VITOR APARECIDO CASTANIA

**ENXERTO CORTICOESPONJOSO HOMÓGENO PROCESSADO
QUIMICAMENTE, ESTERILIZADO EM ÓXIDO DE ETILENO E
EMBEBIDO EM MEDULA ÓSSEA AUTÓGENA.**

“ESTUDO EXPERIMENTAL EM CÃES (*Canis familiaris* LINNAEUS, 1758)”

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de concentração: Ortopedia, Traumatologia e
Reabilitação do Aparelho Locomotor.

Orientador: Prof. Dr. José B. Volpon

**Ribeirão Preto
2007**

FICHA CATALOGRÁFICA

Castania, Vitor Aparecido

Enxerto corticoesponjoso homogêneo processado quimicamente, esterilizado em óxido de etileno e embebido em medula óssea autógena. "Estudo experimental em cães (*Canis familiaris* LINNAEUS, 1758)". Ribeirão Preto, 2007.

66 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Ortopedia, Traumatologia e Reabilitação do Aparelho Locomotor.

Orientador: Volpon, José Batista.

1. Enxerto ósseo. 2. Óxido de etileno. 3. Medula óssea. 4. Enxerto homogêneo.

DEDICATÓRIA

À minha esposa Fátima, minhas filhas Taís e Mayara eu dedico; à minha mãe, Paulina, ao meu pai, Victor João (In memorian), irmãos e sobrinhos, eu ofereço.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus por me dar forças para vencer as dificuldades; ao meu orientador, professor Dr José Batista Volpon por entendê-las e pela orientação.

Ao meu grande amigo e sempre colaborador Marcos Massao Shimano e sua esposa Suraya pelo precioso apoio e colaboração.

Ao professor Dr Antonio Carlos Shimano pelos conselhos e incentivo.

Aos amigos do Laboratório de Bioengenharia, Francisco Carlos Mazocato, Luís Alves Pereira, Reginaldo Trevilatto da Silva, pela prestimosa colaboração e convívio.

À Srta Maria Teresinha, secretária do Laboratório de Bioengenharia, pela imensa colaboração.

Às secretárias do departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor, Maria de Fátima, Rosa Brites, Moira Larissa e Elisângela Bernardi.

Ao engenheiro Carlos Alberto Moro pelo incentivo e companherismo.

Aos colegas de Pós-graduação, Francisco Cláudio, João Paulo, Cristiane Graminha, Vera, Leandro, Giuliano Barbieri, Rodrigo Rosa, Rodrigo Andraus, Patrícia, Juliana, Ariane, Davi Haje, Vanessa, Maurício, Emilson, Gustavo, Leonardo, Daiana, Ilton, Priscila, Graziela, Giovana, Okubo, Dimitri, Fabiano, Bruno, Geiza, Paulo Eugênio, Fabiano Canto, Carlos Giglio, Orli, Daniel Augusto, Daniel Mendes e todos aqueles que, por ventura, eu possa ter esquecido. A todos meu muito obrigado pelo convívio.

Aos funcionários do Biotério Central, Dr Eduardo Laus, Dr Helder Tambellini, Antonio Ferreira, José Traia Castania, Lourdes Castania, João Sérgio Epifânio, Carlos Magno Cândido, Rinaldo e José Joaquim Ambrósio: meu muito obrigado pela amizade e colaboração.

A todos os funcionários da oficina de precisão, em especial, Otávio Terra, Davidson Intrabartolo, Edmilson, Osvaldo Padovan, Odair, Moacir, Paulo Ambrósio, Amauri e Edgar pela prestimosa ajuda na elaboração das trefinas.

Aos funcionários do Centro de Ciência das Imagens e Física Médica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto pela revelação das radiografias.

Aos Especialistas de Laboratório do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia da USP-Ribeirão Preto, Luis Gustavo de Souza e Paulo Batista de Vasconcelos pela preciosa ajuda no desenvolvimento da câmara de silicone para inclusão das peças em resina.

Aos Técnicos do Laboratório de Cirurgia Experimental, Sebastião de Assis Mazetto, Paulo, José Carlos, Wagner, Daniel, pela cessão de ossos para produção dos enxertos e também ao Jorge Forjás pela confecção das lâminas para estudo histológico.

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

Muito Obrigado!

RESUMO

CASTANIA, V.A. **Enxerto corticoesponjoso homogêneo processado quimicamente, esterilizado em óxido de etileno e embebido em medula óssea autógena. “Estudo experimental em cães (*Canis familiaris* LINNAEUS, 1758)”**. 2007. 66 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

Foi estudado experimentalmente o desempenho biológico de um tipo de enxerto ósseo homogêneo, processado quimicamente, esterilizado em óxido de etileno e embebido em medula óssea autógena. De cães doadores adulto-jovens foram obtidos blocos cilíndricos de 1,0 x 1,0 cm da epífise distal do fêmur, com auxílio de uma trefina. Os ossos assim obtidos foram clareados, desengordurados, esterilizados em óxido de etileno e mantidos em estoque. Trinta cães adultos jovens foram usados como receptores do enxerto e foram alocados em dois grupos. No grupo I (experimental) os animais foram operados e, criado, transversalmente, com trefina de 1,0 cm de diâmetro externo, um espaço cilíndrico de 1,0 cm de diâmetro por 1,0 cm de altura na epífise distal do fêmur direito, onde foi encaixado o enxerto preparado e que foi previamente embebido em medula óssea do próprio animal retirada por punção óssea na crista ilíaca. Três semanas depois, o mesmo animal foi submetido ao mesmo procedimento cirúrgico no fêmur esquerdo. Os cães deste grupo foram sacrificados seis semanas após a primeira cirurgia. O grupo II constituiu o controle e foi formado por vinte cães adulto-jovens em que, primeiro, foi retirado um cilindro de osso da epífise distal do fêmur esquerdo e, em seguida, no mesmo tempo cirúrgico, foi criado o mesmo espaço no fêmur direito, com uma trefina de um centímetro de diâmetro interno e, então, encaixado o bloco de osso retirado do fêmur do outro lado do mesmo animal. Estes animais foram subdivididos em dois subgrupos de dez cães cada, em relação ao tempo de sacrifício. Em um subgrupo os cães foram sacrificados três semanas após, enquanto que, no outro subgrupo, foram sacrificados seis semanas após a cirurgia de implantação do enxerto. O processo de incorporação do enxerto foi avaliado pela histologia convencional e histologia de fluorescência óssea, pela injeção prévia de tetraciclina. A comparação foi entre os grupos I e II, nos períodos de três e seis semanas pós-implante. As áreas dos enxertos homogêneos com 21 dias pós-implante, geralmente mostraram-se visíveis, na maioria das vezes, formadas por trabéculas finas irregulares, sem osteócitos, porém com áreas de neoformação óssea. Já os enxertos autógenos, a

área do osso implantado era bem visível, com trabéculas de osso antigo, mais adelgaçadas, em menor número que o osso receptor, porém com intensa deposição de osso neoformado. Para os enxertos homogêneos com 42 dias pós-implante, a área do enxerto estava bem definida e integrada ao osso adjacente, composta por trabéculas antigas com predomínio de osso neoformado sobre a superfície. Nos enxertos autógenos com 42 dias pós-implante, as trabéculas tinham orientação comum, com espaço intertrabecular preenchido por tecido conjuntivo denso, em algumas áreas, e por medula óssea madura em outras. O enxerto homogêneo processado e esterilizado em óxido de etileno e embebido em medula óssea apresentou boa atividade biológica, embora, com integração mais lenta e menor desempenho em relação ao enxerto autógeno, o que o torna um bom substituto para este último.

Palavras chave: enxerto ósseo; óxido de etileno; medula óssea; enxerto homogêneo.

ABSTRACT

CASTANIA, V.A. **Homogenous cortical-cancellous bone graft chemically processed, sterilized with ethylene oxide and soaked in autogenous bone marrow. "An experimental study in dogs (*Canis familiaris* LINNAEUS, 1758)".** 2007. 66 f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

In the present investigation the biological performance of the homogenous bone graft chemically processed, sterilized with ethylene oxide and soaked in autogenous bone marrow was investigated. Thirty dogs were assigned into two groups. In group I, ten young adult dogs received a cylindrical block of the above mentioned graft. Previously, the bone graft was immersed in autogenous bone marrow and then inserted in a cylindrical hole, with the same dimensions, created at the distal femoral epiphysis of the right femur. After three weeks the same animal was submitted to the same surgical procedure, but on the left femur. The animal was killed six weeks later. The group II was made up of twenty dogs that received an autogenous graft obtained from the left distal femur and implanted into the right distal femur (same shape, dimensions and technique). From this group, 10 dogs were killed three weeks later and 10 dogs were killed six weeks later. The graft incorporation was evaluated by light microscopy and fluorescence microscopy. Results showed that for 21 day implant in the homogenous group, there was osteogenesis at the periphery of the bone graft, but most of its trabeculae were still inviable. Conversely, for the autogenous grafts newly-formed bone was found on the trabecular surface, even in the inner parts of the implanted bone. At 42 days there was active osteogenesis in homogenous grafts with new bone deposition on the trabeculae but, in two cases, the graft was not incorporated (reabsorbed in one case and sequestered in the other one). The autogenous graft showed newly formed bone arranged in a well mature fashion with new bone marrow filling the intertrabecular gaps. It was concluded that the homogenous graft as prepared herein is a good alternative for autogenous grafts, although with a slower osteogenesis rate and less biological performance.

Key words: bone graft; ethylene oxide; bone marrow; homogenous graft

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Trefinas usadas para obtenção do osso doador (A) e para criação do leito no osso receptor (B). A trefina maior tem diâmetro interno de 1,0 cm e a trefina menor tem 1,0 cm de diâmetro externo. A trefina maior foi usada para a retirada do enxerto e a menor para criar a cavidade no leito receptor.....23
- Figura 2 – Passos técnicos de obtenção de cilindro ósseo do côndilo femoral. Detalhe do posicionamento da trefina no lado medial do côndilo femoral (A); Detalhe da penetração da trefina, até o corte, da camada cortical oposta(B); Detalhe do osso recortado (C); Bloco retirado do fêmur (D).....23
- Figura 3 – Aspecto dos cilindros ósseos obtido da epífise distal do fêmur de cão doador. Osso *in natura* (A). Osso processado pronto para a esterilização (B)...24
- Figura 4 – (A) Detalhes da obtenção da medula óssea por aspiração. (B) Medula óssea aspirada que foi usada para embeber o bloco ósseo a ser usado como enxerto.....28
- Figura 5 – Detalhes do procedimento cirúrgico para o implante do enxerto. (A) incisão da cápsula articular na face medial do fêmur, (B) afastamento da cápsula e exposição da superfície óssea epifisária, (C) Corte do osso com a trefina de menor diâmetro interno acoplada à furadeira elétrica, (D) leito receptor criado após a retirada do cilindro ósseo, (E) colocação do bloco de enxerto previamente embebido em medula óssea e (F) detalhe do enxerto já colocado sob pressão no leito do osso receptor.29
- Figura 6 – A radiografia mostra o local do implante do enxerto na epífise do fêmur distal. Notar a presença de um alo radiodenso (seta) ao redor do enxerto provocado pela impactação do enxerto contra a parede do leito recepto.....30
- Figura 7 – Sinopse do protocolo experimental mostrando a divisão dos grupos e os respectivos períodos de acompanhamento.33
- Figura 8 – Inclusão do fragmento ósseo em resina transparente para o estudo de fluorescência. Da fôrma de silicone obtém-se um bloco de resina acrílica com fragmento ósseo incluído.....36
- Figura 9 – Máquina para corte de osso modelo Isomet 1000 da Buehler®. Detalhe da peça presa à máquina (seta) e do disco de corte diamantado.36
- Figura 10 – A - Fotomicrografia mostrando detalhe do enxerto homogêneo apresentando um trabeculado delicado com poucos espaços entre as trabéculas e com áreas de neoformação óssea (NO). Ao redor pode-se notar o trabeculado do leito (LR). (Coloração: *tricroômico azul alciano*; aumento original 12,5x). B- Detalhe da fotomicrografia anterior em maior aumento, mostrando parte de uma trabécula (T) do enxerto sofrendo reabsorção (Coloração: *tricroômico azul alciano*; Aumento original 100x).....39
- Figura 11 – Fotomicrografia na região da interface leito receptor–enxerto homogêneo (LR) composta por tecido fibroso e sem neoformação óssea na área do enxerto (TF). (Coloração: *tricroômico azul alciano* ; aumento original 25x).....40
- Figura 12 – A - Fotomicrografia na região da interface enxerto autógeno-leito receptor, onde a área do enxerto (E) apresenta poucas trabéculas em relação ao leito receptor (LR), porém com áreas de deposição óssea. (Coloração *tricroômico azul alciano*; aumento original 12,5x). B- Detalhe da lâmina anterior, mostrando

-
- trabéculas antigas (vermelho) do enxerto autógeno com deposição de osso novo (azul) (*Coloração: tricrômico azul alciano; aumento original 100x*).....41
- Figura 13 – Em A a fotomicrografia mostra área de intensa neoformação óssea na região do enxerto. Osso antigo (vermelho), tecido cartilaginoso (azul) e osso neoformado (cinza) (*Coloração: tricrômico azul alciano; aumento original 40x*). Em B o detalhe ilustra área de neoformação óssea endocondral (*Coloração: tricrômico azul alciano; aumento original 100x*).....41
- Figura 14 – A-Fotomicrografia de fluorescência óssea de área de transição entre o leito receptor e o osso homogêneo implantado após 21 dias. A cor amarelodourada mostra ossificação. A área do enxerto (E) não apresenta ossificação (*Aumento original 1,25x*). B- Detalhe da transição leito-enxerto mostrando início de ossificação no lado do enxerto (E) (*Aumento original 4x*).....42
- Figura 15 – Fotomicrografia de fluorescência óssea de área do enxerto autógeno três semanas após a implantação. Há intensa neoformação óssea na área de transição entre o leito e o osso implantado (*aumento original 4x*) e, também, no interior do enxerto (B) (*aumento original 10x*).....43
- Figura 16 – Fotomicrografia mostrando área do enxerto homogêneo com numerosas trabéculas neoformadas (TN), de aspecto homogêneo e preenchimento dos espaços intertrabeculares com medula óssea. (*Coloração tricrômico azul alciano; aumento original 12,5x*). (*Coloração: tricrômico azul alciano. Aumento original 100x*).44
- Figura 17 – A – Fotomicrografia com áreas do enxerto homogêneo sem trabéculas, preenchidas por tecido amorfo (TA) e ausência de áreas de neoformação óssea, sugerindo reabsorção do enxerto. B – Fotomicrografia mostrando área do enxerto homogêneo com várias trabéculas ordenadas e regulares, onde uma área apresenta estroma de medula intertrabecular (MO), contrastando com área de tecido denso (TD) (*Coloração: tricrômico azul alciano; aumento original 25x*). ..45
- Figura 18 – A - Fotomicrografia de área do enxerto autógeno com trabéculas regulares com orientação comum, conteúdo intertrabecular de tecido conjuntivo denso. (*Coloração: tricrômico azul alciano; aumento original 12,5x*). Em B, a fotomicrografia ilustra área do enxerto autógeno com trabéculas mais organizadas e com medula óssea madura interposta. (*Coloração: tricrômico azul alciano; aumento original 25x*).....46
- Figura 19 – Em A, a área de enxerto homogêneo após 42 dias do implante ósseo mostra a presença de osso mais maduro que corresponde ao leito receptor (R) e áreas de osso neoformado mais imaturo (E), correspondendo à região do implante homogêneo (*Aumento original 1,24x*). Em B a área de enxerto autógeno apresenta estrutura óssea mais organizada e deposição óssea predominantemente sobre trabéculas ósseas com aspecto laminar (*Aumento original 4,0x*).47

SUMÁRIO¹

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Enxerto ósseo.....	12
1.1.1	Osteoindução e Osteocondução.....	17
1.1.2	Antigenicidade e rejeição nos enxertos homogêneos.....	19
1.2	Objetivo	21
2	MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1	Preparo do enxerto ósseo homogêneo	22
2.2	Animal Receptor	25
2.3	Agrupamento	25
2.3.1	Preparo pré-cirúrgico e procedimento anestésico	26
2.4	Preparação do material para avaliação microscópica	34
2.4.1	Preparação do material para microscopia de luz convencional.....	34
2.4.2	Preparação do material para estudo com luz ultravioleta.	35
3	RESULTADOS	38
3.1	Observações trans-operatórias.....	38
3.2	Observações pós-operatórias	38
3.3	Achados macroscópicos	38
3.4	Achados com microscopia de luz comum para os enxertos autógenos e homogêneos 21 dias pós-implante.	39
3.5	Achados histológicos com microscopia de fluorescência para os enxertos homogêneos e autógenos 21 dias pós-implante.	42
3.6	Achados histológicos em microscopia de luz comum, para os enxertos homogêneos e autógenos 42 dias pós-implante.	44
3.7	Achados histológicos em microscopia de fluorescência com luz ultravioleta para os enxertos homogêneos e autógenos 42 dias pós-implante.....	47
4	DISCUSSÃO	48
4.1	O modelo experimental.....	53
4.2	Estudo histológico	56
5	CONCLUSÃO	60
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
	ANEXO	67

¹ Normas de acordo com as Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: documento eletrônico e impresso – São Paulo – 2004.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Enxerto ósseo

A cirurgia ortopédica moderna tem como grande desafio a preservação de membros amplamente afetados pela destruição óssea. Diversos caminhos têm sido pesquisados para a recuperação das perdas ósseas, desde a utilização de enxertos autógenos, homogêneos e os xenógenos, além de técnicas de estimulação elétrica, eletromagnética e ultra-sônica (DUARTE, 1983).

Historicamente, a utilização de enxertos ósseos em humanos remonta ao século XVII quando, Job Van Meekeren utilizando uma peça de osso de cão, reconstituiu um defeito ósseo no crânio de um soldado. Por isto, o paciente foi excomungado pela igreja que intimou o cirurgião a retirar o implante, porém o enxerto já estava integrado (SCHWEIBERER et al., 1989).

Há várias décadas, muitos estudos têm sido realizados pesquisando a osteogênese nos enxertos. Duhamel (1839) (Apud CHASE e HERDON, 1955²), em estudos experimentais, implantou fios de prata no tecido subperiosteal e verificou que houve formação de osso novo sobre eles, sendo que esta propriedade do perióstio foi confirmada, em 1842, por Flourens.

Ollier (1867) (Apud CHASE e HERDON, 1955³) realizou transplante ósseo de ossos íntegros recobertos pelo perióstio e concluiu que, em condições ideais, o osso e o perióstio sobreviviam e podiam tornar-se osteogênicos.

² DUHAMEL, H.L. Sur le développement et la crue des os des animaux. **Mém. de l'Acad. Roy. des Sciences**, Paris, v.55, p.354-370, 1742.

³ OLLIER, L. Traité expérimental et clinique de la régénération des os et de la production artificielle du tissu osseux. **Victor Masson et Fils**, Paris, 1867.

Phemister (1914) estudou a influência do perióstio e do endóstio dos enxertos na indução da osteogênese e concluiu que a viabilidade das células dos enxertos depende da capacidade do enxerto em conseguir nutrição. O perióstio por sua localização superficial e, histologicamente, ser constituído de tecido frouxo, nutre-se mais facilmente, o que favorece a proliferação celular. As células ósseas, envoltas por uma barreira de matriz calcificada, necrosam-se e são reabsorvidas.

Analisando resultados de biópsias realizadas de ossos de pacientes que tinham sido submetidos à enxertia óssea, Abbot et al. (1947) concluíram que elementos celulares maduros do osso cortical e do osso esponjoso sobreviviam ao transplante, sendo que as células sobreviventes eram capazes de produzir osso novo. Estas células estavam localizadas no perióstio e no endóstio.

Quando comparado ao osso esponjoso, o osso cortical compacto tem menor potencial osteogênico. A explicação para este fato é que a superfície do osso esponjoso é maior, quando comparada ao osso cortical. Desta forma, para um mesmo volume de osso, a quantidade de elementos celulares sobreviventes no osso esponjoso seria maior que no osso cortical (ABBOTT et al., 1947).

Os enxertos ósseos são utilizados em diversas ocasiões tais como falhas da consolidação ósseas, pseudo-artroses, más formações congênitas, defeitos pós-ressecção de tumores ósseos (DE BOER, 1988; LIPTAK et al., 2006), fusões vertebrais, revisão de artroplastias, ou qualquer outra situação onde ocorrem perdas ósseas, dificuldade da osteogênese ou necessidade de reforçá-la. São classificados com base nos aspectos morfológicos e imunológicos. De acordo com o aspecto morfológico são nomeados esponjoso, cortical ou misto. O osso esponjoso apresenta delicadas trabéculas que contêm grandes espaços preenchidos por células hematopoiéticas, o que facilita a migração de vasos, células e deposição de

tecido ósseo, porém não proporciona suporte mecânico significativo (WEIGEL, 1993). O enxerto de osso esponjoso é vascularizado mais rapidamente e de maneira mais completa que o de osso cortical, sendo que a substituição do tecido ósseo, inicialmente, envolve uma fase de formação óssea aposicional seguida pela fase de reabsorção, com substituição completa do material enxertado com o passar do tempo.

O enxerto ósseo cortical é obtido do córtex dos ossos longos. Apresenta microarquitetura bastante compacta, formada por lâminas justapostas, intensamente mineralizadas, dispostas concentricamente ao redor dos canais de Havers. Este enxerto permanece mesclado ao osso neoformado pelo hospedeiro por muito tempo. Isto pode ser explicado pelo fato do osso ser muito denso, dificultando a entrada de vasos e a difusão de nutrientes e células, o que atrasa o processo de reabsorção e reossificação (GOLDBERG e STEVENSON, 1987).

Imunologicamente, os enxertos ósseos dividem-se em autógenos, homólogos e xenólogos (ALEXANDER, 1987).

O enxerto autógeno, uma vez obtido, é transplantado de um sítio a outro no mesmo indivíduo, ou entre gêmeos idênticos o que não causa imunoincompatibilidade, favorecendo os processos de revascularização e reparação (BLOOMBERG et al., 1984; WEIGEL, 1993). Nestes casos, a fonte de osso reside no próprio indivíduo, e a obtenção do osso a ser enxertado implica em cirurgia adicional que aumenta o tempo operatório, expõe o paciente à dor, provoca maior perda sangüínea e apresenta possibilidade de infecção local. Outro fator que poderá tornar-se um problema é a quantidade requerida de osso para preencher falhas ósseas extensas (FRIEDLAENDER, 1982; DEFINO et al., 1998). Estes aspectos tornam-se mais críticos no paciente pediátrico.

O enxerto cortical homogêneo envolve dois indivíduos da mesma espécie com códigos genéticos diferentes, sujeitos a respostas imunes diretamente relacionadas com a diferença genética entre ambos (ALEXANDERS, 1987). Apresenta ampla aplicação em situações em que se pretende preencher grandes falhas ósseas, visto a facilidade de ser obtido em vários tamanhos, sem necessidade de dois ou mais procedimentos cirúrgicos (MANKIN et al., 1983).

O enxerto ósseo xenógeno é aquele proveniente de um indivíduo de espécie diferente daquela do receptor, portanto, sem compatibilidade genética.

O uso do enxerto xenógeno *in natura* não proporciona bons resultados em função da interferência de fatores imunológicos (ALEXANDERS, 1987). Entretanto, quando preparado tecnicamente, permite o uso de maneira rápida, em quantidade, de um material imunologicamente neutro. Geralmente, estes enxertos são preparados pelo desengorduramento e desproteinização, tornando-se imunologicamente inertes. Entretanto, eles não são osteogênicos e nem osteoindutores, e apresentam função apenas osteocondutora (WORTH, 2005).

O enxerto alógeno é uma alternativa para o osso autógeno, desde que usado com certo nível de segurança, principalmente no que se concerne à transmissão de doenças, tais como a hepatite C (CONRAD et al., 1995), HIV, e outras relacionadas à contaminação bacteriana (SCHWEIBERER et al., 1989; CORNU et al., 2000), bem como a antigenicidade desenvolvida pelo osso alógeno.

Uma propriedade bastante útil dos enxertos ósseos homogêneos e alógenos é a possibilidade de serem estocados de modo a constituir bancos de tecidos. Um método de preservação ideal é aquele que não requeira equipamento especial, onde os enxertos possam ser mantidos à temperatura ambiente, com a facilidade de serem livremente transportados (VOLPON e COSTA, 2000).

O enxerto corticoesponjoso homogêneo preparado por limpeza, com retirada da gordura, desidratado, esterilizado pelo óxido de etileno e embalado individualmente como o utilizado por Volpon e Costa (2000), em tese, apresenta as propriedades acima mencionadas e foi objeto de pesquisa neste estudo.

Esse tipo de enxerto tratado quimicamente e esterilizado em óxido de etileno mostrou menores valores de propriedades mecânicas como, tensão, deformação, e módulo de Young no limite elástico, quando comparado com o osso fresco. Entretanto, pela análise radiográfica, uma boa integração foi obtida, quando do implante deste enxerto na metáfise distal dos fêmures de cães, só que com menor desempenho, quando comparado com o enxerto autógeno (CASTANIA e VOLPON, 2003).

Ainda, enxertos homogêneos podem ser utilizados frescos, congelados em temperatura variando de -60° a -80°C, liofilizados (FUJIKI et al., 2005) ou após algum preparo especial.

Um aspecto importante no transplante ósseo é a preservação da vitalidade das células do enxerto e ausência de necrose do leito receptor.

Phemister (1914) estudou a capacidade osteogênica dos constituintes ósseos transplantados e recomendou que se devem preservar viáveis as células e os meios de nutrição dos enxertos. Após a obtenção e a implantação de um osso, é possível que elementos tais como o perióstio, endóstio, medula, diferentes osteócitos ou osteoblastos possam sobreviver. Assim, o enxerto ideal seria uma porção viva de um osso autógeno que mantém a função celular em seu novo sítio. Em 1975, Taylor et al. descreveram o primeiro enxerto ósseo bem sucedido conectado ao leito receptor por microanastomose, mostrando que, através do restabelecimento do suprimento sanguíneo, é possível transplantar grandes segmentos de osso cortical sem

inviabilizar a reconstrução de defeitos maiores que seis centímetros. Com este modelo, surgiu o chamado enxerto autólogo pediculado, onde vasos do segmento ósseo a ser transplantado são anastomosados aos vasos do leito receptor, melhorando a nutrição do enxerto a ser transplantado, o que favorece a sua integração (BARBIERI e MAZER, 1984, EPPLEY et al., 1991).

Em termos de incorporação e de atividade osteogênica, o enxerto autólogo é superior aos demais (PARRISH, 1966).

1.1.1 Osteoindução e Osteocondução

A atividade osteoindutora de alguns enxertos ósseos pôde ser demonstrada pela primeira vez quando, em 1965, Urist implantou fragmentos de osso descalcificado na musculatura de animais e encontrou neoformação óssea, após quatro a seis semanas.

O enxerto ósseo deve possuir a capacidade de recrutar e estimular células multipotenciais do tecido mesenquimal a se diferenciar em células osteogênicas. Tal fenômeno é conhecido como osteoindução (CHALMERS et al., 1975, WORTH et al., 2005). Esta função está relacionada com as proteínas morfogênicas da matriz óssea (URIST et al., 1967).

Segundo Urist et al. (1967), logo após a primeira semana do implante de um fragmento ósseo, leucócitos polimorfonucleares, linfócitos e histiócitos distribuem-se ao redor do enxerto. A partir da segunda semana surge neovascularização do osso que é invadido por células mesenquimais e ocorre grande proliferação de fibroblastos que originarão condroblastos e osteoblastos.

Muitos fatores podem influenciar a osteogênese. Urist e Dowell (1968) mostraram a influência do tamanho dos grânulos e da geometria das partículas do enxerto.

Segundo Brown e Cruess (1982), a conservação do osso pelo congelamento, liofilização e descalcificação não interfere na osteoindução.

Moore et al. (1990) mostraram que as proteínas morfogenéticas do osso são resistentes à degradação pelo tratamento como óxido de etileno e que o osso desmineralizado e esterilizado pelo óxido de etileno apresentaram capacidade osteoindutiva.

Arizono et al. (1994) acreditaram que uma concentração residual mínima de óxido de etileno pudesse aumentar a capacidade osteoindutiva, porém Aspenberg et al., (1990) relataram um acentuado comprometimento da osteoindução com esse tratamento.

Os enxertos também servem como arcabouço para a migração de vasos sangüíneos e deposição de osso neoformado (PHEMISTER, 1914). Tal fenômeno é conhecido como osteocondução. Com a evolução do processo de consolidação, o enxerto ósseo pode ser incorporado à arquitetura local ou ser lentamente reabsorvido e substituído por osso neoformado (BLOONBERG et al., 1984). O processo de substituição óssea é lento, podendo durar meses, anos e, até mesmo, nunca ocorrer completamente (BLOONBERG et al., 1984).

Os enxertos de osso esponjoso apresentam melhor capacidade osteogênica que o cortical. Em contrapartida, este último apresenta melhor resistência mecânica. Esta propriedade pode ser útil quando o enxerto atua também como espaçador mecânico ou necessita ser fixado por placas e parafusos. Há uma forma híbrida

desses dois tipos que é o enxerto corticoesponjoso que apresenta associação das propriedades das duas modalidades anteriores.

1.1.2 Antigenicidade e rejeição nos enxertos homógenos

O fenômeno da rejeição aos enxertos homógenos foi reconhecido há muitos anos. Entretanto, nos anos 50, a participação do sistema imune foi confirmada (FRIEDLAENDER, 1983). Segundo Muscolo et al. (1976), a presença de antígenos no tecido doador provoca dois tipos de respostas imunológicas: a celular, que é mediada pelos linfócitos, e a humoral, mediada por anticorpos.

O maior componente imunogênico nos enxertos homógenos está presente na medula óssea (BUCHARDT, 1983). As estruturas antigênicas estão localizadas nas células ósseas, hematopoiéticas, vasos sangüíneos, e tecidos conectivos do enxerto, sendo a fração mineral não imunogênica. O enxerto esponjoso alógeno, devido à maior celularidade, sensibiliza mais os receptores. Quando comparado com o cortical, no esponjoso o mecanismo de rejeição ocorre com maior intensidade (OLDS, 1981).

Segundo Burwell e Gowland (1962) e Burwell et al., (1963), enxertos ósseos alogênicos frescos com medula óssea, mostram-se mais imunogênicos que um enxerto destituído de medula óssea. Esses autores enfatizam a necessidade de se proceder à retirada da medula, por meio de técnicas de preparação, antes de se efetuar o implante do enxerto no leito receptor, sendo que os componentes da medula óssea, leucócitos, osteócitos, osteoblastos, células do sistema hematopoiético (antígeno ABO), vasos, nervos, células gordurosas, células do tecido

conectivo, e componentes orgânicos da matriz, tais como colágeno e proteoglicans, são considerados elementos antigênicos (DICKSON, 1974; FRIEDLAENDER, 1983).

Os mais importantes antígenos são os de histocompatibilidade da membrana dos leucócitos (HLA), que aderem à maioria das células nucleadas. Eles induzem os linfócitos B e linfócitos T a episódios de rejeição (BUCHARDT e ENNEKING, 1978; BUCHARDT et al., 1978).

1.2 Objetivo

O objetivo deste trabalho foi estudar experimentalmente o desempenho biológico do enxerto corticoesponjoso homogêneo processado quimicamente, esterilizado em óxido de etileno e embebido em medula óssea autógena, quando implantado em defeitos ósseos na região do fêmur distal do cão, por meio da histologia convencional e fluorescência óssea.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio animal realizado neste trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Anexo A). As cirurgias foram realizadas no Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Após a cirurgia, os animais foram mantidos em baias individuais no laboratório de Bioengenharia, por três dias. Em seguida, foram enviados ao setor de Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus Administrativo de Ribeirão Preto, onde permaneceram, em número de dois animais por baia, até o período final de observação.

2.1 Preparo do enxerto ósseo homogêneo

Os ossos usados como enxertos homogêneos foram obtidos de cães doadores saudáveis, fornecidos pelo Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus Administrativo de Ribeirão Preto e sacrificados após as aulas práticas de técnica cirúrgica, no Laboratório de Cirurgia Experimental e Técnica Cirúrgica do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Destes animais foram retirados ambos os fêmures e estocados em “freezer” a -20°C até no máximo 30 dias após a retirada do osso.

De cada fêmur foi retirado transversalmente do côndilo femoral, com o uso de uma trefina de 1,0 cm de diâmetro interno (Figura 1), um bloco ósseo cilíndrico (Figura 2), que foi reduzido a 1,0 cm de comprimento.

Figura 1 – Trefinas usadas para obtenção do osso doador (A) e para criação do leito no osso receptor (B). A trefina maior tem diâmetro interno de 1,0 cm e a trefina menor tem 1,0 cm de diâmetro externo. A trefina maior foi usada para a retirada do enxerto e a menor para criar a cavidade no leito receptor.

Figura 2 – Passos técnicos de obtenção de cilindro ósseo do côndilo femoral. Detalhe do posicionamento da trefina no lado medial do côndilo femoral (A); Detalhe da penetração da trefina, até o corte, da camada cortical oposta(B); Detalhe do osso recortado (C); Bloco retirado do fêmur (D).

Os blocos ósseos foram processados quimicamente como descrito por Volpon & Costa, 2000. Primeiro, os resquícios de partes moles aderidas foram removidas por raspagem do osso. Depois, foram aparados e padronizados nas dimensões de

1,0 cm de diâmetro por 1,0 cm de comprimento e fixados em álcool absoluto por dois dias. Após este período, os blocos ósseos foram mantidos em água oxigenada 40 até o clareamento. A gordura foi extraída com éter etílico, em trocas sucessivas, até o desengorduramento total dos ossos, o que foi conseguido quando não surgiam mais gotículas de gordura sobrenadantes. Em seguida, os cilindros ósseos foram desidratados em álcool absoluto por 48 horas, embalados individualmente em sacos de papel e celofane, e que foram fechados por selamento e esterilizados em óxido de etileno na Central de Esterilização do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Foram utilizados 2,0 kg de óxido de etileno por ciclo de três horas, aeração e hiperventilação de duas horas, temperatura de 55 °C à pressão de 0,5 kgf/cm² com -0,5 kgf/cm² de vácuo. O aparelho utilizado foi da marca Sercon® (Alemanha). Após a esterilização as embalagens contendo os enxertos foram estocadas à temperatura ambiente, apenas com o cuidado de não violá-las. Os ossos foram usados por um período máximo de seis meses após a preparação (Figura 3).

Figura 3 – Aspecto dos cilindros ósseos obtido da epífise distal do fêmur de cão doador. Osso *in natura* (A). Osso processado pronto para a esterilização (B).

2.2 Animal Receptor

Foram utilizados 30 cães adultos (*Canis familiaris* LINNAEUS, 1758), mestiços, com massa corporal de 12 a 25 kg, machos e fêmeas, procedentes do Biotério Central da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto – USP. Foram selecionados os animais de porte semelhante e em bom estado de saúde, com membros longos, que foram previamente tratados com vermífugos, receberam suplementação vitamínica e mantidos no biotério do Laboratório de Bioengenharia, em baias individuais para receberem ração adequada e, com isto garantir um bom estado geral.

2.3 Agrupamento

Os cães foram divididos em dois grupos experimentais, de acordo com o tipo de enxerto que receberam.

GRUPO I – Enxerto homogêneo

Dez animais pertencentes a este grupo receberam um bloco cilíndrico de enxerto processado e esterilizado em óxido de etileno, obtido de cão doador, que foi implantado na metáfise distal do fêmur direito. Três semanas após, os mesmos animais receberam o mesmo tipo de enxerto no fêmur esquerdo.

O sacrifício ocorreu após seis semanas da primeira cirurgia. Ambos os fêmures foram avaliados.

GRUPO II – Enxerto autógeno.

Este constituiu o grupo controle e foi formado por vinte animais que receberam na metáfise distal do fêmur direito um bloco ósseo retirado da metáfise distal do fêmur esquerdo do mesmo animal.

Este grupo foi dividido em dois subgrupos. No **Subgrupo II-A**, composto por 10 animais, o sacrifício ocorreu após três semanas. No Subgrupo II-B, também formado por 10 animais, o sacrifício ocorreu após seis semanas. Em todos os animais deste grupo foi avaliado somente o lado receptor do enxerto (fêmur direito).

Tanto para o Grupo I, quanto para o Grupo II, as características gerais dos animais, técnica cirúrgica, conduta pós-operatória e avaliação foram semelhantes.

2.3.1 Preparo pré-cirúrgico e procedimento anestésico

Para a realização da cirurgia, foi utilizada medicação pré-anestésica, anestesia epidural e anestesia geral nos animais receptores.

Primeiro, os cães foram mantidos em jejum hídrico e alimentar de 12 horas antes de serem submetidos à cirurgia e pré-anestesiados com acetilpromazina (Acepran[®]), na dose de 0,1 mg/kg de massa corporal, via intramuscular. Após a sedação, foram submetidos à anestesia epidural, com bupivacaína 0,5%, na dose de 2,0 mg/kg de massa corporal, respeitando o volume de 1,0 ml/4,0 kg. O membro a ser operado foi tricotomizado, desde a região da crista ilíaca, até a altura do maléolo tibial. Transcorridos 10 minutos após a aplicação do pré-anestésico, foi feita a anestesia geral com injeção intravenosa de Tiopental[®] na dose de 15,0 mg/kg de massa corporal, via intravenosa, dose suficiente para atos cirúrgicos de aproximadamente uma hora de duração.

Foi realizada a anti-sepsia com desgermante à base de iodo povidona 10% e, depois, com álcool iodado 3%, procedendo-se, então, à colocação dos campos cirúrgicos estéreis.

Antes do início da cirurgia, os animais receberam uma aplicação de enrofloxacina (Baytril®) na dose de 5,0 mg/kg e também tramadol (Tramal®) na dose de 4,0 mg/kg, sendo estes produtos adicionados a 250 ml de solução fisiológica e aplicados lentamente, via intravenosa, durante o procedimento cirúrgico.

No período pós-operatório os cães foram submetidos à antibioticoterapia com enrofloxacina (Baytril®), na dose de 5,0 mg/kg de massa corporal, via intramuscular, por sete dias. Como medicação antiinflamatória e analgésica, foi utilizado o cetoprofeno na dose de 2,0 mg/kg de massa corporal, via intramuscular, por três dias.

2.3.1.1 Técnica cirúrgica para o implante do enxerto ósseo

a) Grupo I (enxerto homogêneo preparado)

Inicialmente, foi colhida a medula óssea do osso ilíaco. Os animais foram posicionados em decúbito lateral direito ou esquerdo e, com a palpação, foi delimitada a crista ilíaca onde foi introduzida agulha 40 x 16 provida de mandril. Após certificar do correto posicionamento da agulha, foi retirado o mandril e adaptada uma seringa de 10 ml previamente umedecida com três gotas de EDTA, e realizada a aspiração de mais ou menos 10 ml de medula óssea (Figura 4A) que foi colocada em cuba de modo a embeber o bloco de osso a ser usado como enxerto (Figura 4b).

Figura 4 – (A) Detalhes da obtenção da medula óssea por aspiração. (B) Medula óssea aspirada que foi usada para embeber o bloco ósseo a ser usado como enxerto.

Para a enxertia os animais foram operados inicialmente no membro posterior direito. Foi realizada incisão de pele de aproximadamente 5,0 cm na face interna do joelho, sobre a epífise distal do fêmur, tendo como referência o côndilo medial femoral, de maneira a deixar exposta a cápsula articular, que foi incisada e afastada, juntamente com a patela. O periósteo foi descolado e removido de modo a deixar exposta a superfície óssea.

Com uma trefina de 1,0 cm de diâmetro externo, acoplada a uma furadeira elétrica funcionando em baixa rotação e sob irrigação contínua com solução fisiológica para evitar o aquecimento do osso, foi preparado o leito receptor, criando uma cavidade cilíndrica com 1,0 cm de diâmetro e 1,0 cm de profundidade, no sentido transversal, que correspondia às dimensões do enxerto a ser implantado. A trefina tinha marcação externa para controlar a profundidade.

O corte e a retirada do cilindro ósseo foi feito de modo a preservar a córtex oposta. Após a criação e inspeção do leito, o enxerto, já embebido em medula óssea

foi colocado sob pressão no leito receptor (Figura 5). A ferida cirúrgica foi fechada por planos, primeiro a cápsula articular e depois o tecido subcutâneo com categute 3-0 e, então, a pele com fio de náilon 3-0.

Figura 5 – Detalhes do procedimento cirúrgico para o implante do enxerto. (A) incisão da cápsula articular na face medial do fêmur, (B) afastamento da cápsula e exposição da superfície óssea epifisária, (C) Corte do osso com a trefina de menor diâmetro interno acoplada à furadeira elétrica, (D) leito receptor criado após a retirada do cilindro ósseo, (E) colocação do bloco de enxerto previamente embebido em medula óssea e (F) detalhe do enxerto já colocado sob pressão no leito do osso receptor.

Seis dias após a cirurgia, o joelho operado foi radiografado em perfil para avaliação do posicionamento do implante (Figura 6).

Figura 6 – A radiografia mostra o local do implante do enxerto na epífise do fêmur distal. Notar a presença de um halo radiodenso (seta) ao redor do enxerto provocado pela impactação do enxerto contra a parede do leito recepto.

Três semanas após, os animais foram operados novamente, desta vez no membro posterior esquerdo, seguindo os mesmos procedimentos empregados na primeira cirurgia, utilizando o mesmo tipo de enxerto, seguindo o mesmo procedimento pós-operatório.

Os animais foram mortos com dose excessiva de tiopental aplicada endovenosamente, seguida da aplicação de solução saturada de cloreto de potássio. Assim, em um mesmo animal, foi possível avaliar, no lado direito, o enxerto implantado por seis semanas e, no lado esquerdo, o enxerto implantado por três semanas.

b) Grupo II (Enxerto Autógeno)**- Subgrupo A**

Da mesma forma que no Grupo I, foi feita a incisão de pele de aproximadamente cinco centímetros na porção distal do fêmur esquerdo, sobre o epicôndilo medial, de modo a deixar exposta a cápsula articular que foi incisada e afastada para expor o osso. Com a trefina mais larga acoplada a um perfurador elétrico, foi realizado o corte circular do osso da metáfise distal do fêmur no sentido de medial para lateral, até a cortical oposta, que foi preservada, sendo então retirado um bloco ósseo em forma de cilindro de 1,0 cm de diâmetro que foi reduzido a 1,0 cm de altura, e mantido em solução fisiológica até o momento do implante. A ferida cirúrgica foi fechada por planos da mesma forma já descrita.

Em seguida, foi abordada a região distal do fêmur direito, na sua face medial, sobre a epífise do fêmur, e um leito receptor de 1,0 cm de diâmetro e 1,0 cm de profundidade foi preparado com a trefina de menor diâmetro acoplada a uma furadeira elétrica. O enxerto previamente retirado do fêmur esquerdo foi colocado sobre pressão no leito receptor do fêmur direito procedendo-se, então, ao fechamento da incisão.

Após seis dias da cirurgia, o animal foi radiografado para verificação do posicionamento do implante. Neste subgrupo os animais foram seguidos por três semanas.

- Subgrupo B

Neste subgrupo os procedimentos cirúrgicos para o implante do enxerto foram os mesmos, sendo apenas o período de observação diferente (42 dias).

Seis dias antes do sacrifício, todos os cães receberam uma única aplicação de oxitetraciclina (Sigma[®]) via intravenosa, na dose de 30 mg/kg, diluída em 100,0 ml de soro fisiológico.

A sinopse do protocolo experimental está detalhada na Figura 7.

Sinopse do protocolo experimental.

Figura 7 – Sinopse do protocolo experimental mostrando a divisão dos grupos e os respectivos períodos de acompanhamento.

2.4 Preparação do material para avaliação microscópica

Após o sacrifício dos cães, o terço distal do fêmur foi dissecado, retirado e serrado de modo a produzir um bloco ósseo que continha a região do enxerto. Este material foi seccionado longitudinalmente ao meio, sendo que uma metade foi fixada em formalina tamponada a 4%, e destinada à histologia convencional e, a outra, foi fixada em álcool absoluto para estudo da fluorescência óssea.

2.4.1 Preparação do material para microscopia de luz convencional

A metade do bloco ósseo contendo o enxerto foi fixada em solução de Bouin para descalcificação por passagem de corrente elétrica contínua, segundo a técnica descrita por Gonçalves & Oliverio (1965). Tal técnica é realizada pela passagem de corrente elétrica alternada por solução de ácido tricloroacético a 5 %, onde o osso fica submerso até se completar o processo de descalcificação. Depois, as peças foram processadas de maneira rotineira, sendo incluídas em parafina e cortadas transversalmente em relação ao maior eixo do enxerto, fornecendo cortes de seis micrômetros de espessura que foram corados pelo tricrômico azul de alciano-fucsina (*azul alciano*).

2.4.2 Preparação do material para estudo com luz ultravioleta.

A outra metade da peça foi processada para inclusão em acrílico. Primeiramente, foram aparadas com a retirada do excesso de osso. Os cortes foram desidratados em solução de álcool etílico com concentrações crescentes de 60° GL até álcool absoluto, por três dias em cada concentração.

Após a desidratação, os blocos ósseos foram colocados em uma fôrma de silicone e incluídos em resina de poliéster - T208 (Fiberglass® – Brazil) dissolvida em monômero de estireno e catalisada pela adição de peróxido de metil etil cetona (Figura 8).

Figura 8 – Inclusão do fragmento ósseo em resina transparente para o estudo de fluorescência. Da fôrma de silicone obtém-se um bloco de resina acrílica com fragmento ósseo incluído.

As peças assim obtidas tinham um formato que possibilitava prendê-las à cortadeira metalográfica, modelo Isomet 1000 da Buehler®, produzindo cortes regulares de aproximadamente 200 μm de espessura (Figura 9).

Figura 9 – Máquina para corte de osso modelo Isomet 1000 da Buehler®. Detalhe da peça presa à máquina (seta) e do disco de corte diamantado.

As fatias assim obtidas foram desgastadas manualmente por meio de movimentos circulares, em lixas d'água de granulação decrescente, com início pelo

número 400, até 600, quando era atingida a espessura de 90 a 100µm. Depois, as fatias foram lavadas em água corrente, secadas e montadas entre lâmina e lamínula com meio de inclusão (Entellan[®]).

Para o estudo da fluorescência óssea, as lâminas foram examinadas em microscópio com epiiluminação por luz ultravioleta, conjunto de filtro 9 (Zeiss[®]), objetiva 5 e aumentos de 1,25; 2,5; 4,0 e 10 vezes.

3 RESULTADOS

3.1 Observações trans-operatórias

Em três animais do Grupo II (enxerto autógeno), houve fratura parcial do bloco ósseo no momento da colheita. Como a fratura não comprometeu a estabilidade do implante, ele foi utilizado como enxerto.

3.2 Observações pós-operatórias

Todas as radiografias mostraram o enxerto adequadamente posicionado.

Após a cirurgia, os animais apresentaram ligeiro edema no local operado e claudicação transitória. Em nenhum deles houve infecção.

Um animal do Grupo II apresentou uma fratura do fêmur doador do enxerto e foi excluído e repostado por outro cão.

3.3 Achados macroscópicos

Durante a colheita do material para a histologia pôde-se observar que os enxertos estavam visivelmente integrados ao osso receptor. Nos animais do Grupo I o contorno do enxerto era mais visível, tanto aos 21, quanto ao 42 dias pós-implante.

Nos animais do Grupo II, a demarcação entre o enxerto e o leito era menos nítida já aos 21, mas principalmente aos 42 dias.

Em um dos animais do Grupo I o enxerto estava seqüestrado e em outro, reabsorvido.

3.4 Achados com microscopia de luz comum para os enxertos autógenos e homógenos 21 dias pós-implante.

No Grupo I aos 21 dias pós-implante os cortes mostravam as áreas do enxerto claramente visíveis e constituídas, na maioria das vezes, por trabéculas finas, irregulares, sem osteócitos, e grandes espaços medulares preenchidos predominantemente por tecido conjuntivo fibroso frouxo, pouco vascularizado. Algumas trabéculas estavam colapsadas e sofriam processo de reabsorção (Figura 10).

Em dois animais, as trabéculas mais periféricas ao enxerto mostravam áreas de deposição de osso neoformado; em um animal, havia um nicho no centro do enxerto composto por área de neoformação óssea.

Figura 10 – A - Fotomicrografia mostrando detalhe do enxerto homogêneo apresentando um trabeculado delicado com poucos espaços entre as trabéculas e com áreas de neoformação óssea (NO). Ao redor pode-se notar o trabeculado do leito (LR). (Coloração: tricrômico azul alciano; aumento original 12,5x). B-Detalhe da fotomicrografia anterior em maior aumento, mostrando parte de uma trabécula (T) do enxerto sofrendo reabsorção (Coloração: tricrômico azul alciano; Aumento original 100x).

A interface enxerto-leito receptor estava preenchida predominantemente por tecido conjuntivo fibroso denso (Figura 11) e menos vezes, por áreas de osso jovem neoformado.

Figura 11 – Fotomicrografia na região da interface leito receptor–enxerto homógeno (LR) composta por tecido fibroso e sem neoformação óssea na área do enxerto (TF). (Coloração: tricrômico azul alciano; aumento original 25x)

No Grupo II, subgrupo A, a área do osso implantado era bem visível e constituída por trabéculas de osso antigo mais adelgaçadas e em menor número que o osso receptor (Figura 12), porém, havia intensa deposição de osso neoformado sobre as trabéculas do enxerto, com vascularização e lacunas que continham osteócitos. O tecido de preenchimento dos espaço medulares era constituído por conjuntivo fibroso. Um animal diferenciou-se dos demais por apresentar intensa ossificação na região do enxerto.

Figura 12 – A - Fotomicrografia na região da interface enxerto autógeno-leito receptor, onde a área do enxerto (E) apresenta poucas trabéculas em relação ao leito receptor (LR), porém com áreas de deposição óssea. (Coloração tricrômico azul alciano; aumento original 12,5x). B- Detalhe da lâmina anterior, mostrando trabéculas antigas (vermelho) do enxerto autógeno com deposição de osso novo (azul) (Coloração: tricrômico azul alciano; aumento original 100x).

Na interface enxerto-osso receptor havia áreas de tecido cartilaginoso e ossificação endocondral (Figura 13).

Figura 13 – Em A a fotomicrografia mostra área de intensa neoformação óssea na região do enxerto. Osso antigo (vermelho), tecido cartilaginoso (azul) e osso neoformado (cinza) (Coloração: tricrômico azul alciano; aumento original 40x). Em B o detalhe ilustra área de neoformação óssea endocondral (Coloração: tricrômico azul alciano; aumento original 100x).

3.5 Achados histológicos com microscopia de fluorescência para os enxertos homogêneos e autógenos 21 dias pós-implante.

Nos animais pertencentes ao Grupo I pôde-se observar uma fluorescência concentrada na periferia das trabéculas do osso receptor (Figura 14A), mas praticamente sem áreas de fluorescência no enxerto como um todo. Estas, quando existiam, estavam localizadas na transição osso receptor-enxerto (Figura 14B).

Figura 14 – A-Fotomicrografia de fluorescência óssea de área de transição entre o leito receptor e o osso homogêneo implantado após 21 dias. A cor amarelo-dourada mostra ossificação. A área do enxerto (E) não apresenta ossificação (*Aumento original 1,25x*). B- Detalhe da transição leito-enxerto mostrando início de ossificação no lado do enxerto (E) (*Aumento original 4x*).

Entretanto, no Grupo II predominava uma fluorescência mais esparsa, depositada sobre as trabéculas e com predomínio na periferia do enxerto, particularmente na transição osso receptor-enxerto (Figura 15A), mas também no interior do enxerto (Figura 15B).

Figura 15 – Fotomicrografia de fluorescência óssea de área do enxerto autógeno três semanas após a implantação. Há intensa neoformação óssea na área de transição entre o leito e o osso implantado (*aumento original 4x*) e, também, no interior do enxerto (B) (*aumento original 10x*).

3.6 Achados histológicos em microscopia de luz comum, para os enxertos homogêneos e autógenos 42 dias pós-implante.

A área dos enxertos homogêneos era ainda identificável, mas já integrada ao osso adjacente. Era composta ainda por trabéculas antigas, com predomínio de osso neoformado sobre a superfície. O trabeculado era mais fino, porém mais regular em algumas áreas e ainda irregular, em outras (Figura 16).

Figura 16 – Fotomicrografia mostrando área do enxerto homogêneo com numerosas trabéculas neoformadas (TN), de aspecto homogêneo e preenchimento dos espaços intertrabeculares com medula óssea. (Coloração tricrômico azul alciano; aumento original 12,5x). (Coloração: tricrômico azul alciano. Aumento original 100x).

Um animal apresentou reabsorção do enxerto e substituição dele por tecido amorfo, sem áreas de osteogênese (Figura 17A). Em outro, o enxerto estava seqüestrado e constituído por trabéculas finas e irregulares de osso necrótico.

Um outro animal apresentou a região do enxerto composta quase que totalmente por osso neoformado e com preenchimento intertrabecular com medula óssea (Figura 17B).

Figura 17 – A – Fotomicrografia de área do enxerto homogêneo sem trabéculas, preenchidas por tecido amorfo (TA) e ausência de áreas de neoformação óssea, sugerindo reabsorção do enxerto. B – Fotomicrografia mostrando área do enxerto homogêneo com várias trabéculas ordenadas e regulares, onde uma área apresenta estroma de medula intertrabecular (MO), contrastando com área de tecido denso (TD) (Coloração: tricrômico azul alciano; aumento original 25x).

A região do enxerto autógeno era composta, principalmente, por osso jovem disposto em trabéculas com orientação comum (Figura 18A) e os espaços intertrabeculares estavam preenchidos por tecido conjuntivo denso em algumas áreas, e estroma de medula óssea em outras, com algumas regiões de medula óssea madura (Figura 18B). Não havia separação nítida da área do enxerto daquela do leito receptor, a não ser pelo tipo trabeculado.

Figura 18 – A - Fotomicrografia de área do enxerto autógeno com trabéculas regulares com orientação comum, conteúdo intertrabecular de tecido conjuntivo denso. (Coloração: tricrômico azul alciano; aumento original 12,5x). Em B, a fotomicrografia ilustra área do enxerto autógeno com trabéculas mais organizadas e com medula óssea madura interposta. (Coloração: tricrômico azul alciano; aumento original 25x).

3.7 Achados histológicos em microscopia de fluorescência com luz ultravioleta para os enxertos homogêneos e autógenos 42 dias pós-implante.

Nos animais do Grupo I, havia intensa fluorescência depositada sobre trabéculas, tanto na região periférica, quanto no interior da área enxertada. Em algumas regiões a fluorescência era difusa, mas diferia da fluorescência mais organizada, correspondente ao leito receptor (Figura 19-A). No Grupo II, a marcação do osso neoformado foi maior sobre as trabéculas ósseas, que apresentavam aspecto laminar (Figura 19-B)

Figura 19 – Em A, a área de enxerto homogêneo após 42 dias do implante ósseo mostra a presença de osso mais maduro que corresponde ao leito receptor (R) e áreas de osso neoformado mais imaturo (E), correspondendo à região do implante homogêneo (*Aumento original 1,24x*). Em B, a área de enxerto autógeno apresenta estrutura óssea mais organizada e deposição óssea predominantemente sobre trabéculas ósseas com aspecto laminar (*Aumento original 4,0x*).

4 DISCUSSÃO

A enxertia óssea tem importante papel no tratamento de pseudo-artroses, atrasos de consolidação óssea (RAJAN et al., 2006), em casos onde ocorre destruição óssea em decorrência de traumatismos ou tumores, ou na cirurgia de revisão de artroplastia (GONÇALVES et al., 2003, ARTS et al., 2006). Cada situação clínica requer um tipo de procedimento, com utilização do tipo de enxerto mais apropriado. O enxerto autólogo, devido à capacidade osteogênica, facilidade de incorporação e ausência de reações imunológicas, é o preferido pelos cirurgiões ortopédicos (BURCHARDT, 1983), sendo indiscutível a superioridade biológica em relação ao enxerto homogêneo já que, segundo Puranen (1966), o valor biológico do enxerto é baseado na capacidade osteogênica, na qualidade e rapidez com que ele organiza.

Entretanto, a retirada do enxerto do próprio indivíduo aumenta a morbidade, pois representa ato operatório adicional que, além de aumentar o tempo cirúrgico, pode apresentar todos os riscos dela (Salkeld et al., 2001), sendo o principal a infecção e mesmo a fratura do osso doador (SCHWEIBERER et al., 1989, DEFINO et al., 1987, WORTH et al., 2005, RAJAN et al., 2006), principalmente nos ossos longos, como a tíbia. Outras complicações são descritas, principalmente para o ilíaco, dentre elas hérnias abdominais (CASTELEIN e SANTER, 1985), lesões do nervo cutâneo femoral (KAMBIM, 1980) e dor crônica à deambulação (DAWSON et al., 1981).

Outra limitação cirúrgica na enxertia óssea é a pouca disponibilidade da quantidade de osso requerida para o transplante (BROWN e CRUESS, 1982,

SALKELD, 2001), o que torna a possibilidade de criação de bancos de osso bastante atraente.

Essas dificuldades podem ser resolvidas com o uso dos enxertos homogêneos, que são armazenados em bancos de tecidos, onde a principal função do processamento do osso a ser estocado é aumentar a taxa de incorporação, segurança, garantia da esterilidade e facilidade do manuseio do material (THORÉN et al., 1995). Neste caso, outros aspectos devem ser considerados como o uso de métodos de preparo que reduzam a antigenicidade, o risco de transmissão de infecção (FRAYSSINET et al., 1998), além da preservação da atividade biológica, compatível com a do osso autógeno (FRAITZL et al., 2001),

Os enxertos homogêneos podem apresentar vantagem adicional, agora com relação aos materiais sintéticos, por apresentar propriedades mecânicas compatíveis com as do osso receptor (FRAYSSINET et al., 1998).

Em vista disso, é desejável a preservação do osso por meio de uma técnica fácil, relativamente barata, passível de ser realizada na rotina de esterilização de um hospital de médio porte, de modo a propiciar um enxerto fácil de ser transportado, e possibilidade de armazenagem simples, em temperatura ambiente, sem criopreservação e liofilização. Baseados nestes aspectos nos propusemos a estudar o enxerto corticoesponjoso homogêneo processado quimicamente e esterilizado em óxido de etileno, segundo a técnica proposta por Volpon e Costa (2000). Esta técnica de preparação utiliza basicamente a atividade osteocondutora do osso corticoesponjoso, visto que todos os elementos osteogênicos são eliminados por ocasião do processamento, restando somente matriz mineral e colágeno.

O processamento químico do osso tem o objetivo de remover impurezas representadas por restos de gorduras e células que atuam imunologicamente, além

de facilitar a preservação (WORTH, 2005). O osso assim preparado, além de preencher espaços, deve facilitar a osteogênese reparadora.

Muitos autores descrevem vários métodos de preparação de enxerto, todos eles com vantagens e limitações. A questão, entretanto, está sempre na perda da osteogenicidade com os diferentes métodos de processamento e preservação.

Burwell e Gowland (1962) relatam que o principal componente antigênico do enxerto homogêneo fresco é a medula óssea. O processamento químico livra o osso deste elemento que, segundo Sabet (1961), causa redução de vascularização do enxerto devido à reação antígeno-anticorpo. Este autor refere que o grau de ossificação está relacionado às semelhanças ou diferenças genéticas entre o doador e o receptor.

As células osteogênicas podem ter quatro diferentes origens: do periósteo, da zona intracortical, do endósteo e da medula óssea. Tanto o enxerto autógeno como o homogêneo fresco, são osteoindutores, sendo que a atividade osteoindutora pode estar diminuída nos homogêneos, em virtude de fatores imunológicos.

O papel da medula óssea autógena, como elemento fornecedor de células osteogênicas, é bastante conhecido por diversos autores (Burchardt, 1983, Burwell, 1964). Isto motivou-nos a usar, concomitantemente com o osso corticoesponjoso homogêneo processado e esterilizado em óxido de etileno, a medula óssea autógena colhida pela punção do osso ilíaco do cão receptor, na suposição de que, o enxerto embebido em medula óssea autógena carregaria células osteogênicas autógenas, que seriam transferidas para o leito receptor, juntamente com o implante. A medula autógena é um material livre de componentes imunogênicos que estão presentes em grande quantidade na medula alogênica (BURCHARDT, 1983). Com este procedimento, o enxerto de osso corticoesponjoso homogêneo processado, embora

sendo osteocondutor teria, teoricamente, alguma atividade osteogênica e osteoindutora.

Em trabalho semelhante ao nosso, Burwell (1964) testou com sucesso o enxerto denominado homólogo-autólogo que, na verdade, era o osso ilíaco homólogo livre do componente medular, preservado e banhado em tecido medular do receptor. Mais tarde, Nade e Burwell (1977), trabalhando com enxerto ósseo descalcificado, observaram que ocorria melhor atividade osteogênica neste tipo de enxerto quando a ele fosse associada medula autógena. Da mesma forma, Salama e Gazit (1978) estudaram o transplante de osso de Kiel e Oswestry impregnados com medula óssea do receptor na tentativa de melhorar seu desempenho. Suas observações mostraram que a neo-osteogênese parecia ter origem a partir das células que impregnavam o implante.

Sharp et al. (2005) utilizaram células de medula óssea, produzidas em meio de cultura, para induzir a formação de osso. Concluíram que a osteogênese provida por aquelas células era função direta da duração do período de cultura antes do transplante. Em cultura de células de período curto (pouco mais de três semanas), a produção de osso era similar à de células de medula fresca, com a formação de pouco ou nenhum osso, sendo que, para períodos de cultura acima de seis semanas, mais osso novo era formado. Em nosso trabalho utilizamos medula óssea autógena fresca, que teoricamente, em relação à cultura de células, teria menor quantidade de células osteogênicas.

Outro aspecto de nossa metodologia que deve ser abordado é o uso do óxido de etileno na esterilização de enxertos; diferentes opiniões são formuladas pelos autores, algumas favoráveis, outras não.

Alguns autores relatam efeitos deletérios sobre a osteoindução causado pela esterilização com o óxido de etileno, sendo os principais a temperatura a que os enxertos são submetidos (ARIZONO et al., 1994, ZHANG et al., 1997), a dose de óxido de etileno a qual são sujeitos (ASPENBERG et al., 1990), o tempo a que ficam expostos à aeração e à presença de resíduos de óxido de etileno (ARIZONO et al., 1994).

Zhang et al. (1997) mostram que outro fator que interfere na osteoindução é a sequência de processamento e esterilização.

Menor concentração de óxido de etileno residual foi observada por Arizono et al. (1994) ao proceder o desengorduramento e liofilização antes da esterilização com esse gás. Entretanto, maior concentração do gás foi encontrada quando o enxerto foi liofilizado após a exposição ao óxido de etileno. Achados semelhantes foram encontrados por aqueles autores também em cultura de fibroblastos.

Uma opinião drástica sobre o efeito do óxido de etileno na propriedade osteoindutiva é dada por Munting et al. (1988). Segundo eles, o óxido de etileno destrói totalmente a propriedade osteoindutiva. Já Moore et al. (1990) são mais otimistas ao afirmarem que esse gás não interfere na propriedade osteoindutiva. Paradoxalmente, Arizono et al. (1994) afirmam que uma concentração residual mínima de óxido de etileno aumenta a capacidade osteoindutiva do enxerto.

Além da atividade biológica, há relatos de que mudanças estruturais na superfície óssea possam ocorrer em decorrência da utilização do óxido de etileno, por tempo prolongado (DOHERTY et al., 1993). Este fato foi comprovado por Haje (2004) ao submeter parafusos confeccionados de osso cortical bovino e processados segundo a técnica proposta por Volpon e Costa (2000).

Entretanto, não só a ação do óxido de etileno provoca mudanças estruturais da superfície óssea. Vastel et al. (2004) relatam que elas podem ocorrer também em decorrência do processamento químico do osso.

Castania e Volpon (2003) relatam que enxertos de osso corticoesponjoso homogêneo obtidos de fêmures de cães, processados quimicamente e esterilizado em óxido de etileno, apresentaram diminuição das propriedades mecânicas, em ensaio de compressão. Entretanto, estes autores não puderam determinar se este fato ocorreu pelo processamento químico ou pelo efeito da esterilização pelo gás. Contrariamente, Haje (2004) encontrou que o osso assim tratado apresentou maiores valores dos parâmetros mecânicos, exceto para os esforços de torção.

Em nosso estudo não nos preocupamos em verificar a eficiência da esterilização pelo óxido de etileno e não procedemos ao controle bacteriológico pré e pós-esterilização, porque foi utilizada a rotina de esterilização do Hospital das Clínicas da FMRP, que segue rígidos controles. Da mesma maneira, não avaliamos a influência do óxido de etileno na incorporação do enxerto, porque não foi objetivo deste estudo.

Em nosso material, processamos quimicamente o osso para depois submetê-lo ao tratamento com óxido de etileno e não esperamos que o enxerto atuasse como osteoindutor. Assim, a possível ação daquele gás nesta propriedade ficaria irrelevante.

4.1 O modelo experimental

O cão foi utilizado como animal de experimentação porque o tamanho do fêmur na porção distal forneceu uma boa superfície para o fornecimento e

implantação do enxerto. Além disso, foi obtido um cilindro ósseo composto principalmente por osso esponjoso, mas recoberto por osso cortical na periferia o que, teoricamente, aumenta a sua resistência mecânica. Também, a anatomia regional, mais propriamente na área medial da epífise distal, propiciou uma boa superfície para o implante. Este local apresenta uma delgada camada de partes moles, sem nervos e vasos importantes, que torna fácil o acesso cirúrgico ao osso, com menor morbidade.

A utilização da trefina facilitou a confecção do leito receptor; o formato cilíndrico permitiu o encaixe do enxerto de modo estável, o que dispensou o uso de placas, pinos ou outros dispositivos para a fixação. Segundo Stevenson et al. (1996), o mau contato entre o enxerto e o leito receptor é um dos fatores da não integração dele ao leito receptor. Como nosso enxerto foi colocado sob pressão, isto assegurou um bom contato e retenção do bloco ósseo, pois não observamos casos de extrusão. Da mesma forma, Castania e Volpon (2003) estudaram a mesma técnica de enxertia por meio de radiografias e não descrevem o deslocamento do enxerto do leito em caso algum.

Entretanto, algumas dificuldades surgiram, como uniformizar os animais que se apresentavam com variação de tamanho, gênero, idade e peso. Além disso, como os cães provieram de captura nas ruas, houve necessidade de período prévio de recuperação, visando a melhorar as condições gerais de saúde.

Trabalhos de Garrahan et al. (1986) mostraram a influência da idade e do gênero em alterações estruturais do osso trabecular, bem como as modificações no conteúdo de minerais. Estes fatos podem alterar principalmente a resistência mecânica do osso, propriedade importante, quando o enxerto é utilizado como um

espaçador (CASTANIA e VOLPON, 2003). Em nosso trabalho, entretanto, o osso implantado ficou protegido de esforços mecânicos importantes.

Durante o experimento, uma dificuldade encontrada foi em relação ao grupo dos animais que receberam o implante de enxerto autólogo. Para colheita do bloco ósseo no membro contralateral, o procedimento mais indicado seria atravessar a metáfise distal do fêmur com a trefina no sentido medial para o lateral até o desprendimento total do bloco ósseo. Entretanto, este procedimento não foi realizado, pois desta forma, ocorreria enfraquecimento do membro doador do enxerto, o que poderia levar à fratura do fêmur, ou à necessidade de preencher a cavidade com cimento acrílico, por exemplo.

Em vista disto, optamos por proceder à confecção do leito somente até próximo da cortical do lado lateral, porém mantendo-a intacta. Este aspecto tornou mais difícil a retirada do cilindro ósseo, não sendo raras as trincaduras do bloco, o que levou ao descarte do animal.

Embora com todos esses cuidados, a morbidade provocada no membro doador do enxerto fez com que os animais utilizassem para o apoio mais o membro receptor que o membro doador; o que provocou fratura no local do implante em um deles. Além disso, no Grupo II, houve necessidade de dividi-lo em dois subgrupos, visto que, as trefinas usadas para a colheita do osso e para a confecção do leito receptor do enxerto não são intercambiáveis. Assim, o cilindro ósseo obtido seria sempre 1,0 mm mais estreito que o canal produzido no outro lado, o que comprometeria a estabilidade do implante. Isto tornou inviável a troca de implante ósseo entre os lados.

Já nos animais que receberam o enxerto homogêneo, a morbidade foi muito menor, visto que o período de claudicação logo após a cirurgia foi muito curto (três

dias). Não houve infecção no local da cirurgia; este fato, indiretamente, mostrou a eficiência do processo de esterilização e da técnica cirúrgica, embora estes aspectos não tenham sido objetivos deste estudo.

Seis dias após o implante ósseo os membros foram radiografados com objetivo de confirmar a adequação do enxerto ao local. Na presente investigação não tivemos interesse em estudar os aspectos radiográficos da integração óssea, visto que este estudo já fora feito em uma outra publicação (CASTANIA e VOLPON, 2003).

4.2 Estudo histológico

As técnicas histológicas rotineiras são um dos recursos mais importantes para a avaliação da neoformação óssea e, em nossa investigação, forneceram dados importantes, sendo que a análise da microscopia de fluorescência com luz ultravioleta as complementaram. Nos últimos anos houve estudos que empregaram isótopos para avaliar a neoformação óssea em transplantes, porém a tetraciclina apresenta vantagens, como produzir fluorescência amarelo-dourada intensa, duradoura, fácil de ser obtida e de baixo custo (VOLPON, 1985). Segundo Puranem (1966), o uso da tetraciclina para a avaliação da osteogênese é um método com igual importância ao uso de isótopos e atinge os mesmos objetivos.

Nosso estudo não visou a estudar quantitativamente a neoformação óssea, e sim qualitativamente, embora estudos quantitativos enriquecessem os resultados. Por isto, deixamos como sugestão a análise histomorfométrica para estudos futuros.

A análise histológica mostrou que os eventos ocorridos no Grupo I (enxerto homogêneo) foram semelhantes àqueles ocorridos no Grupo II (enxertos autógenos),

porém, mais atrasados, o que corrobora os resultados de Parrish (1966), Goldberg e Stevenson (1987) e Salkeld (2001) que mostraram que o enxerto esponjoso autógeno é vascularizado e integrado mais rapidamente que o homogêneo. A taxa de revascularização dos enxertos freqüentemente influencia a reabsorção do osso enxertado, sendo ela dependente, muitas vezes, do tipo de processamento (SOLHEIN et al., 2001).

Nossos resultados mostraram que, tanto os enxertos homogêneos analisados aos 21 dias pós-implantes, como aos 42 dias apresentaram boa resposta biológica.

A aceitação de um enxerto por um determinado receptor pode ser avaliada pela qualidade e quantidade do infiltrado celular. No entanto, a reação não pode ser diferenciada daquela proveniente da reação inflamatória inespecífica. Em nosso estudo não foi observada a presença de células, que sugerissem processo infeccioso ou de rejeição do enxerto implantado.

Freqüentemente, em vários cortes do enxerto homogêneo, verificamos presença de trabéculas com deposição de osso neoformado, inclusive com medula óssea, indicando maturação óssea. Embora temporalmente diferente, seqüencialmente o processo de incorporação do osso implantado foi o mesmo nos dois tipos de enxertos, ou seja, a osteogênese iniciou-se pela periferia do enxerto, com deposição inicial de osso novo sobre trabéculas antigas que foram progressivamente substituídas e, por fim, a remodelação do osso neoformado com a formação de medula óssea. Isto sugere que o mecanismo de atuação do enxerto homogêneo foi por osteocondução.

Histologicamente, apenas um dos cortes com 42 dias pós-implante apresentou reabsorção do enxerto no Grupo I, cuja causa não foi possível determinar, visto que nenhum elemento, a não ser presença de tecido amorfo foi

encontrado. Porém, não podem ser descartadas reações imunológicas ocorridas anteriormente ao sacrifício. Um outro corte mostrou que o enxerto estava seqüestrado, mas a causa também não pôde ser determinada. Eppley et al., (1991) estudaram a influência do fator de crescimento de fibroblastos na angiogênese de leitões previamente irradiados e mostraram a importância da vascularização na prevenção do seqüestro dos enxertos. Para estes autores, vascularização e antigenicidade são dois fenômenos que freqüentemente estão associados.

Os enxertos autógenos, tanto com 21, como com 42 dias pós-implante, apresentaram seqüência de eventos histológicos bastante semelhantes, sendo que em ambos houve presença de lacunas osteocíticas abundantes e, a maioria das vezes, não foi possível separar nitidamente o osso do enxerto daquele do leito receptor, o que indica um processo de integração do enxerto ao leito receptor. Assim, embora o enxerto homogêneo tenha tido um desempenho menor que o enxerto autógeno, sua integração foi bastante adequada, estando praticamente completa em apenas seis semanas, na maioria dos casos.

As diferentes situações envolvendo perdas ósseas, necessidades de enxertia maciças, afrouxamento de componentes de artroplastia, entre outras, requerem na maioria das vezes uma demanda muito grande de osso, que não pode ser solucionada com o uso do enxerto autógeno.

O osso homogêneo, desde que utilizado com bom nível de segurança, principalmente no que diz respeito à esterilização, pode ser uma boa alternativa para o autógeno.

O enxerto de osso corticoesponjoso homogêneo processado quimicamente, esterilizado em óxido de etileno e embebido em medula óssea autógena, em teses, preenche estes requisitos, com a vantagem de estocagem em bancos de ossos a

temperatura ambiente. A possibilidade de se usar esse tipo de enxerto em bancos de osso, não como substituto para o autógeno, mas como uma alternativa para ele, aumenta seu uso potencial.

5 CONCLUSÃO

O enxerto homogêneo processado e esterilizado em óxido de etileno e embebido em medula óssea apresentou boa atividade biológica. Embora com integração mais lenta e menor performance em relação ao enxerto autógeno, o enxerto homogêneo pode ser um bom substituto para o enxerto autógeno, principalmente pela possibilidade de estocagem em bancos de osso.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOT, L.C.; SCHOTTSTAEDT, E.R; SAUNDERS, J.B.C.M; BOST, F.C. The evaluation of cortical and cancellous bone as grafting material. **The Journal of Bone and Joint Surgery AM**, Boston, v.29 (2), p.381-414, 1947.

ALEXANDER, J.W. Bone grafting. **The Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, Philadelphia, Saunders, v.17, p.811-819, 1987.

ARIZONO, T.; IWAMOTO, Y.; OKUYAMA, K.; SUGIOKA, Y. Ethylene oxide sterilization of bone graft. Residual gas concentration and fibroblast toxicity. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, Basingstoke, v.65 (6), p.640-642, 1994.

ARTS, J.J.C.; VERDONSCHOT, N.; BUMA,P.; SCHREURS, B.W. Larger bone graft size and washing of bone grafts prior to impaction enhances the initial stability of cemented cups. **Acta orthopaedica**, Basingstoke, v. 77(2), p.227-233, 2006.

ASPENBERG, P.; JOHNSON, E.; THORNGREN, K.G. Dose-dependent reduction of bone inductive properties by ethylene oxide. **The Journal of Bone and Joint Surgery BR**, London, v.72 (6), p.1036-1037, 1990.

BARBIERI, C.H.; MAZER, N. Enxerto ósseo livre vascularizado: Alternativa de tratamento da pseudoartrose congênita da tíbia. Relato de caso. **Revista Brasileira de Ortopedia**, Rio de Janeiro, v.19 (1), p.16-20, 1984.

BLOOMBERG, M.S.; CRING, R.L.; BORN, F. Bone and cartilage transplantation in orthopaedic surgery. **Journal of the America Animal Hospital Association**, South Bend, v.20, p.393-402, 1984.

BROWN, K.L.B.; CRUESS, R.L. Bone and cartilage transplantation in ortopedic surgery. **The Journal of Bone and Joint Surgery AM.**, Boston, v.64 (2), p.270-279, 1982.

BURCHARDT, H. The biology of bone graft repair. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v.174, p.28-42, 1983.

BURCHARDT, H.; ENNEKING, W.F. Transplantation of bone. **Surgery Clinical of North America**, Philadelphia, v.58 (2), p.403-427, 1978.

BURCHARDT, H.; JONES, H.; GLOWCZEWSKIE, B.S.; RUDNER, C.; ENNEKING, W.F. Freeze-dried allogeneic segmental cortical-bone graft in dogs. **The Journal of Bone and Joint Surgery AM**, Boston, v.60 (8), p.1082-1090, 1978.

BURWELL, R.G. Studies in the transplantation of bone VII. The fresh composite homograft- autograft of cancellous bone. An analysis of factors leading to osteogenesis in marrow transplants and in marrow- containing bone grafts. **The Journal of Bone and Joint Surgery BR**, London, v.46 (1), p.110-140, 1964.

BURWELL, R.G.; GOWLAND, G. The immune responses of lymphonodes draining components of fresh homologous cancellous bone and homologous bone treated by different methodes. **The Journal of Bone and Joint Surgery BR**, London, v.44 (1), p.131-148, 1962.

BURWELL, R.G.; GOWLAND, G.; DEXTER, F. Further observation concerning the antigenicity of homologous cortical and cancellous bone. **The Journal of Bone and Joint Surgery BR**, London , v.45 (3), p.597-608, 1963.

CASTANIA, V.A.; VOLPON, J.B. Enxerto ósseo processado quimicamente e esterilizado em óxido de etileno. Ensaio mecânico e teste em cães. **Revista Brasileira de Ortopedia Pediátrica**, São Paulo, v.4 (1/2), p.22-29, 2003.

CASTELEIN, R.M.; SANTER, A.J.M. Lumbar hernia in an iliac bone graft defct. A case report. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, Basingstoke, v.56 (3), p.273-274, 1997.

CHALMERS, J. Transplantation immunity in bone homografting. **The Journal of Bone and Joint Surgery BR**, London, v.41 (1), p.160-179, 1959.

CHALMERS, J.; GRAY, D.H.; RUSH, J. Observation on the induction of bone in soft tissues. **The Journal of Bone and Joint Surgery BR**, London, v.5 (1), p.36-45, 1975.

CHASE, SW, HERNDON, C.H. The fate of autogenous and homogenous bone grafts. A historical review. **The Journal of Bone and Joint Surgery AM**, Boston, v.37 (4), p.809-841, 1955.

CONRAD, E.U., GRETCH, D.R., OBERMEYER, K.R., SAYERS, M., WILSON, J.J., STRONG, D.M. Transmission of the hepatitis-C virus by tissue transplantation. **The Journal of Bone and Joint Surgery AM**, Boston, v.77 (2), p.214-224, 1995.

CORNU, O.; BANSE, X.; DOCQUIER, P.L.; LUYCKX, S.; DELLOYE, CH. Effect of freeze-drying and gamma irradiation on the mechanical properties of human cancellous bone. **Journal of Orthopaedic Research**, New York, v.18 (3), p.426-431, 2000.

DAWSON, E.G.; LOTYSCH, M.; URIST, M.R. Intertransverse process lumbar arthrodesis with autogenous bone graft. **Clinical Orthopaedics**, Philadelphia v.154, p.90-96, 1981.

DE BOER, H.H. The history of bone grafts. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v 226, p. 292-298, 1988.

DEFINO, H.L.A.; FUENTES, A.E.R.; OLIVEIRA JR, W.M. Reconstrução da área doadora de enxerto ósseo do ilíaco. Apresentação de técnica cirúrgica. **Revista Brasileira de Ortopedia**, Rio de Janeiro, v.32 (10), p.822-826, 1987.

DEFINO, H.L.A.; DE CONTI, O.; VELLUDO, M.A.S.L. Estudo experimental da integração óssea da hidroxiapatita. **Revista Brasileira de Ortopedia**, Rio de Janeiro, v.33 (9), p.713-718, 1998.

DICKSON, I. The composition and antigenicity of sheep cortical bone matrix proteins. **Calcified Tissue Research**, Berlim, v.16 (4), p.321-323, 1974.

DOHERTY, M.J. Effect of ethylene oxide sterilization on human demineralized bone. **Biomaterials**, Guilford, v.14 (13), p.994-998, 1993.

DUARTE, LR. Estimulation of bone by ultrasound. **Archives of Orthopaedics and Trauma Surgery**, Berlim, v.101 (3), p.153-159, 1983.

EPPLEY, L.B.; CONNOLLY, D.T.; WINKELMANN, T.; SADOVE, M.A.; HEUVELMAN, D.; FEDER, J. Free bone graft reconstruction of irradiated facial tissue: Experimental effects of basic fibroblast growth factor stimulation. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Dallas, v.88 (1), p.1-11, 1991.

FRAITZL, C.R.; LEUNIG, M.; DEMHARTNER, T.J.; SCKELL, A.; GANZ, R. Development of transplanted fetal bones. Differences between isografts and allografts in mice. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v.382, p.267-276, 2001.

FRAYSSINET, P.; ROUQUET, N.; MATHON, D.; AUTEFAGE, A.; FAGES, J. Histological integration of allogeneic cancellous bone tissue treated by supercritical CO₂ implanted in sheep bone. **Biomaterials**, Guilford, v.19 (24), p.2247-2253, 1998.

FRIEDLAENDER, G.E. Current concepts review: Bone banking. **The Journal of Bone and Joint Surgery AM**, Boston, v.64 (2), p.307-311, 1982.

FRIEDLAENDER, G.E. Immune responses to osteochondral allografts. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v.174, p.28-42, 1983.

FUJIKI, E.N.; HONDA, E.K.; FUKUSHIMA, W.Y.; CHIKUDE, T.; DE MENEZES JR, D.R.; OLIVEIRA, C.A.P.; TELLES, D.F. Enxerto liofilizado homólogo em artroplastia de revisão em quadril. **Revista Brasileira de Ortopedia**, Rio de Janeiro, v.40 (5), p.280-287, 2005.

GARRAHAN, N.J.; MELLISH, R.W.E.; COMPSTON, J.E. A new method for two-dimensional analysis of bone structure in human iliac crest biopsies. **Journal of Microscopy**, Oxford, v.142 (3), p.341-349, 1986.

GOLDBERG, V.M.; STEVENSON, S. Natural history of autograft and allografts. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v.225, p.7-16, 1987.

GONÇALVES, R.G.; HONDA, E.K.; ONO, N.K. Análise da incorporação do enxerto ósseo acetabular. **Revista Brasileira de Ortopedia**, Rio de Janeiro, v.38 (4), p.149-160, 2003.

GONÇALVES, R.P.; OLIVÉRIO, L.G. Electrical decalcification of bone. **Mikroskopie**, München, v.20, p.154-156, 1965.

HAJE, D.P. **Desenvolvimento de parafusos de osso bovino: efeitos do processamento químico e da confecção de roscas sobre alguns aspectos mecânicos e estruturais**. 2004.139p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

KAMBIN, P. Anterior cervical fusion using vertical self-locking T-graft. **Clinical Orthopaedics**, Philadelphia, v.153, p.132-137, 1980.

LIPTAK, J.M., DERNELL, W.S., EHRHART, N., LAFFERTY, M.H., MONTEITH, G.J., WITHROW, S.J. Cortical allograft and endoprosthesis for limb-sparing surgery in dogs with distal radial osteosarcoma: a prospective clinical comparison of two different limb-sparing techniques. **Veterinary Surgery**, Davis, v.35 (6), p.518-533, 2006.

MANKIN, H.J.; DOPPELT, S.; TOMFORD, W. Clinical experience with allograft implantation: The first ten years. **Clinical Orthopaedics and related Research**, Philadelphia v.174, p.69-86, 1983.

MOORE, J.R. Delayed autogenous bone graft in the treatment of congenital pseudoarthrosis. **The Journal of Bone and Joint Surgery AM**, Boston, v.31.(1), p.23-39, 1949.

MOORE, T.M.; ARTAL, R.; ARENAS, M.; GENDLER, E. Influence of postmortem time and temperature on osteoinductive activity of demineralized microperforated ethylene oxide sterilized syngeneic bone implant in rat. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v.259, p.239-244, 1990.

MUNTING, E.; WILMART, F.F.; WIJNE, A.; HENNEBERT, P.; DELLOYE, C. Effect of sterilization on osteoinduction. Comparison of five methods in demineralized rat bone. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, Basingstoke, v.59 (1), p.34-48, 1988.

MUSCOLO, D.L.; KAWAI, S.; RAY, R.D. Cellular and humoral immune response analysis of bone-allografted rats. **The Journal of Bone and Joint Surgery AM**, Boston, v.58 (6), p.826-832, 1976.

NADE, S.; BURWELL, R.G. Decalcified bone as a substrate for osteogenesis. An appraisal of the interrelation of bone and marrow in combined grafts. **The Journal of Bone and Joint Surgery BR**, London, v. 59 (2), p. 189-196, 1977.

OLDS, R.B. Pathophysiology in small animal surgery. In Bojrab, M.J. (ED). **Bone Grafting**, 2 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1981.

PARRISH, F.F. Treatment of bone tumor by total excision and replacement with massive autologous and homogenous graft. **The Journal of Bone and Joint Surgery AM**, Boston, v.48 (5), p.968-990, 1966.

PHEMISTER, D.B. The fate of transplanted bone and regenerative power of its various constituents. **Surgery Gynecology Obstetric**, Chicago, v.19 (3), p.303-333, 1914.

PURANEN, J. Reorganization of fresh and preserved transplants. An experimental study in rabbits using tetracycline labeling. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, Basingstoke, v.92, Suppl., p.1-75, 1966.

RAJAN, G.P.; FORNARO, J.; TRENTZ, O.; ZELLWEGER, R. Cancellous allograft versus autologous bone grafting for repair of comminuted distal radius fractures: A prospective randomized trial. **The Journal of Orthopaedic Trauma**, Hagerstow, v.60 (6), p.1322-1329, 2006.

SABET, T.Y.; HIDVEGI, E.B.; RAY, R.D. Bone immunology II. Comparison of embrionic mouse isografts and homografts. **The Journal of Bone and Joint Surgery AM**, Boston, v.43 (5), p.1007-1021, 1961.

SALAMA, R.; GAZIT, E. The antigenicity of Kiel bone in the human host. **The Journal of Bone and Joint Surgery BR**, London, v.60 (2), p.262-265, 1978.

SALKELD, S.L.; PATRON, L.P.; BARRACK, R.; COOK, S.D. The effect of osteogenic protein-1 on the healing of segmental bone defects treated with autograft or allograft bone. **The Journal of Bone and Joint Surgery AM**, Boston, v.83 (6), p.803-816, 2001.

SCHWEIBERER, L.; STÜTZLE, H.; MANDELKOW, H.K. Bone transplantation. A historical review. **Archives of Orthopaedics and Trauma Surgery**, Berlim, v.109(1), p.1-8, 1989.

SHARP, J.G.; MURPH, B.O.; JACKSON, J.D.; BRUSNAHAN, S.K.; KESSINGER, A.; NEFF, J.R. Promises and pitfalls of stem cell therapy for promotion of bone healing. **Clinical Orthopaedics and related Research**, Philadelphia, v.435, p.52-61, 2005.

SOLHEIN, E.; PINHOLT, E.M.; TALSNES, O.; LARSEN, T.B.; KIRKEBY, O.J. Revascularization of fresh compared with desmineralized bone grafts in rats.

Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery, Stockholm, v.35 (2), p.113-116, 2001.

STEVENSON, S.; EMERY, S.E.; GOLDBERG, V.M. Factors affecting bone graft incorporation. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v.324, p.66-74, 1996

TAYLOR, G.I.; MILLER, G.D.H.; HAM, F.J. The free vascularized bone graft. A clinical extension of microvascular techniques. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Dallas, v.55 (5), p.533-544, 1975.

THORÉN, K.; ASPENBERG, P. THORNGREN, K.G. Lipid extracted bank bone. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v.311, p.232-246, 1995.

URIST, M.R.; DOWELL, T.A. Inductive substratum for osteogenesis in pellets of particulate bone matrix. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v.61, p.61-78, 1968.

URIST, M.R.; SILVERMAN, F.F.; BÜRING, K.; DUBUC, F.L.; ROSEMBERG, J.M. The bone induction principle. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v.53, p.243-283, 1967.

VASTEL, L.; MEUNIER, A.; SINEY, H.; SEDEL, L.; COURPIED, J.-P. Effect of different sterilization processing methods on the mechanical properties of human cancellous bone allografts. **Biomaterials**, Guilford, v.25 (11), p.2105-2110, 2004.

VOLPON, J.B. **Estudo experimental comparativo entre o enxerto homólogo descalcificado simples e o enxerto homólogo descalcificado retardado**. 1985. 78p. Tese (Livre docência) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1985.

VOLPON, J.B; DA COSTA, R.M.P. Ensaio mecânico e uso clínico do enxerto homogêneo processado. **Revista Brasileira de Ortopedia**, Rio de Janeiro, v.35 (6), p.219-224, 2000.

WEIGEL, J.P. Bone graft. In: BOJRAB, M.J. **Disease mechanisms in small animal surgery**, 2 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p.678-684, 1993.

WORTH, A.; MUCALO, M.; HORNE, G.; BRUCE, W.; BURBIDGE, H. The evaluation of processed cancellous bovine bone as a graft substitute. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v.6 (3), p.379-386, 2005.

ZHANG, Q.; CORNU, O.; DELLOYE, C. Ethylene oxide does extinguish the osteoinductive capacity of demineralized bone. A reappraisal in rats. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, Basingstoke, v.68 (2), p.104-108, 1997.

ANEXO

ANEXO A – Protocolo da aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Protocolo nº 054/2003).

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

"CAMPUS" DE RIBEIRÃO PRETO
TELEFONE: PABX 602.3000 – FAX: (0XX16) 633.1586
14049-900 – RIBEIRÃO PRETO – ESTADO DE SÃO PAULO

Folha de Informação rubricada sob Nº
do processo Nº (a)

Interessado: VITOR APARECIDO CASTANIA

Orientador: Prof. Dr. JOSÉ BATISTA VOLPON

Assunto: Avaliação do projeto de pesquisa: "*Estudo da integração do enxerto cortiço-esponjoso homogêneo processado e esterilizado em óxido de etileno, em cães: Estudo da integração por meio da histologia convencional e fluorescência óssea*".

INFORMAÇÃO

O projeto intitulado "*Estudo da integração do enxerto cortiço-esponjoso homogêneo processado e esterilizado em óxido de etileno, em cães: Estudo da integração por meio da histologia convencional e fluorescência óssea*", foi analisado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em sua 11ª Reunião Ordinária, realizada em 29 de março de 2004, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Protocolo Nº 054/2003.

Ribeirão Preto, 02 de abril de 2004.

Prof. Dr. JOÃO SANTANA DA SILVA
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal