Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Fabiano Ricardo de Tavares Canto

**Influência da decorticação na neoformação
tecidual da interface do enxerto ósseo na
coluna vertebral.**

Ribeirão Preto

2007

Fabiano Ricardo de Tavares Canto

**Influência da decorticação na neoformação
tecidual da interface do enxerto ósseo na
coluna vertebral.**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo junto ao Departamento de
Biomecânica Medicina e reabilitação do aparelho locomotor,
para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Médicas_
Área de concentração : Ortopedia e Traumatologia.**

Orientador: Prof. Dr. Helton L. A. Defino

**Ribeirão Preto
2007**

Canto, Fabiano Ricardo Tavares

Influência da decorticação na neoformação tecidual da interface
do enxerto ósseo na coluna vertebral _ Ribeirão Preto, 2007.

77f.:il;30cm

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

Orientador: Defino, Helton Luiz Aparecido.

1. Decorticação da coluna vertebral. 2. Enxerto ósseo. 3. Neoformação
tecidual. 4. Histomorfometria

Folha de Aprovação

Fabiano Ricardo de Tavares Canto

Influência da decorticação na neoformação tecidual da interface do enxerto ósseo na coluna vertebral.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo junto ao Departamento de Biomecânica Medicina e reabilitação do aparelho locomotor, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Médicas_ Área de concentração: Ortopedia e Traumatologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr : _____
Instituição _____ Assinatura:

Prof. Dr : _____
Instituição _____ Assinatura:

Prof. Dr : _____
Instituição _____ Assinatura:

Prof. Dr : _____
Instituição _____ Assinatura:

Prof. Dr : _____
Instituição _____ Assinatura:

Prof. Dr : _____
Instituição _____ Assinatura:

Dedicatória

Aos meus pais e irmãos pela educação,
dedicação e empenho em me ajudar.
À Paula pelo carinho, compreensão e
pela ausência em muitos momentos
dedicados ao trabalho.

Agradecimentos

Ao Prof Dr Helton que orientou este trabalho com sabedoria, paciência, boas idéias e sempre soube conduzir as dificuldades que aconteceram no decorrer deste trabalho. Gostaria também de agradecer ao professor pela amizade e pelos conhecimentos transmitidos durante os nossos anos de convivência.

Ao meu pai Prof Dr Roberto S T Canto pelo exemplo de conduta na sua vida profissional e por sempre ter me motivado para pesquisar e estudar mais.

Às secretárias do departamento de Biomecânica Maria de Fátima F de Lima, Rosa Pereira Brites Alves, Elisângela B de Oliveira.

Aos funcionários do Laboratório de Bioengenharia, pela amizade, por estarem sempre à disposição, pela educação e dedicação ao trabalho: Luis Henrique Alves, Francisco Carlos Mazzocato e Maria Terezinha de Moraes.

À técnica de patologia Auristela pela grande amizade e por ter feito os cortes histológicos utilizados no estudo.

À Rosângela Orlandim por também ajudar na preparação do corte histológico

Ao Prof. Dr. José Batista Volpon chefe do laboratório de Bioengenharia.

Aos amigos Franco, Marisa, Camila, tio Chico, tia Regina, tia Maria Luiza, tio Rubens pelos conselhos no decorrer deste trabalho.

Aos meus amigos Patrícia, Leandro, Orli pela ajuda na leitura do texto e pelos conselhos nos momentos difíceis.

Lista de ilustrações

Figura 1_ Figura demonstrando a técnica operatória utilizada no experimento. **A.** Exposição das duas primeiras vértebras lombares. **B.** Mais detalhes das duas primeiras vértebras lombares, demonstrando os elementos posteriores da coluna vertebral- lâminas vertebrais, facetas articulares, processos espinhosos. **C.** Secção dos dois primeiros processos espinhosos na sua base, através de uma tesoura de Allis delicada. **D.** Decorticação dos elementos posteriores com um osteótomo delicado.

Figura 2_ Figura demonstrando a técnica operatória utilizada no experimento. **A.** Secção dos processos espinhosos no plano sagital, separando-os em duas partes. **B.** Parte externa lisa do processo espinhoso, que foi usada como enxerto cortical. **C.** Parte interna rugosa do processo espinhoso, que foi usada como enxerto esponjoso. **D.** Colocação do enxerto esponjoso sobre o leito posterior. **E.** Colocação do enxerto cortical sobre o leito receptor posterior.

Figura 3_ Figura demonstrando a preparação das vértebras operadas para a confecção do corte histológico. **A.** Identificação das vértebras operadas com dissecação por planos. **B e C.** Liberação das vértebras operadas das partes moles e ressecção dessas vértebras do restante da coluna. **D.** Região operada após a fixação e a descalcificação, etapa em que a clivagem do material foi efetuada. Notar que as duas vértebras operadas possuem um formato retangular.

Figura 4. Seqüência para a preparação do corte histológico. **A.** Região operada após a fixação e descalcificação. **B.** Clivagem da peça, separando a interface leito receptor posterior e enxerto ósseo do restante da coluna. **C. e D** Preparação da interface para a inclusão em parafina. Notar a seqüência ordenada das clivagens para facilitar a identificação da interface durante o estudo histomorfométrico (setas).

Figura 5. Fotomicrografia de um campo visual ilustrando a régua em escala decimal acoplada à objetiva do microscópio, que foi utilizada para calcular a área dos tecidos neoformados na interface leito receptor posterior e enxerto ósseo. (T Masson, 100X).

Figura 6_ Gráfico ilustrando a média da porcentagem de neoformação tecidual nos animais sacrificados com três semanas de pós-operatório. * representa diferença estatística.

Figura 7_ Gráfico ilustrando a média da porcentagem de neoformação tecidual nos animais sacrificados com seis semanas de pós-operatório. * representa diferença estatística.

Figura 8_ Gráfico ilustrando a média da porcentagem de neoformação tecidual nos animais sacrificados com nove semanas de pós-operatório. * representa diferença estatística.

Figura 9_ Gráfico ilustrando a média da porcentagem de osso neoformado no grupo decorticado mais enxerto esponjoso com 3,6,9 semanas.

Figura 10_ Gráfico ilustrando a média da porcentagem de osso neoformado no grupo decorticado mais enxerto cortical com 3,6,9 semanas.

Figura 11_ Gráfico ilustrando a média da porcentagem de osso neoformado no grupo não decorticado mais enxerto esponjoso com 3,6,9 semanas. * significa diferença estatística entre os dois tempos ($p=0,0043$).

Figura 12_ Gráfico ilustrando a média da porcentagem de osso neoformado no grupo não decorticado mais enxerto cortical com 3,6,9 semanas. *,** significam diferenças estatísticas entre os tempos, * ($p=0,0087$), ** ($p=0,0043$).

Figura 13_ Gráfico ilustrando a média da porcentagem de cartilagem neoformada no grupo decorticado mais enxerto esponjoso nos três diferentes tempos analisados, *,** significam diferenças estatísticas entre os tempos. * ($p=0,0043$), ** ($p=0,0152$).

Figura 14_ Gráfico ilustrando a média da porcentagem de cartilagem neoformada no grupo decorticado mais enxerto cortical nos três diferentes tempos analisados. *significa diferença estatística entre os dois tempos ($p=0,0087$).

Figura 15_ Gráfico ilustrando a média da porcentagem de cartilagem neoformada no grupo não decorticado mais enxerto esponjoso nos três diferentes tempos analisados.

Figura 16_ Gráfico ilustrando a média da porcentagem de cartilagem neoformada no grupo não decorticado mais enxerto cortical nos três diferentes tempos analisados. * significa diferença estatística entre os dois tempos analisados ($p=0,0087$).

Figura 17_ Gráfico ilustrando a média da porcentagem de tecido fibroso neoformado no grupo decorticado mais enxerto esponjoso nos três diferentes tempos analisados. * representa diferença estatística entre os dois tempos ($p=0,0043$).

Figura 18_ Gráfico ilustrando a média da porcentagem de tecido fibroso neoformado no grupo decorticado mais enxerto cortical nos três diferentes tempos analisados. * e ** representam diferenças estatísticas entre os tempos analisados. * ($p=0,0022$) e ** ($p=0,0087$)

Figura 19_ Gráfico ilustrando a média da porcentagem de tecido fibroso neoformado no grupo não decorticado mais enxerto esponjoso nos três diferentes tempos analisados. * e ** representam diferenças estatísticas entre os tempos analisados. * ($p=0,0043$) e ** ($p=0,0022$).

Figura 20_ Média da porcentagem de tecido fibroso neoformado no grupo não decorticado mais enxerto cortical nos três diferentes tempos analisados. * e ** representam diferenças estatísticas entre os tempos analisados. * ($p=0,0152$) e ** ($p=0,0043$).

Figura 21. Fotomicrografia de animal com o leito receptor decorticado e enxerto ósseo cortical sacrificado com três semanas de pós-operatório. Notar a grande formação de osso compacto com osteoblastos fusiformes com uma conformação desordenada e a ausência de tecido cartilaginoso. O osso compacto que é visto na interface representa osso neoformado por uma ossificação predominantemente intramembranosa. (HE, 100X)

Figura 22. A Fotomicrografia de animal com o leito receptor decorticado e enxerto esponjoso ,sacrificado com 6 semanas de pós-operatório, notar a completa integração do enxerto ósseo (parte superior da figura) pelo leito receptor e também a grande quantidade de osso neoformado corado em azul na interface. A seta está destacando uma área em estágio de remodelação óssea, onde o osso compacto neoformado está se transformando em osso trabecular mais antigo. (T Masson,40X). **B.** Fotomicrografia em maior aumento, notar a grande neoformação óssea corada em azul com a ausência de tecido cartilaginoso, característico do modelo de ossificação intramembranosa. (T Masson, 100X).

Figura 23 A. Fotomicrografia de animal com o leito receptor decorticado e enxerto esponjoso sacrificado com 6 semanas de pós-operatório. Notar a exuberante neoformação óssea (azul) por ossificação intramembranosa predominantemente, a completa integração do enxerto ósseo (parte superior da figura). (T Masson,25X). **B.** Fotomicrografia do mesmo animal em maior aumento, a seta está indicando uma área de remodelação óssea. Notar a organização do osso compacto em osso trabecular, com a formação de trabéculas ósseas mais espessadas e de coloração arroxeadas. (T Masson,40X). **C.** Fotomicrografia do mesmo animal em maior aumento evidenciando osso compacto neoformado pelo mecanismo de ossificação intramembranosa. Notar a grande quantidade de vasos sanguíneos entre os osteoblastos do osso compacto.(T Masson,100X).

Figura 24 A. Fotomicrografia de animal com o leito receptor decorticado e enxerto ósseo cortical, sacrificado com 9 semanas de pós-operatório. A ossificação na interface foi predominantemente intramembranosa, notar grandes áreas de remodelação óssea. (T Masson,40X). **B** Fotomicrografia do mesmo animal em maior aumento, notar as características morfológicas do corte histológico que se repetiram em todos animais decorticados, ou seja, grande quantidade de osso compacto formado diretamente, sem um molde cartilaginoso prévio. (T Masson,100X).

Figura 25: Fotomicrografia de animal do grupo não decorticado mais enxerto esponjoso sacrificado com 3 semanas de pós-operatório. Notar a ausência de contato direto entre o enxerto ósseo e o leito receptor, a formação do broto de ossificação endocondral em contato com o leito receptor (seta), a neoformação de osso compacto em pequena quantidade ao redor da matriz de tecido cartilaginoso e a neoformação de tecido fibroso ao longo de toda a interface. (HE,100X).

Figura 26 Fotomicrografia de animal do grupo não decorticado mais enxerto esponjoso sacrificado com 3 semanas de pós-operatório. Notar o pouco contato entre o leito receptor e o enxerto na interface, a presença de tecido fibroso nas extremidades do enxerto ósseo e do leito receptor, a formação do molde de tecido cartilaginoso em contato com o leito receptor (seta) e a pequena quantidade de osso compacto neoformado crescendo em direção ao enxerto ósseo. (T Masson,40X).

Figura 27 **A.** Fotomicrografia do animal do grupo não decorticado mais enxerto cortical sacrificado com 6 semanas de pós-operatório, notar a ocorrência de ossificação endocondral e a presença de tecido fibroso na interface. (T Masson,40X). **B** Fotomicrografia do mesmo animal com maior aumento, notar a formação de osso novo compacto pelo modelo de ossificação endocondral. (T Masson,100X).

Figura 28 **A** Fotomicrografia de animal sacrificado com 9 semanas de pós-operatório, notar que com essa evolução pós-operatória passou a existir um melhor contato entre o enxerto e o seu leito receptor. (T Masson, 40X). **B.**Fotomicrografia do mesmo animal em maior aumento, notar o modelo de ossificação endocondral e a remodelação do tecido ósseo neoformado na região em contato com o enxerto ósseo, parte superior da figura. (T Masson, 100X).

Figura 29 **A** Fotomicrografia de animal não decorticado mais enxerto esponjoso sacrificado com 3 semanas de pós operatório. O leito receptor que está aqui representado na parte inferior da figura apresenta pouca integração com o enxerto ósseo, a interface apresenta uma pequena quantidade de tecido ósseo e cartilaginoso neoformados, com uma grande quantidade de tecido fibroso. (T Masson, 40X). **B** Fotomicrografia de animal decorticado mais enxerto cortical sacrificado com 3 semanas de pós-operatório. O leito receptor que também está representado na parte inferior da figura apresenta uma boa integração com o enxerto ósseo, a interface apresenta uma grande quantidade de tecido ósseo neoformado que preenche todos os espaços entre o leito receptor e o enxerto ósseo. (T Masson, 40X).

Lista de Tabelas

Tabela 1 _ Grupos experimentais de acordo com a realização da decorticação e natureza do enxerto ósseo utilizado.

Tabela 2_ Valores em porcentagem(%) dos tecidos neoformados de todos os animais sacrificados com três semanas de pós-operatório, subdivididos de acordo com a preparação do leito posterior e com o tipo de enxerto ósseo utilizado.

Tabela 3_ Valores em porcentagem(%) dos tecidos neoformados de todos os animais sacrificados com seis semanas de pós-operatório, subdivididos de acordo com a preparação do leito posterior e com o tipo de enxerto ósseo utilizado.

Tabela 4_ Valores em porcentagem(%) dos tecidos neoformados de todos os animais sacrificados com nove semanas de pós-operatório, subdivididos de acordo com a preparação do leito posterior e com o tipo de enxerto ósseo utilizado.

Sumário

1_Introdução.....	14
2_Objetivo.....	18
3_Revisão bibliográfica.....	19
4_Material e método.....	27
4.1-Material.....	27
4.1.1-Animal utilizado.....	27
4.2-Método.....	27
4.2.1-Modelo experimental.....	27
4.2.2-Técnica operatória.....	28
4.2.3-Grupo experimental.....	31
4.2.4-Método de avaliação.....	32
4.2.4.1-Preparação histológica.....	32
4.2.4.2-Avaliação histológica e histomorfométrica.....	35
4.2.5-Análise estatística.....	36
5-Resultados.....	37
5.1-Considerações gerais.....	37
5.2-Avaliação histomorfométrica.....	37
5.3-Avaliação histológica.....	55
6-Discussão.....	64
7-Conclusão.....	69
8-Resumo.....	70
9-Summary.....	72
10-Referências bibliográficas.....	74
11-Formato para a publicação.....	78

1-Introdução

O conceito da decorticação do leito receptor do enxerto ósseo nas artrodeses vertebrais foi introduzido por Hibbs em 1911.(Hibbs,1911)

A técnica descrita por Hibbs preconiza a ampla ressecção das estruturas músculo ligamentares, facetectomia e a decorticação dos elementos posteriores. A decorticação significa a remoção da parte superficial de osso cortical que recobre os elementos posteriores da base do processo espinhoso até a parte mais lateral da lâmina e das facetas articulares, dessa forma expondo a camada subjacente de osso esponjoso. O objetivo da técnica descrita por Hibbs foi deixar o leito receptor cruento para diminuir o número de falhas para se alcançar a consolidação óssea na artrodese posterior da coluna vertebral(Hibbs,1924).

A decorticação aumenta a morbidade do procedimento cirúrgico, aumentando o tempo operatório, aumentando a perda sanguínea e enfraquecendo o suporte ósseo para a fixação do material de síntese. Motivados por esses problemas alguns autores não têm decorticado os elementos posteriores da coluna vertebral em uma artrodese com instrumentação cirúrgica segmentar(Roy-Camille et al.,1986; Vaccaro et al.,2002).

O sucesso ou a falha da artrodese da coluna vertebral depende da combinação entre a estabilidade mecânica fornecida pelo implante metálico num curto período de tempo e a fusão biológica que o enxerto ósseo oferece após um tempo mais longo. A fusão biológica é o resultado da formação de osso novo na área da artrodese(Burchardt,1983). Na ausência de uma fusão biológica desencadeada pelo enxerto, o implante metálico da coluna vertebral pode falhar.

O objetivo de qualquer artrodese da coluna não é recriar a anatomia local original, e sim desfazer a anatomia patológica, tentando recriar um ambiente biomecanicamente favorável. Em muitas circunstâncias isso representa um desvio em termos biológicos e biomecânicos. Na coluna lombar, por exemplo, a fusão posterolateral requer a formação autógena de osso heterotópico entre os processos transversos para formar uma ponte óssea em um ambiente sem as condições de carga fisiológica normal e também prejudicado por uma lesão iatrogênica das partes moles. Em decorrência disso o índice de falhas para a artrodese posterolateral da coluna lombar descrito na literatura está entre 5 e 40%(Depalma et al.,1968; Lehman et al.,1981; Steinmann et al.,1992). Essa alta taxa de falhas na osteogênese entre o leito receptor e o enxerto ósseo deve motivar estudos histológicos que interpretem os fatores biológicos que influenciam a osteogênese.

Ishikawa em 1994 demonstrou em estudo experimental em coelhos que a taxa de consolidação da artrodese foi semelhante, no grupo decorticado e sem instrumentação e no grupo não decorticado mas com instrumentação(Ishikawa et al.,1994). Outros trabalhos também chegaram ao mesmo resultado(Sandhu et al.,1995; Sandhu et al.,1996; David et al.,1999).

Os diferentes materiais que são usados para enxerto na artrodese posterior da coluna vertebral são sempre comparados com o enxerto ósseo autólogo proveniente da crista do ilíaco, porque esse enxerto apresenta propriedades osteoindutoras, osteogênicas e osteocondutoras, sendo considerado o melhor enxerto ósseo(Steinmann et al.,1992). Um tecido osteoindutor é capaz de induzir a neoformação óssea, já o osteogênico é capaz de realizar a neoformação óssea e o osteocondutor é aquele tecido que pode guiar ou conduzir a neoformação óssea(Vital et al.,2003).

Para que ocorra a ossificação deve existir um molde para que a matriz de osso desmineralizado possa ser depositada. Esse molde funciona inicialmente como uma ponte entre superfícies ósseas que irão se unir. Na consolidação da fratura de um osso longo esse molde consiste em fibrina e um interstício de colágeno, que forma o calo ósseo ao redor da fratura(Cheng et al.,2002). A formação dessa ponte óssea também é importante na integração do enxerto ósseo com o seu leito posterior da coluna vertebral, porque ela diminui o movimento entre o leito ósseo e o enxerto. Possibilitando que a neoformação óssea invada o enxerto ósseo(Blatter et al.,2003). Em consequência disso é favorável para a integração do enxerto que essa “massa de neoformação óssea” seja estabelecida no menor tempo possível, colando o enxerto no seu leito receptor(Conti et al.,2006).

A integração do enxerto ósseo na artrodese da coluna vertebral pode ser dividida em etapas, a formação da ponte óssea através do tecido neoformado seria a primeira etapa. A segunda etapa, que dependente exclusivamente do leito receptor do enxerto, seria a invasão do enxerto ósseo pela neoformação vascular. A terceira e quarta etapas seriam a remoção da matriz óssea pré-existente e a substituição dessa matriz por osso neoformado(Toribatake et al.,1998). Para que ocorra essa neoformação óssea três requisitos básicos devem ser alcançados. A célula formadora de tecido ósseo deve ser a mais adequada, com uma boa nutrição e com uma quantidade suficiente de estímulos para a neoformação tecidual(Boden et al.,2004). Essa célula formadora do tecido ósseo pode ser qualquer célula que tenha capacidade de abandonar o seu habitat natural e modificar as suas funções intracelulares para se transformar em um osteoblasto.(Boden et al.,2004)

Uma ferramenta eficiente para se avaliar a qualidade da fusão espinhal é a histologia da secção completa de uma parte da área da artrodese, só que esse método não pode ser usado com frequência em humanos(Boden et al.,1995). Uma grande vantagem do método

histológico para a avaliação da integração do enxerto ósseo na artrodese da coluna vertebral é que ele pode qualificar a interface leito receptor e enxerto ósseo, tornando-o um método bastante objetivo para estudar a integração do enxerto ósseo(Krijnen et al.,2004). O estudo histológico e histomorfométrico da interface leito posterior e enxerto ósseo também permite diferenciar e quantificar os vários mecanismos de osteogênese que podem estar envolvidos na integração do enxerto nessa interface(Xiao et al.,2002).

Alguns fatores biológicos envolvidos na histologia da integração do enxerto ósseo pelo seu leito receptor ainda não estão totalmente esclarecidos(Farey et al.,1989; Li et al.,2007).

A consolidação da artrodese é um evento multifatorial, o que torna difícil o seu estudo através de investigações clínicas(Brodsky et al.,1991). Sendo assim, um modelo animal é uma solução prática para o estudo de um fator isolado na integração do enxerto ósseo na coluna vertebral.

2-Objetivo

O objetivo deste trabalho foi estudar o papel da decorticação dos elementos posteriores da coluna vertebral na integração dos enxertos ósseos autólogos cortical e esponjoso com o seu leito receptor posterior. Para isso, foi realizado o estudo histomorfométrico da interface leito receptor posterior e enxerto ósseo, quantificando os tecidos ósseo, cartilaginoso e fibroso neoformados nessa interface.

3-Revisão bibliográfica

Para que uma artrodese da coluna vertebral seja bem sucedida, uma combinação entre fatores locais e sistêmicos que estimule a formação e a consolidação óssea deve estar presente. Deve haver um adequado suprimento sanguíneo no leito receptor, o afastamento excessivo da musculatura paravertebral e uma dissecação muscular que leve à desvascularização podem limitar a disponibilidade de oxigênio, nutrientes, neovascularização e migração celular para a área de artrodese. Ao mesmo tempo, uma necrose muscular excessiva pode gerar um ambiente propício para a proliferação bacteriana, que vai competir por nutrientes disponíveis e interferir na cascata inflamatória importante para a consolidação da artrodese(Boden et al.,2004). Adicionalmente, comorbidades sistêmicas como o abuso de nicotina e o diabetes, também afetam o crescimento vascular(Dawson et al.,1985).

A instabilidade mecânica com um “strain” excessivo permite a lesão nos vasos sanguíneos neoformados que migram em direção ao enxerto ósseo, ou promove a neoformação fibroblástica.(Vaccaro et al.,2002)

Células osteogênicas são necessárias para uma artrodese eficaz da coluna vertebral. O enxerto autólogo oferece células totipotenciais e osteoblastos que irão iniciar o processo de consolidação da coluna vertebral. O interstício colagenoso do enxerto autólogo e o hematoma adjacente contêm vários fatores osteoindutivos como as proteínas morfogenéticas do osso. Esses fatores estimulam o recrutamento de mais células osteogênicas e também estimulam a neovascularização. Simultaneamente, a hidroxiapatita e o colágeno do enxerto autólogo oferecem um leito osteocondutivo que permite a expansão geográfica da neoformação vascular e das células totipotenciais por todo o leito da artrodese para a neoformação óssea (Boden,2002).

Para ocorrer a osteocondução deve existir um ambiente com uma certa rigidez biomecânica e uma aposição entre enxerto ósseo e leito receptor menor que 1mm. Uma falha entre as duas partes pode interromper a matriz osteocondutiva, inibindo a transferência das citocinas(Ilizarov,1989). Vários fatores vão determinar a viabilidade de nutrientes na matriz extracelular, que são: 1) o estado nutricional do organismo receptor do enxerto ósseo, 2) a distância entre a célula e seu suprimento vascular, 3) a velocidade de difusão nessa matriz extracelular, 4) a interposição de barreiras para a difusão(Kitchel et al.,2005). A nutrição celular não está relacionada apenas com os fatores extracelulares, mas também com propriedades da própria célula como o movimento celular, potencial elétrico da membrana, tamanho dos poros na membrana, a taxa de pinocitose e o fluxo intracelular da célula.

Os osteoblastos não são as únicas células na superfície do enxerto ósseo que podem provocar a neoformação óssea na artrodese vertebral com enxerto autólogo, as células osteogênicas primitivas presentes na medula óssea também são muito importantes para essa neoformação óssea(Burwell,1964). As células retículoendoteliais do endotélio dos sinusóides vasculares têm a capacidade de se transformarem em osteoblastos com grande capacidade de produção de tecido ósseo, essas células migram do interior dos sinusóides vasculares para sofrerem a diferenciação para osteoblastos em decorrência de fatores osteoindutivos liberados quando ocorre a necrose do enxerto ósseo transplantado(Burwell,1985).

Existem células totipotenciais presentes na superfície óssea e no estroma da medula óssea que têm a capacidade de replicação e diferenciação em osteoblastos independentemente dos fatores estimuladores da formação óssea, e outras células totipotenciais que são capazes de se diferenciar em osteoblastos apenas na presença de um estímulo osteoindutor(Vaughan,1981).

A osteogênese para a formação do osso compacto,pode ser explicada pela teoria da indução por contato e pela teoria da seletividade para a agregação celular(Xie et al.,2006). Quando células menos especializadas sofrem um contanto com células mais especializadas, as menos especializadas são induzidas a se diferenciarem e se especializarem. Um bom exemplo disso é o contato das células totipotenciais indiferenciadas com os osteoblastos. Já a teoria da seletividade para a agregação celular, postula que células semelhantes tendem a ficar juntas em decorrência da maior afinidade entre as suas membranas.

A ossificação é usualmente classificada em dois tipos: ossificação intramembranosa (direta) e endocondral (indireta). O exemplo clássico de ossificação intramembranosa ocorre no desenvolvimento embrionário dos ossos da calota craniana, mas pode ocorrer também em vários outros locais e em diferentes situações, quando não existe um molde prévio de tecido cartilaginoso e o osso novo é formado diretamente através de osteoblastos diferenciados. O exemplo clássico de ossificação endocondral ocorre durante o desenvolvimento embrionário dos ossos longos. O molde de cartilagem é formado inicialmente, a matriz de cartilagem é calcificada, invadida por capilares e osso neoformado é depositado na matriz de condrócitos hipertróficos em seguida (Burbidge et al., 1995). Existe uma controvérsia na literatura quanto o destino desses condrócitos hipertróficos na matriz de cartilagem calcificada. Alguns autores acreditam que todas essas células degeneram ou são programados para morrerem (Brighton et al., 1973; Hatori et al., 1995), já outros acreditam que elas podem sobreviver e se transformar em osteoblastos com a influência da vascularização (Holtrop, 1972; Shimomura et al., 1975).

A inclusão de uma matriz óssea desmineralizada no subcutâneo de ratos halogênicos desencadeia fenômenos osteoindutores em cascata que são muito semelhantes aos fenômenos que ocorrem na ossificação endocondral. A proliferação de células mesenquimais ocorre em três dias, essas células diferenciam-se em condroblastos em cinco dias e ocorre a formação de tecido cartilaginoso após sete dias, a invasão vascular e a calcificação da cartilagem ocorrem em nove dias, a formação óssea entre dez e onze dias, a remodelação óssea entre doze e dezoito dias, ao final de vinte dias a matriz óssea está remodelada com osso neoformado e a medula óssea com células hematopoiéticas proliferativas (Reddi, 1983).

A decorticação da coluna vertebral de coelhos facilitou a incorporação do enxerto autólogo do íliaco segundo os achados da análise histológica(Ishikawa et al.,1994). Foi também demonstrado que principalmente quando a artrodese foi realizado com instrumentação a osteogênese na interface leito receptor e enxerto ósseo ocorreu pelo mecanismo de ossificação endocondral(Ishikawa et al.,1994).

A ossificação endocondral predominou antes de três semanas em um modelo experimental para osteogênese por distração em ossos longos de ratos. Após a terceira semana, quando o calo cartilaginoso foi todo substituído por tecido ósseo a ossificação intramembranosa passou a predominar. Um terceiro mecanismo produziu tecido intermediário entre a cartilagem e o osso, que foi chamado de osso condróide. Os condrócitos hipertróficos desse tecido diferenciaram-se em células parecidas com osteoblastos e participaram da ossificação. No tecido ósseo condróide, células das linhagens condroblástica e osteoblástica convivem sem uma clara distinção entre elas, e o seu arranjo colunar sugere que elas originaram-se de uma mesma célula mesenquimal comum.(Yasui et al.,1997).

A formação de tecido ósseo ou cartilaginoso está relacionada com a quantidade de colágeno produzida pela célula. Quando o colágeno é sintetizado em grande quantidade, com uma supressão para a produção de mucopolissacarídeos e mucoproteínas ocorre a formação de tecido ósseo, quando a produção de colágeno é suprimida e ocorre a produção de mucopolissacarídeos e mucoproteínas ocorre a formação de tecido cartilaginoso(Bassett,1972). Em culturas de tecidos os condrócitos podem ser induzidos a produzir grande quantidade de colágeno e algumas vezes assumirem características de osteócitos(Cheng et al.,2002).

Fatores eletromecânicos estão relacionados com a osteogênese na fase inicial e tardia da consolidação da artrodese da coluna vertebral, forças em compressão estimulam a formação de osteoblastos e forças em tensão estimulam a formação de osteoclastos e fibroblastos(Bassett,1972; Vaccaro et al.,2002).

Para usarmos um material osteocondutivo na artrodese da coluna vertebral, é preferível que suas propriedades mecânicas sejam similares às do osso e que ele receba forças em compressão no local onde ele está sendo utilizado. Outros fatores a serem considerados que também determinam o comportamento dos osteoblastos, incluem o tamanho dos poros do material e a interconexão tridimensional desse material. A neoformação óssea acontece sobre a matriz desse material osteocondutivo e se remodela ao longo de linhas de estresse que seguem a lei de Wolff. O osso autólogo promove essa infraestrutura favorável, porque o osso novo é formado por uma substituição contínua(Burchardt,1983).

O enxerto cortical ou cortico-esponjoso autólogo comparado ao enxerto esponjoso apresenta uma morbidade maior no seu procedimento de retirada. Por outro lado, os enxertos corticais ou cortico-esponjosos são capazes de suportar uma carga imediata e também fornecem um suporte estrutural para a coluna vertebral. Esses tipos de enxertos são usados para grandes falhas ósseas da coluna vertebral (0,5 a 25 cm) e quando é desejado um suporte estrutural imediato. O osso cortical pode perder até 33% da sua resistência mecânica durante a sua incorporação e geralmente remodela em um período de 6 a 18 meses, ele apresenta menor área de superfície em que o osso novo pode ser formado, é mais resistente à neoformação e à remodelação vasculares(Boden,2002).

O enxerto autólogo derivado dos processos espinhosos, lâmina, facetas articulares pode ser usado como forma de enxerto para a artrodese lombar. Entretanto esse tipo de enxerto não apresenta o mesmo potencial osteogênico do enxerto autólogo do ilíaco. E muitas vezes ele não é em quantidade suficiente para garantir uma boa fusão da coluna lombar.(Romith et al.,2005)

O enxerto ósseo sofre mudanças degenerativas e proliferativas após o seu transplante, osteoblastos ploriferam na superfície do osso trabeculado esponjoso e na periferia do enxerto. A parte mais externa do enxerto que sobrevive ao transplante ósseo rapidamente invade a parte mais interna que evolui para necrose. Essa invasão é acompanhada por crescimento vascular e por componentes celulares derivados do local onde o enxerto foi colocado(Krijnen et al.,2004).

Em algumas semanas, dessa região de intensa proliferação celular começa a ser formado o osso compacto, que é uma matriz de células mielóides pouco diferenciadas e rodeadas por vasos sangüíneos. Nas próximas semanas o osso compacto é remodelado e substituído por osso lamelar, as células mielóides se diferenciam e começam a participar da hematopoiese. A partir desse momento ou o enxerto se incorpora ao esqueleto, ou forma uma ponte óssea que irá funcionar como uma ossificação heterotópica(Lamghari et al.,2001).

A proporção entre a quantidade de ossificação endocondral ou intramembranosa na artrodese da coluna parece estar relacionada com a concentração de BMP implantada, com o modelo animal utilizado para o experimento, com o local da implantação e a natureza do material osteocondutor utilizado na artrodese(Boden et al.,2002).

Defeitos metafisários, fraturas de ossos longos, fusão intersomática vertebral, fusão interlaminar posterior e a fusão vertebral posterolateral são ecossistemas diferentes para a consolidação óssea; em escala crescente de dificuldade para formação de osso novo(Boden,2002). Por exemplo, um defeito metafisário pode ser resolvido com sucesso com o uso exclusivo de um material osteocondutor. Entretanto, apenas o material osteocondutor em uma fusão posterolateral não é suficiente, ele deve ser usado como um adjuvante ao enxerto ósseo autólogo(Boden,2002).

4_Material e Método

4.1_Material

4.1.1_Animal utilizado

Foram utilizados no estudo 72 ratos Wistar do sexo masculino pesando entre 250g e 350g, fornecidos pelo Biotério Geral da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Os animais do experimento foram avaliados quanto ao estado geral e condições de pele do dorso antes do procedimento cirúrgico.

Após a realização das cirurgias os animais foram mantidos em gaiolas com água e ração padrão “ad libitum” no Biotério Central da Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

4.2_Método

4.2.1_Modelo experimental

A primeira e a segunda vértebras da coluna lombar do rato foram escolhidas devido à facilidade para a sua identificação através da palpação das costelas na transição toracolombar e também em decorrência da facilidade ao acesso para essas vértebras.

Os elementos posteriores da coluna lombar foram expostos bilateralmente e preparados para a aposição do enxerto ósseo.

4.2.2_ Técnica operatória

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal utilizando-se 0,1ml de Ketamina e 0,07ml de Xilazina para cada 100 gramas de peso do animal. O couro, o subcutâneo e a musculatura paravertebral posteriores foram incisados longitudinalmente por planos, expondo as duas primeiras vértebras lombares bilateralmente. Os processos espinhosos dessas vértebras foram seccionados na sua base, divididos ao meio no plano sagital e utilizados como enxerto ósseo. Uma das faces do enxerto ósseo foi constituída de osso cortical e a face oposta de osso esponjoso.

A decorticação dos elementos posteriores da vértebra (lâmina, faceta articular, processo transversos) foi realizada com osteótomo para a remoção do osso cortical. O processo espinhoso foi colocado sobre os elementos vertebrais posteriores, decorticados ou não decorticados, com a sua face de osso esponjoso ou cortical em contato com o leito receptor do enxerto ósseo, dependendo do grupo experimental. A incisão cirúrgica foi fechada por planos com fio absorvível (figuras 1 e 2).

Figura 1_ Figura demonstrando a técnica operatória utilizada no experimento. **A.** Exposição das duas primeiras vértebras lombares. **B.** Mais detalhes das duas primeiras vértebras lombares, demonstrando os elementos posteriores da coluna vertebral- lâminas vertebrais, facetas articulares, processos espinhosos. **C.** Secção dos dois primeiros processos espinhosos na sua base, através de uma tesoura de Allis delicada. **D.** Decorticação dos elementos posteriores com um osteótomo delicado.

Figura 2_ Figura demonstrando a técnica operatória utilizada no experimento. **A.** Secção dos processos espinhosos no plano sagital, separando-os em duas partes. **B.** Parte externa lisa do processo espinhoso, que foi usada como enxerto cortical. **C.** Parte interna rugosa do processo espinhoso, que foi usada como enxerto esponjoso. **D.** Colocação do enxerto esponjoso sobre o leito posterior. **E.** Colocação do enxerto cortical sobre o leito receptor posterior.

4.2.3_Grupo experimental

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais, sendo cada grupo formado por seis animais de acordo com a realização da decorticação dos elementos vertebrais posteriores e a natureza do enxerto ósseo utilizado, cortical ou esponjoso (tabela.1).

Tabela 1 _ Grupos experimentais de acordo com a realização da decorticação e natureza do enxerto ósseo utilizado.

	Elementos posteriores	Enxerto ósseo
Grupo I	decorticado	esponjoso
Grupo II	decorticado	cortical
Grupo III	não decorticado	esponjoso
Grupo IV	não decorticado	cortical

Os quatro grupos experimentais foram sacrificados com 3,6 e 9 semanas de pós-operatório.

4.2.4_Método de avaliação

4.2.4.1_Preparação histológica

Foi realizada a fixação do material com formol a 10% por 48 horas, em seguida esse material foi descalcificado com ácido tricloro acético a 10% por 5 dias com várias trocas.

Após a descalcificação, foi realizada a clivagem do material com a escolha do melhor fragmento, posteriormente foi realizada a desidratação com escala crescente de álcoois de 80% a 100%, seguida por dois banhos de Xilol e dois banhos de parafina.

As peças foram incluídas em parafina e realizados dois cortes histológicos de 5 µm por animal, que foram corados pela Hematoxilina Eosina (HE) e pelo Tricrômico de Masson (T Masson) (figuras 3 e 4).

Figura 3_ Figura demonstrando a preparação das vértebras operadas para a confecção do corte histológico. **A.** Identificação das vértebras operadas com dissecação por planos. **B e C.** Liberação das vértebras operadas das partes moles e ressecção dessas vértebras do restante da coluna. **D.** Região operada após a fixação e a descalcificação, etapa em que a clivagem do material foi efetuada. Notar que as duas vértebras operadas possuem um formato retangular.

Figura 4. Seqüência para a preparação do corte histológico. **A.** Região operada após a fixação e descalcificação. **B.** Clivagem da peça, separando a interface leito receptor posterior e enxerto ósseo do restante da coluna. **C. e D** Preparação da interface para a inclusão em parafina. Notar a seqüência ordenada das clivagens para facilitar a identificação da interface durante o estudo histomorfométrico (setas).

4.2.4.2_Avaliação Histológica e Histomorfométrica

A interface entre o leito receptor e o enxerto ósseo foi o alvo do estudo, tendo sido quantificado o tecido ósseo neoformado, o tecido cartilaginoso e o tecido fibroso por meio do estudo histomorfométrico. Para esse estudo foi utilizado o método manual da contagem do tecido neoformado entre linhas paralelas graduadas, através da microscopia de luz tradicional em um aumento de 100X. (Weibel et al.,1966)

O estudo histomorfométrico foi realizado nos cortes corados pelo Tricrômico de Masson, foi considerada a área total do corte histológico como possuindo a forma retangular em decorrência do formato e das dimensões apresentadas. Os tecidos estudados eram identificados pela sua cor característica e pelas suas diferenças morfológicas. O tecido ósseo antigo apresentava cor vermelha escura, o tecido cartilaginoso cor azul clara, o tecido fibroso cor azul escura e o tecido ósseo neoformado cor azul intermediária entre o azul claro do tecido cartilaginoso e o azul escuro do tecido fibroso.

Com uma régua em escala decimal acoplada a objetiva do microscópio foi calculada a área total do corte histológico e a área dos tecidos ósseo, cartilaginoso e fibroso neoformados. A área dos três tecidos neoformados foi expressa em porcentagem com relação à área total do corte histológico. Procurou-se efetuar a varredura de todo o corte histológico, realizando-se 25 mensurações em cada corte histológico (figura 5).

A escolha das dos cortes histológicos para a avaliação histomorfométrica foi realizada de forma aleatória por sorteio. Todos os cortes foram identificados por um número e o examinador não sabia a natureza da cirurgia realizada no animal durante a avaliação histomorfométrica.

Figura 5. Fotomicrografia de um campo visual ilustrando a régua em escala decimal acoplada à objetiva do microscópio, que foi utilizada para calcular a área dos tecidos neoformados na interface leito receptor posterior e enxerto ósseo (T Masson,100X).

4.2.5_Análise estatística

A análise estatística para a comparação da quantidade dos tecidos neoformados na interface utilizou o teste de Kurtosis para a avaliação da normalidade da amostra.

Posteriormente foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para a comparação estatística envolvendo mais de duas variáveis. Após esse primeiro teste, sendo constatada a diferença estatística entre as variáveis o teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar duas variáveis entre si. Foi adotado nível de significância de 5%.

5_ Resultados

5.1_ Considerações gerais

A anestesia intraperitoneal e o procedimento cirúrgico foram bem tolerados pelos animais. O procedimento cirúrgico teve a média de 30 minutos de duração nos grupos em que a decorticação dos elementos posteriores não foi realizada e a média de 40 minutos nos grupos em que os elementos posteriores foram decorticados. A impressão durante o ato cirúrgico foi de que os grupos decorticados apresentaram uma maior perda sangüínea em comparação com os não decorticados. A recuperação de todos os animais ocorreu de forma semelhante e por volta de uma hora após o fechamento da ferida os animais estavam andando sem dificuldades nas gaiolas.

5.2_ Avaliação Histomorfométrica

Animais sacrificados na terceira semana de pós-operatório

A média da porcentagem de osso neoformado no grupo decorticado com a utilização do enxerto esponjoso foi de $40,87\% \pm 5,24$, no grupo decorticado mais enxerto cortical de $39,13\% \pm 7,27$, no grupo não decorticado mais enxerto esponjoso de $6,13\% \pm 2,13$ e no grupo não decorticado mais enxerto cortical de $9,27\% \pm 4,06$. Foi observada diferença estatística entre os valores dos grupos analisados ($p=0,0005$, Kruskal-Wallis). A diferença estatística entre os grupos experimentais esteve relacionada à decorticação ($p=0,0022$,

Mann-Whitney), sendo que não foi observada diferença estatística entre os grupos experimentais considerando-se o tipo de enxerto utilizado ($p=0,9372$).

A média da porcentagem de cartilagem neoformada no grupo decorticado mais enxerto esponjoso foi de $8,36\% \pm 1,08$, no grupo decorticado mais enxerto cortical de $7,46\% \pm 0,85$, no grupo não decorticado mais enxerto esponjoso de $11,10\% \pm 6,026$ e no grupo não decorticado mais enxerto cortical de $9,133\% \pm 3,84$. Não foi observada diferença estatística entre os valores dos grupos analisados ($p=0,6544$).

A média da porcentagem de tecido fibroso neoformado no grupo decorticado mais enxerto esponjoso foi de $11\% \pm 3,97$, no grupo decorticado mais enxerto cortical de $6,13\% \pm 1,78$, no grupo não decorticado mais enxerto esponjoso de $26,27\% \pm 7,25$ e no grupo não decorticado mais enxerto cortical de $21,87\% \pm 12,7$. Foi observada diferença estatística entre os valores dos grupos analisados ($p=0,0008$). A diferença estatística entre os grupos experimentais esteve relacionada à decorticação, nas comparações entre os grupos I, II e grupo III ($p=0,0022$); entre I e IV ($p=0,0152$); entre II e IV ($p=0,0043$); e não esteve relacionada ao tipo de enxerto utilizado, entre I e II e entre III e IV ($p=0,2403$) (tabela 2 e figura 6).

Tabela 2_ Valores em porcentagem(%) dos tecidos neoformados de todos os animais sacrificados com três semanas de pós-operatório, subdivididos de acordo com a preparação do leito posterior e com o tipo de enxerto ósseo utilizado.

	decorticado esponjoso			decorticado cortical			n decorticado esponjoso			n decorticado cortical		
	osso novo	cartilagem	fibrose	osso novo	cartilagem	fibrose	osso novo	cartilagem	fibrose	osso novo	cartilagem	fibrose
	35,2	10	16,4	42,4	8	7,6	5,2	5,6	35,2	8,8	9,6	16
	41,2	9,2	14,4	49,2	7,6	7,6	6	11,6	25,2	8,4	15,6	16
	43,2	8	8,4	41,6	5,6	6	3,6	3,6	27,2	4,4	10	9,2
	44,4	7,2	11,6	28,4	8,4	6	5,6	15,8	13,6	8,8	5,2	19,6
	34	9,4	9,6	39,6	8	6,8	10	10,4	25,6	16,8	5,2	45,6
	47,2	6,4	5,6	33,6	7,2	2,8	6,4	19,6	30,8	8,4	9,2	24,8
média	40,87	8,367	11	39,13	7,467	6,133	6,133	11,1	26,27	9,267	9,133	21,87
d padrão	5,242	1,4	3,974	7,268	1,001	1,783	2,127	6,026	7,256	4,059	3,84	12,7

Figura 6_ gráfico ilustrando a média da porcentagem de neoformação tecidual nos animais sacrificados com três semanas de pós-operatório. * representa diferença estatística.

Animais sacrificados na sexta semana de pós-operatório

A média da porcentagem de osso neoformado no grupo decorticado mais enxerto esponjoso foi de $38,53\% \pm 14,13$, no grupo decorticado mais enxerto cortical de $40,40\% \pm 13,90$, no grupo não decorticado mais enxerto esponjoso de $10,27\% \pm 5,17$, no grupo não decorticado mais enxerto cortical de $7,6\% \pm 3,53$. Foi observada diferença estatística entre os valores dos grupos analisados ($p=0,0005$), a diferença estatística entre os grupos experimentais esteve relacionada à decorticação ($p=0,0022$) e não ao tipo de enxerto utilizado, entre os grupos I e II ($p=0,4848$), entre os grupos III e IV ($p=0,3939$).

A média da porcentagem de cartilagem neoformada no grupo decorticado mais enxerto esponjoso foi de $6,6\% \pm 3,46$, no grupo decorticado mais enxerto cortical de $8,07\% \pm 1,74$, no grupo não decorticado mais enxerto esponjoso de $7,47\% \pm 3,27$, no grupo não decorticado mais enxerto cortical de $6,13\% \pm 2,08$. Não foi observada diferença estatística entre os valores dos grupos analisados ($p=0,4889$).

A média da porcentagem de tecido fibroso neoformado no grupo decorticado mais enxerto esponjoso foi de $7,67\% \pm 5,12$, no grupo decorticado mais enxerto cortical foi de $7,1\% \pm 3,16$, no grupo não decorticado mais enxerto esponjoso foi de $9,8\% \pm 7,54$ e no grupo não decorticado mais enxerto cortical de $10,4\% \pm 5,59$. Não foi observada diferença estatística entre os valores dos grupos analisados ($p=0,7880$) (tabela 3, figura 7).

Tabela 3_ Valores em porcentagem(%) dos tecidos neoformados de todos os animais sacrificados com seis semanas de pós-operatório, subdivididos de acordo com a preparação do leito posterior e com o tipo de enxerto ósseo utilizado.

	decorticado esponjoso			decorticado cortical			n decorticado esponjoso			n decorticado cortical		
	osso novo	cartilagem	fibrose	osso novo	cartilagem	fibrose	osso novo	cartilagem	fibrose	osso novo	cartilagem	fibrose
	46,4	4,4	11,6	40,8	8,8	10,6	14,8	8,4	7,2	4	4,8	13,6
	30	9,2	14,4	36	6	6	15,2	4	24	8,4	5,6	14,8
	60,8	4	2,8	64	10,8	3,2	6,8	13,2	12,4	7,6	5,2	15,2
	25,6	12,4	1,6	44,8	7,2	4	5,6	6	5,6	3,6	7,6	7,2
	24,4	5,6	10	34,8	6,8	8,6	4,4	5,2	5,6	8,8	4	5,6
	44	4	5,6	22	8,8	10,2	14,8	8	4	13,2	9,6	6
média	38,53	6,6	7,667	40,4	8,067	7,1	10,27	7,467	9,8	7,6	6,133	10,4
d padrão	14,33	3,457	5,119	13,9	1,742	3,167	5,17	3,266	7,538	3,533	2,081	4,589

Figura 7_Gráfico ilustrando a média da porcentagem de neoformação tecidual nos animais sacrificados com seis semanas de pós-operatório. * representa diferença estatística.

Animais sacrificados na nona semana de pós-operatório

A média da porcentagem de osso neoformado no grupo decorticado mais enxerto esponjoso foi de $29,53\% \pm 3,473$, no grupo decorticado mais enxerto cortical de $30,6\% \pm 10,48$, no grupo não decorticado mais enxerto esponjoso de $16,4\% \pm 6,072$ e no grupo não decorticado mais enxerto cortical de $18,73\% \pm 5,727$. Foi observada diferença estatística entre os valores dos grupos analisados ($p = 0.0026$). A diferença estatística entre os valores dos grupos analisados esteve relacionada à decorticação, entre os grupos I e III ($p = 0.0022$), entre I e IV ($p = 0.0087$), entre II e III ($p = 0.0087$), entre II e IV ($p = 0.0152$), e não esteve relacionada ao tipo de enxerto utilizado, entre I e II ($p = 0.6991$), entre III e IV ($p = 0.5887$).

A média da porcentagem de cartilagem neoformada no grupo decorticado mais enxerto esponjoso foi de $3,133\% \pm 1,33$, no grupo decorticado mais enxerto cortical de

4,067%±1,686, no grupo não decortificado mais enxerto esponjoso de 10,53%±4,751 e no grupo não decortificado mais enxerto cortical de 12,07%±2,753. Foi observada diferença estatística entre os valores dos grupos analisados ($p= 0.0006$). A diferença ocorreu em decorrência da decorticação dos elementos posteriores ($p= 0,0022$) e não com relação ao tipo de enxerto utilizado entre I e II ($p= 0,5887$), entre III e IV ($p= 0,2403$).

A média da porcentagem de tecido fibroso neoformado no grupo decortificado mais enxerto esponjoso foi de 3,733%±1,672, no grupo decortificado mais enxerto cortical de 4,4%±1,339, no grupo não decortificado mais enxerto esponjoso de 6,67%±2,767 e no grupo não decortificado mais enxerto cortical de 6,8%±2,492. Foi observada diferença estatística entre os valores dos grupos analisados ($p= 0,0214$). A diferença ocorreu em decorrência da decorticação dos elementos posteriores, entre o grupo I e os grupos III e IV ($p= 0,0260$), entre o grupo II e os grupos III e IV ($p= 0.0411$) e não com relação ao tipo de enxerto utilizado, entre o grupo I e II ($p= 0.4848$), entre III e IV ($p= 0.9372$) (tabela 4 figura 8).

Tabela 4_ Valores em porcentagem(%) dos tecidos neoformados de todos os animais sacrificados com nove semanas de pós-operatório, subdivididos de acordo com a preparação do leito posterior e com o tipo de enxerto ósseo utilizado.

	decortificado esponjoso			decortificado cortical			n decortificado esponjoso			n decortificado cortical		
	osso novo	cartilagem	fibrose	osso novo	cartilagem	fibrose	osso novo	cartilagem	fibrose	osso novo	cartilagem	fibrose
	23,2	1,2	5,2	48,8	4	2,4	22,4	7,2	6,8	18	14,8	6,8
	32,8	4,8	2,4	19,6	7,2	6	8	20	6	24	12,8	10
	29,2	3,6	3,2	24,4	3,2	3,6	10,4	9,2	10,4	18,4	7,2	8
	28,8	3,6	4	36,4	2,4	4,8	22	7,6	2,4	8,8	12	6,8
	31,2	3,6	1,6	26,4	4,4	4	19,6	9,6	5,6	24,8	11,2	6,8
	32	2	6	28	3,2	5,6	16	9,6	8,8	18,4	14,4	2,4
média	29,53	3,133	3,733	30,6	4,067	4,4	16,4	10,53	6,667	18,73	12,07	6,8
d padrão	3,473	1,3	1,672	10,48	1,686	1,339	6,072	4,751	2,767	5,727	2,753	2,492

Figura 8_ Gráfico ilustrando a média da porcentagem de neoformação tecidual nos animais sacrificados com nove semanas de pós-operatório. * representa diferença estatística.

No grupo decorticado mais enxerto esponjoso a média da porcentagem de osso neoformado foi de $40,87\% \pm 5,242$ nos animais sacrificados com três semanas, naqueles sacrificados com seis e nove semanas foi de $38,53\% \pm 14,33$ e $29,53\% \pm 3,473$, respectivamente. Não foi observada diferença estatística na comparação entre os valores encontrados nos três diferentes tempos ($p=0,0644$) (figura 9).

Figura 9_ Gráfico ilustrando a média da porcentagem de osso neoformado no grupo decorticado mais enxerto esponjoso com 3,6,9 semanas.

No grupo decorticado mais enxerto cortical a média da porcentagem de osso neoformado foi de $39,13\% \pm 7,27$ nos animais sacrificados com três semanas, naqueles sacrificados com seis e nove semanas foi de $40,4\% \pm 13,9$ e $30,6\% \pm 10,48$, respectivamente. Não foi observada diferença estatística na comparação entre os valores encontrados nos três diferentes tempos analisados ($p=0,2497$) (figura 10).

Figura 10_ Gráfico ilustrando a média da porcentagem de osso neoformado no grupo decorticado mais enxerto cortical com 3,6,9 semanas.

No grupo não decorticado mais enxerto esponjoso a média da porcentagem de osso neoformado foi de $6,13\% \pm 2,13$ nos animais sacrificados com três semanas, naqueles sacrificados com seis e nove semanas foi de $10,27\% \pm 5,17$ e $16,4 \pm 6,072$, respectivamente. Foi observada diferença estatística na comparação entre os valores dos três tempos analisados ($p=0,0122$). Na comparação entre 3 e 9 semanas ocorreu diferença estatística ($p=0,0043$) e não ocorreu na comparação entre 3 e 6 semanas ($p=0,1797$) e entre 6e9 ($p=0,0649$) (figura 11).

Figura 11_ Gráfico ilustrando a média da porcentagem de osso neoformado no grupo não decorticado mais enxerto esponjoso com 3,6,9 semanas. * significa diferença estatística entre os dois tempos ($p=0,0043$).

No grupo não decorticado mais enxerto cortical a média da porcentagem de osso neoformado foi de $9,27\% \pm 4,06$ nos animais sacrificados com três semanas, naqueles sacrificados com seis e nove semanas foi de $7,6\% \pm 3,53$ e $18,73\% \pm 5,727$, respectivamente. Foi observada diferença estatística na comparação entre os valores encontrados nos três diferentes tempos analisados ($p=0,0072$). Na comparação entre 3 e 9 semanas ocorreu diferença estatística ($p=0,0087$), entre 6 e 9 semanas também ($p=0,0043$), não ocorrendo diferença entre 3 e 6 semanas ($p=0,3939$) (figura 12).

Figura 12_Gráfico ilustrando a média da porcentagem de osso neoformado no grupo não decorticado mais enxerto cortical com 3,6,9 semanas. *,** significam diferenças estatísticas entre os tempos, *($p=0,0087$), **($p=0,0043$).

A média da porcentagem de cartilagem neoformada no grupo decorticado mais enxerto esponjoso nos animais sacrificados com 3 semanas foi de $8,367\% \pm 1,4$, naqueles sacrificados com 6 e 9 semanas foi de $6,6\% \pm 3,457$ e de $3,133\% \pm 1,33$, respectivamente. Foi observada diferença estatística na comparação entre os valores encontrados nos três diferentes tempos analisados ($p=0,0081$). Ocorreu diferença na comparação entre 3 e 9 semanas ($p=0,0043$), entre 6 e 9 semanas ($p=0,0152$), não ocorreu diferença entre 3 e 6 semanas ($p=0,3939$) (figura 13).

Figura 13 Gráfico ilustrando a média da porcentagem de cartilagem neoformada no grupo decorticado mais enxerto esponjoso nos três diferentes tempos analisados, *,** significam diferenças estatísticas entre os tempos. * ($p=0,0043$), ** ($p=0,0152$).

A média da porcentagem de cartilagem neoformada no grupo decorticado mais enxerto cortical nos animais sacrificados com 3 semanas foi de $7,467\% \pm 1,001$, naqueles sacrificados com 6 e 9 semanas foi de $8,067\% \pm 1,742$ e $4,067\% \pm 1,686$, respectivamente. Foi observada diferença estatística na comparação entre os valores encontrados nos três diferentes tempos analisados ($p=0,00334$). Ocorreu diferença na comparação entre 6 e 9 semanas ($p=0,0087$), não ocorreu diferença entre 3 e 6 semanas ($p=0,8182$) e entre 3 e 9 semanas ($p=0,0649$) (figura 14).

Figura 14_Gráfico ilustrando a média da porcentagem de cartilagem neoformada no grupo decorticado mais enxerto cortical nos três diferentes tempos analisados. *significa diferença estatística entre os dois tempos ($p=0,0087$).

A média da porcentagem de cartilagem neoformada no grupo não decorticado mais enxerto esponjoso nos animais sacrificados com 3 semanas foi de $11,1\% \pm 6,026$, naqueles sacrificados com 6 e 9 semanas foi de $7,467\% \pm 3,266$ e $10,53\% \pm 4,751$, respectivamente. Não foi observada diferença estatística na comparação entre os valores encontrados nos três diferentes tempos analisados ($p=0.4332$) (figura 15).

Figura 15 Gráfico ilustrando a média da porcentagem de cartilagem neoformada no grupo não decorticado mais enxerto esponjoso nos três diferentes tempos analisados.

A média da porcentagem de cartilagem neoformada no grupo não decorticado mais enxerto cortical nos animais sacrificados com 3 semanas foi de $9,133\% \pm 3,84$, naqueles sacrificados com 6 e 9 semanas foi de $6,133\% \pm 2,081$ e $12,07\% \pm 2,753$, respectivamente. Foi observada diferença estatística na comparação entre os valores encontrados nos três diferentes tempos analisados ($p=0,0235$). Ocorreu diferença na comparação entre 6 e 9 semanas ($p=0,0087$), não ocorreu diferença na comparação entre 3 e 6 semanas ($p=0,1320$) e entre 3 e 9 semanas ($p=0,1797$) (figura 16)

Figura 16_Gráfico ilustrando a média da porcentagem de cartilagem neoformada no grupo não decorticado mais enxerto cortical nos três diferentes tempos analisados.* significa diferença estatística entre os dois tempos analisados ($p=0,0087$).

A média da porcentagem de tecido fibroso neoformado no grupo decorticado mais enxerto esponjoso nos animais sacrificados com 3 semanas foi de $11\% \pm 3,974$, naqueles sacrificados com 6 e 9 semanas foi de $7,667\% \pm 5,119$ e $3,733\% \pm 1,672$, respectivamente. Foi observada diferença estatística entre os valores encontrados nos três diferentes tempos analisados ($p=0,0236$). Ocorreu diferença na comparação entre 3 e 9 semanas ($p=0,0043$), não ocorreu diferença na comparação entre 3 e 6 semanas ($p=0,3939$) e entre 6 e 9 semanas ($p=0,0649$) (figura 17)

Figura 17_Gráfico ilustrando a média da porcentagem de tecido fibroso neoformado no grupo decorticado mais enxerto esponjoso nos três diferentes tempos analisados. * representa diferença estatística entre os dois tempos ($p=0,0043$).

A média da porcentagem de tecido fibroso neoformado no grupo decorticado mais enxerto cortical nos animais sacrificados com 3 semanas foi de $6,133\% \pm 1,783$, naqueles sacrificados com 6 e 9 semanas foi de $7,1\% \pm 3,167$ e $4,4\% \pm 1,339$, respectivamente. Foi observada diferença estatística entre os valores encontrados nos três diferentes tempos analisados ($p=0,0063$). Ocorreu diferença na comparação entre 3 e 9 semanas ($p=0,0022$) e entre 6 e 9 semanas ($p=0,0087$), não ocorreu diferença na comparação entre 3 e 6 semanas ($p=0,4848$) (figura 18).

Figura 18_Gráfico ilustrando a média da porcentagem de tecido fibroso neoformado no grupo decorticado mais enxerto cortical nos três diferentes tempos analisados. * e ** representam diferenças estatísticas entre os tempos analisados. * ($p=0,0022$) e ** ($p=0,0087$).

A média da porcentagem de tecido fibroso neoformado no grupo não decorticado mais enxerto esponjoso nos animais sacrificados com 3 semanas foi de $26,27\% \pm 7,256$, naqueles sacrificados com 6 e 9 semanas foi de $9,8\% \pm 7,538$ e $6,667\% \pm 2,767$, respectivamente. Foi observada diferença estatística entre os valores encontrados nos três diferentes tempos analisados ($p=0,0045$). Ocorreu diferença na comparação entre 3 e 6 semanas ($p=0,0043$), entre 3 e 9 semanas ($p=0,0022$) e não ocorreu diferença na comparação entre 6 e 9 semanas ($p=0,9372$) (figura 19).

Figura 19_Gráfico ilustrando a média da porcentagem de tecido fibroso neoformado no grupo não decorticado mais enxerto esponjoso nos três diferentes tempos analisados. * e ** representam diferenças estatísticas entre os tempos analisados. * ($p=0,0043$) e ** ($p=0,0022$).

A média da porcentagem de tecido fibroso neoformado no grupo não decorticado mais enxerto cortical nos animais sacrificados com 3 semanas foi de $21,87\% \pm 12,7$, naqueles sacrificados com 6 e 9 semanas foi de $10,4\% \pm 4,589$ e $6,8\% \pm 2,492$, respectivamente. Foi observada diferença estatística entre os valores encontrados nos três diferentes tempos analisados ($p=0,0082$). Ocorreu diferença na comparação entre 3 e 6 semanas ($p=0,0152$), entre 3 e 9 semanas ($p=0,0043$) e não ocorreu diferença na comparação entre 6 e 9 semanas ($p=0,3939$) (figura 20).

Figura 20_ Média da porcentagem de tecido fibroso neoformado no grupo não decorticado mais enxerto cortical nos três diferentes tempos analisados. * e ** representam diferenças estatísticas entre os tempos analisados. * ($p=0,0152$) e ** ($p=0,0043$).

5.3_Avaliação Histológica

No grupo decorticado mais enxerto esponjoso e no grupo decorticado mais enxerto cortical a osteogênese na interface entre o leito receptor e o seu enxerto ósseo ocorreu pelo mecanismo de ossificação intramembranosa e endocondral, com um predomínio da ossificação intramembranosa nos grupos sacrificados com 3, 6, e 9 semanas de pós-operatório (figura 21,22,23,24).

Figura 21. Fotomicrografia de animal com o leito receptor decorticado e enxerto ósseo cortical sacrificado com três semanas de pós-operatório. Notar a grande formação de osso compacto com osteoblastos fusiformes com uma conformação desordenada e a ausência de tecido cartilaginoso. O osso compacto visto na interface foi formado por uma ossificação predominantemente intramembranosa.(HE, 100X).

Figura 22. **A** Fotomicrografia de animal com o leito receptor decorticado e enxerto esponjoso sacrificado com 6 semanas de pós-operatório, notar a completa integração do enxerto ósseo (parte superior da figura) pelo leito receptor e também a grande quantidade de osso neoformado corado em azul na interface. A seta está destacando uma área em estágio de remodelação óssea, onde o osso compacto neoformado está se transformando em osso trabecular mais antigo. (T Masson,40X). **B.** Fotomicrografia em maior aumento, notar a grande neoformação óssea corada em azul com a ausência de tecido cartilagenoso, característico do modelo de ossificação intramembranosa. (T Masson,100X).

Figura 23 **A.** Fotomicrografia de animal com o leito receptor decorticado e enxerto esponjoso sacrificado com 6 semanas de pós-operatório. Notar a exuberante neoformação óssea (azul) por ossificação intramembranosa predominantemente e a completa integração do enxerto ósseo (parte superior da figura). (T Masson,25X). **B.** Fotomicrografia do mesmo animal em maior aumento, a seta está indicando uma área de remodelação óssea. Notar a organização do osso compacto em osso trabecular, com a formação de trabéculas ósseas mais espessadas e de coloração arroxeada. (T Masson,40X). **C.** Fotomicrografia do mesmo animal em maior aumento evidenciando osso compacto neoformado pelo mecanismo de ossificação intramembranosa. Notar a grande quantidade de vasos sanguíneos entre os osteoblastos do osso compacto. (T Masson,100X).

Figura 24 A. Fotomicrografia de animal com o leito receptor decorticado e enxerto ósseo cortical, sacrificado com 9 semanas de pós-operatório. A ossificação na interface foi predominantemente intramembranosa, notar grandes áreas de remodelação óssea. (T Masson, 45X). **B** Fotomicrografia do mesmo animal em maior aumento, notar as características morfológicas do corte histológico que se repetiram em todos animais decorticados, ou seja, grande quantidade de osso compacto formado diretamente, sem um molde cartilaginoso prévio. (T Masson, 100X).

No grupo não decorticado mais enxerto esponjoso e no grupo não decorticado mais enxerto cortical a osteogênese na interface entre o leito receptor e o seu enxerto ósseo ocorreu predominantemente pelo mecanismo de ossificação endocondral nos grupos sacrificados com 3,6 e 9 semanas de pós-operatório (figura 25,26,27,28).

Figura 25: Fotomicrografia de animal do grupo não decorticado mais enxerto esponjoso sacrificado com 3 semanas de pós-operatório. Notar a ausência de contato direto entre o enxerto ósseo e o leito receptor, a formação do broto de ossificação endocondral em contato com o leito receptor (seta), a neoformação de osso compacto em pequena quantidade ao redor da matriz de tecido cartilaginoso e a neoformação de tecido fibroso ao longo de toda a interface. (HE, 100X).

Figura 26 Fotomicrografia de animal do grupo não decorticado mais enxerto esponjoso sacrificado com 3 semanas de pós-operatório. Notar o pouco contato entre o leito receptor e o enxerto na interface, a presença de tecido fibroso nas extremidades do enxerto ósseo e do leito receptor, a formação do molde de tecido cartilaginoso em contato com o leito receptor (seta) e a pequena quantidade de osso compacto neoformado crescendo em direção ao enxerto ósseo. (T Masson, 40X).

Figura 27 A. Fotomicrografia do animal do grupo não decorticado mais enxerto cortical sacrificado com 6 semanas de pós-operatório, notar a ocorrência de ossificação endocondral. (T Masson, 40X). **B** Fotomicrografia do mesmo animal em maior aumento, notar a formação de osso novo compacto pelo modelo de ossificação endocondral. (T Masson, 100X).

Figura 28 **A** Fotomicrografia de animal sacrificado com 9 semanas de pós-operatório, notar que com essa evolução pós-operatória passou a existir um melhor contato entre o enxerto e o seu leito receptor. (T Masson, 40X). **B.**Fotomicrografia do mesmo animal em maior aumento, notar o modelo de ossificação endocondral e a remodelação do tecido ósseo neoformado na região em contato com o enxerto ósseo, parte superior da figura.(T Masson, 100X).

A integração do enxerto ósseo foi mais rápida nos grupos com os leitos receptores decorticados em comparação com os grupos sem a decorticação do leito receptor (figura 29).

Figura 29 **A** Fotomicrografia de animal não decorticado mais enxerto esponjoso sacrificado com 3 semanas de pós operatório. O leito receptor que está aqui representado na parte inferior da figura apresenta pouca integração com o enxerto ósseo, a interface apresenta uma pequena quantidade de tecido ósseo e cartilaginoso neoformados, com uma grande quantidade de tecido fibroso. (T Masson, 40X). **B** Fotomicrografia de animal decorticado mais enxerto cortical sacrificado com 3 semanas de pós-operatório. O leito receptor que também está representado na parte inferior da figura apresenta uma boa integração com o enxerto ósseo, a interface apresenta uma grande quantidade de tecido ósseo neoformado que preenche todos os espaços entre o leito receptor e o enxerto ósseo. (T Masson, 40X).

6_Discussão

A integração do enxerto ósseo na artrodese vertebral está relacionada a fatores locais e sistêmicos e o leito receptor atua como importante fator local para a integração do enxerto(Boden et al.,2004).

A decorticação do leito receptor acelera a integração óssea(Conti et al.,2006). Os fatores biológicos envolvidos nesse fenômeno ainda não são totalmente conhecidos(Vaccaro et al.,2002), tendo sido esse o motivo para a elaboração deste modelo experimental, em que se utilizou um animal de pequeno porte como o rato para quantificar o fenômeno da osteogênese entre o leito receptor decorticado ou não decorticado e o enxerto ósseo.

O tempo de integração do enxerto ósseo é variável nas diferentes espécies, entre 2 e 3 semanas em ratos, 3 a 4 semanas em coelhos e alguns meses em humanos e primatas (Boden et al.,1995; Boden et al.,1996), com base nessa informação o primeiro tempo de sacrifício dos animais na terceira semana foi selecionado e dois tempos mais longos também foram escolhidos para avaliar o processo de osteogênese numa fase mais tardia, em que está acontecendo o processo de remodelação óssea.

O método histomorfométrico que utiliza uma régua acoplada à objetiva do microscópio e a área total de uma figura geométrica plana permite quantificar de forma satisfatória os diferentes tecidos formados no processo de osteogênese, sendo um método de fácil utilização e baixo custo(Li et al.,2007). Esse método tem sido utilizado por outros pesquisadores para avaliar o leito da artrodese posterior da coluna vertebral, que o consideram mais sensível que exames de imagem(Lamghari et al.,2001; Boden et al.,2004). Ele é mais sensível que os exames de imagem porque a histomorfometria pode quantificar e

qualificar a neoformação tecidual na interface leito receptor e enxerto ósseo. As diferenças nas quantidades dos tecidos ósseo, cartilaginoso e fibroso na interface irão influenciar a velocidade e a qualidade de integração do enxerto ósseo(Foster et al.,2002).

O enxerto ósseo esponjoso é mais vantajoso em relação ao enxerto cortical para a integração óssea mais rápida na interface entre o leito receptor e o seu enxerto ósseo na artrodese posterior da coluna lombar. Porque ele apresenta maior quantidade de células osteoprogenitoras viáveis, além de possuir uma maior área de contato com o leito receptor(Vaccaro et al.,2002). No presente trabalho o tipo de enxerto não interferiu na neoformação dos tecidos ósseo, cartilaginoso e fibroso na interface leito receptor e enxerto ósseo em nenhum dos quatro grupos experimentais na 3^a,6^a e 9^a semanas de pós-operatório e conseqüentemente não interferindo na integração do enxerto ósseo. O único fator que interferiu na neoformação desses três diferentes tecidos na interface leito receptor enxerto ósseo em todos os quatro grupos experimentais na 3^a,6^a e 9^a semanas foi a decorticação dos elementos posteriores. Esse procedimento interferiu de forma clara, estimulando exuberantemente a neoformação tecidual e provavelmente essa interferência se sobrepôs ao efeito do enxerto ósseo sobre a neoformação tecidual.

A capacidade de indução e aceleração da formação óssea nas áreas decorticadas tem sido experimentalmente observada(Foster et al.,2002; Conti et al.,2006). Estudos histológicos com marcadores da neoformação vascular indicam que o suprimento vascular inicial para a massa da artrodese origina-se dos processos transversos decorticados e não dos tecidos moles adjacentes(Cunningham et al.,2002). Essa seria a explicação para a maior neoformação óssea no grupo de animais decorticados. A profusão de nutrientes proporcionados pela irrigação sangüínea mais abundante representa um fator importante de estímulo à osteogênese(Romith et al.,2005). Além disso, a decorticação dos elementos

posteriores coloca o enxerto ósseo em contato direto com células do sistema retículo endotelial e com fatores osteoindutores e osteogênicos presentes na corrente sanguínea(Cunningham et al.,2002). Esses dados da literatura reforçam os achados da maior neoformação óssea nos grupos decorticados do presente estudo.

O enxerto ósseo sofre um processo de necrose e reabsorção, as células do sistema retículo endotelial são atraídas e quando em contato com esse ambiente, têm a capacidade de se transformarem em células progenitoras da linhagem osteoblástica(Burwell,1964). O contato das células retículo endoteliais com a interface leito receptor enxerto ocorreu de forma mais rápida no grupo de animais decorticados do presente estudo, sendo que a transformação dessas células retículo endoteliais em osteoblastos também poderia explicar a maior formação de osso novo no grupo de animais decorticados. O contato direto do enxerto ósseo com a área cruenta permitiria maior abundância dos fatores indutores e osteogênicos, como as proteínas morfogênicas do osso na interface leito posterior e enxerto do presente estudo. Esses fatores estimulam o recrutamento de mais células osteogênicas e também estimulam a neovascularização(Boden,2002).

O estudo mais detalhado da interface entre o enxerto ósseo e o leito receptor permitiu a observação e a quantificação dos diferentes tecidos neoformados. A maior quantidade de tecido ósseo neoformado, com uma menor quantidade de tecido cartilaginoso e fibroso na interface nos grupos decorticados seria mais vantajosa para a integração do enxerto ósseo, porque a ponte óssea se forma mais rapidamente, garantindo maior resistência para a integração do enxerto ósseo. Essa constatação também foi encontrada por outro autor em um modelo experimental para artrodese intertransversa em carneiros(Foster et al.,2002).

A quantidade de tecido ósseo neoformado apresentou diferença estatística nos grupos experimentais com 3,6 e 9 semanas e a quantidade de tecido fibroso com 3 e 9 semanas, mostrando a interferência da decorticação sobre a integração do enxerto ósseo. Não somente a quantidade dos tecidos neoformados, mas também o processo de osteogênese da integração do enxerto ósseo foi modificado pela decorticação.

A osteogênese na interface não foi semelhante entre os animais decorticados e não decorticados. No grupo de animais decorticados ocorreu osteogênese pelo mecanismo de ossificação intramembranosa e endocondral, com predomínio da ossificação intramembranosa. Essa ossificação leva a uma neoformação óssea mais exuberante e mais rápida (Cunningham et al., 2002). No grupo não decorticado a ossificação endocondral foi predominante com uma neoformação óssea mais lenta. Essa provavelmente deve ser a explicação para a diferença estatística na quantidade de tecido cartilaginoso entre os grupos decorticados e não decorticados sacrificados com 9 semanas de pós-operatório, e também para o aumento da formação óssea no decorrer das 9 semanas nos grupos não decorticados. A osteogênese da interface com 9 semanas de pós-operatório nos animais decorticados estava num estágio mais maduro de remodelação óssea, nos animais não decorticados a osteogênese estava atrasada e ainda num estágio de formação óssea para a integração do enxerto.

A maior abundância de oxigênio na interface decortificada poderia induzir a ossificação de origem intramembranosa. Em condições de baixa concentração de oxigênio há tendência para o modelo de ossificação endocondral (Kusec et al., 2003). No presente trabalho a decorticação proporcionou o aumento do aporte de oxigênio para a interface, induzindo a ossificação intramembranosa. O maior aporte de proteínas morfogênicas do osso para a interface seria outro possível estímulo para a ocorrência de ossificação

intramembranosa no presente trabalho, dado que já foi constatado por outro autor.(Cunningham et al.,2002).

A maior quantidade de tecido fibroso na interface dos animais sacrificados com três semanas do grupo não decorticado poderia estar relacionada com a maior lentidão do modelo de ossificação endocondral para formar uma ponte óssea estável entre o leito posterior e o enxerto ósseo e também com a menor estabilidade na interface, conferida pela menor área de contato entre o leito posterior e o enxerto ósseo. O aumento da estabilidade na interface com a evolução da osteogênese, também explica a diminuição na quantidade de tecido fibroso em todos os modelos experimentais no decorrer das nove semanas. Tem sido observado que nas regiões de menor estabilidade existe formação de tecido fibroso(Zimmermann et al.,2005).

7_Conclusões

O tipo de enxerto ósseo utilizado não interferiu na neoformação tecidual e conseqüentemente na integração do enxerto ósseo em nenhum grupo experimental com 3, 6 e 9 semanas de pós-operatório.

A decorticação do leito receptor do enxerto ósseo interferiu na neoformação tecidual. Foi observada diferença estatística na quantidade do tecido ósseo neoformado com 3,6 e 9 semanas de pós-operatório, do tecido fibroso neoformado com 6 e 9 semanas e do tecido cartilaginoso com 9 semanas.

A decorticação interferiu no mecanismo de ossificação na interface, nos animais decorticados predominou a ossificação intramembranosa e nos não decorticados predominou o mecanismo endocondral.

A decorticação do leito receptor acelerou a integração do enxerto ósseo.

8-Resumo

Foi realizado estudo experimental para determinar a influência da decorticação dos elementos posteriores da coluna vertebral na integração do enxerto ósseo autólogo esponjoso ou cortical, considerando a avaliação histológica quantitativa e qualitativa dos tecidos (ósseo, cartilaginoso e fibroso) presentes na interface entre o leito receptor e o enxerto ósseo. Setenta e dois ratos Wistar foram divididos em quatro grupos experimentais: grupo I_ leito posterior decorticado enxerto esponjoso, grupo II_ leito posterior decorticado enxerto cortical, grupo III_ leito posterior não decorticado enxerto esponjoso, grupo IV_ leito posterior não decorticado enxerto cortical. Os quatro grupos experimentais foram sacrificados com 3, 6 e 9 semanas de pós-operatório e a região operada foi submetida a avaliação histológica e histomorfométrica.

Nos animais sacrificados com 3 semanas de pós-operatório a média da porcentagem de osso neoformado no grupo I foi de $40,87\% \pm 5,24$, no grupo II de $39,13\% \pm 7,27$, no grupo III de $6,13\% \pm 2,13$, no grupo IV de $9,27\% \pm 4,06$. Foi observada diferença estatística entre os valores da neoformação óssea ($p=0,0005$). A média da porcentagem de tecido cartilaginoso neoformado no grupo I foi de $8,36\% \pm 1,08$, no grupo II de $7,46\% \pm 0,85$, no grupo III de $11,10\% \pm 6,026$ e no grupo IV de $9,133\% \pm 3,84$. Não foi observada diferença estatística entre os valores da neoformação de tecido cartilaginoso ($p=0,6544$). A média da porcentagem de tecido fibroso neoformado no grupo I foi de $11\% \pm 3,97$, no grupo II de $6,13\% \pm 1,78$, no grupo III de $26,27\% \pm 7,25$ e no grupo IV de $21,87\% \pm 12,7$. Foi observada diferença estatística entre os valores da neoformação de tecido fibroso ($p=0,0008$).

Nos animais sacrificados com 6 semanas de pós-operatório a média da porcentagem de osso neoformado no grupo I foi de $38,53\% \pm 14,13$, no grupo II de $40,40\% \pm 13,90$, no grupo III de $10,27\% \pm 5,17$ e no grupo IV de $7,6\% \pm 3,53$. Foi observada diferença estatística entre os valores da neoformação óssea ($p=0,0005$). A média da porcentagem de tecido cartilaginoso neoformado no grupo I foi de $6,6\% \pm 3,46$, no grupo II de $8,07\% \pm 1,74$, no grupo III de $7,47\% \pm 3,27$ e no grupo IV de $6,13\% \pm 2,08$. Não foi observada diferença estatística entre os valores da neoformação de tecido cartilaginoso ($p=0,4889$). A média da porcentagem de tecido fibroso neoformado no grupo I foi de $7,67\% \pm 5,12$, no grupo II foi

de $7,1\% \pm 3,16$, no grupo III de $9,8\% \pm 7,54$ e no grupo IV de $10,4\% \pm 5,59$. Não foi observada diferença estatística entre os valores da neoformação de tecido fibroso ($p=0,7880$).

Nos animais sacrificados com 9 semanas de pós-operatório a média da porcentagem de osso neoformado no grupo I foi de $29,53\% \pm 3,473$, no grupo II de $30,6\% \pm 10,48$, no grupo III de $16,4\% \pm 6,072$ e no grupo IV de $18,73\% \pm 5,727$. Foi observada diferença estatística entre os valores de osso neoformado ($p=0,0026$). A média da porcentagem de tecido cartilaginoso neoformado no grupo I foi de $3,133\% \pm 1,33$, no grupo II de $4,067\% \pm 1,686$, no grupo III de $10,53\% \pm 4,751$, no grupo IV de $12,07\% \pm 2,753$. Foi observada diferença estatística entre os valores de tecido cartilaginoso neoformado ($p=0,0006$). A média da porcentagem de tecido fibroso neoformado no grupo I foi de $3,733\% \pm 1,672$, no grupo II de $4,4\% \pm 1,339$, no grupo III de $6,67\% \pm 2,767$ e no grupo IV de $6,8\% \pm 2,492$. Foi observada diferença estatística entre os valores da neoformação de tecido fibroso ($p=0,0214$).

A realização da decorticação acelerou o processo histológico da integração do enxerto ósseo. Ocorrendo maior produção de tecido ósseo neoformado e predomínio da ossificação do tipo intramembranosa no grupo de animais nos quais a decorticação foi realizada.

9-Summary

An experimental study was conducted to determine the influence of the posterior vertebral spine elements decortication in the cancellous or cortical bone graft integration, considering the qualitative and quantitative histologic evaluation of the tissue (bone, cartilaginous and fibrous) presents in the interface between the receptor bed and the bone graft. Seventy two Wistar rats were divided in four experimental groups: group I_ decorticated posterior bed and cancellous graft, group II_ decorticated posterior bed and cortical graft, group III_ not decorticated posterior bed and cancellous graft, group IV_ not decorticated posterior bed and cortical graft. The four experimental groups were sacrificed in 3,6 and 9 post-operative weeks and the operated section of the spine was submitted to a histologic and histomorphometric evaluation.

In the animals sacrificed in the third post-operative week the mean percentage of new bone formation in the group I was $40,87\% \pm 5,24$, in the group II $39,13\% \pm 7,27$, in the group III $6,13\% \pm 2,13$ and in the group IV $9,27\% \pm 4,06$. Was observed statistic difference between the percentage of new bone formation ($p=0,0005$). The mean percentage of cartilaginous tissue new formation in the group I was $8,36\% \pm 1,08$, in the group II $7,46\% \pm 0,85$, in the group III $11,10\% \pm 6,026$ and in the group IV $9,133\% \pm 3,84$. Was not observed statistic difference between the percentage of cartilaginous tissue new formation ($p=0,6544$). The mean percentage of fibrous tissue new formation in the group I was $11\% \pm 3,97$, in the group II $6,13\% \pm 1,78$, in the group III $26,27\% \pm 7,25$ and in the group IV $21,87\% \pm 12,7$. Was observed statistic difference between the percentage of fibrous tissue new formation ($p=0,0008$).

In the animals sacrificed in the sixth post-operative week the mean percentage of new bone formation in the group I was $38,53\% \pm 14,13$, in the group II $40,40\% \pm 13,90$, in the group III $10,27\% \pm 5,17$ and in the group IV $7,6\% \pm 3,53$. Was observed statistic difference between the percentage of new bone formation ($p=0,0005$). The mean percentage of cartilaginous tissue new formation in the group I was $6,6\% \pm 3,46$, in the group II $8,07\% \pm 1,74$, in the group III $7,47\% \pm 3,27$ and in the group IV $6,13\% \pm 2,08$. Was not observed statistic difference between the percentage of cartilaginous tissue new formation ($p=0,4889$). The mean percentage of fibrous tissue new formation in the group I was $7,67\% \pm 5,12$, in the group II $7,1\% \pm 3,16$, in the group III $9,8\% \pm 7,54$ and in the group IV $10,4\% \pm 5,59$. Was not observed statistic difference between the percentage of fibrous tissue new formation ($p=0,7880$).

In the animals sacrificed in the ninth post-operative week the mean percentage of new bone formation in the group I was $29,53\% \pm 3,473$, in the group II $30,6\% \pm 10,48$, in the group III $16,4\% \pm 6,072$ and in the group IV $18,73\% \pm 5,727$. Was observed statistic difference between the percentage of new bone formation ($p=0,0026$). The mean percentage of cartilaginous tissue new formation in the group I was $3,133\% \pm 1,33$, in the group II $4,067\% \pm 1,686$, in the group III $10,53\% \pm 4,751$ and in the group IV $12,07\% \pm 2,753$. Was observed statistic difference between the percentage of cartilaginous tissue new formation ($p=0,0006$). The mean percentage of fibrous tissue new formation in the group I was $3,733\% \pm 1,672$, in the group II $4,4\% \pm 1,339$, in the group III $6,67\% \pm 2,767$ and in the group IV $6,8\% \pm 2,492$. Was observed statistic difference between the percentage of fibrous tissue new formation ($p=0,0214$).

The decortication procedure accelerated the histologic process of the bone graft integration, occurring more new bone formation and predominance of intramembranous type of ossification, in the animals with the decorticated posterior elements.

10-Referências bibliográficas

Referências

- Bassett, C.L.Clinical implication of cell function in bone grafting. **Clin Orthopaedics and Related Research**,v. 87,p.49-57,1972.
- Blattert, T.R.;Delling, G. ;Weckbach, A.Evaluation of an injectable calcium phosphate cement as an autograft substitute for transpedicular lumbar interbody fusion: a controlled, prospective study in the sheep model. **Eur Spine J**,v. 12,p.216-223,2003.
- Boden, S.D.Overview of the biology of lumbar spine fusion and principles for selecting a bone graft substitute. **Spine**,v. 27,p.S26-S31,2002.
- Boden, S.D.;Andersson, G.B.J.;Anderson, D.G. ;Damien, C.Overview of bone morphogenetic proteins for spine fusion. **Spine J**,v. 27,p.S2-S8,2002.
- Boden, S.D.;Grob, D. ;Damien, C.Ne-Osteo bone growth factor for posterolateral lumbar spine fusion: results from a nonhuman primate study and a prospective human clinical pilot study. **Spine**,v. 29,p.504-514,2004.
- Boden, S.D.;Moskovitz, P.A.;Morone, M.A. ;Toribitake, Y.Video-assisted lateral intertransverse process arthrodesis. Validation of a new minimally invasive lumbar spinal fusion technique in the rabbit and nonhuman primate (rhesus) models. **Spine**,v. 21,p.2689-2697,1996.
- Boden, S.D.;Schimandle, J.H. ;Hutton, W.C.An experimental lumbar intertransverse process spinal fusion model. Radiographic, histologic, and biomechanical healing characteristics. **Spine**,v. 20,p.412-420,1995.
- Brighton, C.T.;Sugioka, Y. ;Hunt, R.M.Cytoplasmic structures of epiphyseal plate chondrocytes: quantitative evaluation using electron micrographs of rats costochondral junctions with especial reference to the fate of hypertrophic cells **J Bone Joint Surg Am**,v. 55,p.771-784,1973.
- Brodsky, A.E.;Kovalsky, E.S. ;Khalil, M.A.Correlation of radiologic assessment of lumbar spine fusion with surgical exploration. **Spine**,v. 16(6 Suppl),p.S261-S265,1991.
- Burbidge, H.M.;Thompson, K.C. ;Hodge, H.Post natal development of canine caudal cervical vertebrae. **Res Vet Sci**,v. 59,p.35-40,1995.
- Burchardt, H.The biology of bone graft repair. **Clin Orthop Relat Res**,v. 174,p.28-42,1983.
- 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. **J Bone Joint Surg Br**,v. 46,p.110-120,1964.
- Burwell, R.G.The function of the bone marrow in the incorporation of a bone graft. **Clin Orthop**,v. 200,p.125-135,1985.
- Cheng, J.C.;Guo, X.;Law, L.P.;Lee, K.M.;Chow, D.H. ;Rosier, R.How does recombinant human bone morphogenetic protein-4 enhance posterior spinal fusion? **Spine**,v. 27,p.467-474,2002.
- Conti, O.J.;Pastorello, M.T. ;Defino, H.L.A.Estudo experimental da decorticação óssea na integração dos enxertos na coluna vertebral. **Acta Ortop Bras**,v. 14,p.67-71,2006.
- Cunningham, B.W.;Shimamoto, N.;Seftor, J.C.;Dmitriev, A.E.;Orbegoso, C.M.;Mccarthy, E.F.;Fedder, I.L. ;Mcafee, P.C.Osseointegration of autograft versus osteogenic protein-1 in posterolateral spinal arthrodesis: emphasis on the comparative mechanisms of bone induction. **Spine J**,v. 2,p.11-24,2002.
- David, S.M.;Gruber, H.E.;Meyer, R.A., Jr.;Murakami, T.;Tabor, O.B.;Howard, B.A.;Wozney, J.M. ;Hanley, E.N., Jr.Lumbar spinal fusion using recombinant human bone morphogenetic protein in the canine. A comparison of three dosages and two carriers. **Spine**,v. 24,p.1973-1979,1999.
- Dawson, E.G.;Clader, T.J. ;Bassett, L.W.A comparison of different methods used to diagnose pseudoarthrosis following posterior spinal fusion for scoliosis. **J Bone Joint Surg Am**,v. 67,p.1153-1159,1985.
- Depalma, A.F. ;Rothman, R.H.The nature of pseudoarthrosis. **Clin Orthop**,v. 59,p.113-120,1968.
- Farey, I.D.;Mcafee, P.C. ;Gur, K.R.Quantitative histologic study of the influence of spinal instrumentation on lumbar fusions: A canine model. . **J Orthop Res**,v. 7,p.709-722,1989.
- Foster, M.R.;Allen, M.J.;Schoonmaker, J.E.;Yuan, H.A.;Kanazawa, A.;Park, S.A. ;Liu, B.Characterization of a developing lumbar arthrodesis in a sheep model with quantitative instability. **Spine J**,v. 2,p.244-250,2002.
- Hatori, M.;Klatte, K.J.;Teixeira, C.C. ;Shapiro, I.M.End labeling studies of fragmented DNA in the avian growth plate: evidence of apoptosis in terminally differentiated chondrocytes. **J Bone Miner Res**,v. 10,p.1960-1968,1995.
- Hibbs, R.A.An operation for progressive spinal deformities. **N Y Med J**,v. 93,p.1013-1016,1911.
- Hibbs, R.A.Scoliosis treated by fusion operation. **J Bone Joint Surg Am**,v. 6,p.33-37,1924.
- Holtrop, M.E.The ultrastructure of the epiphyseal plate.II: the hypertrophic chondrocytes. **Calcif Tiss Res**,v. 9,p.140-151,1972.
- Ilizarov, G.A.The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part 2. The influence of the rate and frequency of distraction. **Clin Orthop Relat Res**,v. 239,p.263-285,1989.
- Ishikawa, S.;Shin, H.D.;Bowen, J.R. ;Cummings, R.J.Is it necessary to decorticate segmentally instrumented spines to achieve fusion. **Spine**,p.1686-1690,1994.
- Kitchel, S.H.;Wang, M.Y. ;Laurysen, C.L.Techniques for aspirating bone marrow for use in spinal surgery. **Neurosurgery**,v. 57,p.286-289; discussion 286-289,2005.
- Krijnen, M.R.;Smit, T.H.;Strijkers, G.J.;Nicolay, K.;Pouwels, P.J. ;Wuisman, P.I.The use of high-resolution magnetic resonance imaging for monitoring interbody fusion and bioabsorbable cages: an ex vivo pilot study. **Neurosurg Focus**,v. 16,p.E3,2004.

- Kusec, V.;Jelic, M.;Borovecki, F.;Kos, J.;Vukicevic, S. ;Korzinek, K.Distractio osteogenesis by ilizarov and unilateral external fixators in a canine model **International Orthopaedics**,v. 27,p.47-52,2003.
- Lamghari, M.;Antonietti, P.;Berland, S.;Laurent, A. ;Lopez, E.Arthrodesis of lumbar spine transverse processes using nacre in rabbit. **J Bone Miner Res**,v. 16,p.2232-2237,2001.
- Lehman, T.R. ;Larocca, H.S.Repeat lumbar surgery:A review of patients with failure from previus lumbar surgery treated by spinal canal exploration and lumbar spinal fusion. **Spine**,v. 6,p.615-630,1981.
- Li, J.P.;Habibovic, P.;Van Den Doel, M.;Wilson, C.E.;De Wijn, J.R.;Van Blitterswijk, C.A. ;De Groot, K.Bone ingrowth in porous titanium implants produced by 3D fiber deposition. **Biomaterials**,2007.
- Reddi, A.H.Extracellular bone matrix dependent local induction of cartilage and bone. **J Rheumatol**,v. 11,p.67-75,1983.
- Romith, M.;Delécrin, J.;Heyman, D. ;Passuti, N.The vertebral interbody grafting site's low concentration in osteogenic progenitors can greatly benefit from addition of iliac crest bone marrow. **Eur Spine J**,v. 14,p.645-648,2005.
- Roy-Camille, R.;Saillant, G. ;Mazel, C.Internal fixation of the lumbar spine with pedicle screw plating. **Clin Orthop**,v. 203,p.7-17,1986.
- Sandhu, H.S.;Kanim, L.E.;Kabo, J.M.;Toth, J.M.;Zeegan, E.N.;Liu, D.;Seeger, L.L. ;Dawson, E.G.Evaluation of rhBMP-2 with an OPLA carrier in a canine posterolateral (transverse process) spinal fusion model. **Spine**,v. 20,p.2669-2682,1995.
- Sandhu, H.S.;Kanim, L.E.;Kabo, J.M.;Toth, J.M.;Zeegen, E.N.;Liu, D.;Delamarter, R.B. ;Dawson, E.G.Effective doses of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in experimental spinal fusion. **Spine**,v. 21,p.2115-2122,1996.
- Shimomura, Y.;Yoneda, T. ;Suzuki, F.Osteogenesis by chondrocytes from growth cartilage of rat rib. **Calcif Tiss Res**,v. 19,p.179-187,1975.
- Steinmann, J.C. ;Herkowitz, H.N.Pseudarthrosis of the spine [review]. . **Clin Orthop Relat Res**,v. 284,p.80-90,1992.
- Toribatake, Y.;Hutton, W.C. ;Boden, S.D.Revascularization fo the fusion mass in a posterolateral intertransverse process fusion. **Spine**,v. 23,p.1149-1154,1998.
- Vaccaro, A.R.;Chiba, K.;Heller, J.G.;Patel, T.C.;Thalgott, J.S.;Truumees, E.;Fischgrund, J.S.;Craig, M.R.;Berta, S.C. ;Wang, J.C.Bone grafting alternatives in spinal surgery. **The Spine Journal**,v. 2,p.206-215,2002.
- Vaughan, J.Osteogenesis and haematopoiesis. **Lancet**,v. 2,p.133-143,1981.
- Vital, J.M.;Gille, O.;Pointllart, V.;Pedram, M.;Bacon, P.;Razanabola, F.;Schaeelderle, C. ;Azzouz, S.Course of modic 1 six months after lumbar posterior osteosynthesis. **Spine**,v. 28,p.715-721,2003.
- Weibel, E.R.;Kistler, G.S. ;Scherle, W.F.Practical stereological methods for morphometric cytology. **Journal of Cell Biology**,v. 30,p.23-38,1966.
- Xiao, R. ;Song, Y.[Gene therapy on spine fusion]. **Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi**,v. 19,p.703-707,2002.
- Xie, Y.;Chopin, D.;Morin, C.;Hardouin, P.;Zhu, Z.;Tang, J. ;Lu, J.Evaluation of the osteogenesis and biodegradation of porous biphasic ceramic in the human spine. **Biomaterials**,v. 27,p.2761-2767,2006.

- Yasui, N.;Sato, M.;Ochi, T.;Kimira, T. ;Kawahata, H.Three modes of ossification during distraction osteogenesis in the rat. **J Bone Joint Surg Br**,v. 79,p.824-830,1997.
- Zimmermann, C.E.;Thurmüller, P.;Troulis, M.J. ;Perrot, D.H.Histology of the porcine distration wound. **Internal Journal of Oral and Maxillofacial surgery**,v. 34,p.411-419,2005.

Influência da decorticação na neoformação tecidual da interface do enxerto ósseo na coluna vertebral.

Decortication influence in the new tissue formation in the bone graft's interface in the spine.

Resumo

A decorticação do leito receptor posterior interfere na integração do enxerto ósseo. Os mecanismos envolvidos na osteogênese da interface leito receptor enxerto não estão totalmente conhecidos. Foram utilizados 24 ratos Wistar, divididos em dois grupos de acordo com a decorticação ou não do leito receptor do enxerto. Foi usado enxerto autólogo derivado dos processos espinhosos das duas primeiras vértebras lombares. A neoformação tecidual na interface entre o leito receptor e seu enxerto ósseo foi estudada através de análise histomorfométrica. No grupo de animais com o leito receptor decorticado a média de osso neoformado foi de $40\% \pm 6,1$, no grupo não decorticado de $7,7\% \pm 3,5$, diferença estatisticamente significativa ($p=0,0001$). A média de formação do tecido cartilaginoso no grupo decorticado foi de $7,2\% \pm 3,5$, no não decorticado de $10,9\% \pm 5,6$ ($p=0,1123$). A formação de tecido fibroso no grupo decorticado apresentou uma média de $8,6\% \pm 3,9$ e no não decorticado de $24\% \pm 10,1$, diferença estatisticamente significativa ($p=0,0002$).

A decorticação acelerou o processo histológico da integração do enxerto ósseo. Ocorrendo maior produção de tecido ósseo neoformado e predomínio da ossificação do tipo intramembranosa.

Descritores: integração do enxerto ósseo, decorticação, histomorfometria, osteogênese, coluna vertebral.

Summary The vertebral posterior elements decortication influences the bone graft integration. All the factors involved in the osteogenesis in the interface between the posterior elements and the bone graft are not known. Twenty four rats were used, divided according to the decortication or not of the posterior elements. Autologous bone grafts of the two first lumbar vertebrae were used. The tissue new formation in the interface between

the posterior elements and the bone graft was studied with histomorphometrical analyses. In the animals with the decorticated posterior elements there was a mean new bone formation of $40\% \pm 6,1$, in the not decorticated group of $7,7\% \pm 3,5$, statistically significant difference ($p=0,0001$). The mean cartilage formation in the decorticated group was $7,2\% \pm 3,5$, in the not decorticated group was $10,9\% \pm 5,6$ ($p=0,1123$). The mean fibrous tissue formation in the decorticated group was $8,6\% \pm 3,9$ and in the not decorticated group was $24\% \pm 10,1$, statistically significant difference ($p=0,0002$).

The decortication accelerated the histologic process of bone graft integration, with more new bone formation and predomination of the intramembranous type of ossification.

Keywords bone graft integration, decortication, histomorphometry, osteogenesis, spine.

Introdução

O conceito da decorticação do leito receptor do enxerto ósseo nas artrodeses vertebrais foi introduzido por Hibbs em 1911(Hibbs,1911). A decorticação implica na remoção da parte superficial do osso cortical que recobre os elementos posteriores da vértebra (processo espinhoso, lâmina e faceta articular), expondo desta maneira o osso esponjoso vertebral. A consolidação da artrodese posterior da coluna vertebral depende da integração do enxerto ósseo com o seu leito receptor, processo esse relacionado à neoformação óssea nessa interface, onde estão presentes os tecidos ósseo, cartilaginoso e fibroso(Boden et al.,1995; Burchardt,1983). A decorticação eleva o metabolismo tecidual na interface pelo aumento do aporte vascular para essa região,acelerando a integração do enxerto ósseo ao leito receptor, e desencadeando maior neoformação óssea(Boden et al.,1995; Conti et al.,2006). Apesar de vários estudos demonstrarem o efeito da decorticação do leito receptor sobre a integração do enxerto ósseo(Foster et al.,2002; Sandhu et al.,1997; Ishikawa et al.,1994), os mecanismos envolvidos na osteogênese da interface leito receptor enxerto não estão totalmente esclarecidos.

O objetivo desse trabalho foi determinar a influência da decorticação dos elementos posteriores sobre a integração do enxerto ósseo, considerando a avaliação quantitativa e qualitativa dos tecidos (ósseo, cartilaginoso e fibroso) presentes na interface.

Material e Métodos

Foram utilizados no estudo 24 ratos Wistar do sexo masculino, pesando entre 250g e 350g. Os animais foram divididos em dois grupos experimentais de acordo com a decorticação dos elementos vertebrais posteriores. Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal utilizando-se 0,1ml de Ketamina e 0,07ml de Xilazina para cada 100 gramas de peso do animal. As duas primeiras vértebras lombares eram bilateralmente expostas através de incisão longitudinal posterior. Os processos espinhosos dessas vértebras eram seccionados na sua base, divididos ao meio no plano sagital e utilizado como enxerto ósseo. (Figura 1). Em 12 animais os elementos posteriores da vértebra (lâmina, faceta articular, processo transversos) foram decorticados, tendo sido utilizado osteótomo para a remoção do osso cortical, e nos outros 12 animais os elementos vertebrais posteriores foram mantidos íntegros. O processo espinhoso era colocado sobre os elementos vertebrais posteriores (decorticados ou não decorticados) de acordo com o grupo experimental e a incisão cirúrgica fechada por planos com fio absorvível.

Na terceira semana após a cirurgia os animais eram sacrificados com dose letal de anestésico e o segmento vertebral operado era removido e preparado para o estudo histológico por meio da fixação em formol a 10% e descalcificação em solução de ácido tricloro acético a 30%. As peças foram incluídas em parafina e realizados cortes histológicos de 5 µm que foram corados pelo Tricrômico de Masson, para o estudo da

interface entre os elementos posteriores da coluna vertebral e o enxerto ósseo. Essa interface foi o alvo do estudo, tendo sido quantificado o tecido ósseo neoformado, o tecido cartilaginoso e o tecido fibroso presentes no corte histológico. O estudo histomorfométrico foi realizado com aumento de 100X.

Os tecidos analisados apresentavam colorações distintas. O tecido ósseo antigo apresentava cor vermelha escura, o tecido cartilaginoso cor azul clara, o tecido fibroso cor azul escura e o tecido ósseo neoformado cor azul intermediária entre o azul claro do tecido cartilaginoso e o azul escuro do tecido fibroso.

A área total do corte histológico foi considerada como possuindo forma retangular devido às dimensões apresentadas, tendo sido utilizado o cálculo da área dessa figura geométrica para a medida da área total do corte histológico na avaliação quantitativa por meio da histomorfometria.

Com uma régua em escala decimal acoplada a objetiva do microscópio foi calculada a área total do corte histológico e a área de cada um dos diferentes tecidos histológicos neoformados presentes no corte, com 25 medidas por corte histológico. A área dos três tecidos neoformados foi expressa em porcentagem com relação à área total do corte histológico. A intersecção em linhas paralelas é um método histomorfométrico descrito na literatura e que permite estimar a porcentagem ocupada por cada tipo de tecido em linhas paralelas graduadas (Aherne et al., 1982; Frenkel et al., 1993; Kusec et al., 2003; Byers et al., 2000).

A análise estatística da comparação dos resultados quantitativos dos tecidos neoformados foi realizada por meio do teste de Kurtosis para avaliação da normalidade da amostra. A normalidade da amostra não foi constatada por meio desse teste, tendo sido utilizado o teste

de Mann-Whitney para comparar as variáveis estudadas. Foi adotado nível de significância de 5%.

Resultados

A avaliação quantitativa do osso neoformado, tecido cartilaginoso e tecido fibroso presentes na interface leito receptor e enxerto ósseo apresentou diferença entre os animais considerando-se a realização da decorticação.

No grupo de animais em que a decorticação foi realizada foi observado maior quantidade de osso neoformado, menor quantidade de tecido cartilaginoso e tecido fibroso, quando comparado com o grupo não decorticado. (Tabelas 1 e 2).

No grupo de animais em que a decorticação foi realizada a média de osso neoformado foi de $40\% \pm 6,1$, e no grupo não decorticado de $7,7\% \pm 3,5$, tendo sido observado diferença estatística entre os dois grupos ($p = 0,0001$). Com relação à formação de tecido cartilaginoso o grupo decorticado apresentou média de $7,2\% \pm 3,5$ e o grupo não decorticado de $10,9\% \pm 5,6$, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,1123$).

O grupo decorticado apresentou média de $8,6\% \pm 3,9$ de tecido fibroso neoformado e o grupo não decorticado de $24\% \pm 10,1$, tendo sido observado diferença estatística entre os dois grupos ($p = 0,0002$). (Figura 2).

A avaliação histomorfométrica da interface entre o leito receptor e o enxerto ósseo mostrou porcentagens diferentes de tecidos neoformados nos dois grupos experimentais.

A análise histológica observacional mostrou que o mecanismo de osteogênese na interface leito receptor e enxerto ósseo não foi semelhante nos dois grupos estudados. Nos animais decorticados ocorreu osteogênese pelo mecanismo de ossificação endocondral e

intramembranosa, com um predomínio da ossificação intramembranosa, enquanto que nos animais não decorticados a osteogênese ocorreu por ossificação endocondral.(Figura 3)

Discussão

A integração do enxerto ósseo na artrodese vertebral está relacionada a fatores locais e sistêmicos e o leito receptor do enxerto ósseo atua como importante fator local para a integração do enxerto(Boden et al.,2004).

A decorticação do leito ósseo receptor do enxerto acelera a integração óssea(Conti et al.,2006). Os fatores biológicos envolvidos nesse fenômeno ainda não são totalmente conhecidos(Vaccaro et al.,2002), tendo sido a motivação para a elaboração do modelo experimental, em que se utilizou um animal de pequeno porte como o rato para quantificar o fenômeno da osteogênese entre o leito receptor decorticado ou não decorticado e o enxerto ósseo.

O tempo de integração do enxerto ósseo é variável nas diferentes espécies, entre de 2 a 3 semanas em ratos, 3 a 4 semanas em coelhos e alguns meses em humanos e primatas (Boden et al.,1996; Boden et al.,1995), com base nessa informação o tempo de sacrifício dos animais na terceira semana foi selecionado.

O método histomorfométrico que utiliza uma régua acoplada à objetiva do microscópio e a área total de uma figura geométrica plana permite quantificar de forma satisfatória os diferentes tecidos formados no processo de osteogênese, sendo um método de fácil utilização e baixo custo(Aherne et al.,1982; Li et al.,2007).

A capacidade de indução e aceleração da formação óssea nas áreas decorticadas tem sido experimentalmente observada(Conti et al.,2006; Foster et al.,2002).

Estudos histológicos com marcadores da neoformação vascular indicam que o suprimento vascular inicial para a massa da artrodese origina-se dos processos transversos decorticados e não dos tecidos moles adjacentes(Cunningham et al.,2002). Essa seria a explicação para a maior neoformação óssea no grupo de animais decorticados. A profusão de nutrientes proporcionados pela irrigação sangüínea mais abundante representa um fator importante de estímulo à osteogênese(Romith et al.,2005). Além disso, a decorticação dos elementos posteriores coloca o enxerto ósseo em contato direto com células do sistema retículo endotelial e com fatores osteoindutores e osteogênicos presentes na corrente sanguínea(Cunningham et al.,2002). O enxerto ósseo sofre um processo de necrose e reabsorção(Burwell,1964). As células do sistema retículo endotelial são atraídas e quando em contanto com esse ambiente tem a capacidade de se transformar em células progenitoras da linhagem osteoblástica(Burwell,1964). O contato direto do enxerto ósseo com a área cruenta permitiria maior abundância dos fatores indutores e osteogênicos, como as proteínas morfogênicas do osso na interface leito posterior e enxerto(Boden,2002).O estudo mais detalhado da interface entre o enxerto ósseo e o leito receptor permitiu a observação e a quantificação dos diferentes tecidos neoformados. A maior quantidade de tecido ósseo neoformado, com uma menor quantidade de tecido cartilaginoso e fibroso na interface no grupo decorticado seria mais vantajosa para a integração do enxerto ósseo, porque a ponte óssea se forma mais rapidamente, garantindo maior resistência para a integração do enxerto ósseo(Foster et al.,2002).

A quantidade de tecido ósseo neoformado e de tecido fibroso apresentou diferença estatística nos grupos experimentais, mostrando a interferência da decorticação sobre a

integração do enxerto ósseo. Não somente a quantidade dos tecidos neoformados, mas também o processo de osteogênese da integração do enxerto ósseo foi modificado pela decorticação.

A osteogênese na interface não foi semelhante entre os animais decorticados e não decorticados. No grupo de animais decorticados ocorreu osteogênese pelo mecanismo de ossificação intramembranosa e endocondral, com predomínio da ossificação intramembranosa, enquanto que no grupo não decorticado a ossificação endocondral foi predominante.

A maior abundância de oxigênio na interface decorticada poderia induzir a ossificação de origem intramembranosa. Em condições de baixa concentração de oxigênio há tendência para o modelo de ossificação endocondral(Kusec et al.,2003). O aumento do aporte de proteínas morfogênicas do osso para a interface seria outro possível estímulo para a ocorrência de ossificação intramembranosa(Cunningham et al.,2002).

A maior quantidade de tecido fibroso na interface dos animais do grupo não decorticado poderia estar relacionada com a maior lentidão do modelo de ossificação endocondral para formar uma ponte óssea estável entre o leito posterior e o enxerto ósseo e também com a menor estabilidade na interface, conferida pela menor área de contato entre o leito posterior e o enxerto ósseo. Tem sido observado que nas regiões de menor estabilidade existe formação de tecido fibroso(Zimmermann et al.,2005).

A decorticação do leito receptor do enxerto ósseo influenciou o processo de integração do enxerto ósseo com o seu leito receptor. Foi observada diferença na quantidade do tecido ósseo neoformado, do tecido fibroso na interface e também do processo de osteogênese. A decorticação interfere no processo de integração do enxerto ósseo, permitindo a sua

integração mais rápida, em decorrência da maior formação de tecido ósseo neoformado e predomínio da ossificação intramembranosa.

A decorticação do leito receptor do enxerto ósseo interfere no seu processo histológico de integração. Ela acelera a integração do enxerto com o seu leito, ocorrendo maior produção de tecido ósseo neoformado e predomínio da ossificação intramembranosa na interface entre o enxerto ósseo e o seu leito receptor.

Referências

- Aherne ;Dunnill.Morphometry. **Morphometry**,1982.
- Bassett, C.L.Clinical implication of cell function in bone grafting. **Clin Orthopaedics and Related Research**,v. 87,p.49-57,1972.
- Blatter, T.R.;Delling, G. ;Weckbach, A.Evaluation of an injectable calcium phosphate cement as an autograft substitute for transpedicular lumbar interbody fusion: a controlled, prospective study in the sheep model. **Eur Spine J**,v. 12,p.216-223,2003.
- Boden, S.D.Overview of the biology of lumbar spine fusion and principles for selecting a bone graft substitute. **Spine**,v. 27,p.S26-S31,2002.
- Boden, S.D.;Andersson, G.B.J.;Anderson, D.G. ;Damien, C.Overview of bone morphogenetic proteins for spine fusion. **Spine J**,v. 27,p.S2-S8,2002.
- Boden, S.D.;Grob, D. ;Damien, C.Ne-Osteo bone growth factor for posterolateral lumbar spine fusion: results from a nonhuman primate study and a prospective human clinical pilot study. **Spine**,v. 29,p.504-514,2004.
- Boden, S.D.;Moskovitz, P.A.;Morone, M.A. ;Toribitake, Y.Video-assisted lateral intertransverse process arthrodesis. Validation of a new minimally invasive lumbar spinal fusion technique in the rabbit and nonhuman primate (rhesus) models. **Spine**,v. 21,p.2689-2697,1996.
- Boden, S.D.;Schimandle, J.H. ;Hutton, W.C.An experimental lumbar intertransverse process spinal fusion model. Radiographic, histologic, and biomechanical healing characteristics. **Spine**,v. 20,p.412-420,1995.
- Brighton, C.T.;Sugioka, Y. ;Hunt, R.M.Cytoplasmic structures of epiphyseal plate chondrocytes: quantitative evaluation using electron micrographs of rats costochondral junctions with especial reference to the fate of hypertrophic cells **J Bone Joint Surg Am**,v. 55,p.771-784,1973.
- Brodsky, A.E.;Kovalsky, E.S. ;Khalil, M.A.Correlation of radiologic assessment of lumbar spine fusion with surgical exploration. **Spine**,v. 16(6 Suppl),p.S261-S265,1991.
- Burbidge, H.M.;Thompson, K.C. ;Hodge, H.Post natal development of canine caudal cervical vertebrae. **Res Vet Sci**,v. 59,p.35-40,1995.
- Burchardt, H.The biology of bone graft repair. **Clin Orthop Relat Res**,v. 174,p.28-42,1983.

- 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. **J Bone Joint Surg Br**, v. 46, p.110-120, 1964.
- Burwell, R.G. The function of the bone marrow in the incorporation of a bone graft. **Clin Orthop**, v. 200, p.125-135, 1985.
- Byers, S.; Moore, A.J.; Byard, R.W.; Fazzalari, N.L. Quantitative histomorphometric analysis of the human growth plate from birth to adolescence **Bone**, v. 27, p.495-501, 2000.
- Cheng, J.C.; Guo, X.; Law, L.P.; Lee, K.M.; Chow, D.H.; Rosier, R. How does recombinant human bone morphogenetic protein-4 enhance posterior spinal fusion? **Spine**, v. 27, p.467-474, 2002.
- Conti, O.J.; Pastorello, M.T.; Defino, H.L.A. Estudo experimental da decorticação óssea na integração dos enxertos na coluna vertebral. **Acta Ortop Bras**, v. 14, p.67-71, 2006.
- Cunningham, B.W.; Shimamoto, N.; Seftor, J.C.; Dmitriev, A.E.; Orbegoso, C.M.; McCarthy, E.F.; Fedder, I.L.; McAfee, P.C. Osseointegration of autograft versus osteogenic protein-1 in posterolateral spinal arthrodesis: emphasis on the comparative mechanisms of bone induction. **Spine J**, v. 2, p.11-24, 2002.
- David, S.M.; Gruber, H.E.; Meyer, R.A., Jr.; Murakami, T.; Tabor, O.B.; Howard, B.A.; Wozney, J.M.; Hanley, E.N., Jr. Lumbar spinal fusion using recombinant human bone morphogenetic protein in the canine. A comparison of three dosages and two carriers. **Spine**, v. 24, p.1973-1979, 1999.
- Dawson, E.G.; Clader, T.J.; Bassett, L.W. A comparison of different methods used to diagnose pseudoarthrosis following posterior spinal fusion for scoliosis. **J Bone Joint Surg Am**, v. 67, p.1153-1159, 1985.
- Depalma, A.F.; Rothman, R.H. The nature of pseudoarthrosis. **Clin Orthop**, v. 59, p.113-120, 1968.
- Farey, I.D.; McAfee, P.C.; Gur, K.R. Quantitative histologic study of the influence of spinal instrumentation on lumbar fusions: A canine model. **J Orthop Res**, v. 7, p.709-722, 1989.
- Foster, M.R.; Allen, M.J.; Schoonmaker, J.E.; Yuan, H.A.; Kanazawa, A.; Park, S.A.; Liu, B. Characterization of a developing lumbar arthrodesis in a sheep model with quantitative instability. **Spine J**, v. 2, p.244-250, 2002.
- Frenkel, S.R.; Moskovich, R.; Spivak, J.; Zhang, Z.H.; Prewett, A.B. Dmineralized Bone Matrix. **Spine J**, v. 18, p.1634-1639, 1993.
- Hatori, M.; Klatte, K.J.; Teixeira, C.C.; Shapiro, I.M. End labeling studies of fragmented DNA in the avian growth plate: evidence of apoptosis in terminally differentiated chondrocytes. **J Bone Miner Res**, v. 10, p.1960-1968, 1995.
- Hibbs, R.A. An operation for progressive spinal deformities. **N Y Med J**, v. 93, p.1013-1016, 1911.
- Hibbs, R.A. Scoliosis treated by fusion operation. **J Bone Joint Surg Am**, v. 6, p.33-37, 1924.
- Holtrop, M.E. The ultrastructure of the epiphyseal plate. II: the hypertrophic chondrocytes. **Calcif Tiss Res**, v. 9, p.140-151, 1972.
- Ilizarov, G.A. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part 2. The influence of the rate and frequency of distraction. **Clin Orthop Relat Res**, v. 239, p.263-285, 1989.

- Ishikawa, S.;Shin, H.D.;Bowen, J.R. ;Cummings, R.J.Is it necessary to decorticate segmentally instrumented spines to achieve fusion. **Spine**,p.1686-1690,1994.
- Kitchel, S.H.;Wang, M.Y. ;Lauryssen, C.L.Techniques for aspirating bone marrow for use in spinal surgery. **Neurosurgery**,v. 57,p.286-289; discussion 286-289,2005.
- Krijnen, M.R.;Smit, T.H.;Strijkers, G.J.;Nicolay, K.;Pouwels, P.J. ;Wuisman, P.I.The use of high-resolution magnetic resonance imaging for monitoring interbody fusion and bioabsorbable cages: an ex vivo pilot study. **Neurosurg Focus**,v. 16,p.E3,2004.
- Kusec, V.;Jelic, M.;Borovecki, F.;Kos, J.;Vukicevic, S. ;Korzinek, K.Distractio osteogenesis by ilizarov and unilateral external fixators in a canine model **International Orthopaedics**,v. 27,p.47-52,2003.
- Lamghari, M.;Antonietti, P.;Berland, S.;Laurent, A. ;Lopez, E.Arthrodesis of lumbar spine transverse processes using nacre in rabbit. **J Bone Miner Res**,v. 16,p.2232-2237,2001.
- Lehman, T.R. ;Larocca, H.S.Repeat lumbar surgery:A review of patients with failure from previous lumbar surgery treated by spinal canal exploration and lumbar spinal fusion. **Spine**,v. 6,p.615-630,1981.
- Li, J.P.;Habibovic, P.;Van Den Doel, M.;Wilson, C.E.;De Wijn, J.R.;Van Blitterswijk, C.A. ;De Groot, K.Bone ingrowth in porous titanium implants produced by 3D fiber deposition. **Biomaterials**,2007.
- Reddi, A.H.Extracellular bone matrix dependent local induction of cartilage and bone. **J Rheumatol**,v. 11,p.67-75,1983.
- Romith, M.;Delécrin, J.;Heyman, D. ;Passuti, N.The vertebral interbody grafting site's low concentration in osteogenic progenitors can greatly benefit from addition of iliac crest bone marrow. **Eur Spine J**,v. 14,p.645-648,2005.
- Roy-Camille, R.;Saillant, G. ;Mazel, C.Internal fixation of the lumbar spine with pedicle screw plating. **Clin Orthop**,v. 203,p.7-17,1986.
- Sandhu, H.S.;Kanim, L.E.;Kabo, J.M.;Toth, J.M.;Zeegan, E.N.;Liu, D.;Seeger, L.L. ;Dawson, E.G.Evaluation of rhBMP-2 with an OPLA carrier in a canine posterolateral (transverse process) spinal fusion model. **Spine**,v. 20,p.2669-2682,1995.
- Sandhu, H.S.;Kanim, L.E.;Kabo, J.M.;Toth, J.M.;Zeegan, E.N.;Liu, D.;Delamarter, R.B. ;Dawson, E.G.Effective doses of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in experimental spinal fusion. **Spine**,v. 21,p.2115-2122,1996.
- Sandhu, H.S.;Kanim, L.E.;Toth, J.M.;Kabo, J.M.;Liu, D.;Delamarter, R.B. ;Dawson, E.G.Experimental spinal fusion with recombinant human bone morphogenetic protein-2 without decortication of osseous elements. **Spine**,v. 22,p.1171-1180,1997.
- Shimomura, Y.;Yoneda, T. ;Suzuki, F.Osteogenesis by chondrocytes from growth cartilage of rat rib. **Calcif Tiss Res**,v. 19,p.179-187,1975.
- Steinmann, J.C. ;Herkowitz, H.N.Pseudarthrosis of the spine [review]. . **Clin Orthop Relat Res**,v. 284,p.80-90,1992.
- Toribatake, Y.;Hutton, W.C. ;Boden, S.D.Revascularization fo the fusion mass in a posterolateral intertransverse process fusion. **Spine**,v. 23,p.1149-1154,1998.
- Vaccaro, A.R.;Chiba, K.;Heller, J.G.;Patel, T.C.;Thalgott, J.S.;Truumees, E.;Fischgrund, J.S.;Craig, M.R.;Berta, S.C. ;Wang, J.C.Bone grafting alternatives in spinal surgery. **The Spine Journal**,v. 2,p.206-215,2002.
- Vaughan, J.Osteogenesis and haematopoiesis. **Lancet**,v. 2,p.133-143,1981.

- Vital, J.M.;Gille, O.;Pointllart, V.;Pedram, M.;Bacon, P.;Razanabola, F.;Schaelderle, C. ;Azzouz, S.Course of modic 1 six months after lumbar posterior osteosynthesis. **Spine**,v. 28,p.715-721,2003.
- Weibel, E.R.;Kistler, G.S. ;Scherle, W.F.Practical stereological methods for morphometric cytology. **Journal of Cell Biology**,v. 30,p.23-38,1966.
- Xiao, R. ;Song, Y.[Gene therapy on spine fusion]. **Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi**,v. 19,p.703-707,2002.
- Xie, Y.;Chopin, D.;Morin, C.;Hardouin, P.;Zhu, Z.;Tang, J. ;Lu, J.Evaluation of the osteogenesis and biodegradation of porous biphasic ceramic in the human spine. **Biomaterials**,v. 27,p.2761-2767,2006.
- Yasui, N.;Sato, M.;Ochi, T.;Kimira, T. ;Kawahata, H.Three modes of ossification during distraction osteogenesis in the rat. **J Bone Joint Surg Br**,v. 79,p.824-830,1997.
- Zimmermann, C.E.;Thurmüller, P.;Troulis, M.J. ;Perrot, D.H.Histology of the porcine distrition wound. **Internal Journal of Oral and Maxillofacial surgery**,v. 34,p.411-419,2005.

Figura 1: Fotografia ilustrando as principais etapas do procedimento cirúrgico. Exposição cirúrgica das duas primeiras vértebras lombares. A) retirada do enxerto do processo espinhoso. B) subdivisão do enxerto em fragmentos menores. C) decorticação dos elementos posteriores. D) aposição do enxerto ósseo sobre o seu leito receptor.

	osso novo	cartilagem	fibrose
1	35,20%	10,00%	16,40%
2	41,20%	9,20%	14,40%
3	43,20%	8,00%	8,40%
4	44,40%	7,20%	11,60%
5	34,00%	4,40%	9,60%
6	47,20%	6,40%	5,60%
7	42,40%	8,00%	7,60%
8	49,20%	7,60%	7,60%
9	41,60%	1,60%	6,00%
10	28,40%	8,40%	6,00%
11	39,60%	8,00%	6,80%
12	33,60%	7,20%	2,80%
média	40%	7,20%	8,60%
desvio padrão	6,1	3,5	3,9

Tabela 1- Porcentagens dos tecidos neoformados do grupo decorticado com as respectivas médias e desvios padrões.

	osso novo	cartilagem	fibrose
1	5,20%	5,60%	35,20%
2	6,00%	11,60%	25,20%
3	3,60%	3,60%	27,20%
4	5,60%	18,80%	13,60%
5	10,00%	16,40%	25,60%
6	6,40%	19,60%	30,80%
7	8,80%	9,60%	16,00%
8	8,40%	15,60%	16,00%
9	4,40%	10,00%	9,20%
10	8,80%	5,20%	19,60%
11	16,80%	5,20%	45,60%
12	8,40%	9,20%	24,80%
média	7,70%	10,90%	24,00%
desvio padrão	3,5	5,6	10,1

Tabela 2- Porcentagens dos tecidos neoformados do grupo não decorticado com as respectivas médias e desvios padrões.

Figura 2: Neoformação tecidual nos dois grupos de animais analisados. * $p=0,0001$ ** $p=0,0002$.

Figura 3: A e B Fotomicrografia do grupo de animais não decortificados, demonstrando padrão de ossificação endocondral, A 28X e B 103X. C e D Fotomicrografia do grupo de animais decortificados, demonstrando um padrão de ossificação predominantemente intramembranoso.