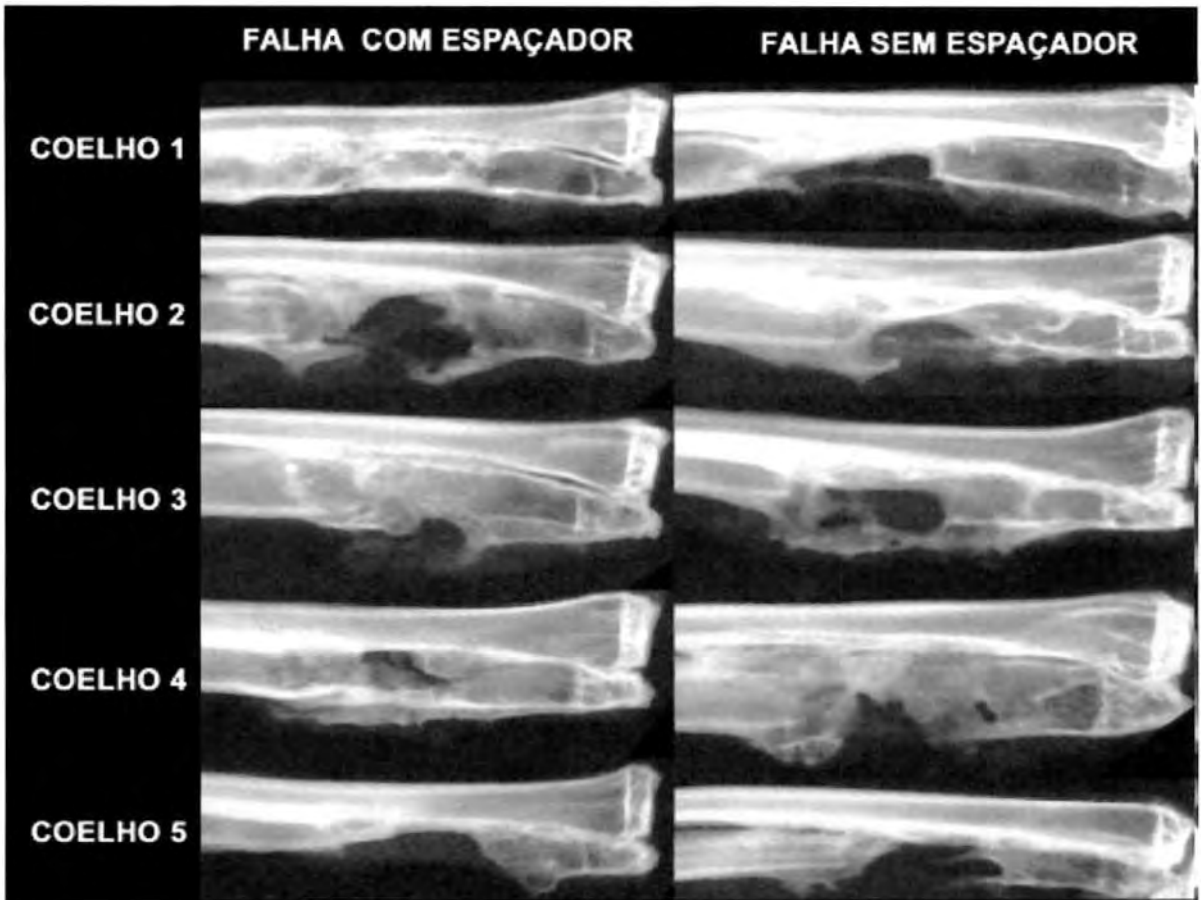


Figura 32 - Resultado final da regeneração óssea nos grupos sem infecção.

5.4.3 Infecção na regeneração da falha óssea.

O impacto da infecção sobre a regeneração da falha óssea foi avaliado ao se analisar em conjunto os resultados dos grupos 1 e 2 (falha óssea não infectada com e sem uso do espaçador de PMMA + ATB) com o dos grupos 3 e 5 (falha óssea infectada com e sem o uso do espaçador de PMMA + ATB). Em todos os critérios avaliados a infecção teve um impacto negativo significativo ($p < 0,001$) sobre a regeneração óssea (Tabela 15 e Figuras 33, 34, 35, 36 e 37).

Parâmetro avaliado	Impacto da infecção na regeneração			Impacto do espaçador na regeneração		
	Sem Infecção	Com Infecção		Sem espaçador	Com Espaçador	
Grupos do Estudo	Grupo 1 + 2	Grupo 3 + 5	<i>p</i>	Grupo 2 + 5	Grupo 1 + 3	<i>p</i>
Preenchimento 12 sem (%)	82,5	37,5	0,001	48,1	65,9	0,11
Class. Lane 12 sem	7,5	3,5	0,001	4,2	6,3	0,07
Class. Ambrose 12 sem	1,1	8,1	0,001	7,2	2,8	0,06
Histograma	80,8	58,5	0,001	67,3	68,4	0,84

Tabela 15 – Avaliação da ação da infecção e do uso do espaçador de PMMA com antibiótico sobre a regeneração óssea. Teste t não pareado.

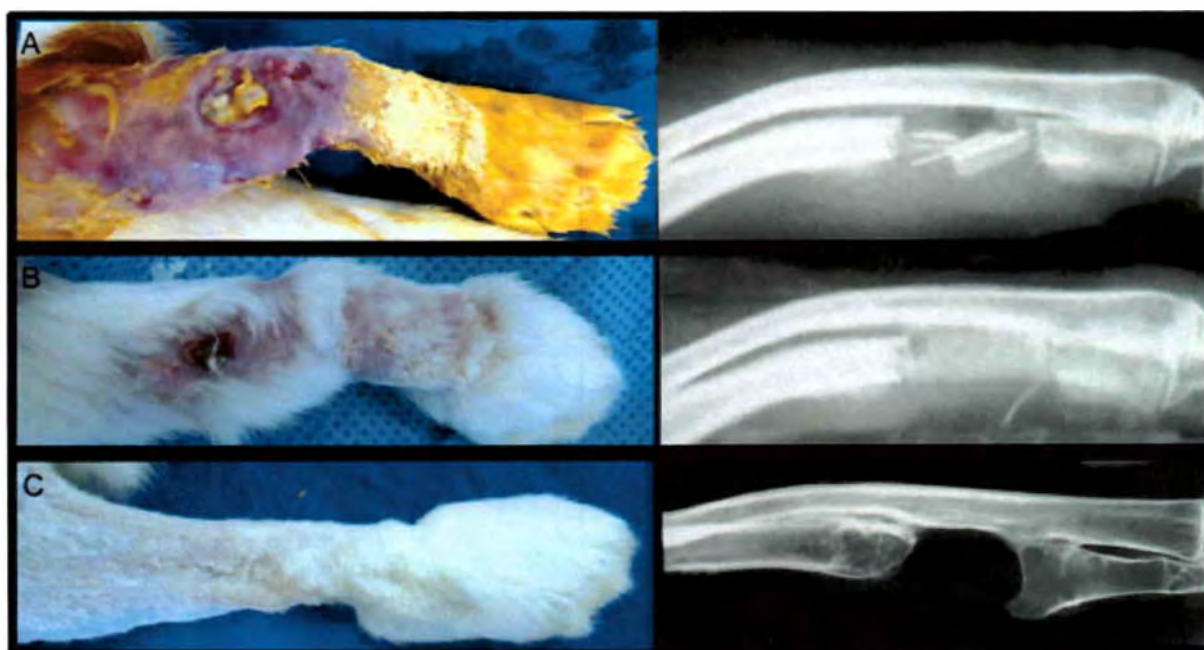


Figura 33 – Regeneração de partes moles em animal do grupo 4. A - No momento do desbridamento. B - Com 4 semanas antes da retirada do espaçador. C - Com 12 semanas ao final do estudo regeneração completa das partes moles e não-regeneração óssea.

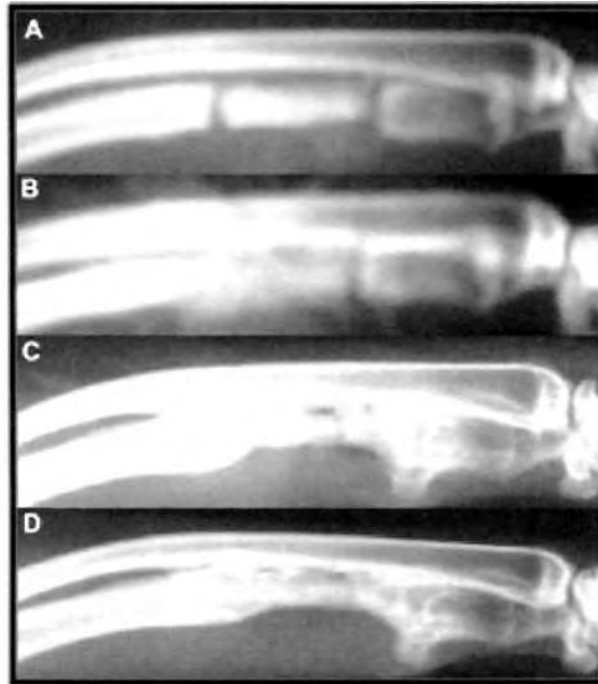


Figura 34 – Radiografia de animal do grupo 3. A – Segmento infectado antes do desbridamento. B – Radiografia com o espaçador no lugar. C – Radiografia com 8 semanas. D – Radiografia final 12 semanas.

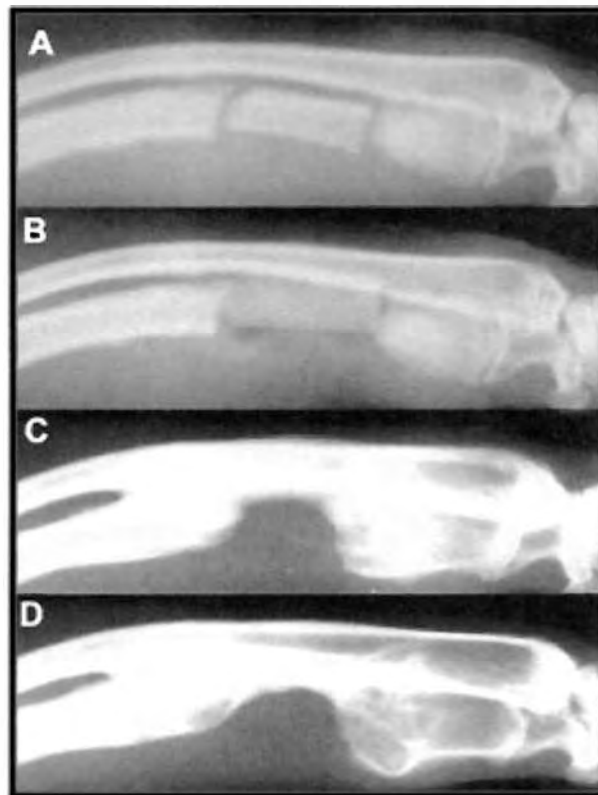


Figura 35 – Radiografia de animal do grupo 4. A – Antes do desbridamento. B – Espaçador colocado na falha óssea. C – Radiografia com 8 semanas. D – Radiografia final com 12 semanas.

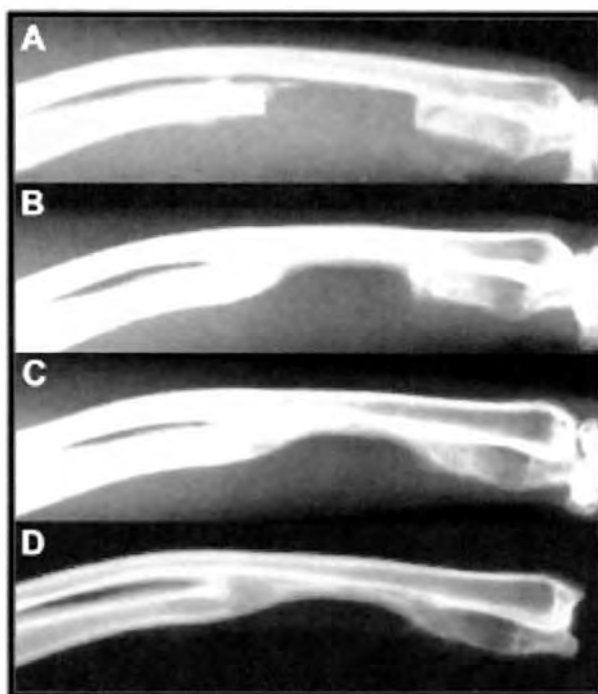


Figura 36 – Radiografia de animal do grupo 5. A – Falha após o desbridamento. B – Radiografia com 4 semanas. C – Radiografia com 8 semanas. D – Radiografia final com 12 semanas.

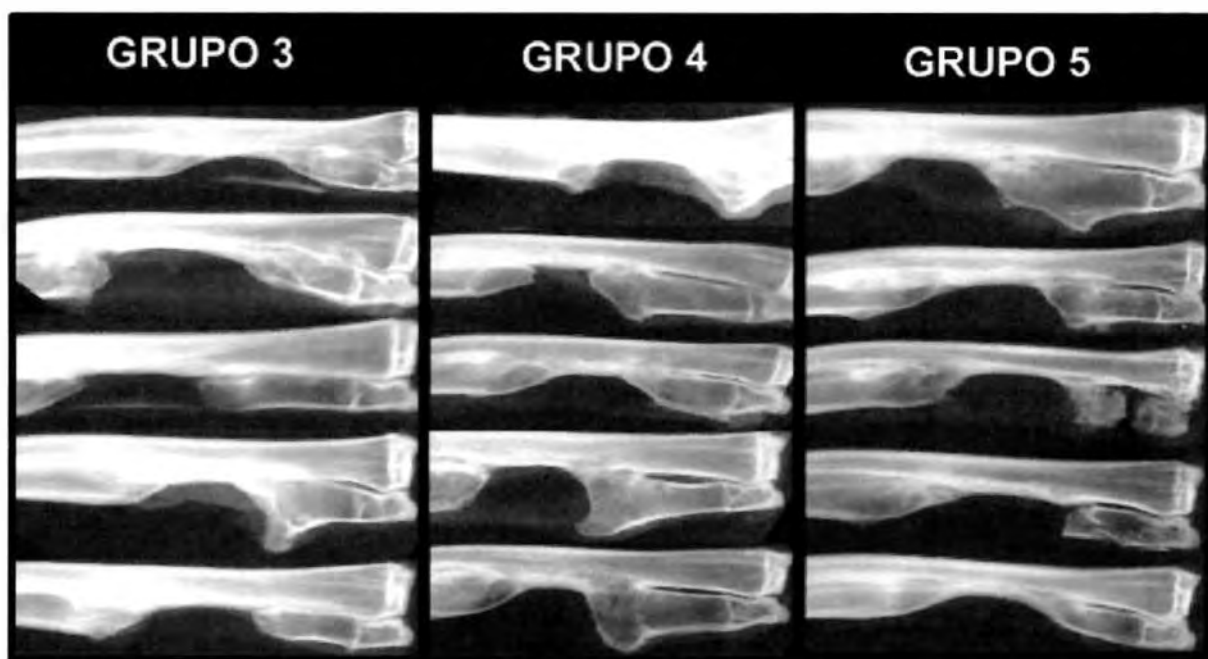


Figura 37 – Resultado final de alguns dos animais dos grupos com infecção. Nota-se que apenas em alguns animais do grupo 3 pode ser vista a imagem do periósteo calcificado sobre a falha.

5.4.4 Espaçador de PMMA + ATB na regeneração da falha óssea.

O impacto da utilização do espaçador de PMMA sobre a regeneração da falha óssea foi avaliado ao se analisar em conjunto os resultados dos grupos 2 e 5 (falha óssea com e sem infecção que não fizeram uso do espaçador de PMMA + ATB) com o dos grupos 1 e 3 (falha óssea com e sem infecção que fizeram uso do espaçador de PMMA + ATB). Em todos os critérios avaliados os grupos que fizeram uso do espaçador apresentaram resultados superiores, com tendência a significativo ($p < 0,07$) pelos resultados dos escores radiográficos (Tabela 13). A análise da interação entre o espaçador e a infecção mostra que a combinação do uso do espaçador na ausência de infecção produziu os melhores resultados sobre a regeneração óssea ($p < 0.001$) (Tabela 15, Gráfico 10 e Figura 38).



Figura 38 - Radiografia de animal do grupo 1. A - Espaçador no lugar preenchendo a falha óssea. B - Radiografia com 4 semanas após a retirada do espaçador mostrando ossificação do periósteo sobre o espaçador. C - Radiografia com 12 semanas.

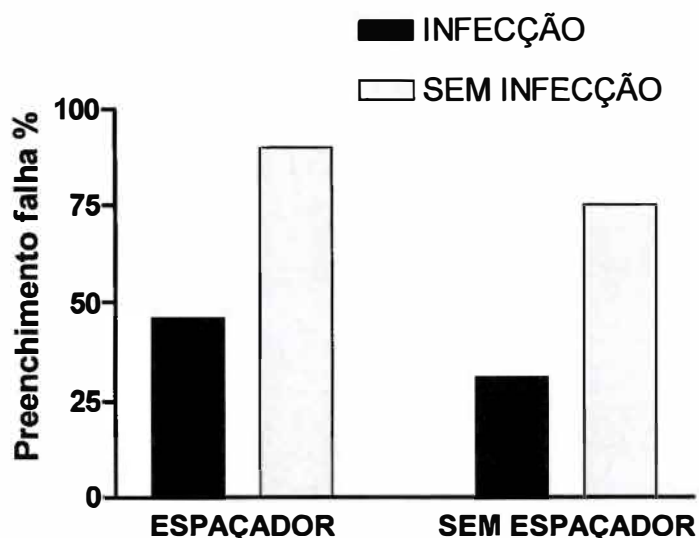


Gráfico 10 – Análise da interação infecção x espaçador levando-se em consideração o critério percentual de preenchimento da falha com 12 semanas.

5.4.5 Ação do perióstio sobre a regeneração da falha óssea infectada.

O impacto da ressecção do perióstio na presença do espaçador de PMMA + ATB pode ser avaliado ao se comparar os resultados dos grupos 3 e 4. Apesar do grupo 3 apresentar resultados superiores em praticamente todos os critérios avaliados (Tabela 12), estes resultados não foram significativos.

Parâmetro avaliado	Impacto do perióstio na regeneração		ρ
	Com perióstio	Sem perióstio	
Grupos do Estudo	Grupo 3	Grupo 4	
Preenchimento 12 sem %	46	34	0.20
Class. Lane 12 sem	4,3	3,3	0.41
Class. Ambrose 12 sem	4,6	7,5	0.33
Histograma	57,9	60,5	0.51

Tabela 16 – Avaliação da ação do perióstio na regeneração da falha óssea infectada com espaçador de PMMA com antibiótico.

5.5 Avaliação histológica

A avaliação dos dados histológicos através dos critérios de Lane e Sandhu (1987), mostraram que o grupo 3 apresentou os piores resultados quanto à união do regenerado com a diáfise, apresentando resultados significativamente inferiores aos demais grupos. Nos critérios que avaliaram a maturidade do osso esponjoso e do cortical, os grupos não infectados apresentaram resultados superiores aos grupos infectados (Gráfico 11). Na avaliação do resultado final novamente ficou evidente a superioridade na regeneração óssea pelos grupos não infectados (Gráfico 12).

Na análise dos dados histológicos através dos critérios de Ambrose et al. (2004), não foi visualizada presença de bactérias dentro do osso. Não houve diferença entre os grupos na inflamação intra-óssea. No critério neo-formação óssea o grupo 2 apresentou um percentual de regeneração da falha significativamente melhor do que os grupos infectados (Gráfico 13). A avaliação do resultado final mostrou que os grupos 1 e 2 (não-infectados) tiveram um resultado global significativamente superior aos grupos 3, 4 e 5 (Gráfico 14). Vale salientar que assim como no escore radiográfico valores menores significam um melhor resultado.

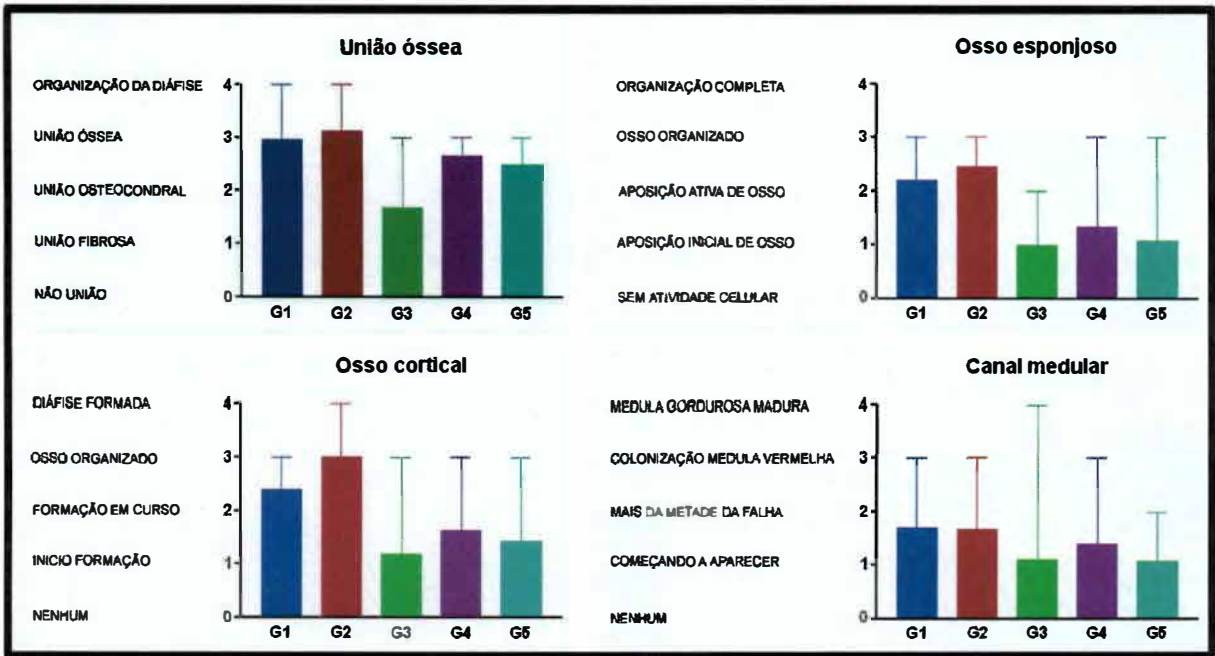


Gráfico 11 - Resultado dos critérios avaliados pela classificação de Lane e Sandhu (1987)

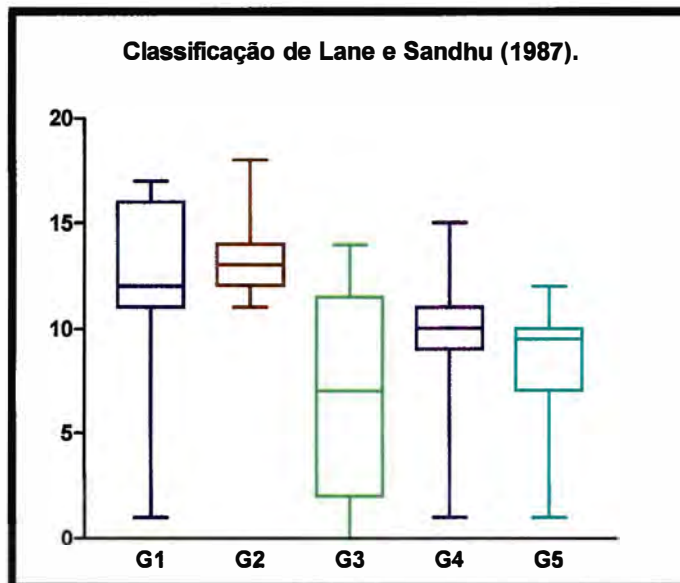


Gráfico 12 - Resultado final da avaliação histológica pela classificação de Lane e Sandhu (1987).

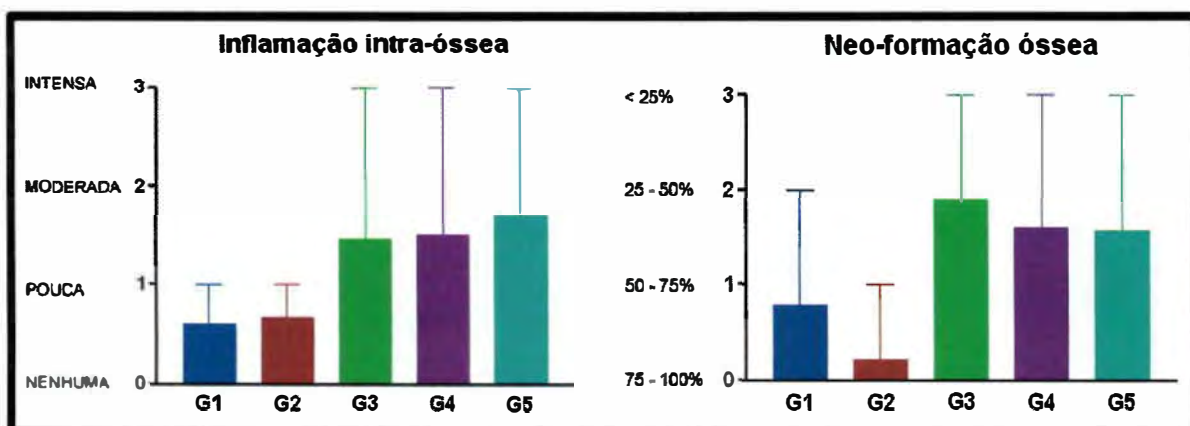


Gráfico 13 - Resultado dos critérios avaliados pela classificação de Ambrose et al (2004).

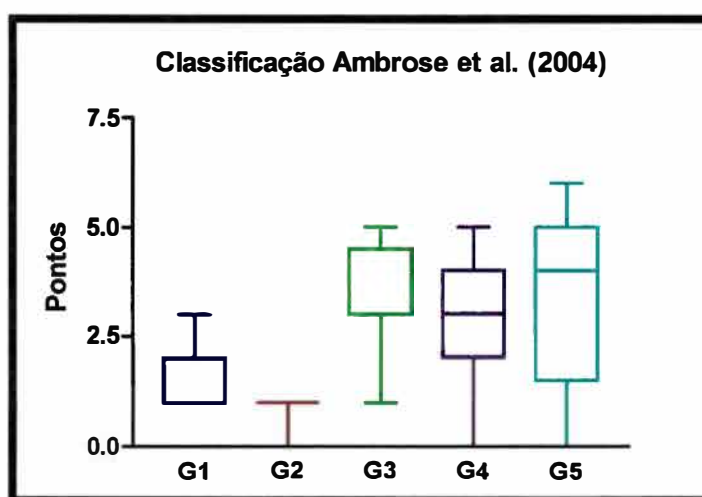


Gráfico 14 - Resultado da avaliação histológica pela classificação de Ambrose et al. (2004).

A deposição de osso novo pelo periosteio tanto na sua borda livre como na região da falha foi observado já com duas semanas (Figuras 39, 40). Apesar disso, a região da falha óssea não apresentava deposição óssea importante após o desbridamento (Figura 41). Mesmo nas falhas que não apresentaram regeneração pode-se observar na décima - segunda semana sinais de que a recanalização do canal medular continuava em andamento (Figura 42). A produção óssea foi mais acentuada na região da falha em contato com o rádio, onde existe uma melhor condição de partes moles e de vascularização (Figura 43) e frequentemente nesta região ocorreu fusão entre a cortical ulnar regenerada e a cortical do rádio (Figura 44).

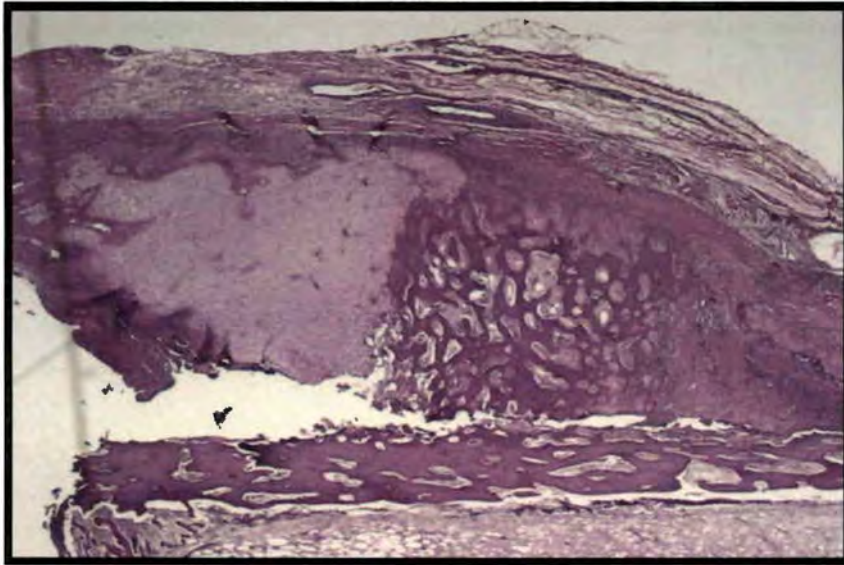


Figura 39 - Formação óssea em grande quantidade pela borda livre do periósteo na margem da falha com duas semanas de evolução, em animal do grupo 1 que morreu durante a anestesia. Coloração Hematoxilina-eosina, 2,5x.

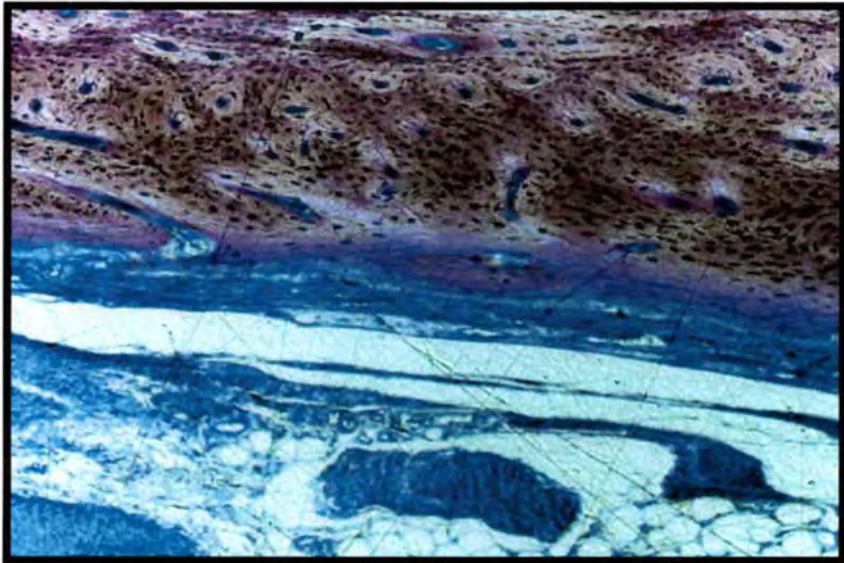


Figura 40 - Deposição óssea pela periósteo. Coloração Levailacvzko, 20x.

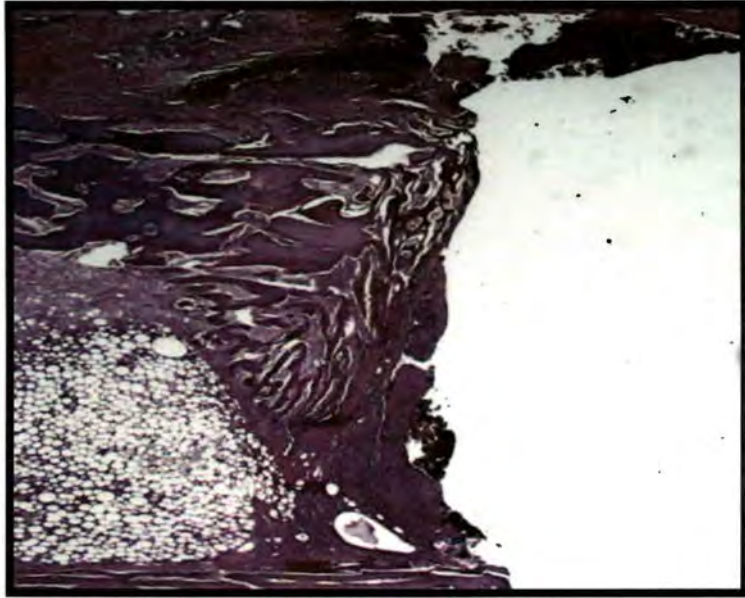


Figura 41 - Falha óssea vazia após o desbridamento em animal do grupo 1 que morreu durante a anestesia. Hematoxilina-eosina, 2,5x.

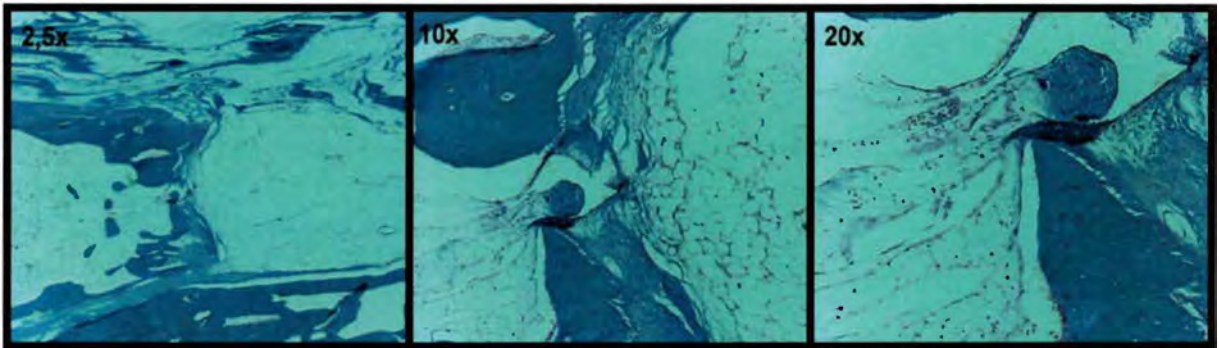


Figura 42 - Recanalização do canal medular com 12 semanas em falha óssea que não regenerou.



Figura 43 - Deposição óssea pelo perióstee sobre a falha e reconstituição completa da diáfise ulnar em contato com o radio. Grupo 3, Coloração Levailaczko, 2,5x.

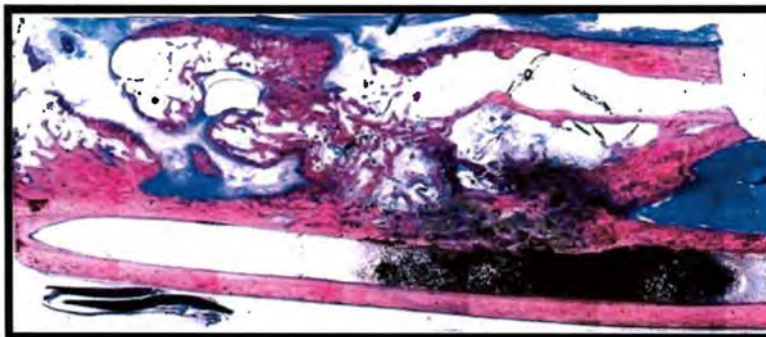


Figura 44 - Falha óssea completamente preenchida pela regeneração óssea. Grupo 1, Coloração Levailaczko, 2,5x.

O estudo de fluorescência demonstrou que apesar da maior parte da regeneração óssea ter ocorrido nas primeiras 4 semanas, na 8ª e na 12ª semana ainda era importante a remodelação no local (Figuras 45 e 46). Na figura 47 pode-se observar o estreitamento da regeneração em uma falha onde não foi utilizado o espaçador e na figura 48 a diferença entre o padrão ósseo com quatro semanas em pontos distintos da falha ossea.

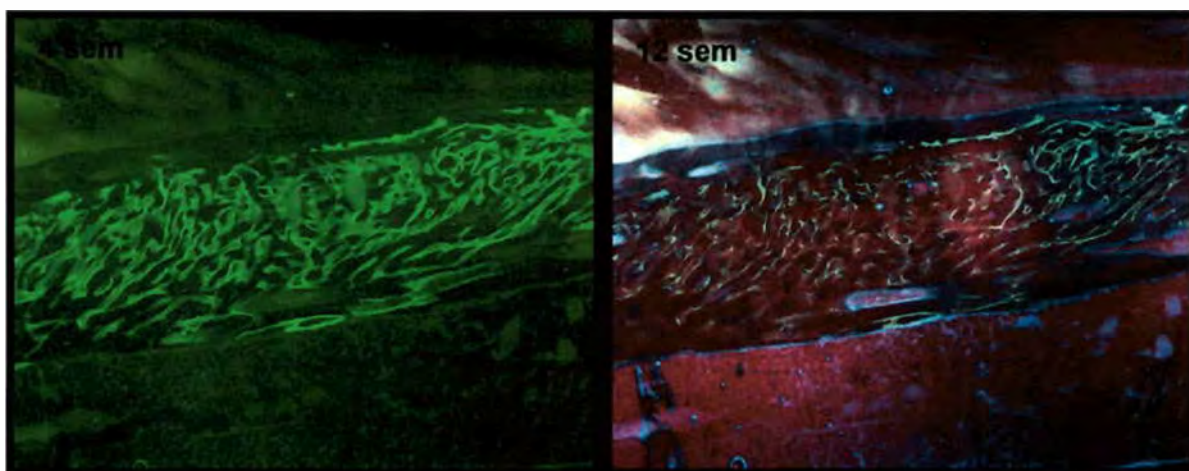


Figura 45 – Fluorescência mostrando que a maior parte da deposição óssea se deu no primeiro mês. A esquerda coloração com calceína administrada com 4 semanas do experimento. A direita oxitetraciclina administrada as 12 semanas. Calceína e oxitetraciclina, aumento 2,5x.

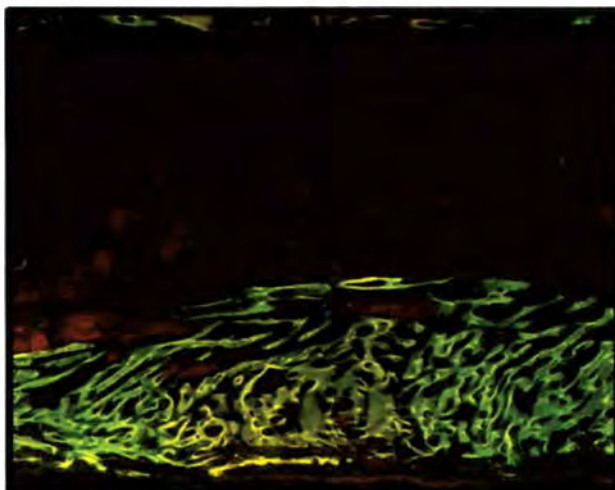


Figura 46 - Fluorescência mostrando a diferença entre a deposição ossea com 4 semanas em verde e 8 semanas em vermelho. Calceína e Alisarina, aumento 2,5x.

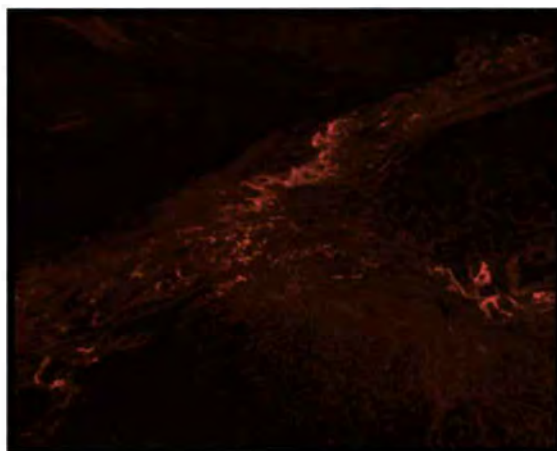


Figura 47 – Fluorescência mostrando estreitamento da região central da falha com 8 semanas em animal que não utilizou espaçador. Alisarina, aumento 2,5x.

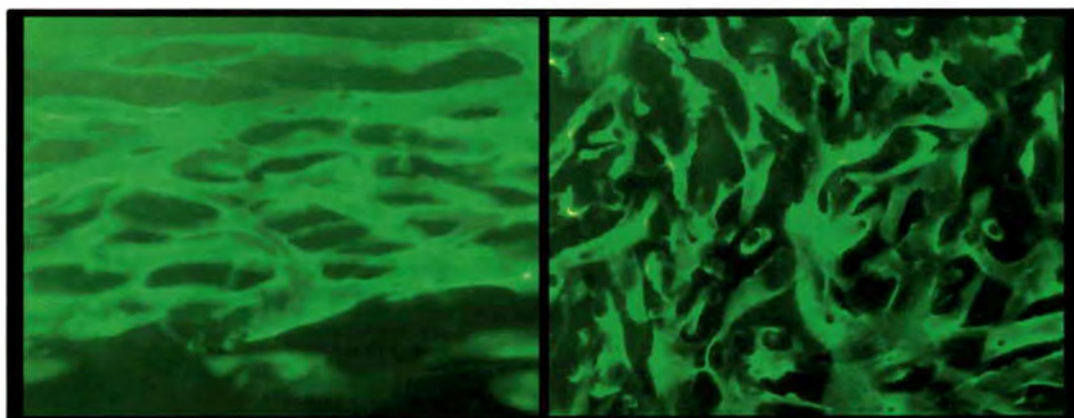


Figura 48 - Fluorescência com 4 semanas demonstrando a diferença entre o osso organizado formado por aposição abaixo do periósteo (esquerda) e o osso desorganizado, formado por ossificação endocondral (direita). Calceína, aumento 20x.

6. *Discussão*

6.1 Falha óssea experimental

Uma enorme variedade de modelos experimentais de falha óssea tem sido descritos e roedores, porcos, cães, ovelhas e um grande número de outras espécies têm sido utilizadas para estudo (EINHORN, 1999; FRIEDENBERG; FRENCH, 1952; HALDEMAN, 1933; LANE; SANDHU, 1987; MOORE et al., 2004; RASCHKE et al., 2001; SHAND et al., 2002; SVERZUT et al., 2008). Considerações acerca da magnitude do defeito ósseo assim como do osso utilizado, sua função biomecânica e a cobertura de partes moles devem ser levadas em consideração ao se avaliar a efetividade. Um modelo reprodutível e bem controlado, em conjunto com métodos de análise padronizados que forneçam uma avaliação qualitativa e quantitativa, é o meio adequado para avaliar o reparo ósseo (LANE; SANDHU, 1987).

Lane e Sandhu (1987), acreditam que o defeito diafisário segmentar é o método mais efetivo para estudar a reparação cortical, além de ser o que mais se aproxima dos defeitos maciços encontrados na prática clínica. É consistentemente reprodutível e permite a comparação precisa entre diversas formas de tratamento, e uma análise detalhada do processo de regeneração através de métodos radiográficos, histológicos e biomecânicos. Em geral defeitos que excedem em duas vezes o diâmetro do osso evoluem para não união na ausência de tratamento, desta forma a eficácia da intervenção terapêutica pode ser avaliada (LANE; SANDHU, 1987).

O modelo escolhido para a realização deste estudo foi a falha óssea na ulna de coelhos, modelo consagrado na literatura sobre a regeneração óssea (BOSTROM et al., 1996; COOK et al., 1994; DJAPIC et al., 2003; EL-GHANNAM et al., 2006; KOKUBO et al., 2003; PERKA et al., 2000; SEEHERMAN; WOZNEY; LI, 2002; SHELLER et al., 2004). A sua principal característica é o fato do rádio e a ulna estarem ligados por uma rígida membrana interóssea, que fornece estabilidade suficiente mesmo após extensas ressecções. Esta

estabilidade é alcançada sem o uso de implantes o que é uma vantagem considerável nos estudos com infecção. O rádio parece ser o osso responsável pela transmissão da maior parte da carga (SHELLER et al., 2004), sendo a fratura da ulna uma complicação associada ao modelo de falha óssea radial (EINHORN, 1999; PINEDA et al., 1996). Pineda et al. (1996), também chamaram a atenção para o risco de lesão de uma das artérias nutridoras do rádio presente no acesso cirúrgico. Apesar de existirem estudos com falhas radiais de 15 a 20 mm de comprimento (LI; HU, 2000; SEEHERMAN; WOZNEY; LI, 2002; VOLPON 1980; VOLPON 1985), na maioria dos estudos o tamanho da falha tem sido menor do que 10 mm, o que em alguns casos levou a regeneração espontânea do defeito (AMBROSE et al., 2004; EVANS; NELSON; 1993; EVANS; NELSON; GILLASPY et al., 1995; HALDEMAN, 1933; HARRISON, 1993; PALEY et al., 1986; PINEDA et al., 1996; SMELTZER et al., 1997).

A ulna do coelho tem sido mais utilizada para realização de falhas ósseas maciças (BOSTROM et al., 1996; COOK et al., 1994; KOKUBO et al., 2003; SHELLER et al., 2004). Sua face lateral é subcutânea o que facilita a abordagem, além de não possuir estruturas neuro-vasculares de importância no acesso. O terço proximal possui grande quantidade de osso esponjoso, sendo ideal para o estudo das falhas metafisárias, já os terços médio e distal possuem características predominantemente de osso diafisário, com corticais espessas e um canal medular bem definido. Têm sido descritas falhas ósseas da ordem de 8 a 20 mm, e apesar de não haver na literatura um estudo específico sobre o tema, alguns autores concordam que a regeneração espontânea é mínima, em geral não sendo suficiente para reconstituir mais do que 20% do osso original (BOSTROM et al., 1996; COOK et al., 1994; KOKUBO et al., 2003; SHELLER et al., 2004). A falha ulnar de 15 mm tem sido chamada de “falha crítica”, ou seja aquela a partir da qual a regeneração espontânea do defeito não é esperada (DJAPIC et al., 2003 ; KOKUBO et al., 2003; SHELLER et al., 2004). Bostrom et

al. (1996), e Bodde et al., (2007), porém consideram que a falha que de fato inviabiliza a regeneração espontânea é aquela maior do que 20 mm.

6.2 Infecção experimental

No intuito de conseguir o controle dos fatores relacionados à infecção, modelos animais têm sido desenvolvidos para simular a osteomielite em humanos. A variabilidade no sucesso em produzir infecção tem sido um problema, e o uso de agentes necrotizantes ou materiais inertes como o murato de sódio, o silastic e o PMMA freqüentemente é necessária para produzir resultados aceitáveis (EVANS; NELSON; HARRISON, 1993). Taxas de infecção que variam de 17% a 95% têm sido relatadas para os diversos modelos, e a septicemia fatal pode ocorrer em alguns animais, assim como complicações locais na ferida e a contaminação por outras bactérias (EVANS; NELSON; HARRISON, 1993; AMBROSE et al., 2004).

Desde Rodet em 1884 muitos investigadores tentaram, sem sucesso, reproduzir em animais a osteomielite em humanos (RIEGELS-NILSEN et al., 1995), até que Norden (1970), com seu modelo de infecção na metáfise proximal da tíbia, criou um método adequado para avaliar a terapêutica antimicrobiana. Evans, Nelson e Harrison (1993), adaptaram um dos modelos clássicos no estudo da regeneração óssea (o antebraço de coelhos) para o estudo da osteomielite experimental. Este modelo dispensava o uso de fixação interna, evitando os problemas associados ao uso de implantes na vigência de infecção. Apesar de serem raros, os estudos que associaram a falha óssea no antebraço de coelhos com infecção, utilizaram o radio como osso para ser infectado (AMBROSE et al., 2004; EVANS; NELSON; 1993; EVANS; NELSON; HARRISON, 1993; GILLASPY et al., 1995; SMELTZER et al., 1997).

Estes estudos tiveram como objetivo o tratamento da infecção e utilizaram falhas com tamanhos inferiores a 10mm, apresentando uma alta incidência de regeneração espontânea.

O inóculo de 10^8 bactérias dentro do canal medular do rádio produz infecção em apenas 42% dos animais, ao passo que, ao tornar um segmento do osso avascular o mesmo inóculo produz infecção em 93% dos animais (EVANS; NELSON; HARRISON, 1993). Smeltzer et al. (1997), não observaram sinais de repercussão sistêmica nos animais e definiram que inóculos acima de 2×10^5 bactérias produziam infecção em mais de 95% dos casos. Apesar de não utilizar agentes facilitadores o modelo de Evans, Nelson e Harrison (1993), alcança altas taxas de infecção pelo fato da bactéria ser introduzida em osso desvitalizado. Para tal, um segmento do rádio é removido da ferida, tornando-se avascular, e em seguida re-introduzido e inoculado. Este artifício cria condições ideais para o desenvolvimento da bactéria, e com a evolução o osso avascular torna-se sequestrado, mimetizando o processo fisiopatológico que se desenvolve na osteomielite.

A despeito da semelhança com a infecção óssea em humanos algumas ressalvas devem ser feitas, pois o procedimento cirúrgico causa lesão importante aos tecidos circunjacentes, e a infecção desde o início pode se disseminar pelos tecidos moles, assim como parte do suprimento sangüíneo do periósteo é interrompido pela cirurgia. Apesar disto o modelo é bem controlado, apresenta alta reprodutibilidade e pode ser avaliado através de escores radiográficos e histológicos, além de já ter sido largamente avaliado (AMBROSE et al., 2004; EVANS; NELSON, 1993; EVANS; NELSON; HARRISON, 1993; GILLASPY et al., 1995; NELSON; HICKMON; SKINNER, 1997; SMELTZER et al., 1997).

O *Staphylococcus aureus* é o agente causal em 65 a 70 % das infecções ósseas em humanos, de forma que tem sido a bactéria utilizada na quase totalidade dos estudos envolvendo a osteomielite experimental (BUCHHOLZ et al., 1981; BUCHHOLZ; ELSON; HEINERT, 1984; CALHOUN et al., 1993; CHUARD et al., 1991). O uso de antibióticos

induziu o predomínio das cepas produtoras de beta-lactamase e para solucionar este problema foram desenvolvidos as penicilinas beta-lactamase resistentes, porém a resistência a estes agentes começou a ser documentada entre 1960 e 1970. Atualmente tem-se presenciado um crescimento das cepas meticilino-resistentes (MRSA) que apresentam resistência múltipla (NA'WAS et al., 1998).

O perfil de sensibilidade a antibióticos é um fator importante na escolha da cepa, devendo esta ser sensível ao antibiótico utilizado e a sua concentração inibitória mínima deve estar dentro dos limites terapêuticos do tratamento planejado. A virulência do agente infeccioso é relevante pois bactérias de baixa virulência não são capazes de produzir infecção clínica, mesmo na presença de osso avascular (EVANS; NELSON; HARRISON, 1993; GILLASPY et al., 1995; SMELTZER et al., 1997).

Diversas técnicas podem ser utilizadas no preparo do inóculo, e este pode ser feito de uma vez e mantido congelado, ou produzido em cada etapa do experimento. O uso do turbidímetro para controle da suspensão tem sido freqüente, e em geral ao menos um controle é feito, através da contagem com microscopia ou de preferência com semeadura. A semeadura apresenta o inconveniente do longo tempo necessário para o crescimento bacteriano, e a confirmação da viabilidade só virá após o experimento ter sido realizado (AMBROSE et al., 2004; CALHOUN; MADER, 1997; FABER et al., 2004; LUKE et al., 2003; LUKE et al., 2005; SMELTZER et al., 1997).

O número de bactérias e o volume do inóculo são fatores de importância, e tem variado entre 10^3 e 10^9 bactérias. Inóculos inferiores a 10^5 resultam em um grande número de animais que não desenvolvem infecção. A maioria dos estudos em antebraço de coelhos tem utilizado valores entre 10^6 e 10^8 bactérias, com taxas de infecção em média superiores a 95%. Quanto ao volume da solução inoculada este deve ser o menor possível, de forma que fique restrito ao fragmento ósseo avascular evitando a contaminação maciça dos tecidos moles, e

geralmente são da ordem de 0,01 a 0,05 cc (AMBROSE et al., 2004, CALHOUN; MADER, 1997, DAHNERS; FUNDERBUK, 1987; EVANS; NELSON, 1993; EVANS; NELSON; HARRISON, 1993; FABER et al., 2004; FITZGERALD, 1983; JOOSTEN et al., 2004; NELSON; HICKMON; SKINER, 1997; PERRY et al., 1985; RIEGELS-NILSEN et al., 1995; SMELTZER et al., 1997; SOWTHWOOD et al., 2004; WAHLING et al., 1978).

Outro fator a ser considerado é o tempo despendido para o desenvolvimento do processo infeccioso, e este período tem variado de 2 a 4 semanas (AMBROSE et al., 2004, CALHOUN; MADER, 1997, DAHNERS; FUNDERBURK, 1987; EVANS; NELSON, 1993; EVANS; NELSON; HARRISON, 1993, FITZGERALD, 1983; JOOSTEN et al., 2004; NELSON; HICKMON; SKINER, 1997; SMELTZER et al., 1997). Tempos maiores têm sido utilizados nos estudos focados no tratamento da infecção com antibióticos, onde a resposta ao tratamento é avaliada através do achado de bactérias viáveis. Estes períodos maiores de infecção freqüentemente causam destruição intensa da arquitetura óssea, e uma reação periosteal desorganizada, com a infecção se estendendo ao longo de todo o osso (AMBROSE et al., 2004; NELSON; HICKMON; SKINER, 1997; EVANS; NELSON, 1993; EVANS; NELSON; HARRISON, 1993; SMELTZER et al., 1997; SOWTHWOOD et al., 2004). Esta destruição óssea pela infecção torna a avaliação da regeneração óssea difícil e passível de erros.

Mesmo em modelos controlados existe a possibilidade de infecção polimicrobiana por contaminação. Desta forma é importante recuperar o germe inoculado, e muitos marcadores como a identificação bacteriana, o antibiograma, a análise de plasmídeos, e a análise de DNA têm sido utilizados em estudos epidemiológicos para diferenciar cepas bacterianas. Para a análise genotípica são necessárias técnicas de eletroforese (pulsed-field electrophoresis - PFGE) e moleculares (Repetitive sequence-based PCR - rep PCR) que são mais precisas, porém são caras, demoradas e que algumas vezes apresentam divergências de resultados

(ICHIYAMA et al., 1991; ZEE et al., 1999). Para propósitos práticos o antibiograma tem sido utilizado com sucesso, principalmente quando combinado a tipagem do polissacarídeo capsular (CHUARD et al., 1991; NA´WAS et al., 1998).

Para este experimento foi modificado o modelo de Evans, Nelson e Harrison (1993), utilizando a ulna ao invés do rádio, e o tamanho da falha óssea foi ampliado de 10 para 15 mm, de forma a criar uma falha mais adequada ao estudo da regeneração óssea. A suspensão bacteriana foi obtida através da diluição em salina, e controlada com o uso da fotometria, da contagem de bactérias pela microscopia e através da semeadura em CLED. O inóculo de 10^8 bactérias associado a um período de duas semanas sem tratamento produziu infecção em todas as falhas, sem levar a uma destruição importante da arquitetura óssea. Após o desbridamento houve um aumento médio de 1 mm no tamanho da falha óssea. Todas as infecções foram causadas por *S. aureus* sensíveis a gentamicina, não ocorrendo infecção cruzada por outros germes.

Para confirmação de que a infecção se deu pela bactéria inoculada, foi utilizada a semeadura em ágar-sangue e NAITO, seguida da incubação a 35 °C por 24 horas. A identificação bacteriana e o antibiograma foram realizados através do MicroScan[®], este método tem se mostrado altamente sensível para a detecção de cepas de *S. aureus* resistentes a oxacilina, sendo seu resultados comparáveis aos métodos de referencia (WOODS; LATEMPLE; CRUZ, 1994; WOODS; YAM, 1988).

6.3 Tratamento da falha ossea infectada

O conceito fisiopatológico clássico da osteomielite é o de que o osso infectado se torna avascular resultando numa porção seqüestrada. Inicialmente este fragmento se encontra envolto por pus e tecido de granulação, contribuindo para a desvascularização do osso

adjacente por ser foco de enzimas e toxinas bacterianas. O tecido de granulação que envolve o osso necrótico é gradualmente substituído por tecido fibroso relativamente avascular e as células mesenquimais do periósteo formam osso reacional que leva ao encapsulamento do seqüestro. Desta forma o corpo isola o hospedeiro da infecção, mas também isola os microorganismos das defesas do hospedeiro, sendo o seqüestro um dos responsável pela cronicidade. Este estado é a base para a intervenção cirúrgica e excisão do seqüestro, tornando a infecção óssea uma doença primariamente cirúrgica (NELSON; HICKMON; SKINNER, 1997). O tratamento cirúrgico isolado porém não é suficiente, e Rutledge et al. (2003), obtiveram a cura da infecção com o desbridamento isolado em apenas 43% dos casos.

Infecção resistente usualmente requer um desbridamento mais radical do osso séptico e das partes moles, associado à rotação de flaps locais e do preenchimento do defeito com PMMA associado a antibiótico. Antibióticos sistêmicos devem ser administrados antes, durante e depois do tratamento (GOLDSTROHM; MEARS; SWARTZ, 1984). Estudos experimentais controlados têm demonstrado de modo controlado o impacto do uso de antibióticos no tratamento da infecção. O desbridamento isolado sem o uso de antibiótico produz a cura da infecção no antebraço de coelhos numa taxa que varia de 12,5 a 43% (EVANS; NELSON; HARRISON, 1993; NELSON; HICKMON; SKINNER, 1997; RUTLEDGE et al, 2003). O uso de antibiótico sistêmico sem desbridamento da ferida produz resultados semelhantes ao do não tratamento (CALHOUN; MADER, 1997). O desbridamento associado ao uso de antibiótico local eleva a taxa de controle da infecção para 79%, ao passo que o uso de quatro semanas de antibiótico sistêmico produz uma taxa de controle da infecção de 92% (EVANS; NELSON; HARRISON, 1993). A associação de tratamentos tem sido o meio mais eficaz, desta maneira o desbridamento associado ao uso de antibióticos por via local e sistêmica produz o controle da infecção em 100% dos casos (EVANS; NELSON; HARRISON, 1993).

A gentamicina foi escolhida para este estudo por ser largamente utilizada como antibiótico local em cirurgia ortopédica. Possui um amplo espectro de ação cobrindo a maioria das bactérias envolvidas na osteomielite. A gentamicina certamente não é o antibiótico de escolha para o tratamento isolado na prática clínica, mas foi utilizada de forma local e sistêmica no intuito de promover circunstâncias comparáveis para os propósitos do estudo.

Os resultados de experimentos *in vitro* acerca da liberação de gentamicina pelo PMMA demonstram uma grande discrepância nos resultados. Estas discrepâncias provavelmente refletem variações nos protocolos experimentais, indicado que o comportamento do cimento impregnado com antibiótico é altamente dependente das condições em que os experimentos são realizados (TRIPPEL; 1986). Desta forma, os dados das análises *in vitro* servem para dar suporte teórico à técnica, porém não podem ser a expressão da verdade no campo clínico.

Optou-se pela realização do teste de eluição em solução salina tamponada com fosfato (Ph de 7,4) por ser esta a mais freqüentemente utilizada em estudos similares (BURD et al., 2001; MINELLI; BENINI; BARTOLOZZI, 2003; NELSON et al., 1992; SELIGSON et al., 1993; TORRADO; FRUTOS; FRUTOS, 2001; WAHLING et al., 1978). O experimento foi conduzido à temperatura ambiente e não foi utilizado nenhum método para estimular a liberação do antibiótico (aquecimento, agitação, dentre outros). O volume da solução foi escolhido de modo que o espaçador ficasse totalmente submerso. Volumes menores poderiam inibir a eluição e também tornar necessário a diluição das amostras para dosagem, pois o aparelho utilizado tem como limite máximo de detecção 10 mcg/ml. Quanto à temperatura de armazenamento das amostras não existe um parâmetro, sendo descrito o armazenamento em temperaturas que variam de -80 a -18 °C (BURD et al., 2001; MINELLI; BENINI; BARTOLOZZI, 2003; NELSON et al., 1992; SEELEY et al., 2004; SELIGSON et al., 1993;

WAHLING et al., 1978). Porém este fator parece irrelevante, visto que o sulfato de gentamicina é estável à temperatura ambiente.

A técnica utilizada para avaliar a liberação de gentamicina pelo espaçador foi a fluorescência polarizada (FPIA – Fluorescence Polarization Immunoassay). Comparações da FPIA com outros métodos como a EMIT (enzyme multiplied immunoassay technique), o RIA (radioimmunoassay) e o SLFIA (substrate-labeled fluorescent immunoassay), mostraram uma correlação excelente entre os métodos, no entanto o sistema Abbot TDx FPIA oferece mais facilidades na calibração e na estabilidade dos reagentes, assim como uma maior sensibilidade em baixas concentrações (OELTGEN et al., 1984; JOLLEY, 1981; JOLLEY et al., 1981).

O equipamento e seus reagentes são desenvolvidos para dosagem da gentamicina em soro humano, porém a adaptação do método para a dosagem em solução salina tem sido realizada no intuito de avaliar *in vitro* as propriedades da mistura de cimento ósseo com antibiótico (MINELLI; BENINI; BARTOLOZZI, 2003; SELDES et al., 2005; TORRADO; FRUTOS; FRUTOS, 2001). Para tornar os resultados mais fidedignos foi realizado o “controle” das dosagens, onde cada amostra é testada duas vezes diminuindo o impacto de possíveis erros.

Para a seleção da dose de gentamicina adicionada ao cimento foi utilizado como parâmetro o estudo de Seldes et al. (2005), que adicionou 480 mg de gentamicina líquida em 40 g de Palacos R[®] e estudo a eluição *in vitro*. Foram utilizados corpos de teste cilíndricos com área de 282,6 mm². As condições do experimento não foram reveladas (temperatura, volume da solução e Ph) e as amostras foram testadas com o método FPIA. A maior parte da gentamicina foi liberada nas primeiras 24 horas com média de 26,4 mcg/ml, caído para 4,15 mcg/ml com três semanas.

Nelson et al. (1992), avaliaram as propriedades de eluição de 1,2 e 2 g de gentamicina adicionada a 40 g dos cimentos Simplex[®], Zimmer[®] e Palacos[®] e compararam os resultados

com o Septopal[®]. Esferas de 8mm de diâmetro foram colocadas em 1 ml de salina tamponada e agitadas a 600 rpm. Nas primeiras 24 horas obteve concentrações de 589 mcg/ml para o Septopal[®], 158 mcg/ml para o cimento Zimmer[®], 159 mcg/ml para o Palacos[®] e 88 mcg/ml para o Simplex[®]. No segundo dia a concentração de gentamicina liberada pelo Simplex[®] caiu para 3 mcg/ml. Este estudo mostrou que o aumento das doses de antibiótico ao PMMA aumentava a quantidade eluída nos primeiros 5 dias, mas não produzia resultados melhores a longo prazo. O cimento Simplex[®] apresentou propriedades inferiores aos demais, porém o padrão de liberação do antibiótico foi idêntico para todas as preparações. Não foram alcançados níveis bactericidas por 30 dias ao usar como referência uma MIC de 4 ug/ml.

A dose de gentamicina adicionada ao cimento encontra-se abaixo dos valores utilizados nas preparações comerciais e tem se mostrado eficaz na profilaxia e tratamento da infecção por *S aureus* (BUCHHOLZ et al., 1981; BUCHHOLZ; ELSON; HEINERT, 1984; FABER et al., 2004; FITZGERALD, 1983; LUCKE et al., 2003; LUCKE et al., 2005). Foi optado por utilizar a mais baixa dose efetiva de gentamicina na confecção do espaçador, e associar a gentamicina sistêmica no tratamento dos animais. Desta forma, pôde-se evitar discrepâncias importantes no número de animais que obtiveram o controle da infecção entre os grupos, já que este é um parâmetro envolvido no resultado da regeneração óssea. Apesar de ser uma variável, a adição de antibiótico ao espaçador é imprescindível, visto que o PMMA é um facilitador para a perpetuação do processo infeccioso ao favorecer a adesão bacteriana. A adição à ferida de PMMA sem antibiótico após o desbridamento causa a redução do índice de cura para 27% (FITZGERALD, 1983; EVANS; NELSON; HARRISON, 1993; NELSON, 2004).

A dose de gentamicina sistêmica administrada foi de 6 mg/kg/dia por via intramuscular (JOOSTEN et al., 2004; PERRY et al., 1985; SAVIN et al., 1985; OGDEN et al., 1995). No coelho as concentrações séricas da gentamicina não são significativamente

diferentes após 25 minutos da administração, independentemente de utilizar-se a via subcutânea, intramuscular ou venosa. A biodisponibilidade da via intramuscular excede 100%, pois a via endovenosa parece apresentar menor biodisponibilidade devido a variações no clearance e no volume de distribuição do antibiótico no coelho (OGDEN et al., 1995).

Após administração, as concentrações séricas caem rapidamente, desta forma intervalos muito curtos entre as doses seriam necessários para manter a concentração recomendada. A gentamicina porém continua a suprimir o crescimento bacteriano por algum tempo, mesmo após os níveis séricos estarem abaixo da MIC, fenômeno conhecido como efeito pós-antibiótico (CURL; CURL, 1988). Joosten et al. (2004), usando 6 mg/kg dia por 42 dia observaram que os níveis séricos se mantiverem em uma banda média compreendida entre 0,20 e 0,25 mcg/ml. No estudo de Perry et al. (1985), doses de 3, 5 e 8 mg/kg/dia produziram concentrações ósseas inferiores a 1mcg na maioria dos animais. A azotemia é uma complicação do uso de aminoglicosídeos em altas doses, e no coelho a administração de 30 mg/kg/dia por 28 a 31 dias, provoca insuficiência renal moderada (SAVIN et al., 1985). A administração de aminoglicosídeos em dose única diária é uma estratégia de tratamento que tem se mostrado tão eficaz quanto à aplicação fracionada, e com menor incidência de nefrotoxicidade (PRINS et al., 1993).

O uso associado de antibióticos diferentes por via oral e sistêmica tem um efeito aditivo sobre o controle da infecção (EVANS; NELSON; HARRISON, 1993), porém o papel do uso simultâneo **do mesmo antibiótico** por via oral e sistêmica é incerto. Calhoun e Mader (1997), avaliaram o uso de vancomicina sistêmica versus vancomicina local e a associação local e sistêmica. O uso combinado do mesmo antibiótico apresentou os melhores resultados, seguido de perto pela aplicação apenas local do mesmo.

6.4 Avaliação do controle da infecção

Para estimar o controle da infecção após o tratamento têm sido utilizados critérios clínicos, radiográficos, microbiológicos e histológicos. Sem dúvida para resultados mais fidedignos a associação de métodos é a melhor estratégia, porém nem sempre é possível compatibilizar todos eles com as necessidades do estudo.

A avaliação clínica leva em consideração fatores como a presença de hiperemia da ferida, abscessos ou fístulas como indícios de infecção em atividade, e a avaliação intra-operatória complementa estes achados.

A avaliação radiográfica também tem sido utilizada e no intuito de torná-la mais fidedigna, Calhoun e Mader (1997), Dahners e Funderburk (1987), e Smeltzer et al. (1997), descreveram escores para avaliação radiográfica da osteomielite experimental em coelhos. Consideraram que a elevação do periósteo e a destruição da arquitetura óssea são os indícios de maior importância, e diversos outros estudos tem utilizado variações destes escores (CHEN, KIDDER; LEW, 2002; SOUTHWOOD et al., 2004). A elevação do periósteo associada à formação de osso novo é o sinal mais precoce de infecção, porém pode estar relacionada à estimulação do periósteo pela cirurgia (SMELTZER et al., 1997). O grau de destruição da arquitetura óssea é de caráter subjetivo e também sujeito a erros de interpretação, de forma que os resultados da análise radiográfica devem ser interpretados em conjunto com os outros métodos (CALHOUN; MADER, 1997; SMELTZER et al., 1997).

A identificação bacteriana é empregada para avaliar a resposta ao tratamento. Diversas técnicas podem ser utilizadas como o swab da amostra, culturas de tecidos e fragmentos ósseos, cultura quantitativa após pulverização ou homogeneização óssea e a pesquisa de DNA bacteriano (AMBROSE et al., 2004, CALHOUN; MADER, 1997; DAHNERS; FUNDERBURK, 1987; EVANS; NELSON, 1993; EVANS; NELSON; HARRISON, 1993;

FITZGERALD, 1983; JOOSTEN et al., 2004; NELSON; HICKMON; SKINNER, 1997; SMELTZER et al., 1997).

Para todos os métodos de análise microbiológica a contaminação é um problema difícil de ser contornado. Apesar dos cuidados na coleta a contaminação tem sido relatada com frequência. O uso de culturas para avaliar a erradicação da infecção tem valor limitado devido a falso-positivos e falso-negativos da ordem de 9% (EVANS; NELSON; HARRISON, 1993), e a avaliação com culturas superestimou as taxas de cura quando comparada com a avaliação histológica (EVANS; NELSON; HARRISON, 1993; NELSON; HICKMON; SKINNER, 1997). As técnicas que avaliam toda a amostra são mais adequadas, identificando bactérias presente em um pequeno seqüestro ou abscesso, no entanto para realizar estes estudos é necessária a destruição de grande parte ou de toda a amostra. As técnicas de culturas quantitativas da amostra tem limite de detecção da ordem de $2,5 \times 10^3$ a 4×10^3 cfu/g, de maneira que amostras pequenas podem gerar resultados errados, sendo necessário complementar a avaliação com culturas convencionais. Este método também não demonstrou boa correlação com a avaliação histológica através do escore de Smeltzer et al. (FABER et al., 2004).

Outro foco de discussão é o fato de que a existência de bactérias na amostra não significa infecção ativa, podendo os agentes bacterianos estarem inativos ou isolados pelas defesas do hospedeiro. Calhoun e Mader (1997), avaliaram com culturas quantitativas de osso pulverizado o controle de uma infecção experimental tratada com vancomicina, e o não tratamento produziu resultados semelhantes ao desbridamento associado à antibiótico sistêmico por quatro semanas, mostrando que este método pode levar a interpretações errôneas (CALHOUN; MADER, 1997).

A avaliação histológica é efetiva em identificar parâmetros associados à infecção, e os indícios histológicos aparecem cedo e persistem durante certo tempo (SMELTZER et al.,

1997). É mais acurada que a avaliação com culturas (EVANS; NELSON; HARRISON, 1993), e nos modelos onde a erradicação da infecção é considerada como critério de sucesso, os achados histológicos de inflamação, seqüestro e presença de bactérias intra-óssea, combinado com as culturas oferecem o meio mais seguro de avaliação (EVANS; NELSON; HARRISON, 1993; NELSON; HICKMON; SKINNER, 1997).

A presença de bactérias isoladas não deve ser considerada como indício de infecção ativa, devendo-se levar em consideração apenas quando estiverem presentes múltiplos cocos agregados e sinais indiretos como fibrose intensa (SMELTZER et al., 1997). A avaliação depende da forma como a amostra é cortada, da coloração utilizada e da capacidade do examinador em interpretar os achados. A coloração com hematoxilina-eosina, às vezes associada ao Gram modificado, tem sido a mais utilizada (AMBROSE et al., 2004; NELSON; HICKMON; SKINNER, 1997; EVANS; NELSON; HARRISON, 1993; FITZGERALD, 1983; JOOSTEN et al., 2004; SMELTZER et al., 1997; SOWTHWOOD et al., 2004; STALLMANN et al., 2004). Apesar do uso de técnicas padronizadas é freqüente a dissociação dos resultados da avaliação quanto a presença de infecção quando são utilizados os dados da histologia e da cultura, e frequentemente o resultado das culturas superestima a presença de infecção (STALLMANN et al., 2004).

Escores de avaliação têm sido propostos no intuito de diminuir a subjetividade na interpretação dos dados (AMBROSE et al., 2004; SMELTZER et al., 1997; SOWTHWOOD et al., 2004). O escore de Ambrose et al. (2004), avalia a presença de bactérias, o grau de inflamação e a quantidade de osso neoformado. Os resultados podem ser mascarados pois um baixo escore pode ser resultado de infecção não controlada ou apenas de uma regeneração óssea pobre. Desta maneira é mais útil avaliar os critérios de maneira isolada do que o escore final.

No presente estudo foi realizada a administração de gentamicina sistêmica em dose única diária, por um tempo insuficiente para produzir insuficiência renal e não houve diferença entre o uso de gentamicina sistêmica isolada ou de gentamicina local e sistêmica no controle da infecção. Ambos os métodos apresentaram taxas de sucessos compatíveis com os resultados da literatura (AMBROSE et al., 2004; EVANS; NELSON; HARRISON, 1993).

Os animais foram acompanhados por um período de oito semanas após o término da antibioticoterapia, e foi possível avaliar a reincidência da infecção, sendo que ao final do estudo apenas um animal apresentou recidiva. Na avaliação conjunta dos critérios clínicos, radiológicos e histológicos, houve grande sobreposição das observações dando maior validade aos resultados. Não foram encontrados estudos experimentais que avaliassem a recidiva da infecção após o tratamento da osteomielite, pois os animais são mortos logo após o tratamento (AMBROSE et al., 2004; DAHNERS; FUNDERBURK, 1987; NELSON; HICKMON; SKINER, 1997; EVANS; NELSON, 1993; EVANS; NELSON; HARRISON, 1993; JOOSTEN et al., 2004; SMELTZER et al., 1997). Foi observado também que a capacidade de recuperação dos tecidos moles neste modelo é muito grande, e após quatro semanas de tratamento 61% dos animais tinham as feridas completamente cicatrizadas.

6.5 Avaliação da regeneração óssea

Radiografias realizadas a intervalos regulares são uma técnica conveniente para a avaliação seqüenciada da regeneração óssea. Parâmetros como a formação óssea, a persistência do defeito e a remodelação podem ser avaliados, e a quantificação destes parâmetros se torna possível através da utilização de escores radiográficos. Radiografias de alta resolução também têm sido utilizadas para fornecer dados acerca da mineralização com o

uso de densitometria óptica ou técnicas de digitalização de imagens (LANE; SANDHU, 1987).

A regeneração óssea das falhas no antebraço de coelhos acontece com maior intensidade nas primeiras quatro semanas, e em geral entre a quarta e a oitava semana uma ponte óssea se forma sobre o defeito. Bostrom et al. (1996), mostraram que a neoformação óssea foi pequena após a sexta semana mesmo com o uso de BMP-2 de liberação prolongada (duas a três semanas). Li e Hu (2001), também com o uso de BMP-2 obtiveram um calo ósseo abundante com oito semanas, e a remodelação do canal medular com 16 semanas. No estudo de Pineda et al. (1996), utilizando membranas sintéticas, com seis semanas foi obtida uma reação óssea organizada e o defeito se encontrava quase coberto por uma ponte óssea. O osso cortical estava formado com 12 semanas e com 20 semanas o defeito estava preenchido. Apesar de obter resultados similares com o uso de injeção de células osteoprogenitoras da medula óssea Paley et al. (1986), chamaram a atenção para o afinamento da extremidade óssea e o estreitamento do regenerado mesmo nas falhas tratadas. Sheller et al. (2004), através do uso de reconstrução com tomografia computadorizada demonstraram que ocorria a fusão radio-ulnar na região do regenerado, o que também já havia sido notado por Pineda et al. (1996).

A regeneração da falha óssea no antebraço de coelhos deixada sem tratamento está confinada às extremidades, proveniente principalmente do endóstio na região exposta do canal medular, levando a uma sinostose rádio-ulnar entre as extremidades da falha e o osso íntegro (PINEDA et al., 1996). Bostrom et al. (1996), definiram que para considerar uma falha óssea no antebraço de coelho como consolidada, o regenerado deve se estender de uma extremidade a outra da falha ocupando pelo menos 25% do defeito ósseo.

Para a avaliação radiográfica da regeneração óssea foram utilizados os escores proposto por Lane e Sandhu, (1987), e Ambrose et al. (2004). A classificação de Lane e

Sandhu (1987), foi desenvolvida originalmente para avaliar a incorporação de enxertos ósseos, porém foi utilizada com sucesso na avaliação da regeneração sem a adição de enxerto (KARAOGLU et al., 2002). Esta classificação avalia a maturidade do regenerado através de parâmetros como a remodelação do canal medular, porém o seu grande mérito é o peso dado ao percentual de preenchimento do defeito por tecido ósseo. Os autores também produziram um escore para a avaliação histológica tornando mais fácil a interpretação em conjunto dos dados.

A classificação de Ambrose et al. (2004), tem como seu principal critério o tamanho da falha óssea. Apesar de ter sido desenvolvida especificamente para estudos sobre regeneração sem o uso de enxertos, não apresenta o mesmo refinamento da classificação de Lane e Sandhu (1987), portanto seus dados devem ser interpretados com cautela.

A avaliação de radiografias digitalizadas através de softwares permite a medida de parâmetros que não são possíveis mensurar na avaliação visual. Digitalizar uma imagem e transformá-la em dados numéricos, isso é o resultado de um processo chamado amostragem, que divide a imagem original em pequenos quadrados e lhes atribui um número. Estes quadrados são chamados de pixels, e cada um corresponde às informações de cor daquele local. Na radiografia em preto e branco o número de tons de cinza determina a densidade da imagem, e em geral o padrão é a digitalização em 256 tons de cinza, onde o zero representa o preto e o 255 o branco. A avaliação de radiografias digitalizadas com o uso do Software Adobe Photoshop[®] mostrou que este método fornece resultados similares a avaliação com o fotodensitômetro óptico (DEZOTTI, 2000; SILVA, 1999).

Neste estudo pode-se observar a presença mais acentuada do estreitamento da região central do regenerado nos animais que não fizeram uso do espaçador de PMMA, o que foi avaliado principalmente através do percentual de preenchimento da falha. Este estreitamento pode ser devido à constrição das partes moles durante o processo de cicatrização, ou a

ausência de sustentação do periósteo nas fases iniciais do processo regenerativo. A utilização do espaçador de PMMA com antibiótico produziu resultados melhores sobre a regeneração com uma tendência a significante ($p = 0,06$).

Nas falhas infectadas a deposição óssea se dá principalmente na região da junção rádio-ulnar, por ser esta área a mais bem vascularizada, freqüentemente levando a sinostose óssea no local. O alargamento das extremidades da falha também foi um achado comum fruto da produção óssea pela borda livre do periósteo descolado. A infecção prévia causou um comprometimento permanente do processo de regeneração, que se manteve mesmo após a sua cura clínica, e pode ser atribuído não só aos efeitos deletérios da infecção sobre o processo de regeneração mas também aos danos que a infecção pode causar ao periósteo e ao seu suprimento sangüíneo (AMBROSE et al., 2004; FABER et al., 2004). Tal fato pode ser observado ao se comparar os resultados dos animais infectados com o dos não-infectados.

Na análise histológica a regeneração de falhas ósseas sem tratamento em geral mostra a não-união. O calo se forma nas extremidades ósseas por 2 a 3 mm e é seguido pelo afilamento das extremidades e pelo preenchimento da região central do defeito por tecido fibroso e invasão por tecido muscular (BOSTROM et al., 1996; MOORE et al., 2004). Para Volpon (1980), o quadro histológico mantém-se estável após a terceira semana, e a falha óssea encontra-se preenchida com tecido conjuntivo frouxo.

Para a avaliação histológica foram utilizados os critérios de Lane e Sandhu (1987), e a classificação histopatológica de Ambrose et al. (2004). A classificação de Lane e Sandhu (1987), avalia critérios como a união do regenerado e o grau de maturidade do osso esponjoso, cortical e do canal medular. Tenta estabelecer uma relação temporal destes parâmetros de forma que resultados melhores significam um regenerado mais evoluído do ponto de vista fisiológico. No entanto, a maioria dos parâmetros são totalmente subjetivos.

Karaoglu et al. (2002), utilizaram o sistema de Lane e Sandhu (1987), para a avaliação radiológica e histológica e obtiveram uma boa correlação.

A classificação de Ambrose et al. (2004), desenvolvida para combinar na avaliação a infecção óssea e a regeneração óssea deve ser vista com cautela. A interação precisa entre infecção e regeneração ainda é uma incógnita, e um resultado final ruim pode ser reflexo de uma infecção não controlada ou de uma falha que não regenerou. Além disso os resultados melhores são identificados através de menor pontuação final, o que muitas vezes causa confusão na interpretação dos dados. A análise individualizada de cada parâmetro desta classificação parece a melhor forma de torná-la útil.

A análise de fluorescência é um método utilizado para mapear a neoformação óssea através do tempo. Os marcadores mais frequentemente utilizados têm sido o xilenol laranja, a alisarina, a calceína verde, a calceína azul, a tetraciclina e a oxitetraciclina, e no coelho sua administração tem sido descrita de forma intraperitoneal, subcutânea ou endovenosa. A administração dos marcadores costuma ter início em torno da segunda semana podendo mostrar evidências de neoformação óssea no coelho até a vigésima quarta semana, e o intervalo entre a administração dos marcadores costuma ser de duas a quatro semanas (CAPRISE et al., 2002; SHAND et al., 2002; VOLPON, 1980).

Diversos critérios foram utilizados na avaliação radiográfica, e alguns como a medida da densidade do regenerado apresentam baixa dependência da interpretação do observador. A metodologia empregada no estudo permitiu que cada peça tivesse pelo menos duas lâminas inclusas na avaliação, diminuindo possíveis variações relacionadas ao local do corte. A correlação entre a avaliação radiográfica e a histológica foi ruim, e muitas vezes apresentaram resultados contraditórios. Estes achados podem ser atribuídos a diversos fatores, e os animais que utilizaram o espaçador, por exemplo, costumavam apresentar a região central da falha

vazia, o que provocou resultados inferiores na avaliação do critério percentual de preenchimento.

6.6 Relevância experimental

No presente estudo foi avaliada uma alternativa para o modelo de falha óssea infectada no rádio de coelhos. A falha óssea infectada na ulna permite a criação de defeitos maciços, apresenta menos chance de fratura do osso intacto e afasta o risco de lesão vascular que possa interferir nos resultados. Este modelo se mostrou facilmente reprodutível e bastante preciso, de modo que pode ser considerado como uma alternativa para os estudos sobre falha óssea e infecção.

Nas falhas ósseas não infectadas e deixadas sem tratamento, apesar da presença do estreitamento central houve regeneração completa do defeito, demonstrando que o conceito de falha óssea crítica na ulna como sendo de 15 mm não está correto.

A infecção tem um impacto definitivo sobre o processo de consolidação mesmo após o seu controle. Este estudo foi capaz de mostrar esta diferença.

O uso do espaçador de PMMA com antibiótico levou a uma melhor regeneração do defeito ósseo tanto na presença de infecção quanto na ausência da mesma no modelo no antebraço de coelhos.

6.7 Relevância clínica

Neste estudo foi demonstrado que o espaçador de PMMA com antibiótico é eficaz como preenchedor da falha óssea infectada. A ação do PMMA com antibiótico na ferida vai além dos objetivos envolvidos no controle da infecção, tendo um impacto positivo também

sobre a regeneração da falha óssea sem infecção. Os estudos existentes demonstram que existem indícios suficientes para a aplicação clínica deste método como uma das alternativas mais seguras na preparação do leito da ferida, infectada ou não, para a enxertia.

7. Conclusão

O uso do espaçador de polimetilmetacrilato na falha óssea com ou sem infecção, esteve associado a melhores resultados no tocante à regeneração óssea, sendo possível identificar, radiologicamente e histologicamente, um padrão de regeneração associado ao uso do mesmo.

Foi desenvolvido um modelo experimental de falha óssea infectada preciso e reprodutível, com taxa de infecção de 100%. O espaçador de polimetilmetacrilato com gentamicina apresentou propriedades de eluição e eficácia similares aos descritos na literatura, e foi adequado para o uso na falha óssea utilizada no estudo. Foi obtido controle efetivo do processo infeccioso com baixa taxa de recidiva ao longo do seguimento de 12 semanas.

8. Referências

- AGIZA, A. H. Treatment of tibial osteomyelitic defects and infected pseudarthroses by the Huntington fibular transference operation. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, Boston, v. 63, p. 814-819, jun. 1981.
- AMBROSE, C. G.; CLYBURN, T. A.; LOUDEN, K.; JOSEPH, J.; WRIGHT, J.; GULATI, P.; GOGOLA, G. R.; MIKOS, A. G. Effective treatment of osteomyelitis with biodegradable microspheres in a rabbit model. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, n. 421, p. 293-299, abr. 2004.
- BODDE, E. W. H.; SPAUWEN, P. H. M.; MIKOS, A. G.; JANSEN, J. A. Closing capacity of segmental radius defects in rabbits. **Journal of biomedical materials research. part A**, Roboken, v. 85, n. 1, p. 206-217, abr. 2008.
- BOSTROM, M.; LANE, J. M.; TOMIN, E.; BROWNE, M.; BERBERIAN, W.; TUREK, T.; SMITH, J.; WOZNEY, J.; SCHILDHAUER, T. Use of bone morphogenetic protein-2 in the rabbit ulnar nonunion model. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, n. 327, p. 272-282, jun. 1996.
- BOSWORTH D. M.; LIEBLER W. A.; NASTASI A. A.; KUNIKATA H. Resection of the tibial shaft for osteomyelitis in children, a thirty two year follow up study. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, Boston, v. 48, p. 1328-1339, out. 1966.
- BUCHHOLZ, H. W.; ELSON R. A.; ENGELBRECHT E.; LODENKÄMPER, H.; RÖTTGER J.; A SIEGEL. Management of deep infection of total hip replacement. **The Journal of bone and joint surgery British volume**, London, v. 63, n. 3. p. 342-353, ago. 1981.
- BUCHHOLZ, H. W.; ELSON, R. A. Antibiotic-loaded acrylic cement: current concepts. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, n. 190, p. 96-108, nov. 1984.
- BURCHARDT, H. Biology of bone transplantation. **The orthopedic clinics of North America**, Philadelphia, v. 18, n. 2, p. 187-195, abr. 1987.
- BURD, T. A.; ANGLIN, J. O.; LOWRY, K. J.; HENDRICKS, K. J.; DAY, D. In vitro elution of tobramycin from bioabsorbable Polycaprolactone Beads. **Journal of orthopaedic trauma**, Hagerstown, v. 15, n. 6, p. 424-428, ago. 2001.
- BURMAN, M. S.; UMANSKY, M. An experimental study of free periosteal transplants, wrapped around tendon. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, Boston, v. 12, p. 579-594, jul. 1930.
- CALHOUN, J. H.; HENRY, S. L.; ANGER, D. M.; COBOS, J. A.; MADER, J. T. The treatment of infected nonunions with gentamicin-polymethylmethacrylate antibiotic beads. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, n. 295, p. 23-21, out. 1993.
- CALHOUN, J. H.; MADER, J. T. Treatment of osteomyelitis with a biodegradable antibiotic implant. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, n. 341, p. 206-214, ago. 1997.

- CAPRISE, P. A.; MICLAU, T., DAHNERS, L. E.; DIRSCHL, D. R. High-pressure pulsative lavage irrigation of contaminated fractures: effects on fracture healing. **Journal of orthopaedic research**, Hoboken, v. 20, n. 6, p. 1205-1209, nov. 2002.
- CARLSSON, A. S.; JOSEFSSON, G.; LINDBERG, L. Revision with gentamicin-impregnated cement for deep infections in total hip arthroplasties. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, Boston, v. 60, n. 8, p. 1059-1064, dez. 1987.
- CATTANEO, R.; CATAGNI, M.; JOHNSON, E. E. The treatment of nonunions and segmental defects of the tibia by the method of Ilizarov. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, n. 280, p. 142-159, jul. 1992.
- CHEN, X.; KIDDER, L. S.; LEW, W. D. Osteogenic protein-1 induced bone formation in an infected segmental defect in the rat femur. **Journal of orthopaedic research**, Hoboken, v. 20, n. 1, p. 142-150, jan. 2002.
- CHRISTIAN, E. P.; BOSSE, M. J.; ROBB, G. Reconstruction of large diaphyseal defects, without free fibular transfer, in grade-IIIB tibial fractures. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, Boston, v. 72, n. 4, p. 427-438, ago. 1989.
- CHUARD, C.; HERRMANN, M.; VAUDAUX, P.; WALDVOGEL, F. A.; LEW, D. P. Successful therapy of experimental chronic foreign-body infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by antimicrobial combinations. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 35, n. 12, p. 2611-2616, dez. 1991.
- CIERNY III, G.; ZORN, K. E. Segmental tibial defects: comparing conventional and Ilizarov methodologies. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, n. 301, p. 118-1123, abr. 1994.
- COHEN, J.; LACROIX, P. Bone and cartilage formation by periosteum: assay of experimental autogenous grafts. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, Boston, v. 37, n. 4, p. 717-730, jul. 1955.
- COOK, S. D.; BAFFES, G. C.; WOLFE, M. W.; SAMPATH, T. K.; RUEGER, D. C.; WHITECLOUD III, T. S. The effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of large segmental bone defects. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, Boston, v. 76, n. 6, p. 827-838, jun. 1994.
- CURL, J. L.; CURL, J. S. Pharmacokinetics of gentamicin in laboratory rabbits. **American journal of veterinarian research**, Chicago, v. 49, n. 12, dez. 1988.
- DAHNERS, L. E.; FUNDERBURK, C. H. Gentamicin-loaded plaster of Paris as a treatment of experimental osteomyelitis in rabbits. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, n. 219, p.279-282, jun. 1987.
- DAOUD, A; SAIGHI-BOUAOUINA, A. Treatment of sequestra, pseudarthroses, and defects in the long bones of children who have chronic hematogenous osteomyelitis. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, Boston, v. 71, n. 10, p. 1448-1468, dez. 1989.

DECOSTER, T. A.; GEHLERT, R. J.; MIKOLA, E. A.; PIRELA-CRUZ, M. A. Management of posttraumatic segmental bone defects. **The journal of the American academy of orthopaedic surgeons**, Rosemont, v. 12, n. 1, p. 28-38, jan./fev. 2004.

DEZOTTI, M. S. G. **Avaliação da densidade ótica e das densidades radiográficas, utilizando filmes radiográficos AGFA Dentus M2 “confort” processado em três soluções de processamento em diferentes temperaturas.** 2000, 145 f. Dissertação, Faculdade de Odontologia de Bauru da universidade de São Paulo, Bauru, 2000.

DIMITRIOU, R.; TSIRIDIS, E.; GIANNOUDIS, P. V. Current concepts of molecular aspects of bone healing. **Injury**, Amsterdam, v. 36, n. 12, p. 1392-1404, dez. 2005.

DJAPIC, T.; KUSEC, V.; JELIC, M.; VUKICEVIC, S.; PECINA, M. Compressed homologous cancellous bone and bone morphogenetic protein (BMP)-7 or bone marrow accelerate healing of long-bone critical defects. **International orthopaedics**, Berlin, v. 27, p. 326-330, ago. 2003.

DOIG, G. S.; SIMPSON, F. Randomization and allocation concealment: a practical guide for researchers. **Journal of critical care**, Orlando, v. 20, p. 187-193, jun. 2005.

EINHORN, T. A. Clinically applied models of bone regeneration in tissue engineering research. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, v. 367, s. 1, p. 59-67, out. 1999.

EINHORN, T. A. The cell and molecular biology of fracture healing. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, v. 355, s. 1, p. 7-21, out. 1998.

EINHORN, T. A.; LANE, J. M.; BURSTEIN, A. H.; KOPMAN, C. R.; VIGORITA, V. J. The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, Boston, v. 66, n. 2, p. 274-278, fev. 1984.

EL-GHANNAM, A.; CUNNINGHAM, L. Jr.; PIENKOWSKI, D.; HART, A. Bone engineering of the rabbit ulna. **Journal of oral and maxillofacial surgery**, Philadelphia, v. 65, n. 8, p. 1495-1502, aug. 2007.

ENNEKING, W. F.; EADY J. L.; BURCHARDT H. Autogenous cortical bone grafts in the reconstruction of segmental skeletal defects. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, Boston, v. 62, n. 7, p. 1039-1058, out. 1980.

ENNEKING, W. F.; SPANIER, S. S.; GOODMAN, M. A. The surgical staging of musculoskeletal sarcoma. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, Boston, v. 62, n. 6, p. 1027-1030, set. 1980.

EVANS, R. P.; NELSON, C. L. Gentamicin-impregnated polymethylmethacrylate beads compared with systemic antibiotic therapy in the treatment of chronic osteomyelitis. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, n. 295, p. 37-42, out. 1993.

EVANS, R. P.; NELSON, C. L.; HARRISON, B. H. The effect of wound environment on the incidence of acute osteomyelitis. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, n. 286, p. 289-297, jan. 1993.

EYRE-BROOK, A. L. The periosteum: Its function reassessed. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, n. 189, p. 301-307. 1984.

FABER, C.; HOOGENDOORN, R. J. W.; STALLMANN, H. P.; LYARUU, D. M.; AMERONGEN, A. N.; WUISMAN, P. I. J. M. In vivo comparison of Dhvar-5 and gentamicin in an MRSA osteomyelitis prevention model. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, London, v. 54, p. 1078-1084, dez. 2004.

FINKEMEIER, C. G. Bone-grafting and bone-graft substitutes. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, Boston, v. 84, n. 3, p. 454-464, mar. 2002.

FITZGERALD, R. H. Experimental osteomyelitis: Description of a canine model and the role of depot administration of antibiotics in the prevention and treatment of sepsis. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, Boston, v. 65, n. 3, p. 371-380, mar. 1983.

FOWLES, J. V.; LEHOUX J.; ZLITNI M.; KASSAB, M. T.; NOLAN, B. Tibial defects due to acute haematogenous osteomyelitis: treatment and results of twenty-one children. **The Journal of bone and joint surgery. British volume**, London, v. 61, n. 1, p. 77- 81, fev. 1979.

FRIEDENBERG, Z.B.; FRENCH, G. The effects of know compression forces on fracture healing. **Surgery, gynecology and obstetrics**, Chicago, v.94, n. 6, p. 743-748, jun. 1952.

FRIEDLAENDER, G. E. Bone grafts. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, Boston, v. 69, n. 5, jun. 1987.

FRIEDLANDER, G. E.; PERRY, C. R.; COLE, J. D.; COOK, S. D.; CIERNY, G.; MUSCHLER, G. F.; ZYCH, G. A.; CALHOUN, J. H.; LAFORTE, A. J.; YIN, S. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunion. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, Boston, v.83, s. 1, pt. 2, p. 151-158, 2001.

GILLASPY, A. F.; HICKMON, S. G.; SKINNER, R. A.; THOMAS, J. R.; NELSON, C. L.; SMELTZER, M. S. Role of the accessory gene regulator (agr) in pathogenesis of Sthaphylococcal osteomyelitis. **Infection and immunity**, Washington, v. 63, n. 9, p. 3373-3380, set. 1995.

GOLDSTROHM, G. L.; MEARS, D. C.; SWARTZ, W. M. The result of 39 fractures complicated by major segmental bone loss and/or leg length discrepancy. **The Journal of trauma**, v. 24, n. 1, p. 50-58, jan. 1984.

GREEN, S. A.; JACKSON, J. M.; WALL, D. M.; MARINOW, H.; ISHKANIAN, J. Management of segmental defects by the Ilizarov intercalary bone transport. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, n.280, p. 137-142, jun. 1992.

GRIFFITHS, J. C. Defects in long bones from severe neglected osteitis. **The Journal of bone and joint surgery British volume**, London, v. 50, n. 4, p. 813-821, nov. 1968.

GRISTINA, A. G.; COSTERTON, J. W. Bacterial adherence to biomaterials and tissue: the significance of its role in clinical sepsis. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, v. 67, n. 2, p. 264-273, fev. 1985.

GUSTILO, R. B.; MENDOZA, R. M.; WILLIAMS, D. N. Problems in the management of type III (severe) open fractures. A new classification on type III open fractures. **The Journal of trauma**, v. 24, p. 742, ago. 1984.

HAAS, S. S.; BRAUER, G. M.; DICKSON, G. A characterization of polymethylmethacrylate bone cement. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, Boston, v. 57, n. 3, p. 380-390, abr. 1975.

HAK, D. J.; The use of osteoconductive bone graft substitutes in orthopaedic trauma. **The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, Rosemont, v. 15, n. 9, p. 525-533, set. 2007.

HALDEMAN, K. O. The influence of periosteum on the survival of bone grafts. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, Boston, v.15, p.302-319, abr. 1933.

HEIPLE, K. G.; KEMDRICK, R. E.; HERDON, C. H.; CHASE, S. W. A critical evaluation of processed calf bone. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, Boston, v. 49, p. 1119-1127, set. 1967.

HENDRICKS, K. J.;LANE, D.; BURD, T. A.; LOWRY, K. J.; DAY, D.; PHAUP, J. G.; ANGLIN, J. O. Elution characteristics of tobramycin from polycaprolactone in a rabbit model. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia , n. 392, p. 418-426, nov. 2001.

HENDRIKS, J.G.E.; VAN HORNB, J.R; VAN DER MEI, H.C.; BUSSCHER H. J. Backgrounds of antibiotic-loaded bone cement and prosthesis-related infection. **Biomaterials**, Guilford, v. 25, n. 3, p. 545–556, fev. 2004.

HERTEL, R.; GERBER, A.; SCHLEGEL, U.; CORDEY, J.; RÜEGSEGGER, P.; RAHN, B. A. Cancellous bone graft for skeletal reconstruction: muscular versus periosteal bed, preliminary report. **Injury**, Amsterdam, s. 1, p. 59-70. 1994.

HUTMACHER, D. W.; SITTINGER, M. Periosteal cells in bone tissue engineering. **Tissue engineering**, New York, v. 9, s.1, p. 45-64, 2003.

ICHIYAMA, S.; OHTA, M.; SHIMOKATA, K.; KATO, N.; TAKEUCHI, J. Genomic DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological marker for study of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 29, n. 12, p. 2690-2695, dez. 1991.

ISEFUKU, S.; JOYNER, C. J.; SIMPSON, A.H. R. W. Gentamicin may have an adverse effect on osteogenesis. **Journal of orthopaedic trauma**, Hagerstown, v. 17, n. 3, p. 212-216, mar. 2003.

- IWAMOTO, Y.; SUGIOKA, Y.; CHUMAN, H.; MASUDA, S.; HOTOKEBUCHI, T.; KAWAI, S.; YAMAMOTO, M. Nationwide survey of bone grafting performed from 1980 through 1989 in Japan. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, v. 335, p. 292-297, fev. 1997.
- JOHNSON, E. E.; URIST, M. R.; FINERMAN, G. A. M. Repair of segmental defects of the tibia with cancellous bone grafts augmented with human bone morphogenetic protein: a preliminary report. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, n. 236, p. 251-257, nov. 1988.
- JOLLEY, M. E. Fluorescence polarization immunoassay for the determination of therapeutic drug levels in human plasma. **Journal of analytical toxicology**, v.5, n. 5, p. 236-240, set/out. 1981.
- JOLLEY, M. E.; STROUPE, S. D.; WANG, C-H. J.; PANAS, H. N.; KEEGAN, C. L.; SCHMIDT, R. L.; SCHWENZER, K. S. Fluorescence polarization immunoassay I: monitoring aminoglycoside antibiotics in serum and plasma. **Clinical chemistry**, Washington, v.27, n. 7, p. 1190-1196, jun. 1981.
- JOOSTEN, U.; JOIST, A.; FREBEL, T.; BRANDT, B.; DIEDERICHS, S.; EIFF, C. Evaluation of an in situ setting injectable calcium phosphate as a new carrier material for gentamicin in the treatment of chronic osteomyelitis: Studies in vitro and in vivo. **Biomaterials**, Guilford, v. 25, p. 4287-4295, ago. 2004.
- KARAOGLU, S.; BAKTIR, A.; KABAK, S.; ARASI, H. Experimental repair of segmental bone defects in rabbits by desmineralized allograft covered by free autogenous periosteum. **Injury**, Amsterdam, v. 33, p. 679-683, out. 2002.
- KING, K. F.; Periosteal pedicle grafting in dogs. **The Journal of bone and joint surgery. British volume**, London, v. 58, n. 1, p. 117-121, fev. 1976.
- KLEMM, K. W. Antibiotic bead chains. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, n. 295, p. 63-76, out. 1993.
- KNOTHE TATE, M. L.; RITZMAN, T. F.; SCHNEIDER, E.; KNOTHE, U. R. Testing of a new one-stage bone-transport surgical procedure exploiting the periosteum for the repair of long-bone defects. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, Boston, v. 89, n. 2, p. 307-316, fev. 2007.
- KNOTHE, U. R.; SPRINGFIELD, D. S. A novel surgical procedure for bridging of massive bone defects. **World journal of surgical oncology**, London, v. 3, n. 3, p. 1-7, fev. 2005.
- KOKUBO, S; FUJIMTO, R.; YOKOTA, S.; FUKUSHIMA. S.; NOZAKI, K.; TAKAHASHI, K.; MIYATA, K. Bone regeneration by recombinant human bone morphogenetic protein-2 and a novel biodegradable carrier in a rabbit ulnar defect model. **Biomaterials**, Guilford, v. 24, p. 1643-1651, abr. 2003.

LACK, W.; BÖSCH, P.; ARBES, H. Chronic osteomyelitis treated by cancellous homografts and fibrin adhesion. **The Journal of bone and joint surgery. British volume**, London, v.69, n. 2, p. 335-337, mar. 1987.

LANE, J. M.; SANDHU, H. S. Current approaches to experimental bone grafting, **Orthopedic clinics of North America**, Philadelphia, v. 18, n. 2, p. 213-225, abr. 1987.

LAZZARINI, L.; MADER, J. T.; CALHOUN, J. H. Osteomyelitis in long bones. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, Boston, v. 86, n. 10, p. 2305-2318, out. 2004.

LEESON, M. C.; STEVEN, B. L. Thermal aspects of the use of polymethylmethacrylate in large metaphyseal defects in bone: a Clinical review and laboratory Study **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, n. 295, p. 239-245, out. 1993.

LI, X.; HU, Y. The treatment of osteomyelitis with gentamicin-reconstituted bone xenograft-composite. **The Journal of bone and joint surgery. British volume**, London, v. 83, n. 7. p. 1063-1068, set. 2001.

LUCKE, M.; SCHMIDMAIER, G.; SADONI, S.; WILDEMANN, B.; SCHILLER, R.; HAAS, N. P.; RASCHKE, M. Gentamicin coating of metallic implants reduces implanted-related osteomyelitis in rats. **Bone**, New York, v.32, n. 5, p. 521-531, mai. 2003.

LUCKE, M.; WILDEMANN, B.; SADONI, S.; SURKE, C.; SCHILLER, R.; STEMBERGER, A.; RASCHKE, M.; HAAS, N. P.; SCHMIDMAIER, G. Systemic versus local application of gentamicin in prophylaxis of implant-related osteomyelitis in a rat model. **Bone**, New York, v. 36, n. 5, p. 770-778, mai. 2005.

MADER, J. T.; LANDON, G. C.; CALHOUN, J. Antimicrobial treatment of osteomyelitis. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, n. 295, p. 87-95, out. 1993.

MASQUELET, A. C. Muscle reconstruction in reconstructive surgery: soft tissue repair and long bone reconstruction. **Langenbecks Archives Surgery**, Berlin, v. 388, p. 344-346, sep. 2003.

MASQUELET, A. C.; FITOUSSI, F.; BEGUE, T.; MULLER G. P. Reconstruction des os longs par membrane induite et autogreffe spongieuse. **Annales de chirurgie plastique et esthétique**, Paris, n. 45, p. 346-53, jun. 2000.

MAURER, R. C.; DILLIN, L. Multistaged surgical management of posttraumatic segmental bone loss. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, n. 216, p. 162-170, mar. 1987.

MAY, J. W.; JUPITER, J. B.; WEILAND, A. J.; BYRD, H. S. Clinical classification of post-traumatic tibial osteomyelitis. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, Boston, v. 71, n. 9, p. 1422-1428, out. 1989.

McKIBBIN, B. The biology of fracture healing in long bones. **The Journal of bone and joint surgery. British volume**, London, v. 60-B, n. 2, p. 150-162, mai. 1978.

- MCLAREN, A. C. Alternative materials to acrylic bone cement for delivery of depot antibiotics in orthopaedic infections. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, n. 427, p. 101-106, out. 2004.
- MINELLI, E. B.; BENINI, B. M.; MAGNAN, B.; BARTOLOZZI, P. Release of gentamicin and vancomycin from temporary human hip spacers in two-stage revision of infected arthroplasty. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, London, n.53, p. 329-334, dez. 2003.
- MOORE, D. C.; PEDROZO, H. A.; CRISCO, J. J.; EHRlich, M. G. Preformed grafts of porcine small intestine submucosa (SIS) for bridging segmental bone defects. **Journal of biomedical materials research**. part A, Roboken, v. 69, n. 2, p. 259-266, mai. 2004.
- MORAN, J. M.; GREENWALD, A. S.; MATEJCZYK, M. B. Effect of gentamicin on shear and interface strengths of bone cement. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, n. 141, p. 96-101, jun. 1979.
- NA`WAS, T.; HAWWARI, A.; HENDRIX, E.; HEBDEN, J.; EDELMAN, R.; MARTIN, M., CAMPBELL, W.; NASO, R.; SCHWALBE, R.; FATTOM, A. I. Phenotypic and Genotypic Characterization of Nosocomial *Staphylococcus aureus* Isolates from Trauma Patients. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 36, n. 2, p. 414-420, fev. 1998.
- NAKAHARA, H.; TAKAOKA, K.; KOEZUKA, M.; SUGAMOTO, K.; TSUDA, T.; ONO, K. O. Periosteal bone formation elicited by partially purified bone morphogenetic protein. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, n. 239, p. 299-305, fev. 1989.
- NELSON, C. L.; EVANS, R. P.; BLAHA, J. D.; CALHOUN, J.; HENRY, S. L.; PATZAKIS, M. A comparison of gentamicin-impregnated polymethylmetacrilate bead implantation to conventional parenteral antibiotic therapy in infected total hip and knee arthroplasty. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, v. 295, p. 96-101, out. 1993.
- NELSON, C. L.; GRIFFIN, F. M.; HARRISON, B. S.; COOPER, R. E. In vitro elution characteristics of commercially and noncommercially prepared antibiotic PMMA beads. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, v. 284, p. 303-309, nov. 1992.
- NELSON, C. L.; HICKMON, S. G.; SKINNER, R. A. Treatment of experimental osteomyelitis by surgical debridement and the implantation of bioerodable, polyanhydride-gentamicin beads. **Journal of orthopaedic research**, Hoboken, v. 15, n. 2, p. 249-255, mar. 1997.
- NELSON, C.L. The current status of material used for depot delivery of drugs. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, v. 427, p. 72-78, out. 2004.
- NEUT, D.; VAN DE BELT, H.; STOKROOS, I.; VAN HORN, J. R.; VAN DER MEI, H. C.; BUSSCHER, H. J. Biomaterial-associated infections of gentamicin-loaded PMMA beads in orthopaedics revision surgery. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, London, v. 47, n. 6, p. 885-891, jun. 2001.
- NICHOLS, E. H. Acute, subacute and chronic infectious osteomyelitis. **Journal of the American medical association**. Chicago, v. 42, p. 439-466, fev. 1904.

- NORDEN, C. W. Experimental osteomyelitis: a description of the model. **The Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 122, n. 5, p. 410-418, nov. 1970.
- OELTGEN, P. R.; SHANK, W. A.; BLOUIN, R. A.; CLARK, T. Clinical evaluation of the Abbott TDx fluorescence polarization immunoassay analyzer. **Therapeutic drug monitoring**, New York, v. 6, n. 3, p. 360-367, 1984.
- OGDEN, L.; WILSON, R. C.; CLARK, C. H.; COLBY, E. D. Pharmacokinetics of gentamicin in rabbits. **Journal of veterinarian pharmacological therapy**, Oxford, n. 18, p. 156-159, abr. 1995.
- OSTERMANN, P. A. W.; HENRY, S. L.; SELIGSON, D. The role of local antibiotic therapy in the management of compound fractures. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, n. 295, p. 102-111, out. 1993.
- PALEY, D.; CATAGNI, M. A.; ARGNANI, F.; VILA, A.; BENEDETTI, G. B.; CATTANEO, R. Ilizarov treatment of tibial nonunions with bone loss. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, n. 241, p. 146-165, abr. 1989.
- PALEY, D.; YOUNG, M. C.; WILEY, A. M.; FORNASIER, V. L.; JACKSON, R. W. Percutaneous bone marrow grafting of fractures and bone defects. An experimental study in rabbits. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, n. 208, p. 300-312, jun. 1986.
- PATZAKIS, M. J.; MAZUR, K.; WILKINS, J.; SHERMAN, R.; HOLTOM, P. Septopal beads and autogenous bone grafting for bone defects in patients with chronic osteomyelitis. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, n. 295, p.112-118, out. 1993.
- PELISSIER, P.; MARTIN, D.; BAUDET, J.; LEPREUX, S.; MASQUELET, A. C. Behaviour of cancellous bone graft placed in induced membranes. **British journal of plastic surgery**, Edinburgh, v. 55, n.7, p. 596-598, out. 2002.
- PELISSIER, P.; MASQUELET, A. C.; BAREILLE, R.; PELISSIER, S. M.; AMEDEE, J. Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and could stimulate bone regeneration. **Journal of orthopaedic research**, Hoboken, v. 22, p. 73-79, jan. 2004.

- PERKA, C.; SHULTZ, O.; SPITZER, R.; LINDENHAYN, K.; BURMESTER, G. SITTINGER, M. Segmental bone repair by tissue-engineered periosteal cell transplants with bioresorbable fleece and fibrin scaffolds in rabbit. **Biomaterials**, Guilford, v. 21, p. 1145-1153, jun. 2000.
- PERRY, C. R.; RICE, S.; RITTERBUSCH, J. K.; BURDGE, R. E. Local administration of antibiotics with an implantable osmotic pump. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, n. 192, p.284-290, jan. 1985.
- PETRIE A.; SABIN, C. **Estatística médica**. São Paulo: Roca, 2007. 164 p.
- PETRIE, A. Statistics in orthopaedic papers. **The Journal of bone and joint surgery. British volume**, London, v. 88, n. 9, p. 1121-1136, set. 2006.
- PHEMISTER, D. B. Subperiosteal resection in osteomyelitis. **Journal of the American medical association**. Chicago, v. 4, p. 1994-2000, dez. 1915.
- PICADO, C. H. F.; PACCOLA, C. A. J.; FILHO, E. F. A. Correção da falha óssea femoral e tibial pelo método do transporte ósseo de Ilizarov. **Acta ortopédica brasileira**, São Paulo, v. 8, n. 4, p. 178-191, out. 2000.
- PINEDA, L. M.; BÜSING, M.; MEINIG, R. P.; GOGOLEWSKI, S. Bone regeneration with resorbable polymeric membranes. III. Effect of poly(l-lactide) membrane pore size on the bone healing process in large defects. **Journal of Biomedical Materials Research**, Hoboken, v. 31. p. 385-394, jun. 1996.
- PRINS, J. M.; BÜLLER, H. R. ; KUIJPER, E. J. ; TANGE, R. A. ; SPEELMAN, P. Once versus thrice daily gentamicin in patients with serious infections. **The Lancet**, London, v. 341, p. 335-339, fev. 1993.
- RASCHKE, M.; KOLBECK, S.; BAIL, H.; SCHMIDMAIER, G.; FLYVBJERG, A.; LINDNER, T.; DAHNE, M.; ROENNE, I.-A.; HAAS, N. Homologous growth hormone accelerates healing of segmental bone defects. **Bone**, New York, v. 29, n. 4, p. 368-373, out. 2001.
- RIEGELS-NILSEN, P.; ESPERSEN, F.; HÖLMIC, L. R., FRIMODT-MØLLER, N. Collagen with gentamicin for prophylaxis of postoperative infection. **Acta orthopaedica Scandinavica**, Basingstoke, v.66, n.1, p.69-72, fev. 1995.
- RITSILÄ, V. A.; SANTAVIRTA, S.; ALHOPURO, S.; POUSSA, M.; JAROMA, H.; RUBBAK, J. M.; ESKOLA, A.; HOIKKA, V.; SNELLMAN, O.; ÖSTERMAN, K. Periosteal and perichondral grafting in reconstructive surgery. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, n. 302, p. 259-265, mai. 1994.
- RUTLEDGE, B.; HUYETTE, D.; DAY, D.; ANGLLEN, J. Treatment of osteomyelitis with local antibiotics delivered via bioabsorbable polymer. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, n. 411, p. 280-287, jun. 2003.

SAVIN, V.; KARNISKI, L.; CUPPAGE, F.; HODGES, G.; CHONKO, A. Effect of gentamicin on isolated glomeruli and proximal tubules of the rabbit. **Laboratory investigation**, New York, v. 52, n. 1, p. 93-102, fev. 1985.

SCHÖTTLE, B. P.; WERNER, C. M. L.; DUMONT, C. E. Two-stage reconstruction with free vascularized soft tissue transfer and conventional bone graft for infected nonunions of the tibia 6 patients followed for 1.5 to 5 years. **Acta orthopaedica**, Basingtoke, v. 76, n. 6, p. 878-883, dez. 2005.

SCHRATT, H. E.; REGEL, G.; KIESEWETTER, B.; TSCHERNE, H. HIV-infektion durch kältekonservierte knochentransplantate. **Unfallchirurg**, Berlin, v. 99, n. 9, p. 679-684, set. 1996.

SCHURMAN, D. J.; TRINDADE, C.; HIRSHMAN, H. P.; MOSER, K.; KAJIYAMA, G.; STEVENS, P. Antibiotic-acrylic bone cement composites: studies of gentamicin and palacos. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, Boston, v. 60, n. 7, p. 380-391, out. 1978.

SEEHERMAN, H. J.; AZARI, K.; BIDIC, S.; ROGERS, L.; LI, X. J.; HOLLINGER, J. O.; WOZNEY, J. M. rhBMP-2 delivered in a calcium phosphate cement accelerates bridging of critical-sized defects in rabbit radii. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, Boston, v. 88, n. 7, p. 1553-1565, jul. 2006.

SEEHERMAN, H.; WOZNEY, J.; LI, R. Bone morphogenetic protein delivery systems. **Spine**, Philadelphia, v. 27, n. 16, s. 1, p. 16-23, ago. 2002.

SEELEY, S. K.; SEELEY, J. V.; TELEHOWSKI, P.; MARTIN, S.; TAVAKOLI, M.; COLTON, S. L.; LARSON, B.; FORRESTER, P.; ATKINSON, P. Volume and surface area study of tobramycin-polymethylmethacrylate beads. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, n. 420, p. 298-303, mar. 2004.

SELDES, R. M.; WINIARSKY, R.; JORDAN, L. C.; BALDINI, T.; BRAUSE, B.; ZODDA, F.; SCULCO, T. P. Liquid getamicin in bone cement: A laboratory study of a potentially more cost-effective cement spacer. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, Boston, v. 87-A, n. 2. p. 268-272, fev. 2005.

SELIGSON, D.; POPHAM, G. J.; VOOS, K.; HENRY, S. L.; FAGHRI, M. Antibiotic-leaching from polymethylmethacrylate beads. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, Boston, n. 75, p. 714-720, mai. 1993.

SHAND, J. M.; HEGGIE, A. A. C.; HOLMES, A. D.; HOLMES, W. Allogeneic bone grafting of calvarial defects: an experimental study in the rabbit. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, Copenhagen, v. 31, n. 5, p. 525-531, out. 2002.

SHELLER, M. R.; CROWTHER, R. S.; KINNEY, J. H.; YANG, J.; DI JORIO, S.; BREUNIG, T.; CARNEY, D. H.; RYABY, J. T. Repair of rabbit segmental defect with the thrombin peptide TP508. **Journal of orthopaedic research**, Hoboken, v. 22, p. 1094-1099, set. 2004.

SILVA, P. G. **Comparação das densidades ópticas e radiográficas analisadas pelo fotodensitômetro M.R.A. e pelo “software” Adobe Photoshop 4.0 dos filmes Kodak TMS-1 processados na solução Kodak RP X-OMAT, a diferentes temperaturas na processadora CRONEX T4.** Bauru, 1999. 113f, Tese, Faculdade de odontologia de Bauru da universidade de São Paulo, Bauru, 1999.

SIMPSON, A. H. R. W. The blood supply of the periosteum. **Journal of Anatomy**, London, v.140, pt.4, p. 697-704, jun. 1995.

SMELTZER, M. S.; THOMAS, J. R.; HICKMON, S. G.; SKINNER, R. A.; NELSON, C. L.; GRIFFITH, D.; PARR, T. R.; EVANS, R. P. Characterization of a rabbit model of Staphylococcal osteomyelitis. **Journal of orthopaedic research**, Hoboken, v. 15, p. 414-421, mai. 1997.

SOUTHWOOD, R. T.; RICE, J. L.; MCDONALD, P. J.; HAKENDORF, P. H.; ROZENBILDS, M. A. Infection in experimental arthroplasties. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, v. 224, p. 33-36, nov. 1987.

SOWTHWOOD, L. L.; FRISBIE, D. D.; KAWCAK, C. E.; GHIVIZZANI, S. C.; EVANS, C. H.; MCILWRAITH, C. W. Evaluation of Ad-BMP-2 for enhancing fracture healing in an infected defect fracture rabbit model. **Journal of orthopaedic research**, Hoboken, v. 22, n. 1, p. 66-72, jan. 2004.

STALLMANN, H. P.; FABER, C.; BRONCKERS, A. L.; NIEUW AMERONGEN, A. V.; WUISMAN, P. I. Osteomyelitis prevention in rabbits using antimicrobial peptide hLF1-11 or gentamicin-containing calcium phosphate cement. **Journal of antimicrobial chemotherapy**. London, v. 54, n. 2, p. 472-476, ago. 2004.

STENGEL, D.; BAUWENS K.; SEHOULI, J.; EKKEMKAMP, A.; PORZOLT, F. Systematic review and meta-analysis of antibiotic therapy for bone and joint infections. **The Lancet**, London, v. 1, p. 175-188, out. 2001.

SUMMERS, B. N.; EISENSTEIN, S. M. Donor site pain from the ilium: a complication of lumbar spine fusion, **The Journal of bone and joint surgery. British volume**, London, v. 71, n. 4, p. 677-680, ago. 1989.

SVERZUT, C. E.; FARIA, P. E. P.; MAGDALENA, C. M.; TRIVELLATO, A. E.; MELLO-FILHO, F. V.; PACCOLA, C. A. J.; GOGOLEWSKI, S.; SALATA, L. A. Reconstruction of mandibular segmental defects using the guided-bone regeneration technique with polylactide membranes and/or autogenous bone graft: a preliminary study on the influence of membrane permeability. **Journal of oral and maxillofacial surgery**, Philadelphia, v. 66, n. 4, p. 647-656, abr. 2008.

TORRADO, S.; FRUTOS, P.; FRUTOS, G. Gentamicin bone cements: characterization and release (in vitro and in vivo assays). **International journal of pharmaceutics**, Amsterdam, v. 217, p. 57-69, abr. 2001.

Transplant foundation, Inc. Disponível em:

<<http://www.transplantfoundation.org/organfacts.htm>. Acesso em 28 dez. 2007.

TRIPPEL, S. B. Antibiotic-impregnated cement in total joint arthroplasty **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, Boston, v. 68, n. 8, p. 1297-1302, out. 1986.

TRUETA, J. The role of the vessels in the osteogenesis. **The Journal of bone and joint surgery. British volume**, London, v. 45, n. 2, p. 402-418, mai. 1963.

TRUETA, J.; CAVADIAS, A. X. Vascular changes caused by the Küntscher type of nailing: an experimental study in the rabbit. **The Journal of bone and joint surgery. British volume**, London, v. 37, n. 3, p. 492-505, ago. 1955.

URIST, M., R.; JOHNSON, R. W.; The healing of fractures in man under clinical conditions. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, Boston, v. 25, n. 2, p. 375-426, abr. 1943.

VAUDAUX, P. E.; ZULIAN, G.; HUGGLER, E.; WALDVOGEL, F. A. Attachment of *Staphylococcus aureus* to polymethylmethacrylate increases its resistance to phagocytosis in foreign body infection. **Infection and immunity**, Washington, v. 50, n. 2, p. 472-477, nov. 1985.

VIEIRA, S. **Análise de variância (ANOVA)**. São Paulo: Atlas, 2006. 204 p.

VIEIRA, S. **Bioestatística: tópicos avançados**. 2ª. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 216 p.

VIEIRA, S. **Introdução à bioestatística**. 3ª. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 1980. 196 p.

VOLPON, J. B. **A matriz de osso cortical homólogo granulado descalcificado na correção de falha óssea diafisária**. Estudo experimental em coelhos. 1980, 71f, Tese de doutoramento, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1980.

VOLPON, J. B. **Estudo experimental comparativo entre o enxerto homólogo descalcificado simples e o enxerto homólogo descalcificado retardado**. 1985, 78f, Tese de livre docência, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1985.

WAHLING, H.; DINGELDEIN, E.; BERGMANN, R.; REUSS, K. The release of gentamicin from polymethylmethacrylate beads: an experimental and pharmacokinetic study. **The Journal of bone and joint surgery. British volume**, London, v. 60, n. 2, p. 270-275, mai. 1978.

WAHLING, H.; DINGELDEIN, E.; BUCHHOLZ, H. W.; BUCHHOLZ, M.; BACHMANN, F. Pharmacokinetic study of gentamicin-loaded cement in total hip replacements: comparative effects of varying dosage. **The Journal of bone and joint surgery. British volume**, London, v. 66, n. 2, p.175-179, mar. 1984.

WALENKAMP, G. H. I. M.; VREE, T. B.; VAN RENS, T. J. G. Gentamicin-PMMA beads pharmacokinetic and nephrotoxicological study. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, n. 205, p. 171-183, abr. 1986.

WELTON, A. The Aminoglycosides. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, v. 190, p. 66-74, nov. 1984.

WIGGINS, C. E.; NELSON, C. L.; CLARKE, R.; THOMPSON, C. H. concentration of antibiotics in normal bone after intravenous injection. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, Boston, v. 60, p. 60-93, jan. 1967.

WILLENEGGER, H. Klinik und therapie der pyogenem knocheninfektion. **Der Chirurg**, Berlin, v. 41, n. 5, p. 215-221, may. 1970.

WOODS, G. L., YAM, P. Evaluation of MicroScan MIC panels for detection of oxacillin-resistant Staphylococci. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 26, n. 5, p. 816-820, mai. 1988.

WOODS, G. L.; LATEMPLE, D.; CRUZ, C. Evaluation of MicroScan rapid Gram-positive panels for detection of oxacillin-resistant Staphylococci. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 32, n. 4, p. 1058-1059, abr. 1994.

WORLOCK, P.; SLACK, R.; HARVEY, L.; MAWHINNEY, R. The prevention of infection in open fractures: an experimental study of the effect of fracture stability. **Injury**, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 31-38, jan. 1994.

WROBLESKI, B. M.; Leaching out from acrylic bone cement experimental evaluation. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, n. 124, p. 311-312, mai. 1977.

YOO, J. U.; JOHNSTONE, B. The role of osteochondral progenitor cells in fracture repair. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, n. 355 s, p. 73-81, out. 1998.

YOUNGER, E. M.; CHAPMAN, M. W. Morbidity at bone graft donor sites. **Journal of orthopedic trauma**, Hagerstown, v. 3, n. 3, p. 192-195, set. 1989.

ZALAVRAS, C. G.; PATZAKIS, M. J.; HOLTOM, P. Local antibiotic therapy in the treatment of open fractures and osteomyelitis. **Clinical orthopedics and related research**, Philadelphia, n. 427, p. 86-93, out. 2004.

ZEE, A.; VERBAKEL, H.; ZON, J.; FRENAY, I.; BELKUM, A.; PEETERS, M.; BUITING, A.; BERGMANS, A. Molecular genotyping of *Staphylococcus aureus* strains: comparison of repetitive element sequence-based PCR with various typing methods and isolation of a novel epidemicity marker. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 37, n. 2, p. 342-349, fev. 1999.

ZUCMAN, J.; MAURER, P.; BERBESSON, C. The effects of autografts of bone and periosteum in recent diaphysial fractures. An experimental study in the rabbit. **The Journal of bone and joint surgery. British volume**, London, v. 50, n. 2, p. 409-422, mai. 1968.

9. Apêndice

9.1 Tabelas de cálculos estatísticos

TESTE DE ELUIÇÃO ESPAÇADORES:

GENTAMICINA ELUIDA POR ESPAÇADOR			
One-way analysis of variance			
P value	1		
P value summary	ns		
Are means signif. different? (P < 0.05)	No		
Number of groups	20		
F	0,01116		
R squared	0.002116		
Bartlett's test for equal variances			
Bartlett's statistic (corrected)	1,28		
P value	1		
P value summary	ns		
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No		
ANOVA Table			
	SS	df	MS
Treatment (between columns)	1,291	19	0,06796
Residual (within columns)	608,9	100	6,089
Total	610,2	119	
Tukey's Multiple Comparison Test	NS		

ELUIÇÃO MEDIA POR DIA DO ESTUDO**TESTE DE BARLET ($p < 0.0001$) INVIABILIZAVA ANOVA**

GENTAMICINA ELUIDA POR DATA			
Kruskal-Wallis test			
P value	P<0.0001		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	***		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	6		
Kruskal-Wallis statistic	91,87		
Dunn's Multiple Comparison Test			
	Difference in rank sum	P value	Summary
D1 vs D2	24,25	P > 0.05	ns
D1 vs D7	53,23	P < 0.001	***
D1 vs D14	56,33	P < 0.001	***
D1 vs D21	76,48	P < 0.001	***
D1 vs D28	89,73	P < 0.001	***
D2 vs D7	28,98	P > 0.05	ns
D2 vs D14	32,08	P > 0.05	ns
D2 vs D21	52,23	P < 0.001	***
D2 vs D28	65,48	P < 0.001	***
D7 vs D14	3,1	P > 0.05	ns
D7 vs D21	23,25	P > 0.05	ns
D7 vs D28	36,5	P < 0.05	*
D14 vs D21	20,15	P > 0.05	ns
D14 vs D28	33,4	P < 0.05	*
D21 vs D28	13,25	P > 0.05	ns

TAMANHO DA FALHA NO INTRA-OPERATORIO

FALHA INTRA-OP			
One-way analysis of variance			
P value	0,4884		
P value summary	ns		
Are means signif. different? (P < 0.05)	No		
Number of groups	5		

F	0,8801		
R squared	0,1117		
Bartlett's test for equal variances			
Bartlett's statistic (corrected)			
P value			
P value summary	ns		
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No		
ANOVA Table			
	SS	df	MS
Treatment (between columns)	0,6566	4	0,1641
Residual (within columns)	5,222	28	0,1865
Total	5,879	32	
Tukey's Multiple Comparison Test			
	Mean Diff.	q	P value
G1 vs G2	0	0	P > 0.05
G1 vs G3	0,1667	0,9013	P > 0.05
G1 vs G4	-0,1111	0,6523	P > 0.05
G1 vs G5	-0,25	1,436	P > 0.05
G2 vs G3	0,1667	0,9013	P > 0.05
G2 vs G4	-0,1111	0,6523	P > 0.05
G2 vs G5	-0,25	1,436	P > 0.05
G3 vs G4	-0,2778	1,726	P > 0.05
G3 vs G5	-0,4167	2,526	P > 0.05
G4 vs G5	-0,1389	0,936	P > 0.05

TAMANHO DA FALHA NO INTRA-OPERATORIO APÓS DESBRIDAMENTO

G1 +G2 + G3 X G1-POS + G2-POS + G3-POS	
Paired t test	
P value	P<0.0001
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t. df	t=5.183 df=22
Number of pairs	23

G3 X G3-POS	
Paired t test	
P value	0,0478
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t. df	t=2.607 df=5
Number of pairs	6

G4 X G4-POS	
Paired t test	
P value	0,0023
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t. df	t=4.400 df=8
Number of pairs	9

G5 X G5-POS	
Paired t test	
P value	0,0199
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t. df	t=3.000 df=7
Number of pairs	8

ANTIBIOGRAMA

ANTIBIOGRAMA			
One-way analysis of variance			
P value	0,1002		
P value summary	ns		
Are means signif. different? (P < 0.05)	No		
Number of groups	29		
F	1,371		
R squared	0,07642		
Bartlett's test for equal variances			
Bartlett's statistic (corrected)			
P value			
P value summary	ns		
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No		
ANOVA Table			
	SS	df	MS
Treatment (between columns)	8,479	28	0,3028
Residual (within columns)	102,5	464	0,2208
Total	110,9	492	
Tukey's Multiple Comparison Test			
	NS		

AVALIAÇÃO RADIOGRAFICA OSTEOMIELITE (CLASSIF. DE CALHOUN)

OSTEOMIELITE NO MOMENTO DO DESBRIDAMENTO			
One-way analysis of variance			
P value	0,0615		
P value summary	ns		
Are means signif. different? (P < 0.05)	No		
Number of groups	3		
F	3,216		
R squared	0,2433		
Bartlett's test for equal variances			
Bartlett's statistic (corrected)			
P value	6,75		
P value summary	0,0342		
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	*		
	Yes		
ANOVA Table			
	SS	df	MS
Treatment (between columns)	1,693	2	0,8463
Residual (within columns)	5,264	20	0,2632
Total	6,957	22	
Tukey's Multiple Comparison Test			
	Mean Diff.	q	P value
3 DESBRID vs 4 DESBRID	0,6111	3,196	P > 0.05
3 DESBRID vs 5 DESBRID	0,625	3,19	P > 0.05
4 DESBRID vs 5 DESBRID	0,01389	0,07879	P > 0.05

OSTEOMIELITE 4 SEMANAS			
One-way analysis of variance			
P value	0,1228		
P value summary	ns		
Are means signif. different? (P < 0.05)	No		
Number of groups	3		
F	2,333		
R squared	0,1892		
Bartlett's test for equal variances			
Bartlett's statistic (corrected)			
P value	1,556		
P value summary	0,4594		
	ns		

Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No		
ANOVA Table			
	SS	df	MS
Treatment (between columns)	7,748	2	3,874
Residual (within columns)	33,21	20	1,66
Total	40,96	22	
Tukey's Multiple Comparison Test			
	Mean Diff.	q	P value
3 4 SEM vs 4 4 SEM	-1	2,082	P > 0.05
3 4 SEM vs 5 4 SEM	0,2917	0,5927	P > 0.05
4 4 SEM vs 5 4 SEM	1,292	2,917	P > 0.05

OSTEOMIELITE 8 SEMANAS			
One-way analysis of variance			
P value	0,459		
P value summary	ns		
Are means signif. different? (P < 0.05)	No		
Number of groups	3		
F	0,8099		
R squared	0.07492		
Bartlett's test for equal variances			
Bartlett's statistic (corrected)			
P value			
P value summary	ns		
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No		
ANOVA Table			
	SS	df	MS
Treatment (between columns)	2,222	2	1,111
Residual (within columns)	27,43	20	1,372
Total	29,65	22	
Tukey's Multiple Comparison Test			
	Mean Diff.	q	P value
3 8 SEM vs 4 8 SEM	-0,7778	1,782	P > 0.05
3 8 SEM vs 5 8 SEM	-0,375	0,8385	P > 0.05
4 8 SEM vs 5 8 SEM	0,4028	1,001	P > 0.05

OSTEOMIELITE 12 SEMANAS			
One-way analysis of variance			
P value	0,2426		
P value summary	ns		
Are means signif. different? (P < 0.05)	No		
Number of groups	3		
F	1,522		
R squared	0,1321		
Bartlett's test for equal variances			
Bartlett's statistic (corrected)			
P value			
P value summary	ns		
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No		
ANOVA Table			
	SS	df	MS
Treatment (between columns)	2,435	2	1,217
Residual (within columns)	16	20	0,8
Total	18,43	22	
Tukey's Multiple Comparison Test			
	Mean Diff.	q	P value
3 12 SEM vs 4 12 SEM	-0,6667	2	P > 0.05
3 12 SEM vs 5 12 SEM	0	0	P > 0.05
4 12 SEM vs 5 12 SEM	0,6667	2,169	P > 0.05

DISTANCIA CARPO-FALHA NO RX

CARPO - FALHA				
One-way analysis of variance				
P value	0,0484			
P value summary	*			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	5			
F	2,74			
R squared	0,2813			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	6,731			
P value	0,1508			
P value summary	ns			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
ANOVA Table				
	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	116,5	4	29,12	
Residual (within columns)	297,5	28	10,63	
Total	414	32		
Tukey's Multiple Comparison Test				
	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G1 vs G2	-0,4	0,2744	P > 0,05	-6,411 to 5,611
G1 vs G3	-4,167	2,985	P > 0,05	-9,922 to 1,589
G1 vs G4	-4,667	3,63	P > 0,05	-9,968 to 0,6346
G1 vs G5	-3,75	2,854	P > 0,05	-9,168 to 1,668
G2 vs G3	-3,767	2,699	P > 0,05	-9,522 to 1,989
G2 vs G4	-4,267	3,319	P > 0,05	-9,568 to 1,035
G2 vs G5	-3,35	2,549	P > 0,05	-8,768 to 2,068
G3 vs G4	-0,5	0,4116	P > 0,05	-5,509 to 4,509
G3 vs G5	0,4167	0,3347	P > 0,05	-4,716 to 5,550
G4 vs G5	0,9167	0,8184	P > 0,05	-3,702 to 5,535

CARPO FALHA INFECÇÃO X SEM INFECÇÃO	
G1 + G2 X G3 +G4 +G5	
Unpaired t test	
P value	P<0.0001
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=5.269 df=31
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column G	14.50 ± 0.1667 N=10
Mean ± SEM of column H	16.17 ± 0.1953 N=23
Difference between means	-1.674 ± 0.3177
95% confidence interval	1.026 to 2.322
R squared	0,4725
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	3.159, 22, 9
P value	0,0392
P value summary	*
Are variances significantly different?	Yes

TAMANHO DA FALHA INICIAL

TAMANHO FALHA INICIAL NO RX				
One-way analysis of variance				
P value	0,0004			
P value summary	***			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	5			
F	7,121			
R squared	0.5043			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	7.236			
P value	0.1239			
P value summary	ns			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
ANOVA Table				
	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	20.84	4	5,211	
Residual (within columns)	20.49	28	0,7317	
Total	41,33	32		
Tukey's Multiple Comparison Test				
	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G1 vs G2	0,6	1,568	P > 0.05	-0.9774 to 2.177
G1 vs G3	-1,533	4,186	P < 0.05	-3.044 to -0.023108
G1 vs G4	-1,422	4,215	P < 0.05	-2.813 to -0.03108
G1 vs G5	-1,2	3,48	P > 0.05	-2.622 to 0.2219
G2 vs G3	-2,133	5,824	P < 0.01	-3.644 to -0.6231
G2 vs G4	-2,022	5,994	P < 0.01	-3.413 to -0.6311
G2 vs G5	-1,8	5,22	P < 0.01	-3.222 to -0.3781
G3 vs G4	0,1111	0,3485	P > 0.05	-1.203 to 1.426
G3 vs G5	0,3333	1,02	P > 0.05	-1.014 to 1.680
G4 vs G5	0,2222	0,7561	P > 0.05	-0.9897 to 1.434

TAMANHO DA FALHA COM 4 SEMANAS

TAMANHO DA FALHA 4SEM				
One-way analysis of variance				
P value	0,0008			
P value summary	***			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	5			
F	6,519			
R squared	0.4913			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	25.86			
P value	P<0.0001			
P value summary	***			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes			
ANOVA Table				
	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	686,8	4	171,7	
Residual (within columns)	711,1	27	26,34	
Total	1398	31		
Tukey's Multiple Comparison Test				
	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G1 vs G2	8,8	3,834	P > 0.05	-0.6879 to 18.29
G1 vs G3	0,5667	0,2579	P > 0.05	-8.517 to 9.651
G1 vs G4	-5,975	2,888	P > 0.05	-14.53 to 2.577
G1 vs G5	1,4	0,6767	P > 0.05	-7.152 to 9.952
G2 vs G3	-8,233	3,747	P > 0.05	-17.32 to 0.8507
G2 vs G4	-14,78	7,142	P < 0.001	-23.33 to -6.223
G2 vs G5	-7,4	3,577	P > 0.05	-15.95 to 1.152
G3 vs G4	-6,542	3,338	P > 0.05	-14.64 to 1.560

G3 vs G5	0,8333	0,4252	P > 0,05	-7,269 to 8,935
G4 vs G5	7,375	4,065	P > 0,05	-0,1259 to 14,88

TAMANHO DA FALHA COM 8 SEMANAS

TAMANHO DA FALHA 8 SEM				
One-way analysis of variance				
P value	0,3871			
P value summary	ns			
Are means signif. different? (P < 0.05)	No			
Number of groups	5			
F	1,077			
R squared	0,1376			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	5,331			
P value	0,255			
P value summary	ns			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
ANOVA Table				
	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	143,6	4	35,89	
Residual (within columns)	899,4	27	33,31	
Total	1043	31		
Tukey's Multiple Comparison Test				
	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G1 vs G2	2,4	0,93	P > 0,05	-8,270 to 13,07
G1 vs G3	-4,267	1,727	P > 0,05	-14,48 to 5,949
G1 vs G4	-2,475	1,064	P > 0,05	-12,09 to 7,143
G1 vs G5	-2,1	0,903	P > 0,05	-11,72 to 7,518
G2 vs G3	-6,667	2,698	P > 0,05	-16,88 to 3,549
G2 vs G4	-4,875	2,095	P > 0,05	-14,49 to 4,743
G2 vs G5	-4,5	1,934	P > 0,05	-14,12 to 5,118
G3 vs G4	1,792	0,813	P > 0,05	-7,320 to 10,90
G3 vs G5	2,167	0,983	P > 0,05	-6,945 to 11,28
G4 vs G5	0,375	0,184	P > 0,05	-8,061 to 8,811

TAMANHO DA FALHA COM 12 SEMANAS

12 SEM				
One-way analysis of variance				
P value	0,0084			
P value summary	**			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	5			
F	4,266			
R squared	0,3873			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)				
P value				
P value summary	ns			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
ANOVA Table				
	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	303,4	4	75,85	
Residual (within columns)	480,1	27	17,78	
Total	783,5	31		
Tukey's Multiple Comparison Test				
	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G1 vs G2	0	0	P > 0,05	-7,796 to 7,796
G1 vs G3	-2,667	1,477	P > 0,05	-10,13 to 4,797
G1 vs G4	-4,375	2,574	P > 0,05	-11,40 to 2,652
G1 vs G5	-8,125	4,78	P < 0,05	-15,15 to -1,098

G2 vs G3	-2,667	1,477	P > 0.05	-10.13 to 4.797
G2 vs G4	-4,375	2,574	P > 0.05	-11.40 to 2.652
G2 vs G5	-8,125	4,78	P < 0.05	-15.15 to -1.098
G3 vs G4	-1,708	1,061	P > 0.05	-8.365 to 4.949
G3 vs G5	-5,458	3,39	P > 0.05	-12.12 to 1.199
G4 vs G5	-3,75	2,515	P > 0.05	-9.913 to 2.413

PERCENTUAL DE PREENCHIMENTO DA FALHA COM 4 SEMANAS

% 4 SEM				
One-way analysis of variance				
P value	0,0675			
P value summary	ns			
Are means signif. different? (P < 0.05)	No			
Number of groups	5			
F	2,483			
R squared	0,2689			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	7,735			
P value	0,1018			
P value summary	ns			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
ANOVA Table				
	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	4370	4	1092	
Residual (within columns)	11880	27	440	
Total	16250	31		
Tukey's Multiple Comparison Test				
	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G1 vs G2	-30	3,198	P > 0.05	-68.78 to 8.781
G1 vs G3	-9,167	1,021	P > 0.05	-46.30 to 27.96
G1 vs G4	1,25	0,1478	P > 0.05	-33.71 to 36.21
G1 vs G5	4,375	0,5174	P > 0.05	-30.58 to 39.33
G2 vs G3	20,83	2,32	P > 0.05	-16.30 to 57.96
G2 vs G4	31,25	3,696	P > 0.05	-3.706 to 66.21
G2 vs G5	34,38	4,065	P > 0.05	-0.5814 to 69.33
G3 vs G4	10,42	1,3	P > 0.05	-22.70 to 43.53
G3 vs G5	13,54	1,69	P > 0.05	-19.57 to 46.66
G4 vs G5	3,125	0,4214	P > 0.05	-27.53 to 33.78

PERCENTUAL DE PREENCHIMENTO DA FALHA COM 8 SEMANAS

% 8 sem				
One-way analysis of variance				
P value	0,0079			
P value summary	**			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	5			
F	4,313			
R squared	0,3898			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	4,256			
P value	0,3724			
P value summary	ns			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
ANOVA Table				
	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	12180	4	3046	
Residual (within columns)	19070	27	706,2	
Total	31250	31		
Tukey's Multiple Comparison Test				
	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff

G1 vs G2	5	0,4207	P > 0,05	-44.13 to 54.13
G1 vs G3	41,67	3,662	P > 0,05	-5.372 to 88.71
G1 vs G4	43,75	4,084	P > 0,05	-0.5358 to 88.04
G1 vs G5	46,88	4,376	P < 0,05	2.589 to 91.16
G2 vs G3	36,67	3,222	P > 0,05	-10.37 to 83.71
G2 vs G4	38,75	3,617	P > 0,05	-5.536 to 83.04
G2 vs G5	41,88	3,909	P > 0,05	-2.411 to 86.16
G3 vs G4	2,083	0,2053	P > 0,05	-39.87 to 44.04
G3 vs G5	5,208	0,5132	P > 0,05	-36.74 to 47.16
G4 vs G5	3,125	0,3326	P > 0,05	-35.72 to 41.97

PERCENTUAL DE PREENCHIMENTO DA FALHA COM 12 SEMANAS

%12 SEM				
One-way analysis of variance				
P value	P<0.0001			
P value summary	***			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	5			
F	18,34			
R squared	0.731			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	1,824			
P value	0,7681			
P value summary	ns			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
ANOVA Table				
	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	15980	4	3994	
Residual (within columns)	5880	27	217,8	
Total	21860	31		
Tukey's Multiple Comparison Test				
	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G1 vs G2	15	2,273	P > 0,05	-12.28 to 42.28
G1 vs G3	44.17	6,99	P < 0,001	18.04 to 70.29
G1 vs G4	55.63	9,35	P < 0,001	31.03 to 80.22
G1 vs G5	58.75	9,876	P < 0,001	34.16 to 83.34
G2 vs G3	29.17	4,616	P < 0,05	3.045 to 55.29
G2 vs G4	40.63	6,829	P < 0,001	16.03 to 65.22
G2 vs G5	43.75	7,354	P < 0,001	19.16 to 68.34
G3 vs G4	11,46	2,033	P > 0,05	-11.84 to 34.76
G3 vs G5	14,58	2,588	P > 0,05	-8.714 to 37.88
G4 vs G5	3,125	0,5989	P > 0,05	-18.44 to 24.69

CLASSIFICAÇÃO DE LANE COM 12 SEMANAS

LANE 12 SEM				
One-way analysis of variance				
P value	0,0001			
P value summary	***			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	5			
F	8,866			
R squared	0.5678			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	1,494			
P value	0.8278			
P value summary	ns			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
ANOVA Table				
	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	132	4	33	

Residual (within columns)	100,5	27	3,722	
Total	232,5	31		
Tukey's Multiple Comparison Test				
	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G1 vs G2	2,2	2,55	P > 0,05	-1,367 to 5,767
G1 vs G3	4,267	5,165	P < 0,01	0,8519 to 7,681
G1 vs G4	5,225	6,719	P < 0,001	2,010 to 8,440
G1 vs G5	5,725	7,362	P < 0,001	2,510 to 8,940
G2 vs G3	2,067	2,502	P > 0,05	-1,348 to 5,481
G2 vs G4	3,025	3,89	P > 0,05	-0,1899 to 6,240
G2 vs G5	3,525	4,533	P < 0,05	0,3101 to 6,740
G3 vs G4	0,9583	1,301	P > 0,05	-2,087 to 4,004
G3 vs G5	1,458	1,98	P > 0,05	-1,587 to 4,504
G4 vs G5	0,5	0,7331	P > 0,05	-2,320 to 3,320

CLASSIFICAÇÃO DE AMBROSE COM 12 SEMANAS

AMBROSE 12 SEM				
One-way analysis of variance				
P value	0,003			
P value summary	**			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	5			
F	5,219			
R squared	0,436			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	18,34			
P value	0,0011			
P value summary	**			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes			
ANOVA Table				
	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	440,4	4	110,1	
Residual (within columns)	569,6	27	21,1	
Total	1010	31		
Tukey's Multiple Comparison Test				
	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G1 vs G2	-1	0,4868	P > 0,05	-9,492 to 7,492
G1 vs G3	-4,067	2,068	P > 0,05	-12,20 to 4,063
G1 vs G4	-6,9	3,727	P > 0,05	-14,55 to 0,7543
G1 vs G5	-10,03	5,414	P < 0,01	-17,68 to -2,371
G2 vs G3	-3,067	1,559	P > 0,05	-11,20 to 5,063
G2 vs G4	-5,9	3,187	P > 0,05	-13,55 to 1,754
G2 vs G5	-9,025	4,874	P < 0,05	-16,68 to -1,371
G3 vs G4	-2,833	1,615	P > 0,05	-10,08 to 4,418
G3 vs G5	-5,958	3,397	P > 0,05	-13,21 to 1,293
G4 vs G5	-3,125	1,924	P > 0,05	-9,838 to 3,588

HISTOGRAMA

HISTOGRAMA 12 SEM				
One-way analysis of variance				
P value	P < 0,0001			
P value summary	***			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	5			
F	12,39			
R squared	0,6473			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	4,212			
P value	0,3781			
P value summary	ns			

Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
ANOVA Table				
	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	3237	4	809,3	
Residual (within columns)	1764	27	65,32	
Total	5001	31		
Tukey's Multiple Comparison Test				
	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G1 vs G2	0,2	0,0553	P > 0,05	-14,74 to 15,14
G1 vs G3	22,96	6,634	P < 0,001	8,652 to 37,26
G1 vs G4	20,42	6,269	P < 0,01	6,954 to 33,89
G1 vs G5	22,09	6,779	P < 0,001	8,618 to 35,56
G2 vs G3	22,76	6,576	P < 0,001	8,452 to 37,06
G2 vs G4	20,22	6,207	P < 0,01	6,754 to 33,69
G2 vs G5	21,89	6,718	P < 0,001	8,418 to 35,36
G3 vs G4	-2,535	0,8213	P > 0,05	-15,29 to 10,22
G3 vs G5	-0,8713	0,2823	P > 0,05	-13,63 to 11,89
G4 vs G5	1,664	0,5822	P > 0,05	-10,15 to 13,48

HISTOLOGIA CLASSIFICAÇÃO DE AMBROSE INFLAMAÇÃO INTRA-OSSEA

AMBROSE INFLAMAÇÃO INTRA-OSSEA				
One-way analysis of variance				
P value	0,0108			
P value summary	*			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	5			
F	3,599			
R squared	0,1962			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	10,31			
P value	0,0355			
P value summary	*			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes			
ANOVA Table				
	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	11,95	4	2,988	
Residual (within columns)	48,98	59	0,8302	
Total	60,94	63		
Tukey's Multiple Comparison Test				
	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G1 vs G2	-0,06667	0,2252	P > 0,05	-1,245 to 1,112
G1 vs G3	-0,8545	3,036	P > 0,05	-1,975 to 0,2659
G1 vs G4	-0,9	3,607	P > 0,05	-1,893 to 0,09318
G1 vs G5	-1,114	4,177	P < 0,05	-2,176 to -0,05253
G2 vs G3	-0,7879	2,721	P > 0,05	-1,940 to 0,3647
G2 vs G4	-0,8333	3,222	P > 0,05	-1,863 to 0,1960
G2 vs G5	-1,048	3,806	P > 0,05	-2,143 to 0,04800
G3 vs G4	-0,04545	0,1879	P > 0,05	-1,008 to 0,9172
G3 vs G5	-0,2597	1,001	P > 0,05	-1,293 to 0,7735
G4 vs G5	-0,2143	0,9544	P > 0,05	-1,108 to 0,6793

AMBROSE NEO-FORMAÇÃO OSSEA

AMBROSE NEO-FORMAÇÃO OSSEA				
One-way analysis of variance				
P value	P<0.0001			
P value summary	***			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	5			
F	7.461			
R squared	0,3437			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	6,631			
P value	0,1567			
P value summary	ns			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
ANOVA Table				
	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	19,78	4	4,944	
Residual (within columns)	37,77	57	0,6626	
Total	57,55	61		
Tukey's Multiple Comparison Test				
	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G1 vs G2	0,5778	2,185	P > 0.05	-0.4765 to 1.632
G1 vs G3	-1,109	4,41	P < 0,05	-2.112 to -0.1065
G1 vs G4	-0,8111	3,573	P > 0.05	-1.716 to 0.09387
G1 vs G5	-0,7714	3,237	P > 0.05	-1.721 to 0.1786
G2 vs G3	-1,687	6,52	P < 0,001	-2.718 to -0.6555
G2 vs G4	-1,389	5,91	P < 0,001	-2.326 to -0.4521
G2 vs G5	-1,349	5,486	P < 0,01	-2.330 to -0.3689
G3 vs G4	0,298	1,353	P > 0.05	-0.5802 to 1.176
G3 vs G5	0,3377	1,456	P > 0.05	-0.5868 to 1.262
G4 vs G5	0,03968	0,1935	P > 0.05	-0.7780 to 0.8573

AMBROSE TOTAL

AMBROSE TOTAL				
One-way analysis of variance				
P value	P<0.0001			
P value summary	***			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	5			
F	7.636			
R squared	0,3411			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	21,91			
P value	0,0002			
P value summary	***			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes			
ANOVA Table				
	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	57,8	4	14,45	
Residual (within columns)	111,6	59	1,892	
Total	169,4	63		
Tukey's Multiple Comparison Test				
	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G1 vs G2	0,5111	1,144	P > 0.05	-1.268 to 2.290
G1 vs G3	-1,964	4,62	P < 0,05	-3.655 to -0.2721
G1 vs G4	-1,65	4,38	P < 0,05	-3.149 to -0.1506
G1 vs G5	-1,886	4,682	P < 0,05	-3.489 to -0.2828
G2 vs G3	-2,475	5,661	P < 0,01	-4.215 to -0.7347
G2 vs G4	-2,161	5,535	P < 0,01	-3.715 to -0.6072
G2 vs G5	-2,397	5,767	P < 0,01	-4.051 to -0.7428
G3 vs G4	0,3136	0,859	P > 0.05	-1.140 to 1.767

G3 vs G5	0.07792	0.1988	P > 0.05	-1.482 to 1.638
G4 vs G5	-0,2357	0.6954	P > 0.05	-1.585 to 1.113

HISTOLOGIA CLASSIFICAÇÃO DE LANE

UNIÃO OSSEA

LANE - UNIÃO OSSEA				
One-way analysis of variance				
P value	0,0001			
P value summary	***			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	5			
F	6,25			
R squared	0,1736			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	32,06			
P value	P<0.0001			
P value summary	***			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes			
ANOVA Table				
	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	25,8	4	6,45	
Residual (within columns)	122,8	119	1,032	
Total	148,6	123		
Tukey's Multiple Comparison Test				
	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G1 vs G2	-0,1611	0,6903	P > 0.05	-1.075 to 0.7533
G1 vs G3	1,268	5,714	P < 0.001	0.3987 to 2.138
G1 vs G4	0,3111	1,553	P > 0.05	-0.4738 to 1.096
G1 vs G5	0,45	2,14	P > 0.05	-0.3740 to 1.274
G2 vs G3	1,429	6,261	P < 0.001	0.5348 to 2.324
G2 vs G4	0,4722	2,277	P > 0.05	-0.3402 to 1.285
G2 vs G5	0,6111	2,816	P > 0.05	-0.2391 to 1.461
G3 vs G4	-0,9571	4,923	P < 0.01	-1.719 to -0.1955
G3 vs G5	-0,8182	3,998	P < 0.05	-1.620 to -0.01636
G4 vs G5	0,1389	0,7673	P > 0.05	-0.5703 to 0.8481

OSSO ESPONJOSO

LANE OSSO ESPONJOSO				
One-way analysis of variance				
P value	P<0.0001			
P value summary	***			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	5			
F	8,681			
R squared	0,3786			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	2,069			
P value	0,7231			
P value summary	ns			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
ANOVA Table				
	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	18,73	4	4,683	
Residual (within columns)	30,75	57	0,5395	
Total	49,48	61		
Tukey's Multiple Comparison Test				
	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G1 vs G2	-0,2444	1,024	P > 0.05	-1.196 to 0.7068

G1 vs G3	1.2	5,288	P < 0.01	0.2954 to 2.105
G1 vs G4	0.8667	4,231	P < 0.05	0.05011 to 1.683
G1 vs G5	1.129	5,248	P < 0.01	0.2714 to 1.986
G2 vs G3	1.444	6,188	P < 0.001	0.5139 to 2.375
G2 vs G4	1.111	5,24	P < 0.01	0.2659 to 1.956
G2 vs G5	1,373	6,188	P < 0.001	0.4885 to 2.258
G3 vs G4	-0,3333	1,677	P > 0.05	-1.126 to 0.4590
G3 vs G5	-0.07143	0,3413	P > 0.05	-0.9056 to 0.7627
G4 vs G5	0,2619	1,415	P > 0.05	-0.4759 to 0.9997

OSSO CORTICAL

OSSO CORTICAL				
One-way analysis of variance				
P value	P<0.0001			
P value summary	***			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	5			
F	7,592			
R squared	0,3476			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	4,046			
P value	0,3998			
P value summary	ns			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
ANOVA Table				
	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	23,31	4	5,826	
Residual (within columns)	43,74	57	0,7674	
Total	67,05	61		
Tukey's Multiple Comparison Test				
	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G1 vs G2	-0,6	2,108	P > 0.05	-1.735 to 0.5346
G1 vs G3	1,218	4,501	P < 0.05	0.1393 to 2.297
G1 vs G4	0,7889	3,229	P > 0.05	-0.1850 to 1.763
G1 vs G5	0,9714	3,788	P > 0.05	-0.05095 to 1.994
G2 vs G3	1,818	6,53	P < 0.001	0.7083 to 2.928
G2 vs G4	1,389	5,492	P < 0.01	0.3808 to 2.397
G2 vs G5	1,571	5,938	P < 0.001	0.5164 to 2.626
G3 vs G4	-0,4293	1,811	P > 0.05	-1.374 to 0.5157
G3 vs G5	-0,2468	0,9887	P > 0.05	-1.242 to 0.7481
G4 vs G5	0,1825	0,827	P > 0.05	-0.6974 to 1.062

CANAL MEDULAR

MEDULAR				
One-way analysis of variance				
P value	0,3312			
P value summary	ns			
Are means signif. different? (P < 0.05)	No			
Number of groups	5			
F	1,176			
R squared	0,07622			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	4,124			
P value	0,3895			
P value summary	ns			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
ANOVA Table				
	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	3,978	4	0,9945	
Residual (within columns)	48,22	57	0,8459	

Total	52.19	61		
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G1 vs G2	0.03333	0,1116	P > 0.05	-1.158 to 1.224
G1 vs G3	0.6091	2.144	P > 0.05	-0.5236 to 1.742
G1 vs G4	0,3111	1,213	P > 0.05	-0.7114 to 1.334
G1 vs G5	0.6286	2.334	P > 0.05	-0.4448 to 1.702
G2 vs G3	0,5758	1,97	P > 0.05	-0.5895 to 1.741
G2 vs G4	0,2778	1,046	P > 0.05	-0.7806 to 1.336
G2 vs G5	0,5952	2,142	P > 0.05	-0.5124 to 1.703
G3 vs G4	-0,298	1,197	P > 0.05	-1.290 to 0.6942
G3 vs G5	0,01948	0,07434	P > 0.05	-1.025 to 1.064
G4 vs G5	0.3175	1.37	P > 0.05	-0.6064 to 1.241

CLASSIFICAÇÃO DE LANE HISTO. TOTAL

LANE				
One-way analysis of variance				
P value	0,0004			
P value summary	***			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	5			
F	6.111			
R squared	0,3001			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	9,166			
P value	0.0571			
P value summary	ns			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
ANOVA Table	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	301,8	4	75,46	
Residual (within columns)	703.9	57	12,35	
Total	1006	61		
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
G1 vs G2	-1,133	0,9927	P > 0.05	-5.684 to 3.418
G1 vs G3	5,564	5.125	P < 0.01	1.236 to 9.891
G1 vs G4	2,589	2,642	P > 0.05	-1.318 to 6.496
G1 vs G5	3,629	3,527	P > 0.05	-0.4725 to 7.730
G2 vs G3	6,697	5,996	P < 0.001	2.245 to 11.15
G2 vs G4	3,722	3,669	P > 0.05	-0.3215 to 7.766
G2 vs G5	4,762	4,486	P < 0.05	0.5300 to 8.994
G3 vs G4	-2,975	3,128	P > 0.05	-6.765 to 0.8160
G3 vs G5	-1,935	1,933	P > 0.05	-5.926 to 2.056
G4 vs G5	1.04	1,174	P > 0.05	-2.490 to 4.569

9.2 Certificado comissão de ética



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação n° **162/2005**, sobre o projeto intitulado “*Tratamento da falha óssea diafisária pós-infecção*”, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Cleber Antonio Jansen Paccola**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de **30 de janeiro de 2006**.

(We certify that the protocol n° **162/2005**, about “*Treatment of large diaphyseal bone defects after infection*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in **01/30/2006** meeting).

Ribeirão Preto, 31 de janeiro de 2006.

Prof. Dr. EDUARDO MAGALHÃES REGO
Decano da Comissão
de Ética em Experimentação Animal

9.3 Laudo de analise da gentamicina em pó

LAUDO DE ANALISE


PRODUTO..:	GENTAMICINA SULFATO	EMISSAO..:	21/10/04
MANUF....:	10/03	PROCEDE...:	CHINA
VALIDADE..:	09/07	ORIGEM...:	CHINA
		No. LOTE..:	0310456

NOME DO PRODUTO:	GENTAMICINA SULFATO
FORMULA MOLECULAR:	NAO HA
PESO MOLECULAR:	NAO HA
FATOR:	1,72 (CONSIDERANDO DOSEAMENTO E TEOR DE AGUA)
CAT. TERAPEUTICA:	ANTIBIOTICO PRODUZIDO PELO Micromonospora purpurea
D.C.B.:	3431.02-9

RESULTADO DE ANALISE B.A.: 396/04 (05/07/2004)

TESTES	ESPECIFICACAO	RESULTADOS
ASPECTO FISICO:	PO BRNADO OU QUASE BRANCO	DE ACORDO
SOLUBILIDADE:	LIVREMENTE SOLUVEL EM AGUA PRATICAMENTE INSOLUVEL EM CLOROFORMIO, EM ETANOL (96%) E EM ETER	DE ACORDO
IDENTIFICACAO:	POSITIVO	DE ACORDO
ACIDEZ (PH SOL 4%)	3,5 A 5,5-	4,20-
LIMPIDEZ E COR DA SOL.	DE ACORDO	DE ACORDO
ROTACAO OPTICA ESPECIFICA:	+107o A +121o	+117,7o
SUFATO:	32,0 A 35,0%	32,26%
METANOL:	DE ACORDO	DE ACORDO
CINZAS SULFATADAS:	MAX. 1,0%	0,68%
AGUA:	MAX. 15,0%	9,38%
DOSEAMENTO:	MIN. 590U/MG (BASE ANIDRA)	634 U/MG
DENSIDADE:	S/ ESPECIFICACAO	1,73 G/ML

OBS: O PRODUTO ESTA DE ACORDO COM A BP 98.


 Dra. Shen Jie
 FARM. CRF-SP No 22.836



9.4 Laudo de análise da solução salina tamponada com fosfato

IMBRALAB – QUÍMICA E FARMACÊUTICA LTDA.

CERTIFICADO DE ANÁLISE**PRODUTO:** Solução salina tamponada pH 7,4**LOTE:** 03018**FABRICANTE:** Imbralab – Química e Farmacêutica Ltda.**COMPOSIÇÃO:** Fosfato biácido de potássio 0,003394 Mol/l., fosfato monoácido de sódio 0,00993 Mol/l e Cloreto de sódio 0,1397 Mol/l.**RASTREAMENTO:** Empregados fosfato biácido de potássio PA-ACSLabsynth – Lote 81816 com 99,5% de pureza, fosfato monoácido de sódio PA-ACS Labsynth – Lote 81669 com 99,5% de pureza e cloreto de sódio PA-ACS Vetec lote 011482 com 99% de pureza, conforme Certificados de Análise Labsynth e Vetec.**Pesagem em balança analítica SAUTER, conforme Certificado de Calibração abaixo:**

Balança Analítica marca SAUTER.
Modelo 414/10.
Código WEXX0001.
Número 14794.
Certificado de Calibração Nº 001311/05
Nome do Laboratório: I.S. Metrologia.
Validade do Certificado: 10/2006

VALIDADE DO PRODUTO: Até Novembro de 2007

Ribeirão Preto, 18 de Novembro de 2005

Resp.: Luiz Carlos Batarra
CRQ-IV 4410780
CRF-SP 1004747

RUA ATAULFO ALVES 396 - CEP 14093-080 – RIBEIRÃO PRETO-SP – FONE/FAX 3965-1315
