

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ENXERTO ÓSSEO AUTÓLOGO RETARDADO  
Estudo Experimental da sua Incorporação

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Cirurgia, Ortopedia e Traumatologia  
Área Ortopedia e Traumatologia - para obtenção do grau de Doutor em Medicina.

Pós-Graduando: CLÁUDIO HENRIQUE BARBIERI  
Orientador: Prof. Dr. J. P. MARCONDES DE SOUZA

Ribeirão Preto  
1977

Aos meus pais que jamais esmoreceram,

À minha esposa Vera Helena pelo apoio que  
nunca faltou,

Aos meus filhos Guilherme Henrique e Alexandre  
Henrique, e o que está por vir...

## AGRADECIMENTOS -

- Ao Prof. Dr. J. P. Marcondes de Souza pela oportunidade de realizar este trabalho e pela firme orientação e apoio.
- Ao Prof. Dr. Camilo A. M. Xavier pelo incentivo e pelas sugestões.

Ao Dr. J. C. Prates Campos pelo auxílio na preparação e na interpretação dos cortes histológicos.

- Ao Prof. Dr. Sikeo Enoki, da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto, pelo auxílio no preparo dos cortes das peças impregnadas com Tetraciclina.
- Aos Profs. Drs. Ricardo R. dos Santos e Renato P. Gonçalves pelo auxílio na obtenção das fotografias que ilustram este trabalho.
- À Srta. Auristela M. Martins, dedicada funcionária do Departamento de Patologia, pela execução dos cortes histológicos.
- Aos funcionários do Laboratório de Cirurgia Experimental, Senhores Sebastião A. Mazzeto, Osmar Vani, Eurípedes G. Teixeira e Srta. Maria C. Rocha.
- À D. Arlene S. Roque, secretária da Área Ortopedia e Traumatologia, pelo precioso trabalho de datilografia e revisão.
- Aos funcionários do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, na pessoa do seu Chefe Dr. José Eduardo Laus, pela boa vontade e colaboração.
- A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho.

# I N D E X

I - INTRODUÇÃO -----	01
II - LITERATURA -----	04
A. Enxertos Ósseos em Geral-----	04
a) Origem da Osteogênese nos Enxertos Ósseos---	04
b) Tipos de Enxertos-----	08
c) Revascularização dos Enxertos Ósseos-----	17
B. Enxerto Ósseo Retardado-----	18
C. Tetraciclina - Seu emprego como marcador ósseo-	21
D. Radioisótopos como processo de Avaliação. Preco-	
ce da Integração do Enxerto Ósseo-----	24
III - MATERIAL E MÉTODO-----	28
Grupo I -----	28
Preparo da Peça para Exame Histológico-----	34
Preparo da Peça para o Estudo de Impregnação com	
Tetraciclina-----	36
Grupo II -----	40
IV - RESULTADOS -----	45
Resultados do Exame Histológico-----	45
Resultados do Exame da Fluorescência da Tetracicli	
na-----	59
Resultados de Exames Cintilográficos-----	66
V - DISCUSSÃO -----	72
VI - CONCLUSÕES -----	82
VII - BIBLIOGRAFIA -----	83
VIII - RESUMO -----	95
IX - SUMMARY -----	96

## I N T R O D U Ç Ã O

## I - INTRODUÇÃO -

Um dos grandes desafios da moderna cirurgia ortopédica tem sido o da preservação de membros afetados pela destruição de largas porções do seu esqueleto, através do emprego de enxerto ósseo.

Inúmeros pesquisadores sondaram os mais variados caminhos que levassem à correção dessas perdas ósseas, começando pelo enxerto autólogo, passando pelo homólogo e pelo heterólogo preservados, e chegando até, mais recentemente, ao emprego de corrente elétrica como estímulo da osteogênese reparadora.

Todavia, problemas de ordem imunológica, ainda não totalmente esclarecidos, desautorizam o emprego indiscriminado dos enxertos homólogos e heterólogos, enquanto que a estimulação elétrica da osteogênese, além de não estar ainda perfeitamente sistematizada, não se presta para a correção de grandes perdas ósseas.

Tem havido uma concordância geral de que esforços devam ser envidados no sentido de melhor conhecer e, se possível, melhorar as qualidades do enxerto autólogo, sem dúvida, o melhor até hoje estudado.

Por outro lado, grande parte das perdas ósseas a serem corrigidas se localizam nas diáfises dos ossos longos, regiões sujeitas a esforços de natureza mecânica, como tensão ou carga axial, quer pela tração muscular, quer pelo peso do corpo ou do próprio membro.

Assim, seria desejável que o enxerto ósseo, além de prover o leito e o material para o desenvolvimento da neo-osteogênese, fornecesse também um certo grau de apoio mecânico, visto que uma imobilização muito próxima da rígida parece ser favorável à integração do enxerto.

Evidentemente, o osso esponjoso não oferece um forte apoio mecânico, de modo que o objetivo deve ser melhorar as qualidades de integração do enxerto cortical. Embora de maneira um tanto quanto empírica, tentativas nesse sentido foram realizadas há mais de 30 anos. Assim é que Moore (1949) desenvolveu o chamado Enxerto Retardado ("Delayed Graft"), com resultados

clínicos animadores.

A técnica desse tipo de enxerto foi trazida dos Estados Unidos pelo Prof. Domingos Define, que a introduziu no Brasil. Seu discípulo, Prof. J. P. Marcondes de Souza trouxe-a para Ribeirão Preto, onde a empregou na correção de vários casos de pseudartrose congênita de tíbia, pseudartrose pós-traumática de ossos longos, pseudartrose pós-osteomielítica com grande perda diafisária de ossos longos, obtendo em quase todos os casos resultados muito bons.

Existe um outro tipo de enxerto autólogo que, possivelmente, oferece melhor resultado, devido à própria condição de manter um pedículo muscular que garante a sua irrigação. É o caso do enxerto músculo-pediculado proposto por Davis (1952, 1954, 1971), cujos resultados em operações de artrose do quadril, realizados no nosso serviço foram excelentes.

O mesmo tipo de enxerto foi utilizado por Judet e cols. (1961) e por Meyer e cols. (1973, 1974) que relataram bons resultados com o seu uso em operações de síntese de fraturas do colo femoral por via posterior.

No entanto o enxerto músculo-pediculado apresenta limitação quanto à distância em que pode ser mobilizado, já que só pode ser transplantado para área próxima da doadora.

Igualmente, o avanço das técnicas de microcirurgia possibilitou o emprego de enxertos de grandes segmentos ósseos vascularizados ("free vascularized graft"), no reparo de lesões ósseas extensas, como foi referido por Ostrup e Fredrekdon (1974), Taylor e cols. (1975) e Weyland e cols. (1977). Esses autores relataram vários casos em que transplantaram grandes segmentos ósseos vascularizados, por meio de microsutura arterial e venosa, para preencher vastos defeitos provocados por ressecções maciças de ossos afetados por tumores. O sucesso desses procedimentos parece ser incontestável, de modo que este deve ser um dos caminhos futuros, inclusive porque Tschopp (1976), em um amplo estudo experimental, demonstrou a extraordinária viabilidade do método. Todavia, a realização do enxerto ósseo vascularizado exige equipamento e treinamento especiais, além de apresentar limitações de ordem topográfica.

Com base nos nossos bons resultados clínicos obtidos com o enxerto cortical retardado, impunha-se uma comprovação experimental do seu comportamento, quanto à integração, a curto prazo, em relação ao enxerto fresco. O presente trabalho foi idealizado com as finalidades de comparar as velocidades de integração e de revascularização do enxerto cortical fresco (EF) e do enxerto cortical retardado (ER), bem como comparar a atividade metabólica dos dois tipos de enxertos.

O levantamento bibliográfico que realizamos abrangeu 4 tópicos principais: Enxertos Ósseos em Geral, Enxerto Ósseo Retardado, Emprego da Tetraciclina como Marcador Ósseo e Emprego dos Radioisótopos como Processo de Avaliação da Integração de Enxerto.

No que se refere aos Enxertos Ósseos em Geral, o levantamento não foi completo porque este não era o objetivo principal deste trabalho. Igualmente, o levantamento dos trabalhos referentes à Tetraciclina e aos Radioisótopos foi dirigido no sentido de se obter conhecimento do que nos interessava mais de perto.

Já no que tange ao Enxerto Retardado, o levantamento foi completo e o pequeno número de trabalhos citados reflete a pouca atenção que esta variedade de enxerto tem despertado, muito embora seu emprego pareça ter ampla aceitação por alguns autores de renome.

L I T E R A T U R A

II - LITERATURA -A - Enxertos Ósseos em Geral -

## a) Origem da Osteogênese nos Enxertos Ósseos:

Duhamel (1839) empreendeu um estudo experimental no qual implantou fios de prata subperiostealmente e observou, se manas mais tarde, que esses fios estavam totalmente cobertos por novo osso. Concluiu que o novo osso era produzido às custas de uma atividade osteogênica do periosteio. Flourens (1842) demonstrou conclusivamente esta propriedade do periosteio.

Ollier (1867) relatou os resultados de seus trabalhos experimentais com transplantes de osso com periosteio íntegro. Com base nas suas observações, concluiu que, em cir - cunstâncias apropriadas, o osso e o periosteio sobrevivem e podem se tornar osteogênicos. Ele acreditava que o elemento importante no caso era o periosteio.

Barth (1893), após uma série de trabalhos experimentais com enxertos ósseos autólogos, chegou à conclusão de que neles tanto o osso como o periosteio morrem, sendo substituí - dos por tecido circunvizinho produtor de osso.

G. Axhausen (1907-1909) após uma série de estudos clínicos e experimentais, concluiu que nos enxertos ósseos o osso morre mas, o periosteio sobrevive, conservando alto poder osteogênico em muitos casos. Referiu ainda que os enxertos autólogos e homólogos não são essencialmente diferentes, apenas diferindo na velocidade de integração, mas que os aa enxertos frescos são superiores aos enxertos heterólogos são pratica - mente inúteis, não devendo ser usados.

Phemister (1914), referindo os resultados de um am - plo trabalho experimental, afirmou que a osteogênese nos en - xertos ósseos ocorre à partir da camada interna do periosteio, do endosteio e, em uma extensão menor, das células sobreviventes, ósseas e fibrosas, dos canais de Havers. A viabilidade das células dos enxertos depende largamente da sua capacidade de conseguir nutrição e, em alguma extensão, do seu grau de

especialização celular. O periosteio, por estar localizado superficialmente e por ser constituído de tecido frouxo, recebe nutrição suficiente para sobreviver e proliferar, apenas às custas de embebição. As células ósseas, por estarem envoltas por uma larga barreira de matriz calcificada impermeável, sofrem necrose e reabsorção.

Levander (1934-1935) mostrou que a reorganização dos transplantes ósseos ocorre a partir de células conjuntivas pluripotenciais circunvizinhas, induzidas, provavelmente, por substâncias liberadas pela necrose do enxerto.

Paralelamente, Engström e Orell (1943), estudando o implante subcutâneo de osso homólogo conservado a 190°C, mostraram que nenhuma célula sobrevivia àquela temperatura e concluíram que toda a osteogênese verificada no enxerto possivelmente era proveniente da transformação de células circunvizinhas.

Abbott e cols. (1947), analisando os dados fornecidos por uma série de biópsias, em humanos que haviam sido previamente submetidos a operações de enxertia óssea, concluíram que elementos celulares maduros, tanto do osso esponjoso como do osso cortical, frequentemente sobrevivem ao transplante. As células sobreviventes, capazes de produzir novo osso, são aquelas localizadas no periosteio e no endosteio.

O osso cortical compacto tem menor poder osteogênico que o osso esponjoso, porque neste último a superfície revestida por endosteio é muito maior do que no primeiro. Assim, em relação a um mesmo volume de osso transplantado, o número de elementos celulares sobreviventes é maior no osso esponjoso.

Lacroix (1947) acreditava na existência de substâncias indutoras liberadas pela necrose do enxerto e denominou-as Osteogeninas. Embora não tenha conseguido isolá-las, seus extratos alcoólicos de osso produziam novo osso quando injetados em músculo.

Heiman e cols. (1949) questionaram a existência das

Osteogeninas, pois conseguiram os mesmos efeitos que Lacroix apenas com injeções de álcool puro, e Lindahl e Orell (1951) e W. Axhausen (1956) mostraram definitivamente que os extratos alcoólicos de osso não têm a menor influência sobre a neo-osteogênese.

Urist (1952), ao estudar o transplante de osso homólogo desvitalizado e descalcificado para a câmara anterior do olho de coelho, concluiu que um mecanismo de auto-indução explicava melhor os fenômenos observados. Ele propôs que os eventos se sucediam da seguinte maneira: estimuladas por produtos de degradação da matriz óssea do enxerto, células provenientes dos tecidos circunvizinhos cresceriam para dentro dele; entre essas células estariam histiócitos migrantes e células conjuntivas perivasculares pluripotenciais. Os histiócitos seriam as células indutoras e as células perivasculares as induzidas, e ambas levariam à neo-osteogênese.

W. Axhausen (1956), em um estudo experimental em cães, no qual testou enxertos homólogos conservados a  $-150^{\circ}\text{C}$  e transplantados para um leito muscular, encontrou dados que mostravam que dois tipos de osteogênese ocorrem nos enxertos: a proveniente de células sobreviventes do enxerto e a proveniente da indução de células mesenquimais pluripotenciais do receptor. Assim, a reorganização do enxerto se faria em duas fases distintas. Na primeira, há uma rápida formação de osso novo, originário de células do periósteo, da medula e dos canais ósseos. Essa fase começa na primeira semana, no enxerto autólogo, e na terceira semana, no enxerto homólogo, tendo a duração aproximada de quatro semanas. Já a segunda fase se inicia na 3a-4a. semana no autólogo e na 8a. semana no homólogo e se origina de células conjuntivas pluripotenciais do leito receptor. Quando o leito receptor é ósseo, esta fase é mais precoce.

Duthie (1958), Hurley e cols. (1959) e Danis (1960), trabalhando com enxertos envoltos em membrana Millipore, demonstraram que a osteogênese se desenvolvia apenas no interior do envoltório e não nos tecidos vizinhos. Isto significa

que ela era devida apenas à proliferação de células do próprio enxerto, o qual não induzia qualquer proliferação além de seus próprios limites. A membrana Millipore, teoricamente, permitia a passagem de substâncias filtráveis, mas não de células.

Todavia, Goldhaber (1961), num experimento semelhante, em ratos, mostrou osteogênese fora dos limites do invólucro, nos tecidos circunvizinhos. Isto indicava que a osteogênese era originária de células do próprio receptor, em resposta a algum agente indutor difusível. Buring e Urist (1967) obtiveram achados semelhantes.

Por outro lado, Chalmers (1959), estudando experimentalmente enxertos autólogos e homólogos, frescos e preservados, encontrou que grande número de células do enxerto fresco sobrevivem, iniciando os processos de neo-osteogênese rapidamente após o transplante.

Igualmente, Burwell (1961), em estudos referentes à antigenicidade dos enxertos ósseos homólogos, também encontrou que um número variável de células do enxerto sobrevive, sendo responsáveis pelos processos iniciais de neo-osteogênese. O número de células sobreviventes no enxerto é função do processo de preservação utilizado.

Ray e Sabet (1963), utilizando Timidina Tritiada como marcador celular e técnicas de auto-radiografia, num experimento com ratos recém-nascidos, demonstraram que no auto-enxerto tanto as células do enxerto como as do leito receptor contribuem para a neo-osteogênese, mas que no enxerto homólogo é limitada e derivada quase que exclusivamente do próprio enxerto.

Urist (1968), analisando os achados de um trabalho experimental em humanos, em cujo subcutâneo implantava fragmentos de osso cortical superficialmente descalcificados, sugeriu que o provável agente indutor ("Bone Induction Principle") fica retido no osso pelos cristais de Hidroxiapatita, sendo liberado mais facilmente após a descalcificação.

Bassett (1972a), discutiu as influências microambientais sobre o comportamento celular nos tecidos transplantado e receptor e afirmou que já havia provas de que células su

-perficiais dos enxertos poderiam sobreviver e dar origem a alguma osteogênese, quando os enxertos eram devidamente manuseados. Por outro lado, achava duvidoso que um número significativo de osteócitos sobrevivessem, e mesmo que o fizessem, não via como eles poderiam romper suas lacunas para se juntar às células em proliferação ao redor do enxerto. Assim, as células responsáveis pela reorganização dos enxertos, na realidade, vêm primariamente dos tecidos invasores do receptor, de modo que a sobrevivência de células não parece ser importante.

Enneking e Morris (1972) analisaram espécimes de biópsias de 11 pacientes submetidos a transplantes ósseos corticais autólogos, sendo 9 artrodeses de coluna e 2 ressecções maciças por osteossarcoma. Eles observaram que nos grandes enxertos corticais a reabitação se dá por regiões, podendo ser mais acentuada numa do que noutra, mas se concentra na periferia e nos extremos do enxerto. Em suma, o padrão de reabitação é irregular e disperso.

Submetendo os dois grandes espécimes, obtidos dos casos de osteossarcoma, a testes de carga até o ponto de rotura, observaram que esta ocorria sempre em área de maior percentual de reabitação. Concluíram que as áreas de maior reabitação são mais fracas e que a união entre o osso esponjoso receptor e o enxerto necrótico é usualmente mais forte que o próprio esponjoso.

#### b) Tipos de Enxertos:

Segundo Chase e Herndon (1955), o primeiro enxerto ósseo autólogo foi realizado por Von Walther, em 1820, e o primeiro enxerto homólogo foi obra de Macewen, em 1878. Esses dois procedimentos foram realizados de maneira empírica, mesmo porque somente os estudos de Ollier (1867), de Barth (1893) e de G. Axhausen (1907-1909) deram um cunho científico ao problema dos transplantes ósseos.

Phemister (1914), com base em seus resultados clínicos e experimentais e em dados da literatura, afirmou que os

enxertos ósseos homólogos funcionam da mesma maneira que os autólogos, mas com poder osteogênico diminuído, e que os enxertos ósseos heterólogos funcionam como um "osso morto" ou como um corpo estranho.

Albee (1923) relatou sua experiência com 3000 cirurgias de transplante ósseo, condenando os transplantes homólogos e os heterólogos, e aceitando apenas os autólogos, com base nos seus resultados clínicos. #

Lexer (1924), em relato semelhante sobre sua experiência com 1000 cirurgias de transplante ósseo, referiu que o enxerto autólogo fresco, coberto de periosteio é o mais indicado, porque nele certamente sobrevivem células. De acordo com os seus achados, os transplantes homólogos podem ser utilizados desde que o tecido do leito receptor seja capaz de ser estimulado a produzir osso; os transplantes heterólogos foram condenados, em vista dos resultados desfavoráveis.

Orell (1934-1937) desenvolveu os chamados "Os Purum", "Os Novum" e "boiled bone". O primeiro, osso de vitela desnaturado por processos químicos, era implantado no espaço subperiosteal da tíbia do receptor, onde se cobria com tecido de granulação óssea. Este último era o "Os Novum", o qual facilitava a integração do primeiro quando implantados no local definitivo. "Boiled Bone" era o osso homólogo fervido previamente à sua utilização.

Inclán (1942) relatou excelentes resultados com transplante de osso homólogo e autólogo preservados em sangue citratado à temperatura de 2 a 5°C. Referiu que seus resultados não diferiam daqueles obtidos com enxertos autólogos frescos, tendo, com isso, inaugurado a fase dos Bancos de Osso.

Wilson (1947-1951) relatou sua experiência com osso homólogo congelado a temperaturas de -20 a -29°C e externou a opinião de que o osso assim preservado não diferia do autólogo fresco.

Bosworth e cols. (1953), num estudo clínico em que empregaram osso de Banco para a Artrodese de Coluna em casos de Tuberculose Espinal, encontraram incidência de falha do

enxerto e pseudartrose cerca de 3 vezes maior do que com o enxerto autólogo fresco.

Campbell e cols. (1953), em estudo experimental em cães, no qual testaram enxertos autólogos e homólogos frescos e congelados, homólogo fervido e "Os Purum", encontraram neo-osteogênese apenas nos enxertos autólogos frescos, na série de enxertos implantados em leito muscular. Na série de enxertos implantados em leito ósseo, encontraram a neoosteogênese evidente apenas nos enxertos autólogos, embora a absorção fosse maior nos homólogos e a invasão de osso do receptor na parte esponjosa do enxerto fosse idêntica em todos os tipos. Do ponto de vista de integração, todos os enxertos foram bem sucedidos, embora os autólogos tivessem um comportamento melhor.

Siffert (1955), em estudo experimental com coelhos, em que transplantou enxertos autólogos e homólogos frescos para leito ósseo ou muscular, descreveu a acentuada superioridade do enxerto autólogo sobre o homólogo, embora este também se integrasse. Contudo, julgou não haver qualquer evidência de que o enxerto estimulasse o crescimento de osso dos tecidos vizinhos.

Vainio (1957), em experimentos com coelhos, nos quais realizava artrodese de coluna pela técnica de Albee, empregou enxerto ósseo autólogo fresco e homólogo congelado. Analisando do ponto de vista histológico, observou que ao tempo em que o enxerto autólogo se mostrava já completamente regenerado, o enxerto homólogo conservava, ainda, sua forma e dimensões originais. Além disso, observou que quando o periosteio estava íntegro no enxerto autólogo, a regeneração ocorria mais facilmente. Com base nos seus achados, Vainio acreditava que pelo menos uma parte das células do enxerto sobreviviam no enxerto autólogo.

Burke-de-la-Camp (1959), com base em trabalhos clínicos, afirmou que o enxerto autólogo fresco realmente é substituído por novo osso mais precocemente do que o homólogo congelado mas a diferença entre ambos não é acentuada, nem parece ser importante.

Carnesale e Spankus (1959) analisaram os resultados de 304 procedimentos cirúrgicos de enxertia óssea, dos quais

137 eram autólogos, 143 eram homólogos preservados em Solução de Mertiolate e 24 eram mistos.

A incidência de falha dos enxertos homólogos foi de cerca de duas vezes maior do que dos enxertos autólogos, embora a incidência de infecção tenha sido muito menor nos homólogos preservados em Mertiolate.

Concluíram que o enxerto autólogo é indubitavelmente superior ao homólogo, o qual é satisfatório em algumas situações, mas necessita de um maior período de proteção externa para sua total integração. Como suplementação para os enxertos autólogos parece ser de valor.

Chalmers (1959), num estudo experimental em ratos, realizou transplantes de enxertos autólogos frescos e homólogos frescos e preservados ("freeze-dried") com vistas a determinar o grau de antigenicidade do tecido ósseo em relação aos outros tecidos.

Observou que o enxerto autólogo fresco desenvolvia grande atividade osteogênica, após rápida revascularização, enquanto o homólogo fresco mostrava duas fases distintas de neo-osteogênese. Na primeira fase, que se inicia no 4º dia, surge osso do tipo entrelaçado ao redor do enxerto. Esse osso, proveniente de células osteogênicas do próprio enxerto, morre no 8º dia. A segunda fase se inicia na 4a. semana e o osso produzido é do tipo lamelar, que permanece aderido ao enxerto e parece derivar de células pluripotenciais do hospedeiro.

Na primeira fase foi possível observar infiltrado inflamatório ao redor do enxerto, sendo essa a possível causa da morte do novo osso então desenvolvido. Na segunda fase, o infiltrado inflamatório era menor.

O osso homólogo preservado não mostrava a primeira fase de neo-osteogênese e a segunda fase ocorria no 5º mês, em alguns casos. Todavia, aqui a inflamação era menor que no enxerto fresco. O teste de rejeição ao enxerto homólogo secundário de pele mostrou alta positividade nos animais que receberam enxerto de osso homólogo.

Maatz e Bauermeister (1961) desenvolveram o chamado Osso de Kiel. Este é um enxerto heterólogo, preparado com

osso proveniente de boi, do qual se remove todo o material orgânico por meio de processos químicos que o tornam imunologicamente inativo. Com este tipo de enxerto os autores preparavam placas, parafusos, pinos e outros implantes, tendo relatado bons resultados.

Burwell e cols. (1961a-b, 1962a-b, 1963a-b, 1964) realizaram uma série de trabalhos experimentais, em coelhos e ratos, com a finalidade de esclarecer alguns aspectos imunológicos relativos aos enxertos homólogos, pois acreditavam que sua menor osteogênese se devia a sua antigenicidade, e que esta pode ser atenuada com vistas a melhorar a oferta dos Bancos de Osso.

Assim, eles comprovaram que realmente o enxerto ósseo homólogo tem considerável potencial antigênico e que a reação do organismo receptor é maior quando este já está sensibilizado contra algum outro tecido do doador, como por exemplo, a pele.

Demonstraram, também, que o enxerto cortical é mais antigênico que o esponjoso total (com medula óssea), que a antigenicidade deste diminui quando dele se retira o tecido medular e que a antigenicidade de ambos pode ser diminuída ou anulada por alguns processos de conservação, os quais também, desafortunadamente, inibem sua capacidade osteogênica.

Um achado interessante desses autores foi o de que qualquer tipo de enxerto homólogo passa por uma fase de atividade metabólica, na primeira semana, que corresponde à primeira fase, de proliferação osteoblástica, de qualquer enxerto ósseo e que se deve às células sobreviventes do enxerto. A inibição antigênica ocorre posteriormente e afeta a segunda fase, indutora, da osteogênese do enxerto.

Finalmente eles testaram com sucesso o enxerto que denominaram homólogo-autólogo combinado e que se constitui de osso ilíaco homólogo, limpo do seu componente medular e preservado, ao qual se ajuntava o tecido medular do receptor. O estudo comparativo deste enxerto com o autólogo mostrou que a

neo-osteogênese em ambos é praticamente idêntica, bem como a antigenicidade do primeiro fica praticamente anulada.

Bassett e Creighton (1962) empreenderam um estudo experimental em cães, nos quais realizavam transplantes ósseos corticais autólogos e heterólogos preservados ("freeze -dried"), do tipo "inlay". Observaram que os enxertos heterólogos se reorganizavam e se remodelavam mais rapidamente que os autólogos, bem como não houve sinais sugestivos de "reação de rejeição" dos heterólogos.

Bassett e cols. (1962) estudaram experimentalmente a integração dos chamados implantes de "osso inorgânico", em cães, a longo prazo e do ponto de vista histológico. Observaram que após o transplante os espaços vasculares dos implantes (corticais) eram invadidos por tecido osteogênico do receptor, mas que nenhuma remodelação significativa ocorria no prazo de um ano.

Todavia, os transplantes de osso homólogo irradiado se remodelavam rápida e progressivamente, de modo que o uso clínico dos implantes de "osso inorgânico" não parece indicado.

Sieber (1954), De Tomasi (1955), Schoch (1956) e Busser (1959) acentuaram que o osso de Banco não pode substituir o enxerto autólogo fresco e que as indicações para o seu uso devem ser cuidadosamente pesadas. Todavia, Magnolfi (1958), Küppermann (1961), Arens (1964), Rehn (1964) e Schwemmer e Contzer (1964), se declararam completamente satisfeitos com o osso de Banco, aconselhando o seu uso quando necessário.

W. Axhausen (1962) chegou às conclusões semelhantes às de Vainio (1957), após extensos estudos histológicos e concluiu que, da maneira como progredem as investigações, o Banco de Osso se tornará desnecessário.

Camera (1966) analisou o emprego clínico de osso de Kiel no tratamento de diversas lesões ósseas, inclusive fraturas. Relatou que esse tipo de enxerto não pode substituir o autólogo fresco, mas que há casos em que o seu emprego é muito útil, como no preenchimento de cavidades de cistos ósseos, em que se emprega o osso de Kiel esponjoso com excelentes re-

-sultados. O osso de Kiel funcionaria por mecanismo de indução.

Kingma (1966) referiu que as falhas com o emprego do osso de Kiel são muito numerosas, atingindo porcentagens de 65% na sua casuística. Apesar de sua pequena mantegênicidade não deve ser utilizado em humanos, mesmo porque o seu uso cada vêz menor atesta sua ineficiência.

Witt (1966), igualmente, afirmou que a única vantagem do osso de Kiel é que ele pode ser preparado em uma fábrica em larga escala. Na sua opinião, o seu emprego deve ser reduzido ao máximo.

Puranen (1966) considerou que os enxertos homólogos preservados continuam sendo usados em todo o mundo, principalmente por razões quantitativas, isto é, quando são necessárias grandes quantidades de enxerto para substituir um grande segmento ósseo. Embora um enxerto homólogo seja preferível a uma prótese metálica, sempre permanece a dúvida quando se confrontam os dois materiais.

Por essa razão, empreendeu um experimento no qual analisou o transplante de vários tipos de enxertos ósseos (autólogo fresco; autólogo e homólogo congelados; autólogo mantido exposto ao ambiente da sala cirúrgica e conservado em solução fisiológica e em sangue total, pelo menos 1 hora antes do seu uso), em coelhos e à luz da marcação com Tetraciclina, in vivo. Seus achados permitiram concluir que há uma nítida diferença entre a capacidade osteogênica do enxerto autólogo fresco e a dos outros tipos.

Em primeiro lugar, o enxerto autólogo fresco se reorganiza decididamente mais rápido; em segundo lugar, o novo osso formado a partir do leito receptor era sempre em maior quantidade quando o enxerto era autólogo fresco, do que quando era de outro tipo.

Condenou a manutenção do enxerto autólogo exposto ao ar por mais de uma hora ou em solução fisiológica por mais de duas horas, visto que esses processos promoviam sensível redução na capacidade osteogênica dos enxertos, os quais passavam a se comportarem como os homólogos preservados. O autor

atribuiu esse melhor comportamento do enxerto autólogo fresco à sobrevivência de elementos celulares, inclusive osteócitos, de modo que ele não seria apenas um guia para o crescimento de osso a partir dos tecidos circunvizinhos, mas participaria ativamente do processo neo-osteogênico.

Sherk e Nicholson (1971) estudaram a influência de enxertos ósseos autólogos e homólogos, estes últimos de 1a. e 2a. séries, na consolidação de fraturas de fêmur em ratos. Demonstraram que as fraturas se consolidavam igualmente com todos os tipos de enxertos e que a reação imune aos homólogos não parece influir nem na qualidade nem no período da consolidação. Todavia, os enxertos autólogos participavam ativamente do processo de consolidação, possivelmente por indução de células do local receptor, enquanto que os enxertos homólogos permaneciam inertes, como corpos estranhos, não contribuindo, mas também não impedindo a consolidação.

Cleaton-Jones e cols. (1971) estudaram o comporta - mento de enxertos de osso homólogo irradiado e congelado, transplantados para defeitos circunscritos produzidos na mandíbula e no fêmur de ratos. Observaram que eles não estimulam nem inibem a osteogênese, não influenciando no curso da cicatrização dos defeitos ósseos.

Baadsgaard (1971) empregou osso de Kiel para obter um implante invadido por novo osso, do tipo "Os Novum". Assim, numa primeira operação, uma placa de osso de Kiel era implantada no espaço subperiosteal da tíbia de coelhos onde permanecia por 2 meses. Numa segunda operação, o osso de Kiel já invadido pelo tecido de granulação óssea, "Os Novum", transplantado para o local receptor desse mesmo animal. Observou que o osso de Kiel se mostrava totalmente envolto em novo osso do receptor, com trabéculas atravessando-o completamente, o que parece ter facilitado sobremaneira a integração do implante.

Bonfiglio e Wayburn (1972) descreveram a reação de rejeição ao enxerto homólogo de osso. Ela se manifesta por exsudatoinflamatório celular que sugere um tipo de reação hi - persensível tardia. O enxerto homólogo inicialmente prolifera,

mas depois o novo osso necrosa e se reabsorve, na medida em que o enxerto é circundado por tecido de granulação do receptor. Procedimentos de desensibilização, na sua opinião, são possíveis, de modo a permitir que o enxerto homólogo seja tolerado pelo receptor.

Goldberg e Lance (1972) estudaram a revascularização e a aposição de novo osso nos transplantes de osso autólogo e homólogo, em coelhos. Utilizaram segmentos de ilíaco de espessura total como enxerto, que era colocado em um defeito produzido no mesmo osso, em local correspondente ao da retirada do enxerto. Fazendo a avaliação por meio de radioisótopos, encontraram que o osso autólogo se revasculariza rapidamente e já mostra intensa atividade metabólica na 3a. semana. Os enxertos homólogos mostravam revascularização bem menor, discreta atividade metabólica e lenta progressão nestes dois processos. No entanto, a instituição de tratamento imunossupressor melhorou as características de integração do enxerto homólogo.

Plenk e cols. (1972) empregaram implantes de osso de Kiel impregnados com medula óssea do receptor para corrigir defeitos ósseos produzidos no ilíaco de ratos e observaram que esse tipo de enxerto mostrou acentuada produção de novo osso. Por outro lado, o osso de Kiel puro mostrou quase nenhuma neo-osteogênese.

Salama e cols. (1973) estudaram, igualmente, o transplante de osso heterólogo, dos tipos de Kiel e de Oswestry, impregnados com medula óssea do receptor, com o que conseguiram incrementar a estimulação da neo-osteogênese, a qual, todavia, parecia derivar apenas das células da medula óssea impregnadas no implante.

Elves e Salama (1974) obtiveram pronta resposta imunológica à presença de hetero-enxertos frescos do ilíaco, com seu total conteúdo medular. A presença de anticorpos já foi detectada no 6º dia após o transplante do enxerto. Já o transplante do mesmo tipo de osso, lavado do seu conteúdo medular, mostrou menor produção de anticorpos, que foi menor ainda com o osso de Kiel impregnado com medula do receptor. Esses anticorpos foram detectados por meio de técnicas de citotoxicida-

-de.

c) Revascularização dos Enxertos Ósseos:

Stringa (1957) realizou um detalhado estudo sobre a revascularização dos enxertos ósseos. Assim, ele realizava um tríplice transplante (enxertos autólogo, homólogo e heterólogo) para a cavidade medular do fêmur ou para o espaço subcapsular renal, em coelhos, e analisava a evolução da revascularização, em períodos variados, utilizando técnicas histológicas com corantes vitais (Azul de Berlin), micro-radiografia com Micropaque e diafanização das peças pela técnica de Spalteholz.

Observou que a revascularização dos enxertos heterólogos corticais era 6 vezes mais lenta do que a dos autólogos e homólogos. Nestes últimos, todavia, grandes áreas permaneciam avasculares por longo tempo (90 dias, final da experiência).

Encontrou ainda aspectos sugestivos de recanalização de vasos pré-existentes, nos enxertos corticais autólogos, já na primeira semana de transplante. Na terceira semana já havia uma rede vascular intra-enxerto e na 12a. semana o enxerto já estava totalmente integrado, tendo praticamente desaparecido. Os enxertos corticais homólogos mostravam revascularização sensivelmente menor, para os mesmos períodos, e os heterólogos mostravam praticamente nenhum vaso penetrando profundamente ao final dos 90 dias.

Concluiu que havia uma correlação direta entre o grau de revascularização e a integração do enxerto.

Deleu e Trueta (1965) estudaram a revascularização de enxertos autólogos e homólogos transplantados para a câmara anterior do olho de cobaias, utilizando, também, microangiografia e micro-radiografia. Concluíram que os melhores enxertos eram o autólogo esponjoso, seguido do autólogo cortical, e que isto está na razão direta da rapidez de revascularização. Enfatizaram que a velocidade de revascularização depende não apenas da afinidade do enxerto com o leito receptor,

mas também das facilidades oferecidas pelo enxerto à penetração por vasos do hospedeiro, como é o caso do enxerto esponjoso.

Ray (1973) chegou a conclusões semelhantes após estudar o transplante autólogo e homólogo de todo o fêmur de ratos de 1 dia de idade para um leito subcutâneo. Empregou, para suas análises, apenas a marcação com Timidina T<sup>3</sup>itida, com o que de monstrou inclusive a sobrevivência de osteócitos.

#### B) - Enxerto Ósseo Retardado -

Orell (1937), conforme referimos anteriormente desenvolveu o chamado "Os Novum", que era, na realidade, o tecido os<sup>te</sup>oide neoformado, profusamente vascularizado, que se desenvolvia sobre placas de "Os Purum" (osso heterólogo desvitalizado por processos químicos) previamente colocadas no espaço subperiostal da face ântero-medial da tíbia do receptor, onde permaneciam por um período variável de tempo de preparo, antes da utilização definitiva. O próprio Orell chamou a esse processo, em mais de uma v<sup>ez</sup>, embora não de forma batismal, "Tranplante Ós - seo Retardado" ("Delayed Bone Transplantation").

Moore (1949) relatou os resultados do tratamento de 8 pacientes portadores de Pseudoartrose Congênita, nos quais em - pregara um processo que chamara de "Enxerto Ósseo Autógeno Re - tardado". Esse processo consistia do seguinte: num primeiro ato cirúrgico era reparado, na tíbia ou no fêmur normal do pacien - te, um enxerto na forma de uma janela cortical, com as dimen - sões adequadas a sua utilização posterior; este enxerto, após totalmente recortado e separado do leito de origem, era recolocado no mesmo local e aí permanecia por um período de 3 semanas.

Após esse período, o enxerto era retirado cuidadosa - mente, de modo a não lesar o tecido de granulação a ele aderido e fixado ao leito receptor da tíbia ou do fêmur doentes.

O exame microscópico de secções do enxerto assim pre - parado revelou a presença de osso adulto morto, envolto por um tecido osteoide de intensa atividade osteoblástica, que o inva - dia em muitos pontos.

A fosfatase alcalina, medida em 4 de seus pacientes ,

mostrou uma elevação da ordem de até 15% durante o período de espera do enxerto.

Seus resultados foram muito bons e ele concluiu que o enxerto retardado estimula a osteogênese e que, talvez, o suprimento extra de fosfatase alcalina provido pelo osteóide aderido ao osso morto fosse o fator estimulante.

Green (1949), discutindo o trabalho de Moore, considerou que o seu processo podia ser considerado uma evolução do "Os Purum - Os Novum" de Orell, com a vantagem de ser autólogo.

Siffert e Barash (1961), em trabalho experimental com cães e coelhos, estudaram o efeito do retardo sobre o transplante de enxerto autólogo do ilíaco para um defeito previamente produzido na ulna. O que eles denominaram enxerto retardado era uma lâmina recortada da tábua externa do ilíaco e ao qual ficava aderida por meio de uma fratura incompleta (galho verde) de uma de suas bordas. Essa lâmina permanecia no local durante 3 semanas, sendo então transplantada, juntamente com o calo ósseo a ela aderido, para o defeito produzido na ulna.

Seus achados levaram-nos a concluir que o calo ósseo ligado ao enxerto morre, da mesma maneira que o enxerto, após o transplante, de modo que a influência do retardo parece ser pouca ou nenhuma.

Lima (1965), num estudo experimental em cães, em que comparou transplantes ósseos corticais, frescos e retardados, encontrou que o enxerto retardado é revascularizado e reorganizado mais precocemente que o fresco. Todavia, empregou um período de retardo de 40 dias, que corresponde ao dobro do que recomendam os outros autores.

Eyre-Brook e cols. (1969) relataram 3 casos de pseudoartrose congênita de tíbia tratados de acordo com a técnica de McFarland (1939-1940), mas nos quais utilizaram enxerto cortical autólogo retardado, ao invés de fresco. Sua opinião, com base em dados radiológicos, era de que o enxerto retardado era integrado mais fácil e rapidamente, fato que provavelmente se devia ao calo ósseo abundante que o enxerto le-

-vava consigo, no momento do transplante.

De acordo com esses autores, o fato de o enxerto retardado se integrar mais rapidamente representa uma grande vantagem, já que, usualmente, o enxerto fresco leva até 5 anos para se revascularizar por completo.

Nelson (1972) estudou experimentalmente, de forma minuciosa, os efeitos do retardo sobre o transplante ósseo autôlogo esponjoso e cortical, em coelhos. Empregou, para tanto, sofisticadas técnicas de marcadores fluorescentes, de marcação com Tetraciclina e de microangiografia, além das técnicas histológicas padronizadas.

O enxerto por ele utilizado, fresco ou retardado, era proveniente da asa ilíaca e constava de um cilindro de 0,5 cm de diâmetro, cujas bases eram as corticais interna e externa do ilíaco, entre as quais estava o osso esponjoso. Esse enxerto era transplantado para um defeito produzido na diáfise da ulna pela ressecção de um segmento de 1cm de comprimento.

Observou que o enxerto retardado leva consigo uma grande quantidade de tecido de granulação osteóide ou calo ósseo e que o hematoma pós-cirúrgico representa uma "barreira" à passagem dos vasos até o 3º dia do transplante. Após esse curto período, os vasos atingem o enxerto e "procuram" orifícios de vasos pré-existentes, por onde penetram, o que fazem apenas depois de percorrer a superfície do enxerto por extensão variável.

A histologia mostrou que há células vivas em ambos os tipos de enxerto, mas os estudos com marcadores fluorescentes e com a Tetraciclina revelaram que elas estão em inatividade metabólica.

Concluiu que o enxerto retardado se revasculariza e se reorganiza bem mais precocemente que o fresco, o que atribuiu ao fato de que o calo ósseo formado sobre o enxerto retardado aumenta consideravelmente a sua superfície de contato, tornando-a mais porosa. Essa maior porosidade seria devida a que o calo ósseo confere ao enxerto um padrão esponjoso de arquitetura óssea superficial, além de lhe aumentar de muitas vezes o grau de celularidade.

De seu relato depreende-se que esses achados e conclusões são muito mais pertinentes ao osso esponjoso, parecendo que o autor não se preocupou muito com a cortical.

Campanacci e cols. (1975), num trabalho de revisão da literatura, citam, dentre vários outros processos, o enxerto cortical retardado usado como by-pass, à McFarland, como sendo um dos métodos de escolha no tratamento da Pseudoartrose Congênita de Tíbia.

#### CII - Tetraciclina - Seu Emprego como Marcador Ósseo.-

Segundo Sissons (1956), J. Belchier, em 1736, já havia relatado que os ossos dos porcos alimentados com raiz de Rubia tinctoria apresentavam coloração avermelhada. Duhamel e Hunter, separadamente, por volta de 1750, realizaram estudos sobre o crescimento ósseo, empregando a Rubia tinctoria.

Da raiz da Rubia tinctoria extraiu-se a "Alizarin red S", produto que purificado é hidrossolúvel, podendo ser administrado por qualquer via, usualmente a intraperitonal, em solução aquosa a 1%.

Massler e Schour (1951), Craven (1956), Erickson e Ogilvie (1958), Hoyte (1960), Johamussen (1961), Dixon e Hoyte (1963) empregaram a alizarina para medir o crescimento ósseo, em trabalhos experimentais com diversos animais. Harris e cols. (1964) compararam a impregnação com a alizarina, avaliada pela sua fluorescência ao microscópio de luz ultravioleta, em relação a dados de microscopia eletrônica e concluíram que aquele corante leva a uma diminuição significativa da osteogênese.

Milch e cols. (1957) relataram suas observações de um trabalho experimental em que utilizaram várias espécies animais e 3 tipos de Tetraciclina. Referiram que fluorescência de cor amarelo-ouro aparecia em todos os tecidos, exceto no cérebro, quase imediatamente após injeção endovenosa e 30 minutos após injeção intraperitonal de Tetraciclina. Esta fluorescência desaparece de todos os tecidos, exceto dos ossos, ao final de 6 horas. Nos ossos a fluorescência permaneceu por todo o período de experimentação (10 semanas) e, microscópica -

-mente, sua localização se limitava às áreas de neoformação óssea. Os autores já sugeriram que, possivelmente, a Tetraciclina ou um seu derivado metabólico se ligava ao cálcio e/ou à matriz do osso neoformado.

Esses mesmos autores, após analisarem espécimes de biópsias, referiram que idêntico fenômeno se observava em humanos (Milch e cols. 1958).

Desde então, o método de marcação do osso com Tetraciclina tem sido empregado com sucesso para medir a osteogênese em inúmeras situações clínicas e experimentais (Harris, 1960; Frost e cols., 1960; Vanderhoeft e col., 1963; Smeenk e cols. 1963; Landry e Fleisch, 1964; Puranen, 1966; Lee, 1967; Enoki, 1971; Österman, 1972).

Rokkanen e cols. (1963) afirmaram que do ponto de vista experimental tem grande importância o fato de que a Tetraciclina só se deposita em osso jovem, neo-formado, não se depositando em cartilagem, osteoide ou osso necrótico.

Muzii (1961) e Urist e Ibsen (1963) consideraram o método superior até mesmo à auto-radiografia, com base no fato de que 99% da Tetraciclina se liga ao osso metabólico, lábil, e apenas 1% se liga ao osso estrutural, estável, o que confere às faixas de deposição alto grau de resolução óptica.

Urist e Ibsen (1963) e Urist e McLean (1963) estabeleceram, com bases experimentais, que a Tetraciclina se liga, de forma inalterada e por mecanismo de quelação, a átomos de cálcio situados superficialmente nos locais de nucleação dos cristais de apatita, no osso neoformado. No osso jovem, recentemente formado e calcificado, os cristais de apatita são menores e formam uma grande superfície de contato, suspensa em tecido de grande conteúdo aquoso e alta reatividade da apatita deficiente de cálcio. Daí a grande concentração de Tetraciclina nesses locais.

Cerca de 24 horas após a mineralização a apatita deficiente de cálcio se transforma em hidroxiapatita, menos reativa. Seus cristais se tornam maiores e a matriz óssea perde água, tornando-se compacta. Isto aprisiona as moléculas de Tetraciclina já depositadas e impede a penetração de novas molé-

-culas.

Puranen (1966) afirma literalmente que a "Tetraciclina dada por boca ou parenteralmente é distribuída difusamente no organismo mas, após 24 horas já desapareceu dos tecidos moles, permanecendo apenas nos tecidos calcificados. O osso marcado com Tetraciclina aparece", ao microscópio de luz ultra-violeta, "como faixas de nítidos limites, de cor amarela, que estão paralelas às lamelas e na própria substância destas. As faixas não cruzam lamelas ou linhas de cimento e sua largura é função direta da duração da administração de Tetraciclina e do grau de mineralização do osteóide. Após a suspensão da administração, o osso marcado se cobre de osso não marcado, a menos que o crescimento ósseo aposicional cesse. Uma vez depositada no osso, a Tetraciclina e sua fluorescência permanecem até que a reabsorção óssea resulte no seu desaparecimento, o que implica em que no indivíduo adulto a fluorescência permanece por anos, mas no indivíduo em crescimento desaparece rapidamente".

Tapp (1966a-b), após estudos experimentais em coelhos, nos quais mediu o crescimento ósseo por meio da marcação com Tetraciclina, concluiu que as principais limitações do método são que nos animais muito jovens as faixas de deposição no osso marcado têm limites indistintos e, neles, a remodelação ocorre rapidamente. Nos animais próximos da maturidade o crescimento ósseo é lento, razão da necessidade de se dar maiores intervalos entre as injeções (geralmente maiores de 14 dias). Todavia, considerou o método excelente para detectar alterações nos processos básicos de formação e reabsorção ósseas.

Vanderhoeft e cols. (1962) e Harris e cols. (1962) consideraram que uma falha do método é o fato de que a quantificação da osteogênese, através da medida da espessura das faixas de deposição de Tetraciclina ou da distância entre duas faixas, é difícil e pode levar a dados incorretos.

No entanto, Frost (1963) relatou bons resultados, em humanos, quando quantificou a osteogênese por meio da impregnação com Tetraciclina e avaliou suas medidas por meio de complicados testes matemáticos.

Puranen (1966), no seu estudo à respeito da integração de enxertos ósseos utilizou o método da Tetraciclina, mas, empregou um processo de avaliação semiquantitativo.

No nosso meio, Enoki (1971) mediu o crescimento transversal do dente incisivo em ratos normais e em ratos diabéticos aloxânicos, através da medida da largura dos anéis de deposição de Tetraciclina, empregando processos planimétrico e gravimétrico. Todavia, o dente do rato tem um crescimento transversal semelhante ao de um único osteon, o que facilita sobremaneira a aplicação do processo.

Puranen (1966) e Östermann (1972) consideraram que, para os experimentos mais complexos, a simples avaliação qualitativa, ou semiquantitativa, sem quantificação absoluta, das faixas de deposição de Tetraciclina, já é muito satisfatória.

#### D' - Radioisótopos como Processo de Avaliação Precoce da Integração do Enxerto Ósseo -

Treadwell e cols. (1942) empregaram, pela primeira vez um radioisótopo (Estrôncio 85) para medir a atividade metabólica de tumores ósseo, por meio da medida da radio-atividade com contador Geiger, com resultados positivos. Dessa maneira inauguraram a fase do emprego dos radioisótopos para tais fins.

Fleming e cols. (1961), Skalaroff e Charkes (1963-1964), Charkes e cols. (1964), Charkes e Sklaroff (1964), Charkes e cols. (1966-1968) e McAfee e Subramanian (1969) desenvolveram, acentadamente a técnica do mapeamento ósseo, empregando principalmente o Estrôncio (Sr 85) e o Fluor (F18), com a finalidade primeira de diagnosticar tumores metastáticos do esqueleto.

Subramanian e McAfee (1971) consideraram que o Sr85 e o F18 eram pouco práticos para o uso clínico ou experimental, o primeiro por ter meia-vida muito longa e expor o paciente a doses desnecessárias de radiação, e o segundo por ter meia-vida muito curta (+-2 horas). Passaram, então, a pesquisar o Tecnécio (Tc99<sup>m</sup>), que já vinha sendo usado para mapeamentos de outros órgãos desde 1969, e cuja obtenção é

relativamente simples e sempre possível, graças a um gerador de Molibdênio ( $\text{Mo}99^m$ ) que pode ser mantido em laboratório.

O  $\text{Tc}99^m$  é um isótopo que apresenta propriedades físicas que o tornam quase ideal para o uso clínico e experimental, pois sua meia-vida é de 6 horas, emite radiação pura, monoenergética, de raios gama facilmente detectada pelos aparelhos mapeadores e seu manuseio envolve a absorção, pelo operador e pelo paciente, de doses toleráveis de radiação.

Do ponto de vista dos estudos esqueléticos, seu inconveniente é que ele não se fixa, in natura, no tecido ósseo. Todavia, ele se combina facilmente com compostos polifosfatados, os quais, por sua vez, têm avidêz pelo osso. Por essa razão, os autores desenvolveram o composto  $\text{Tc}99^m$ -tripoli-fosfato com o qual obtiveram bons resultados.

Subramanian e cols. (1972a), em seguida, desenvolveram o  $\text{Tc}99^m$ -polifosfato de cadeia longa e Subramanian e cols. (1972b), Castronovo e Callahan (1972) e Yano e cols. (1973), independentemente, desenvolveram o  $\text{Tc}99^m$ -hidróxidifosfonato. Todos esses compostos polifosfatados apresentaram bom rendimento e boa definição de imagem, embora tivessem como inconveniente a síntese e o controle de qualidade relativamente difíceis, além de apresentarem, ainda, excessiva avidéz por outros tecidos, tais como o hepático e o renal.

Perez e cols. (1972) desenvolveram o  $\text{Tc}99^m$ -pirofosfato que apresentou excelentes resultados quanto ao rendimento e à definição de imagem, embora ainda mostrasse alta concentração hepática, fenômeno que parecia estar mais ligado ao modo de preparo da solução.

Hosain (1973) desenvolveu, então, um processo químico muito simples e altamente reprodutível de preparo do  $\text{Tc}99^m$ -pirofosfato, que o dotou de melhores qualidades físico-químicas para o uso em mapeamentos esqueléticos e de excelente estabilidade química.

Fletcher e cols. (1973) e Rain e cols. (1973) demonstraram clinicamente que esse último produto apresenta alta concentração esquelética e baixa concentração hepática, além de "clearances" renal e do sangue rápidos, que permitem que o

exame cintilográfico seja realizado já 1 hora após a administração do composto.

Lavender e cols. (1972), Huriet e cols. (1973), Papadimitrous e cols. (1974), Weber e cols. (1974), Flowers (1974), Citrin e cols. (1974) e Rosenfield (1974), empregaram largamente o mapeamento esquelético com os compostos fosfatados do  $Tc99^m$  para o esclarecimento de várias afecções esqueléticas, notadamente metástases de tumores à distância ou tumores do próprio esqueleto.

Lavender e cols. (1972), Weber e cols. (1974), Rosenfield e cols. (1974) e Barrett e Smith (1974), realizando exames cintilográficos comparados, demonstraram a superioridade do  $Tc99^m$  sobre o  $F18$ , quer quanto às suas características físicas, quer quanto à qualidade das imagens obtidas e ao rendimento.

Todavia, de acordo com Thrall e cols. (1974), as melhores imagens com o  $Tc99^m$  são obtidas em jovens, cujo esqueleto em crescimento acelerado capta intensamente o isótopo. Já nos velhos, como o metabolismo ósseo é menos acelerado, as imagens esqueléticas são prejudicadas pela radiação de fundo do  $Tc99^m$  circulante. De maneira geral, o isótopo tende a se concentrar em locais onde o metabolismo é elevado, como por exemplo as regiões periarticulares, os núcleos de ossificação e os tumores ósseos.

Stevenson e cols. (1974) empregaram o mapeamento ósseo com o  $Tc99^m$ , pelo processo linear e pela gama-câmara, para avaliar a integração de enxertos autólogos e homólogos. Eles produziam um defeito pela ressecção de um segmento de 1cm de comprimento na ulna de cães e aí introduziam o enxerto a ser testado. Realizavam exames cintilográficos periodicamente, comparando-os com exames radiográficos da mesma data. Os seus achados atestaram a precocidade dos dados fornecidos pela cintilografia, os quais, analisados por um computador, permitiram definir graficamente um padrão de cicatrização óssea. Por meio do gráfico obtido em cada caso em especial julgavam ser possível prever a evolução da cicatrização de um osso fraturado ou de um enxerto, quando comparado com o gráfico-padrão.

Kelly e cols. (1975) realizaram um experimento no qual testaram a integração de enxertos autólogos e homólogos em defeitos produzidos em ambos os ramos da mandíbula de cães; do mesmo modo, demonstraram a utilidade dos dados fornecidos pela cintilografia, no que se refere à sua precocidade em relação aos achados radiológicos. Além disso, deixaram patente a maior confiabilidade da cintilografia em relação à radiografia, tendo em vista a coincidência dos achados daquela com a observação macroscópica das peças obtidas após o sacrifício dos animais.

Kelly e cols. (1976) referiram que o emprego de radioisótopos para avaliar a integração de enxertos é um método muito sensível, mas que não identifica os processos biológicos específicos que estão ocorrendo.

M A T E R I A L            E            M É T O D O

### III - MATERIAL E MÉTODO -

Foram realizados dois grupos de experiências utilizando-se como animal de experimentação o cão. Ao todo foram operados 32 cães mestiços, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

#### Grupo I -

No grupo I foram operados 24 cães que foram divididos em 3 sub-grupos, quanto ao período de observação após o transplante dos enxertos. O sub-grupo Ia constou de 10 cães, o sub-grupo Ib de 8 cães e o sub-grupo Ic de 6 cães. Morreram 5 cães, sendo 2 no sub-grupo Ia, 2 no sub-grupo Ib e 1 no sub-grupo Ic, de modo que restaram 19 cães para o estudo.

O peso mínimo dos cães foi de 12kg e o peso máximo de 18kg, com média de 15,5kg.

Dos 24 cães, 14 eram machos e 10 eram fêmeas. Essa distribuição foi casual, ocorrendo por conta do Biotério Central. Não houve preocupação com a idade dos cães, tendo em vista o tipo de animal que é fornecido pelo Biotério Central. Todavia, atentou-se para o estado nutricional e de saúde aparentes dos animais, tendo sido rejeitados aqueles que estivessem evidentemente magros ou debilitados. A dieta fornecida aos cães foi a já padronizada pelo Biotério Central e que constava, basicamente, de polenta e carne.

Os cães foram operados à razão de 2 por semana e cada cão foi operado duas vezes. Os procedimentos cirúrgicos foram todos realizados sob anestesia geral, que constou de injeção endovenosa de Nembutal (Abbott), na dose de 33mg/kg de peso. Essa dose em geral é suficiente para os atos cirúrgicos de cerca de 1 hora de duração, sem necessidade de intubação.

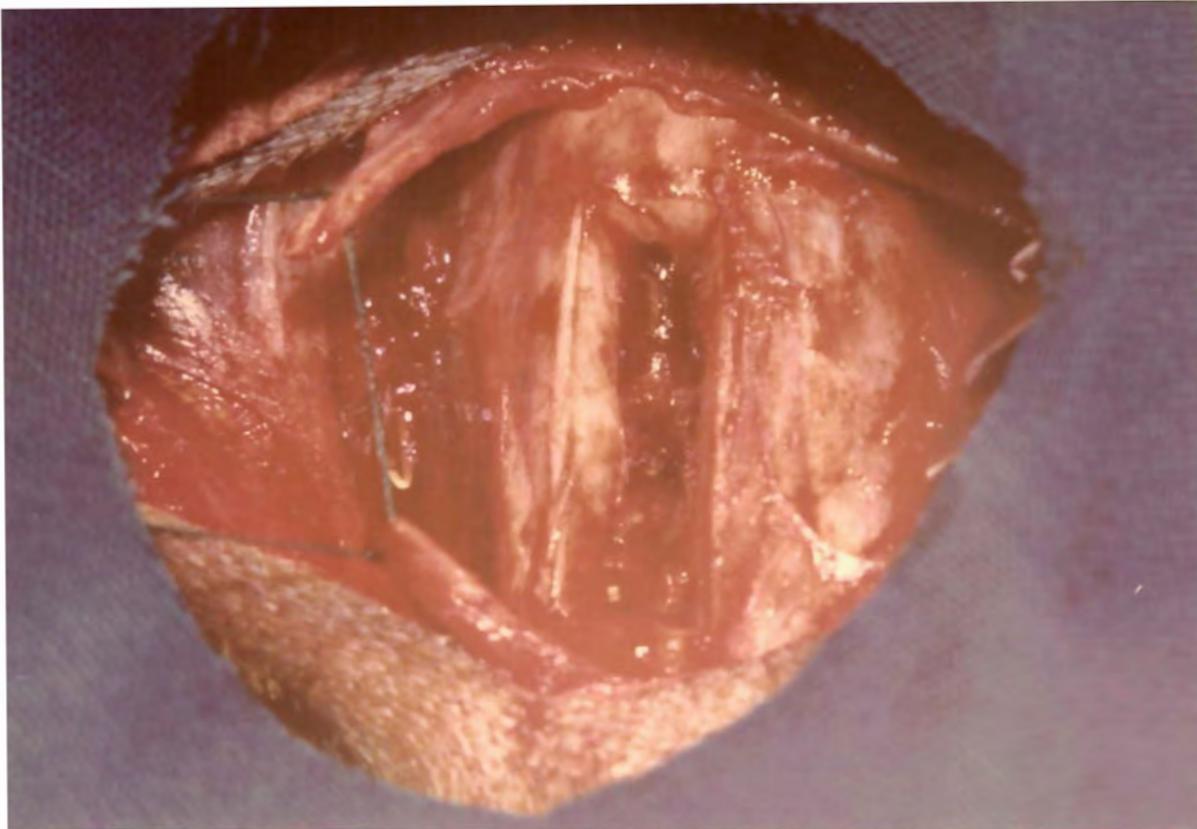
A primeira operação era destinada ao preparo do Enxerto Cortical Retardado (ER). Esse procedimento, sempre rea-

- lizado na tíbia direita, constava dos seguintes passos:
- Raspagem dos pelos das faces medial e lateral da perna direita, desde o joelho até o tornozelo; antissepsia com tintura de iodo; colocação dos campos cirúrgicos.
- Incisão na face ântero-medial da perna, no seu terço médio; exposição dos planos ósseos que neste local são superficiais;
- Incisão do periósteo com bisturi, na face ântero-medial da tíbia, formando um retângulo de 2 x 0,5cm sobre a cortical diafisária.
- Osteotomia da cortical, seguindo a orientação do retângulo anteriormente traçado, com osteótomos delicados de Lambotte, com largura das lâminas de 4, 8 e 12mm. Essa osteotomia era realizada de maneira lenta e progressiva, com aprofundamento homogêneo da lâmina do osteótomo de modo a se evitar quebra da cortical.
- Destacado o enxerto, em forma de janela cortical, ele era lavado em solução fisiológica e recolocado no leito, sem alterar sua orientação, mas deixando um desnível de cerca de 1mm em relação à superfície diafisária, o que facilitava sua localização pelo tato no momento de reutilizá-lo, como mostra a fig. 1a e 1b.
- A ferida cirúrgica era fechada por planos utilizando-se os planos musculares e fasciais profundos para cobrir o enxerto.
- Após a sutura da pele com fio Sutopak 00 (Johnson & Johnson), a ferida cirúrgica era coberta com gase e a perna enfaixada.

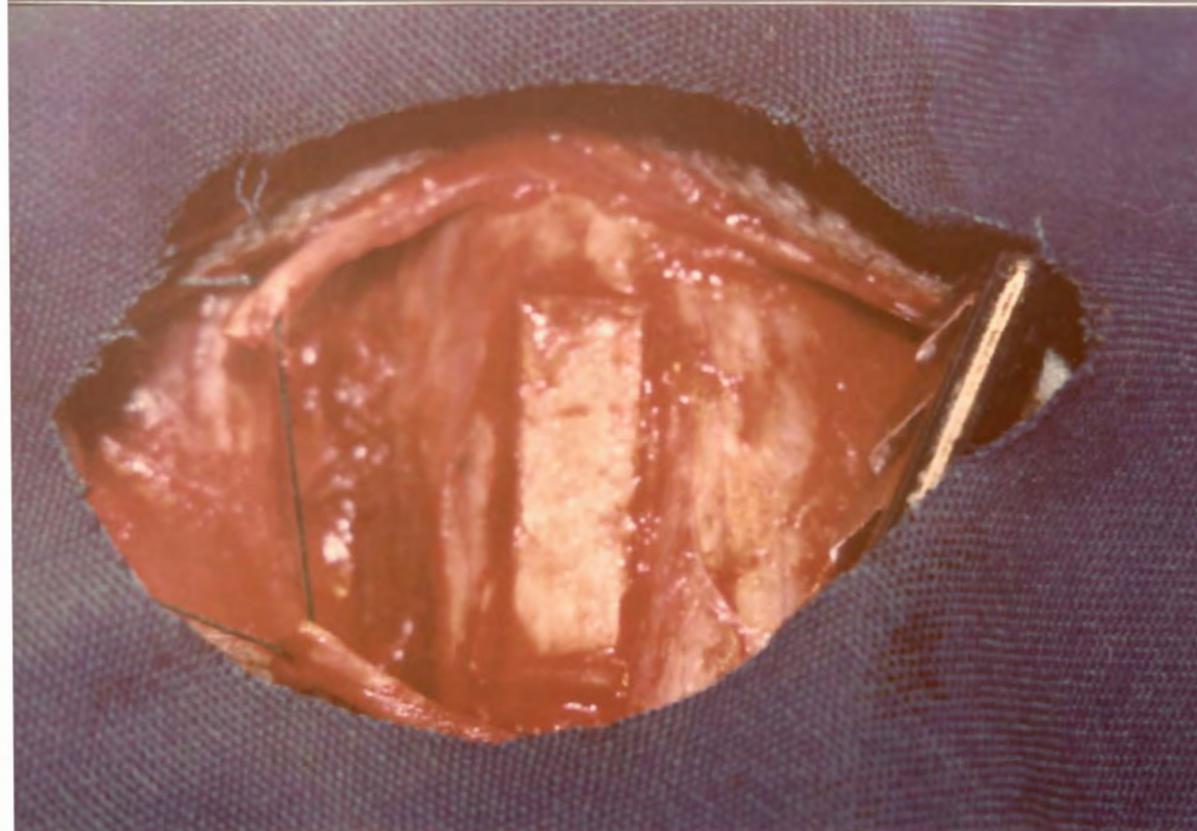
Após essa primeira intervenção, que está representada na fig. 2, aguardava-se o término do período de 3 semanas de retardo e realizava-se a segunda operação, que consistia da transposição do ER para o local receptor. Esse segundo ato cirúrgico constava de duas etapas, cujos passos eram os seguintes:

1a. Etapa:-

- Preparo de ambas as pernas do cão, da mesma maneira que para a primeira operação.



A



B

Fig.1: Fotografia intra-operat6ria. Preparo do Enxerto Retardado.

A) Observa-se o leito de onde foi retirada, temporariamente, a janela cortical.

B) A janela cortical foi recolocada no seu leito, onde permanecer6 por 3 semanas. Percebe-se que o enxerto fica saliente cerca de 1mm em rela76o ao leito.

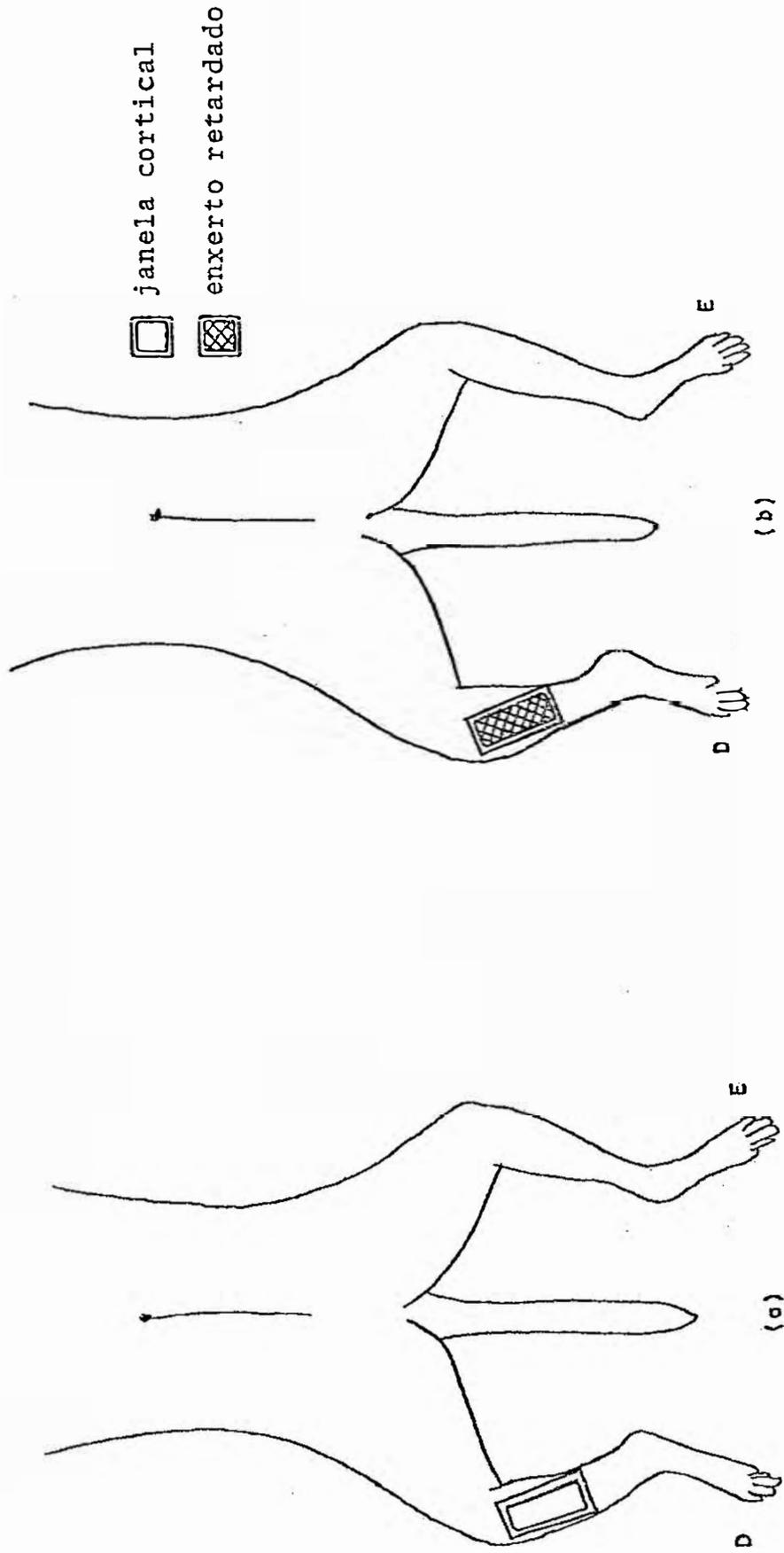


FIG. 2: PREPARAÇÃO E TRANSPLANTE DO ENXERTO RETARDADO.  
a) UMA JANELA CORTICAL FOI RECORTADA E RECOLOCADA NO SEU SÍTIO ORIGINAL,  
NA TÍBIA DIREITA, PARA ORIGINAL O ER;  
b) APÓS 3 SEMANAS, O ER (TÍBIA DIREITA) ESTÁ PRONTO PARA O TRANSPLANTE.

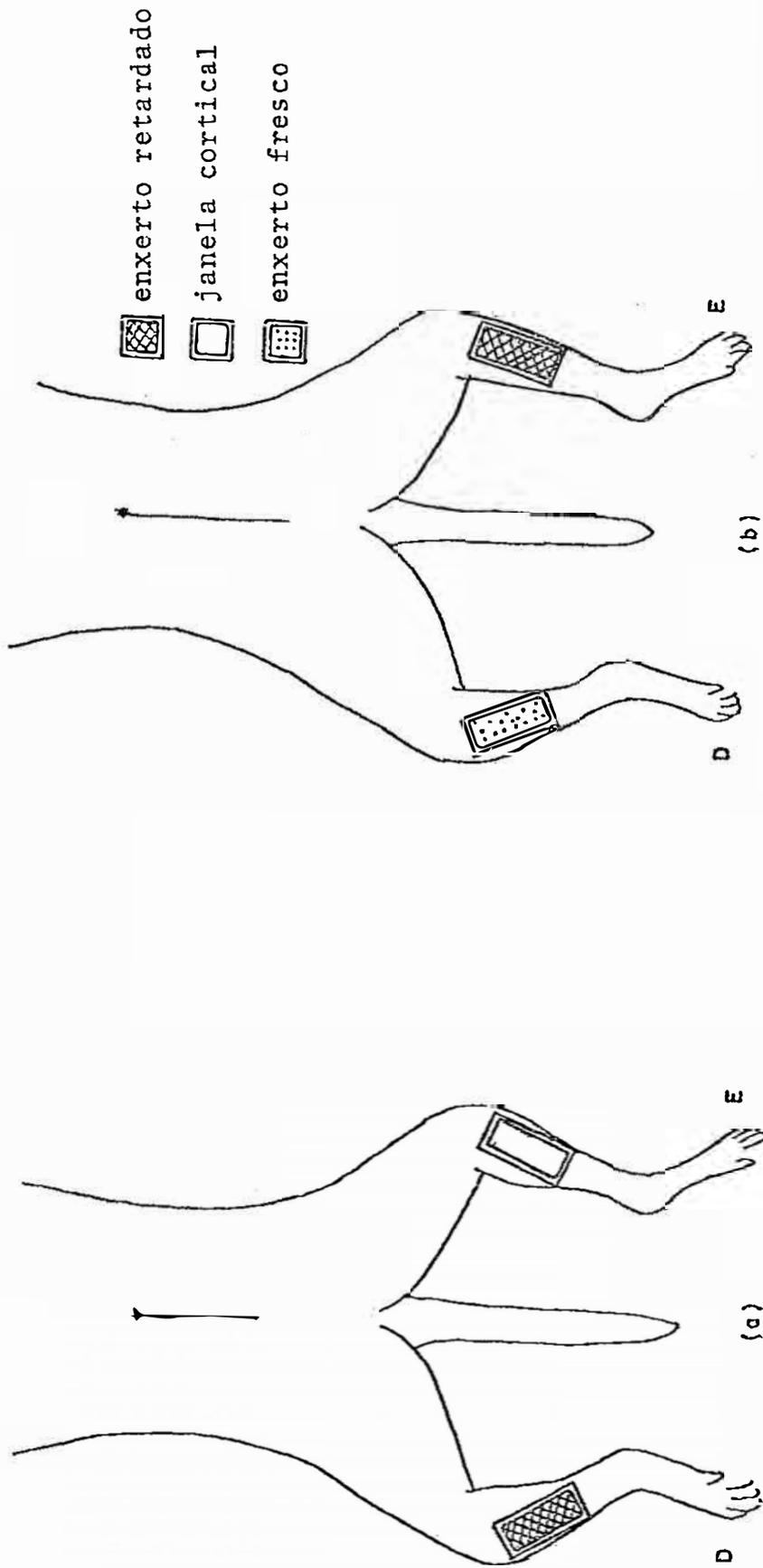


FIG. 3: (CONTINUAÇÃO DA FIG. 2).

- a) UMA JANELA CORTICAL É RECORTADA E PREPARADA NA TÍBIA ESQUERDA DA MESMA MANEIRA QUE O FOI A DA TÍBIA DIREITA (2-A);
- b) O ER (2-B) DA TÍBIA DIREITA É TRANSPLANTADO PARA A TÍBIA ESQUERDA E A JANELA RETIRADA ANTERIORMENTE DA TÍBIA ESQUERDA (3-A), QUE CONSTITUE O EF, É IMEDIATAMENTE TRANSPOSTA PARA A TÍBIA DIREITA (3-B).

- Incisão na perna direita exatamente sobre a cicatriz da incisão anterior e dissecação dos planos profundos.
- Localização do enxerto através da palpação do seu relevo e retirada do mesmo com auxílio de um osteótomo de Lambotte, com cuidado para não remover o tecido de granulação a ele aderido, Após retirado o enxerto era deixado em soro fisiológico até sua utilização, cujo tempo não ultrapassava de 15 minutos.

#### 2a. Etapa:-

- Operando-se agora na perna esquerda do mesmo cão, procedia-se da mesma maneira como foi visto para o preparo do ER, repetindo-se todos os passos igualmente até a obtenção de uma janela cortical de 2 x 0,5cm. Esta janela cortical seria o Enxerto Fresco (EF), que constituiria o controle para o ER, como está representado esquematicamente na fig. 3.
- Obtida a janela cortical, ela era lavada em solução fisiológica e colocada no vazío de onde se havia retirado o ER, na perna direita; esse leito era previamente curetado a fim de ficar livre de qualquer tecido de granulação ou calo ósseo.
- A seguir, o ER era recolocado agora no leito obtido imediatamente antes na tíbia esquerda. Ambos os ER e EF, tinham respeitada sua orientação, isto é, na face periosteal continuava voltada para fora e sua extremidade proximal continua sendo proximal.
- Finalmente, as feridas operatórias eram fechadas da maneira já descrita anteriormente. Após as operações os cães recebiam injeções diárias de Ampicilina (Soma - 250mg, Novaquímica), durante 4 dias. Após essa segunda operação obtínhamos o que mostra a fig. 3.

Os cães do sub-grupo Ia receberam 2 injeções de Tetraciclina\*, sendo uma no final da 1a. semana após a cirurgia de transferência dos enxertos e outra na véspera do sacrifício, na semana seguinte.

Os cães do sub-grupo Ib receberam 4 injeções de Terramicina, semanalmente, a começar do final da 1a. semana até

---

(\* ) Terramicina (Oxitetraciclina, Pfizer).

o final da 4a. semana, na véspera do sacrifício.

Os cães do sub-grupo Ic também receberam 4 injeções de Tetraciclina, a saber: na 1a., na 2a., na 4a. e na 8a. semanas, sendo esta última na véspera do sacrifício.

A dose de Tetraciclina empregada foi de 50mg/kg de peso, que é a dose mais frequentemente empregada pelos autores (Frost, (1963); Puranen, (1966)). Os cães assim operados e tratados com a Tetraciclina foram sacrificados após 2, 4 e 8 semanas, conforme pertencessem aos sub-grupos Ia, Ib ou Ic, respectivamente.

Após o sacrifício retirava-se dos cães ambas as tíbias, das quais se seccionavam as extremidades, de maneira a deixar apenas um segmento central de aproximadamente 4cm de comprimento, que contivesse a área do enxerto e mais uma margem de segurança.

Esse segmento era totalmente limpo de suas partes moles, e, em seguida, seccionado em duas metades, uma proximal e outra distal, que eram colocadas em solução de formol a 10% para fixação. A metade proximal era destinada ao exame histológico, com microscópio ótico comum enquanto que a distal se destinava ao estudo da impregnação pela Tetraciclina, ao microscópio de luz ultra-violeta.

#### Preparo da Peça para Exame Histológico:-

A metade proximal anteriormente referida era seccionada em duas partes, uma lateral e outra medial, segundo um plano longitudinal que passava pelo meio do enxerto, como mostra a fig. 4.

Das duas partes obtidas por meio dessa secção longitudinal escolhia-se aquela na qual o enxerto tivesse maiores dimensões a fim de processá-lo para o exame histológico. O segmento então obtido era, inicialmente, descalcificado pelo método do Ac. Fórmico-Citrato de Sódio (Luna, 1968). Cada peça era descalcificada em frascos individuais, à temperatura ambiente, por um período de cerca de 6 semanas, sendo que o líquido descalcificador era trocado a cada 4-5 dias. O ponto ideal de descalcificação era testado através do teste de

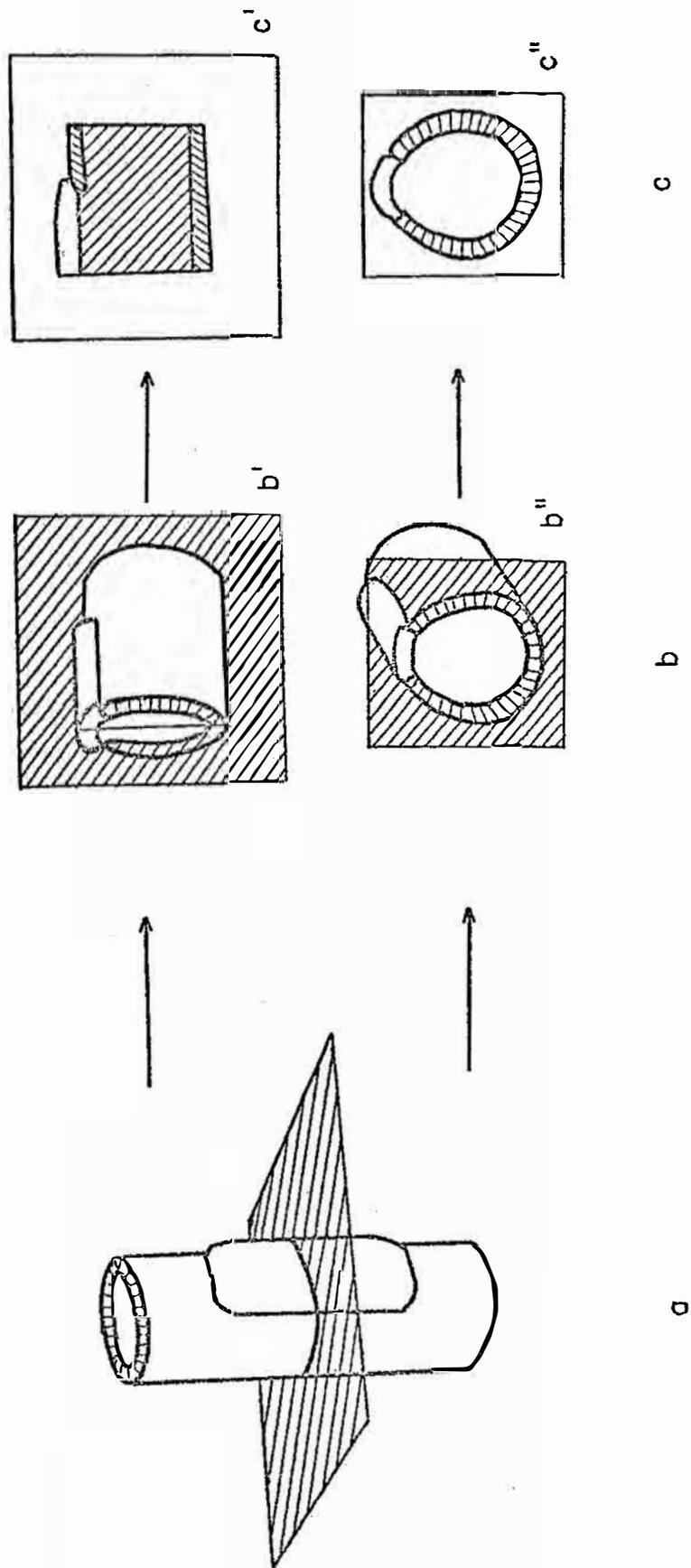


FIG.4:ESQUEMA DA PREPARAÇÃO DAS PEÇAS PARA OBTENÇÃO DOS CORTES.

- a) O SEGMENTO DA TÍBIA CONTENDO O ENXERTO ERA SECCIONADO PERPENDICULARMENTE AO SEU MAIOR EIXO, NA ALTURA DO MEIO DO ENXERTO.
- b') MOSTRA O PLANO DE SECÇÃO LONGITUDINAL DA METADE PROXIMAL DO SEGMENTO INICIAL.
- c') MOSTRA A SUPERFÍCIE DE CORTE DAS LÂMINAS HISTOLÓGICAS.
- b'') MOSTRA O PLANO DE SECÇÃO TRANSVERSAL DA METADE DISTAL DO SEGMENTO INICIAL.
- c'') MOSTRA A SUPERFÍCIE DE CORTE DAS PEÇAS DESGASTADAS.

Sulkovitch no líquido descalcificador. Completada a descalcificação, a peça era lavada em água corrente por 24 horas, após o que era deixada em solução de formol a 10% saturada com Carbonato de Cálcio, para neutralização total do Ac. Fórmico. Em seguida, era colocada em solução de formol a 10% pura até o momento do processamento para inclusão em blocos de parafina que se fazia pelas técnicas rotineiras de histologia. A única diferença, neste ponto, era que o agente clarificador utilizado aqui era o Óleo de Cedro Natural (Merck), ao invés do Xileno. A vantagem do Óleo de Cedro Natural é que ele torna as peças ósseas macias, facilitando os cortes com o micrótomo.

Não consideramos necessária a utilização de outro processo de coloração que o da Hemalumen-Eösina (H.E.).

A rotina do exame das lâminas consistia em examinar sempre lâminas pareadas, isto é, sempre as provenientes do mesmo animal, do lado de teste (E) e do lado controle (D), uma em seguida à outra (várias vezes cada uma).

As fotografias foram obtidas com um microscópio Nikon Apophot provido de equipamento fotomicrográfico Nikon AFM automático, e o filme utilizado foi Kodak Panatomic-X 135 de 32 asa.

#### Preparo da Peça para o Estudo da Impregnação com Tetraciclina:-

A metade distal da peça obtida inicialmente era mantida em solução de formol a 10% até o momento da sua utilização, o que demorou de 2 a 6 semanas, visto que esse tipo de conservação não altera as propriedades de fluorescência da Tetraciclina impregnada (Olerud e Lorenzi, 1970).

O preparo final da peça começava no 4º dia antes da sua inclusão em acrílico. Assim, sem descalcificá-la, a peça era submetida a banhos de 24 horas de duração cada, em álcool, a 50%, 80% e, finalmente, 99%, com o propósito de promover desidratação progressiva de camadas mais superficiais da cortical.

No dia da inclusão em acrílico, elas eram submetidas a banhos de cerca de 20 minutos de duração cada, sem solu

-ções de Acetona a 50%, 80% e 100%, com a finalidade de preparar a superfície cortical para receber o acrílico, do qual a Acetona é um solvente (Frost, 1959a-b).

Um requisito muito importante para a boa inclusão em acrílico é que a peça óssea a ser incluída seja totalmente isenta de partes moles, inclusive periosteio, que impedem a aderência da resina.

A resina aqui utilizada foi do tipo Polylite (Reforplas), que é um polímero de estireno e consta de 3 componentes: Resina de Estireno (semipastosa), Monômero de Estireno (líquido) e Catalizador (peróxido de metil-etil-cetona).

A inclusão de cada peça exigia um volume de resina de 10ml, aos quais se adicionava 1,5ml (15%) do monômero e 0,15ml (1,5%) do catalizador. A adição dos componentes era feita em separados, isto é, adicionava-se primeiro o monômero à resina, mexendo-se a mistura continuamente com um bastão de vidro, até que se obtivesse a homogeneização completa. Então, adicionava-se o catalizador e se continuava a misturar até que toda a mistura estivesse novamente homogeneizada.

Aí vertia-se a resina em um frasco de vidro limpo de 15ml de capacidade. Com o objetivo de eliminar as pequenas bolhas de ar que se formavam na resina durante a mistura, submetia-se o frasco a vibração, em um vibrador de contato do tipo odontológico.

A resina estando livre das bolhas, colocava-se a peça na resina, tomando-se o cuidado de fazer com que seu maior eixo coincidisse com o comprimento do frasco e que ficasse en volta por todos os lados pela mesma espessura de resina.

Essa resina polimeriza ao redor de 15-20 minutos, a partir do momento da adição do catalizador, de modo que ela fica viável para a introdução da peça somente durante os primeiros 5-10 minutos, tornando-se muito espessa depois disso.

Aguardava-se 24 horas para que a resina estivesse totalmente polimerizada; então, quebrava-se o frasco de vidro, retirando-se o cilindro de acrílico em cujo interior se achava a peça. Este cilindro era desgastado de modo a adquirir a forma de um paralelepípedo que facilitava a execução dos

cortes. Os cortes, da espessura de cerca de 1mm, foram executados por uma máquina provida de um disco de aço diamantado que girava à razão de até 2.000. rpm, sendo continuamente refrigerado por 2 jatos laterais de água. (Fig. 5).

De cada peça obtinha-se 2 cortes que eram depois desgastados em lixas progressivamente mais finas, de nºs. 320, 360 e 400, do tipo cuja cola é insolúvel em água. A lixa era colocada sobre uma placa de vidro quadrada de 30cm de lado e 0,8cm de espessura, que ficava apoiada em um plano ligeiramente inclinado de modo a permitir o escoamento do líquido de lavagem dos detritos. Esse líquido de lavagem, que escorria sobre a lixa a partir do ponto mais elevado do plano inclinado por meio de um equipo de soro comum, constava de solução aquosa de detergente do tipo caseiro a 5%. (Frost, 1959a-b).

Os cortes eram delicadamente lixados com os dedos em movimentos circulares largos, aproveitando-se toda a largura da lixa. O uso dos dedos permite uma melhor sensação tátil da pressão exercida sobre o corte. O corte era virado de lado a cada 20 movimentos circulares, de modo a permitir um desgaste uniforme, em suas duas faces; era desgastado na lixa nº 320, até a espessura média de 400  $\mu$ ; daí até 200  $\mu$  na lixa nº 360; então passava para a lixa nº 400, onde era desgastado até a espessura de 100-50  $\mu$ , considerada boa para o exame da fluorescência em microscópio ultra-violeta.

Terminado o desgaste, o excesso de acrílico era cortado com tesoura delicada e o corte era lavado em álcool e xilol e montado em lâmina e lamínula, com Bálsamo do Canadá, não fluorescente. As lâminas eram estocadas em ambiente frio e escuro, muito embora a fluorescência da Tetraciclina perdesse por um ano ou mais.

As lâminas foram examinadas ao microscópio de fluorescência Zeiss com luz Osram HBO-200 de 200 watts, com filtro ativador BG-12 e barreiras na combinação 65-47-41.

As fotografias foram obtidas com um equipamento fotográfico Nilon AFM, automático, acoplado ao microscópio e o filme empregado foi Kodacolor EH-125 (High Speed) de 160 asa.

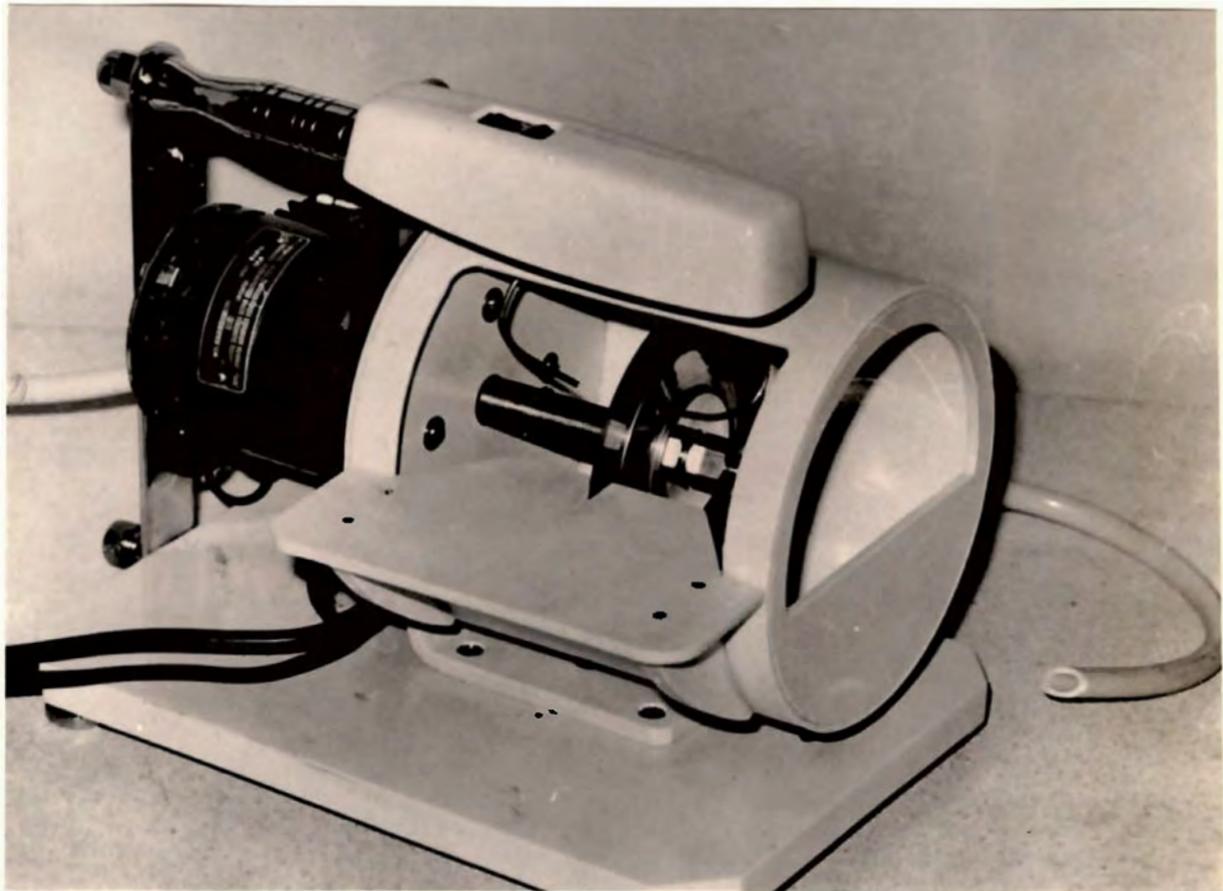


Fig.5: Fotografia da máquina\* utilizada para a execução dos cortes das peças incluídas em acrílico. Observar a navalha de aço diamantado, fixa em um eixo rígido que gira dentro da cobertura de proteção, impulsionado pelo motor à esquerda.

(\* ) Desenvolvida pelo Prof.Dr.Homero Habel Rodrigues do Departamento de Ciências Morfológicas da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto - USP.

A rotina de exame das lâminas aqui foi idêntica a que se procedeu para os exames histológicos, isto é, examinou-se sempre as lâminas provenientes do mesmo animal, do lado de teste (E) e do lado controle (D), uma em seguida à outra, várias vezes cada uma.

Numa mesma lâmina examinava-se primeiramente toda a cortical receptora, a fim de se avaliar antes de mais nada o grau de difusão da Tetraciclina no osso normalmente perfundido. Em seguida, examinava-se o enxerto propriamente dito, cotejando sua aparência com a da cortical receptora. A avaliação da impregnação da Tetraciclina foi feita de maneira semi-quantitativa, conforme recomendado por Puranen (1966).

No enxerto eram observados os seguintes dados:

- Intensidade da fluorescência nas bordas do enxerto e em vasos no seu interior;
- Número de vasos, sua origem e aparente direção de progresso.

Ao primeiro ítem era atribuído um valor em número de cruces, de 1 a 4, conforme a intensidade da fluorescência fosse, respectivamente, Mínima ou Nenhuma, Escassa, Regular e Abundante. (Ver Quadro I). Os dados do segundo ítem eram puramente descritivos.

#### Grupo II -

No grupo II foram operados 8 cães que apresentavam as mesmas características dos cães do grupo I. Assim, não se fez distinção de sexo e idade dos cães, cujo peso médio continuou ao redor de 15,5kg.

Dos 8 cães, operados à razão de 2 por semana, 4 compunham o sub-grupo de teste (II-a) e 4 o de controle (II-b).

No sub-grupo II-a o ER foi preparado de maneira idêntica ao grupo I, na tíbia direita e transplantado 3 semanas após para a tíbia esquerda. A janela cortical obtida da tíbia esquerda no preparo do leito para o ER era desprezada, não sendo transplantada para a tíbia direita. Desse modo, na tíbia direita permanecia um defeito correspondente ao leito doador do enxerto retardado, como mostra a fig. 6.

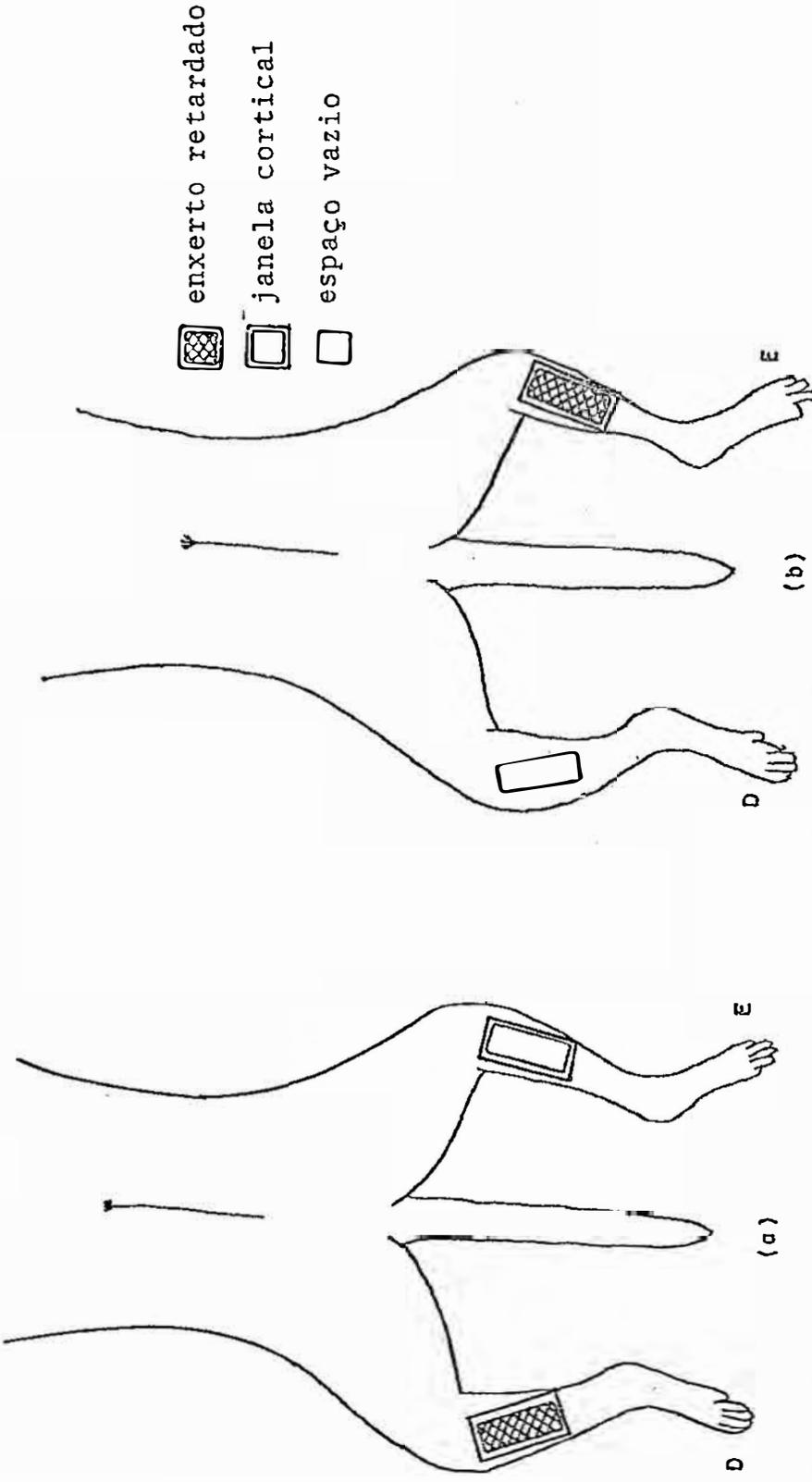


Fig. 6: PREPARAÇÃO E TRANSPLANTE DO ENXERTO RETARDADO.

a) UMA JANELA CORTICAL É RECORTADA DA TÍBIA ESQUERDA E DESPREZADA (PREPARO DO LEITO PARA O ER); À D VÊ-SE UM ENXERTO RETARDADO PREPARADO À MANEIRA DA FIG. 2a E b.

b) O ER, JÁ PREPARADO 3 SEMANAS ANTES NA TÍBIA DIREITA, É TRANSPLANTADO PARA A TÍBIA ESQUERDA; O SÍTIO DE ONDE FOI RETIRADO O ER PERMANECE VAZIO.

No sub-grupo II-b foram operados 4 animais de maneira semelhante aos do sub-grupo II-a. A diferença aqui era que o enxerto cortical (EF) obtido da tíbia direita era imediatamente transplantado para o defeito produzido simultaneamente na tíbia esquerda. Igualmente, a janela obtida da tíbia esquerda, no preparo do leito para o EF proveniente da tíbia direita, era desprezada, de modo que o defeito da tíbia direita era deixado aberto, como mostra a fig. 7.

Em todos os animais dos dois grupos de experimento foram realizados exames cintilográficos e contagem da radioatividade absorvida na área doadora dos enxertos, tanto ER como EF, e no local receptor dos mesmos, no 15º e no 45º dias após o transplante dos enxertos.

Empregou-se para esse fim o isótopo Tecnécio ( $Tc99^m$ -pirofosfato), o mesmo utilizado para fins de diagnóstico clínico, na dose de 8  $\mu$ Cu. A cintilografia era realizada 3 horas após a injeção endovenosa do isótopo, período necessário à captação do mesmo pelo osso. Efetuava-se, então, a contagem da radioatividade três vezes em cada local; dos três valores obtidos extraía-se a média de contagem para cada local, sendo este último o valor que se encontra lançado no Quadro II.

Em seguida às contagens, realizava-se o mapeamento linear em papel e em filme radiográfico. O aparelho utilizado para os exames cintilográficos foi um Scanner Pho-Dot (Nuclear Chicago), com pico de isótopo 620cpm e fator de supressão 50%.

Como a comparação entre os valores absolutos das contagens, além de mais difícil, poderia não dar idéia da evolução dos fatos, optamos pela comparação em valores percentuais. Desse modo, atribuindo o valor 100% à contagem obtida na tíbia direita, era calculado o valor percentual da diferença entre esta e a da tíbia esquerda.

O cálculo obedeceu à seguinte fórmula:

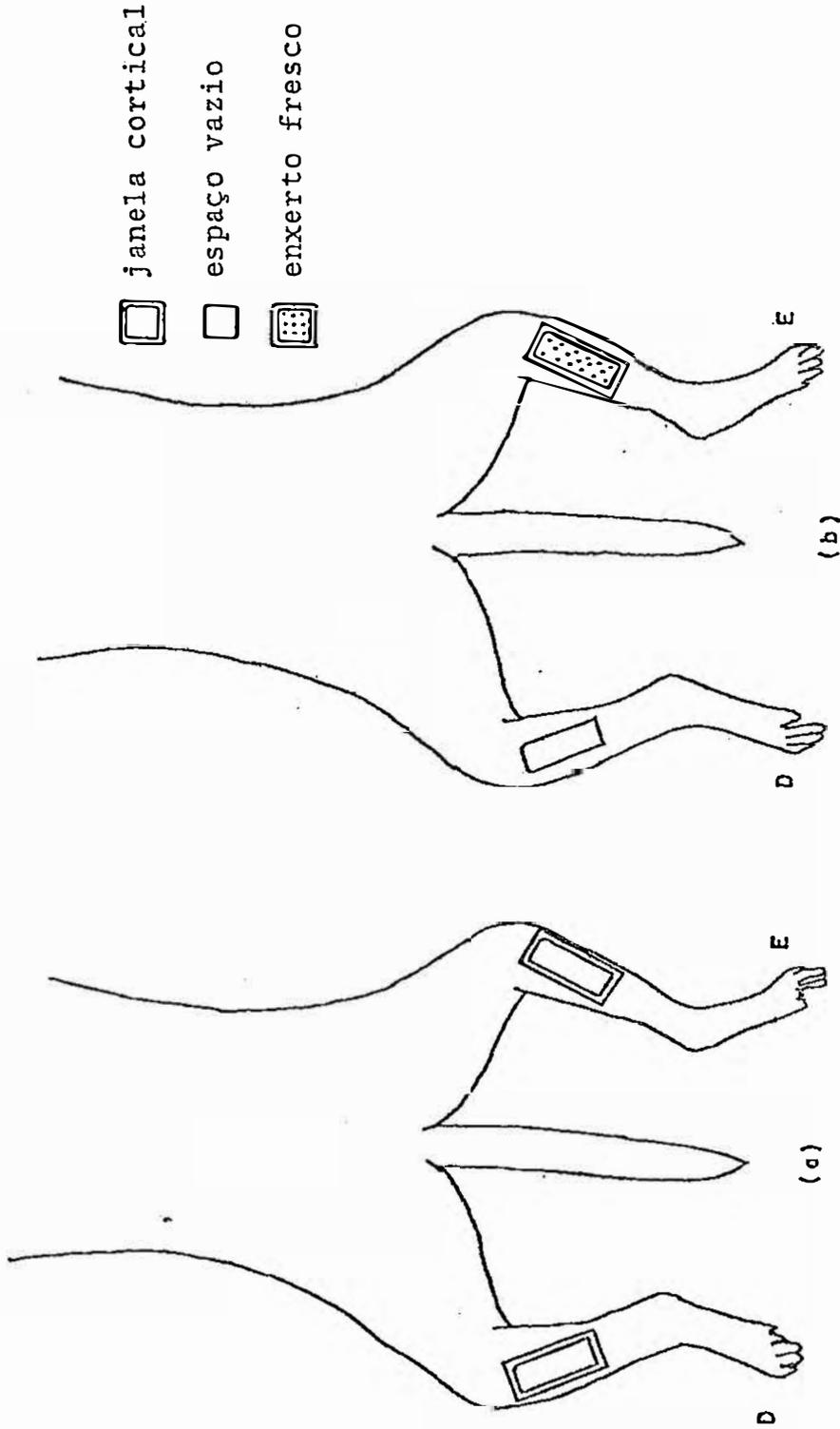


Fig. 7: PREPARAÇÃO E TRANPLANTE DO ENXERTO FRESCO.

- a) UMA JANELA CORTICAL É RECORTADA E PREPARADA NA TÍBIA DIREITA PARA SER TRANSPLANTADA NO MESMO MOMENTO (EF); UMA JANELA IDÊNTICA É PREPARADA NA TÍBIA ESQUERDA,
- b) A JANELA RETIRADA DA TÍBIA ESQUERDA É DESPREZADA; A JANELA PREPARADA NA TÍBIA DIREITA (EF) É IMEDIATAMENTE TRANSPOSTA PARA A TÍBIA ESQUERDA; O SÍTIO ORIGINAL DE ONDE FOI RETIRADO O EF NA TÍBIA DIREITA FICA VAZIO.

$$X = \frac{E - D}{D} \times 100$$

na qual, E é o valor da contagem média obtida na tíbia esquerda, D é o valor da contagem média obtida na tíbia direita e X é o valor percentual da diferença entre ambas.

Desse modo, o percentual obtido significa o quanto a contagem média no lado de teste (E) se diferencia da contagem no lado controle (D). Os resultados das contagens médias e das diferenças percentuais se encontram no Quadro II.

R E S U L T A D O S

IV - RESULTADOS -Grupo I - Resultados do Exame Histológico:

A análise dos cortes revelou uma sequência de eventos mais ou menos comuns aos dois tipos de enxerto; o ER e o EF. No entanto, ficaram comprovados diferenças de comportamento entre ambos, que serão analisadas em seguida.

Sub-Grupo Ia - Com 2 semanas após o transplante o ER conservava sua forma original e seus limites eram ainda muito nítidos. Ao seu redor observava-se diferenciação osteoblástica do tecido conjuntivo com neo-formação de trabéculas ósseas pouco calcificadas que se ligavam à superfície do enxerto e se estendiam no estroma vizinho (Fig.8). Em outras áreas da superfície do enxerto notavam-se numerosos osteoclastos reabsorvendo o osso cortical necrótico do ER, tendo já produzido grandes lacunas de reabsorção, algumas delas já revestidas por uma estreita camada de osso neo-formado margeada de osteoblastos. (Fig. 9).

Nesta fase era quase nula a atividade osteoblástica na superfície sub-periosteal do enxerto, não evidenciada nas figuras.

No osso receptor o periosteio mostrava moderada reação tendo já produzido uma camada de novo osso que elevava as bordas do leito receptor.

O EF mostrava seus limites e forma muito nítidos e estava circundado por tecido fibroso de aspecto pouco denso. Não se notavam ainda sinais de diferenciação osteoblástica neste tecido. A atividade osteoclástica era considerável, sendo possível observar um grande número de osteoclastos margeando o tecido cortical necrótico e já produzindo pequenas lacunas de reabsorção, todavia bem menores das que as observadas no ER. (Fig. 10).

Sub-Grupo Ib - Com 4 semanas os limites do ER eram bem menos nítidos do que o observado com 2 semanas, havendo regiões em que ele se confundia em muitos sítios com o

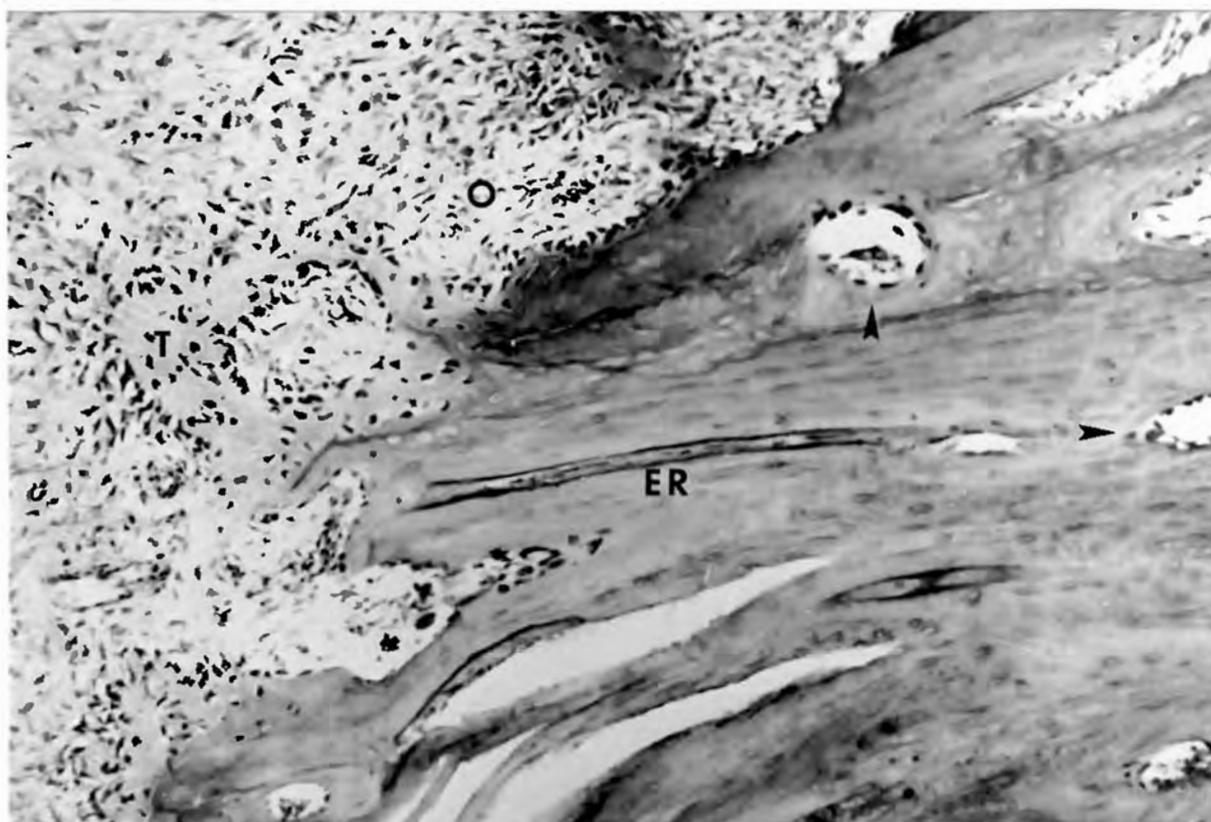


Fig.8: Fotomicrografia de enxerto retardado, com 2 semanas após o transplante. À direita, tecido ósseo cortical necrótico (ER): à esquerda, neoformação óssea (O). A neoformação já evidencia, em alguns pontos, arranjo trabecular(T). As setas indicam espaços medulares alargados contendo elementos celulares aparentemente viáveis em suas paredes. (H.E.100X).

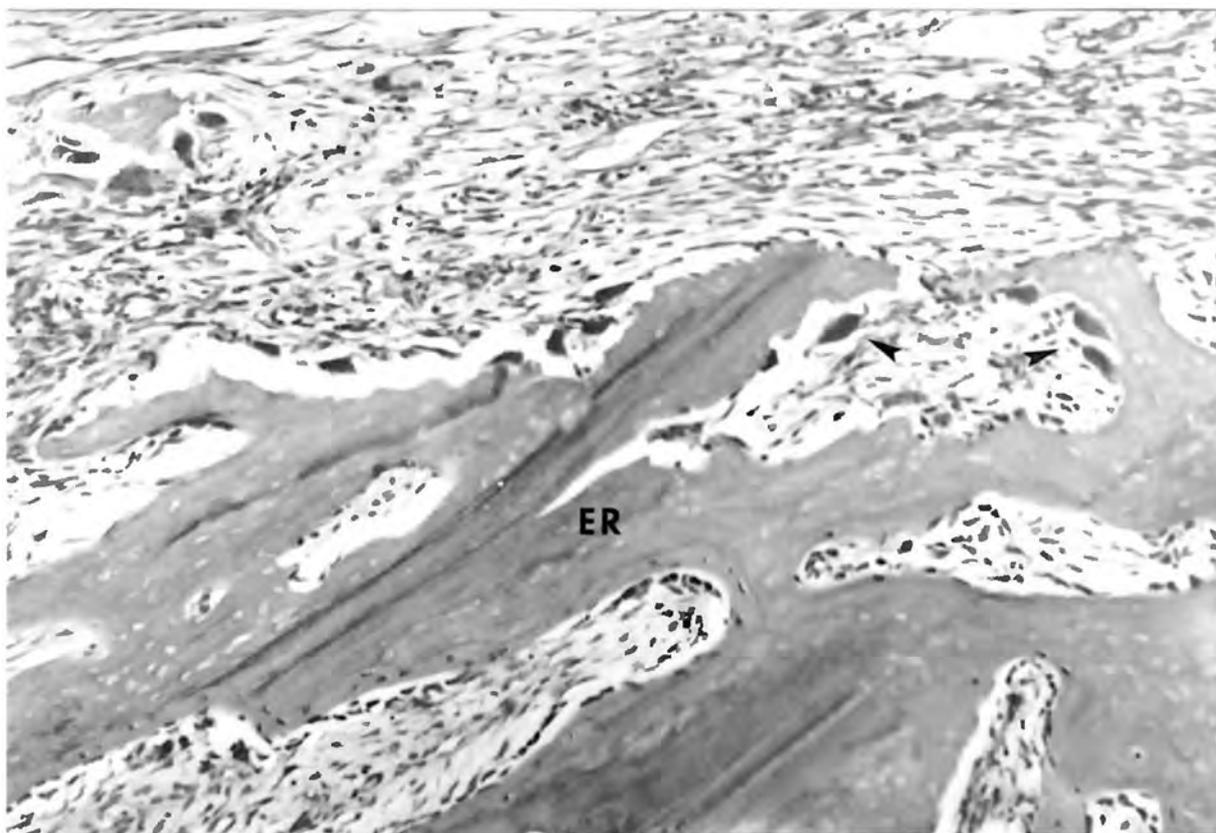


Fig. 9: Fotomicrografia de enxerto retardado, com 2 semanas após o transplante, evidenciando atividade osteoclástica (setas) sobre um tecido ósseo necrótico (ER). Observam-se alguns osteoblastos viáveis nas bordas de espaços medulares, onde já depositaram uma estreita camada de novo osso. (H.E.100X).

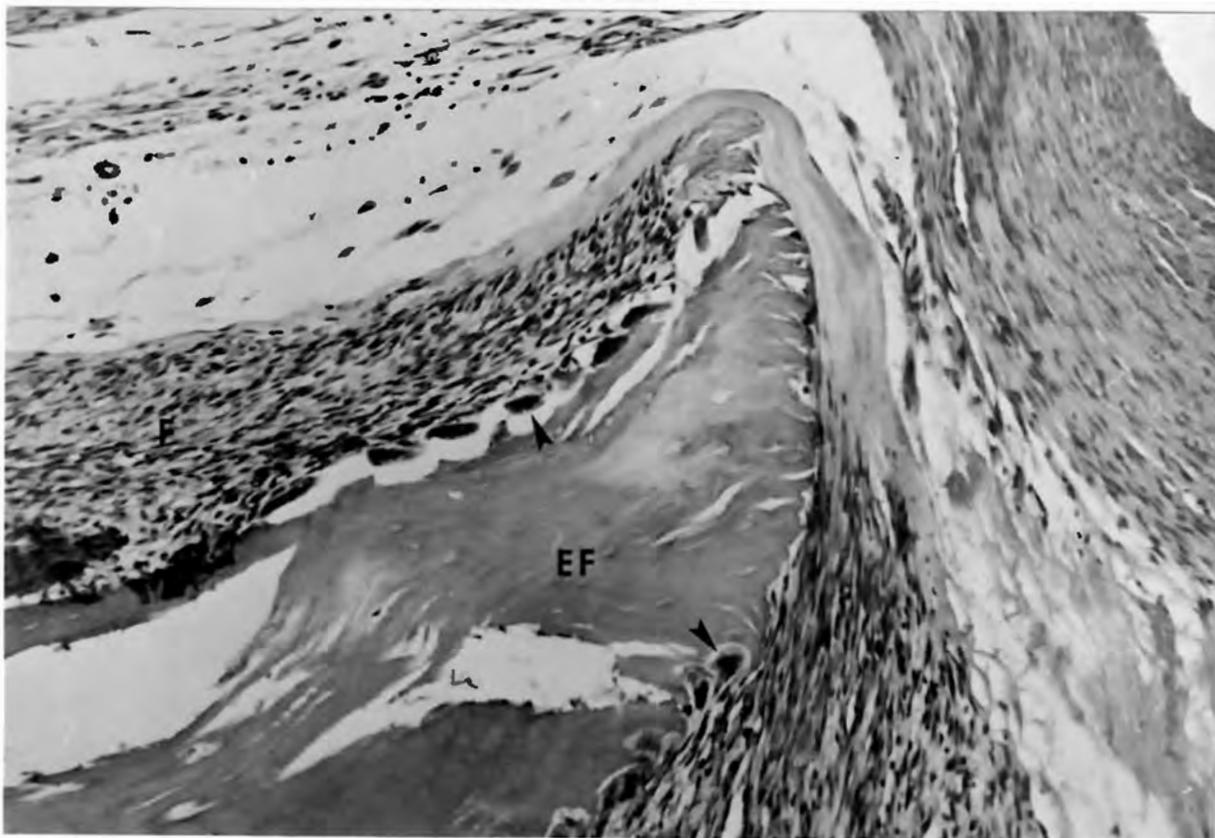


Fig. 10: Fotomicrografia de enxerto fresco com 2 semanas após o transplante, evidenciando atividade osteoclástica (setas) sobre o tecido ósseo necrótico (EF). Na perife - ria do enxerto observa-se uma proliferação fibroblástica que lembra o perioste, embora não esteja produzindo novo osso. (H.E.100X).

osso neoformado que havia substituído o osso necrótico já reabsorvido. Um grande número de fenestrações longitudinais, traduzindo espaços medulares alargados no enxerto abrigavam tecido conjuntivo ricamente vascularizado. A massa de tecido ósseo neoformado ao seu redor era bem mais volumosa do que na 2a. semana e invadia o canal medular quase até a cortical oposta. Seu aspecto era de tecido ósseo mais maduro, já disposto em trabéculas bem calcificadas (Fig. 11). A medula óssea já estava reorganizada, mostrando os seus componentes hemáticos e gordurosos normais. Não havia aqui também, atividade osteoblástica evidente na superfície subperiosteal do ER. O periosteio estava espessado formando uma capa fibrosa que fechava por fora o leito receptor. Em vários cortes foram identificadas áreas evidentes de metaplasia cartilaginosa do tecido neo-formado (matriz condrôide) que envolvia o enxerto. (Fig. 12). A atividade osteoclástica já era bem menos evidente do que na 2a. semana.

O EF na 4a. semana do transplante apresentava, ainda, sua forma original e os limites muito nítidos. No seu interior havia já algumas fenestrações longitudinais (espaços medulares alargados) contendo vasos e tecido mesenquimal. Estas fenestrações eram menores e em menor número do que no ER. O osso neo-formado ao seu redor já tinha um volume maior do que com duas semanas e em alguns casos ocupava todo o diâmetro da cavidade medular. O aspecto desse tecido neo-formado era de osso trabecular menos maduro do que o observado ao redor do ER nesta mesma época. (Fig. 13). O limite entre o osso necrótico do EF e o tecido ósseo neo-formado era bastante nítido, não havendo locais onde este último houvesse substituído o primeiro. Aqui também a atividade osteoclástica já não era tão evidente como no grupo anterior.

Em suma, pelo que se deprendia do aspecto histológico comparativo, o ER mostrava revascularização abundante enquanto que a do EF seria apenas regular. Igualmente, a taxa de neoformação óssea e de remodelação do enxerto era maior no ER do que no EF, tanto com 2 como com 4 semanas.

Sub-Grupo Ic - Com 8 semanas após o transplante o ER já esta-

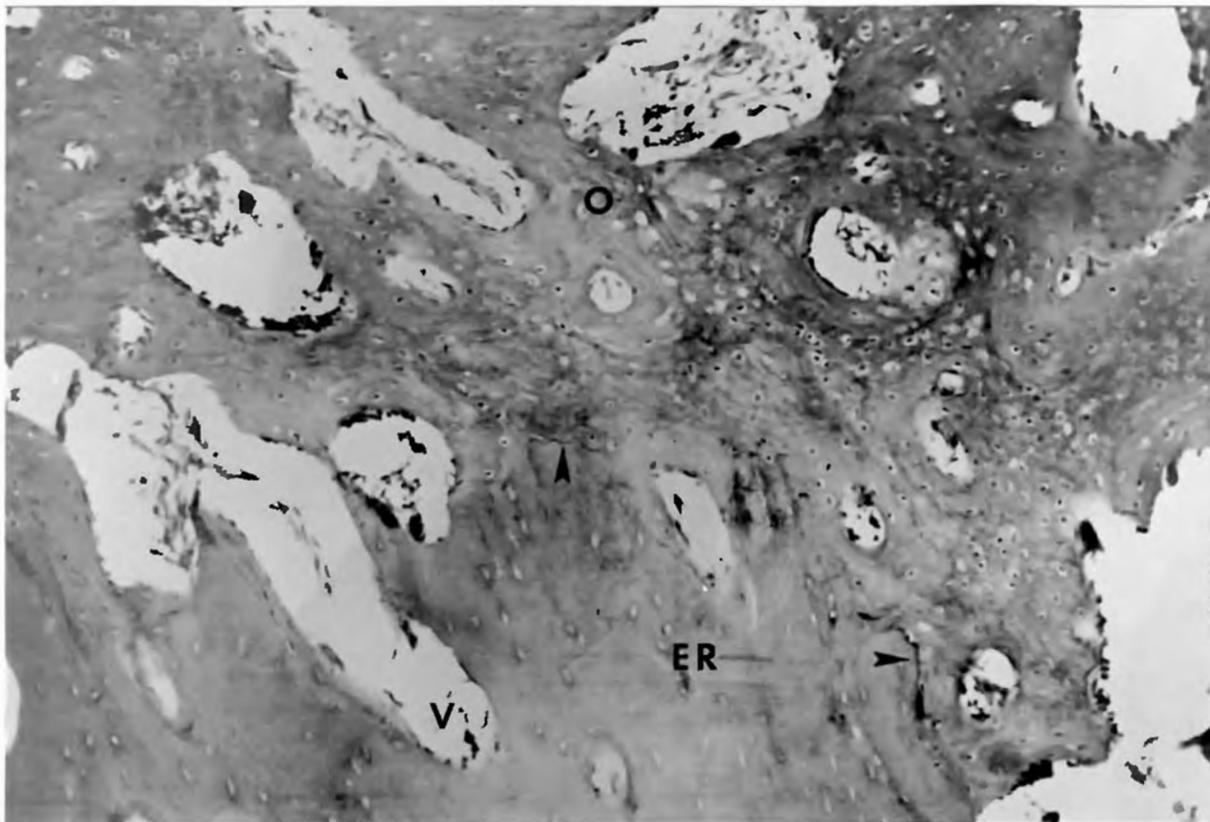


Fig. 11: Fotomicrografia de enxerto retardado com 4 semanas após o transplante. Na parte superior, neo - formação óssea (O) com trabéculas já bem calcifica - das; na parte inferior tecido ósseo cortical necrôti co (ER). Notar que a transição entre ambos os teci - dos é evidente em alguns pontos (setas) e que espa - ços medulares alargados (V) aparecem no tecido necrô - tico do enxerto. (H.E.100X).

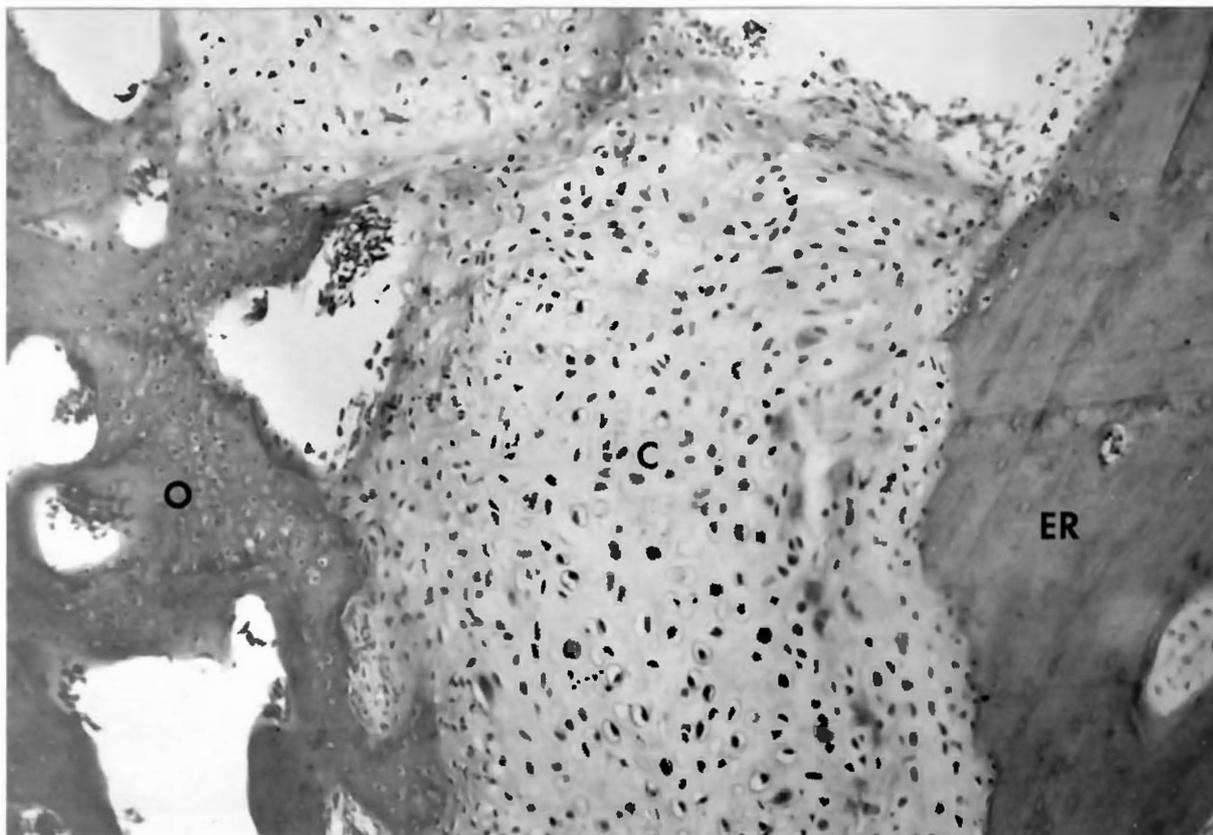


Fig. 12: Fotomicrografia de enxerto retardado, com 4 semanas após o transplante. À direita, tecido ósseo cortical necrótico (ER); no centro, extensa área de metaplasia cartilaginosa (C) ou matriz condrõide; à esquerda tecido ósseo neoformado (O), disposto em trabéculas bem calcificadas e que se continuam com a matriz condrõide. Nota-se zona de tecido osteóide na junção entre o osso neoformado e o tecido cartilaginoso. (H.E.100X).

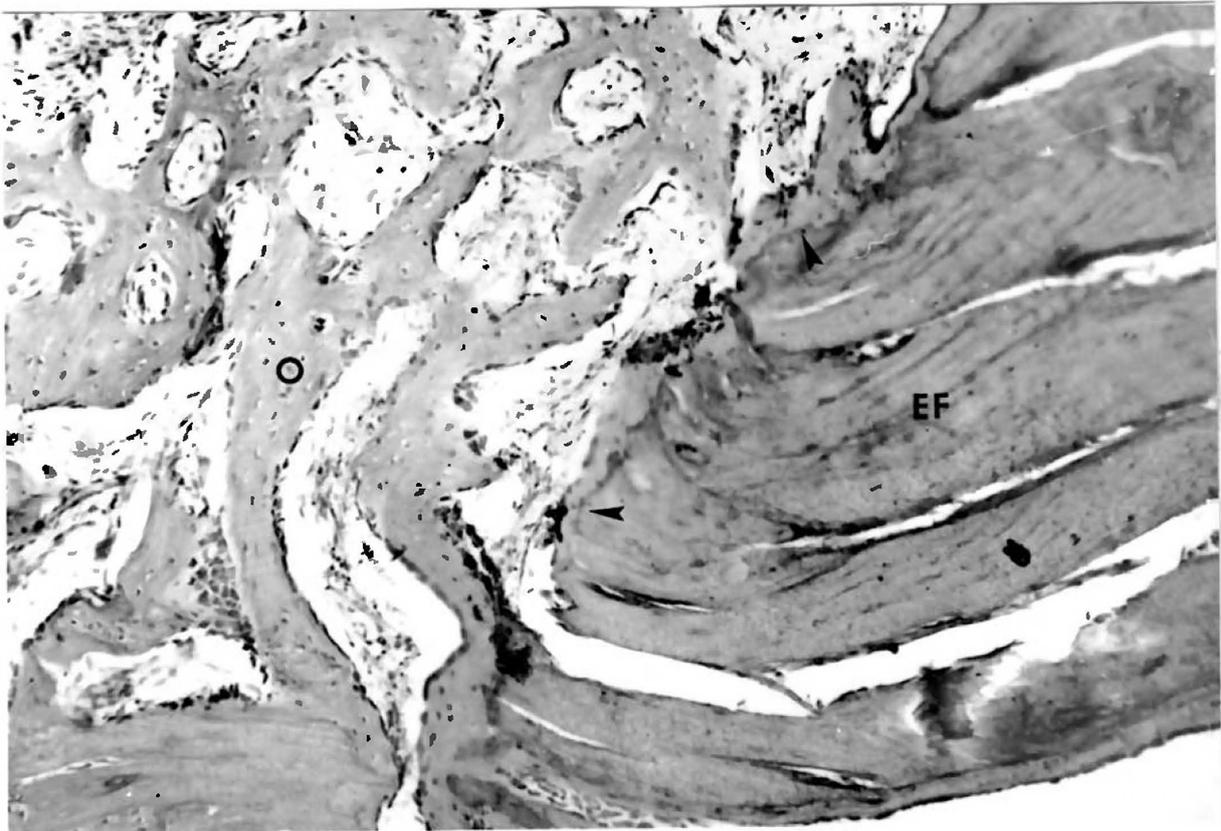


Fig. 13: Fotomicrografia de enxerto fresco, com 4 semanas após o transplante. À direita, tecido ósseo cortical necrótico (EF); à esquerda, neoformação óssea (O), já configurando trabéculas, embora pouco calcificadas. A união entre o osso necrótico e o osso neoformado é bem evidente (setas). (H.E.100X).

-va totalmente reorganizado. O enxerto original tinha sido substituído por uma espessa placa de osso novo de aspecto ma duro. Intimamente, o osso novo se dispunha num padrão de arquitetura do tipo trabeculado, lembrando um segmento de osso esponjoso. Em algumas trabéculas mais largas notava-se uma tendência ao arranjo do tipo cortical (sistema Haversiano). Os espaços entre essas trabéculas estavam preenchidos por te cido medular adulto, rico em elementos hemáticos e com algumas células gordurosas (Figs. 14 e 15). O canal medular já estava completamente recanalizado.

A observação sob aumento maior mostrava que na intimidade das trabéculas jovens que substituíam o enxerto, entremeadas com o osso novo que as compunha, havia ilhas de te cido ósseo cortical morto remanescente do antigo enxerto. A fusão entre estes dois tecidos era perfeita, não havendo espaço real entre ambos (Fig. 16).

Macroscopicamente era impossível perceber os limites do enxerto porque ele já não existia como tal.

Enquanto isso o EF era evidenciado na sua estrutura primitiva e seus limites eram ainda visíveis, embora com certa dificuldade. (Fig. 17). Muitas fendas (espaços medulares alargados) marginados por osteoblastos e de grandes dimensões atravessavam-no longitudinalmente (Fig. 18), embora ele fosse composto essencialmente de osso necrótico. Apesar disso a fusão entre o EF e a cortical receptora era evidente havendo inclusive espaços medulares que cruzavam de um para o outro. O osso neoformado que circundava o enxerto, de padrão esponjoso, se continuava com osso esponjoso do canal me dular, sem uma separação nítida entre ambos. O canal medular em si já estava totalmente reorganizado.

O aspecto do EF na 8a. semana lembrava, de perto, o ER na 4a. semana.

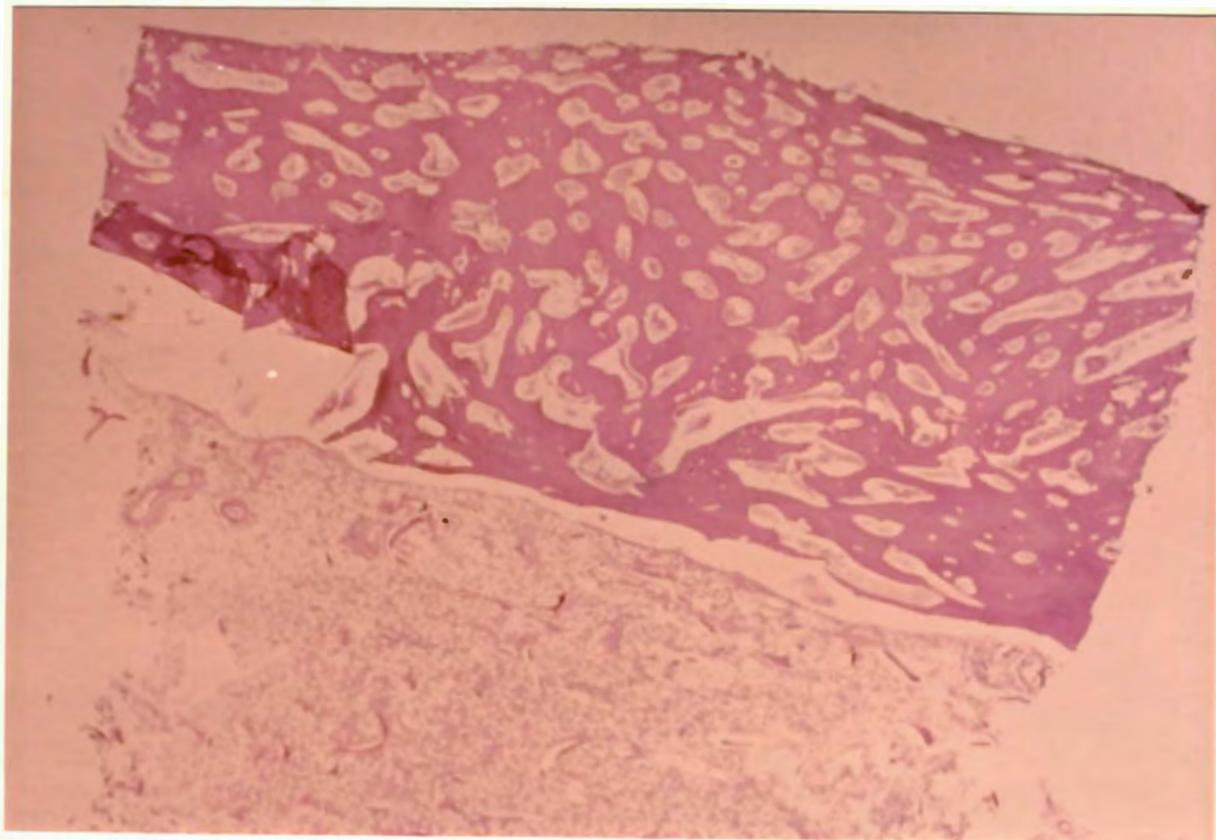


Fig. 14: Fotomicrografia de enxerto retardado, com 8 semanas após o transplante, mostrando a completa substituição do ER por um tecido ósseo neoformado, semelhante ao osso esponjoso. É impossível demarcar os limites do enxerto retardado. Notar que o canal medular (abaixo) já está refeito e preenchido de tecido medular normal. (H.E. ca4X).

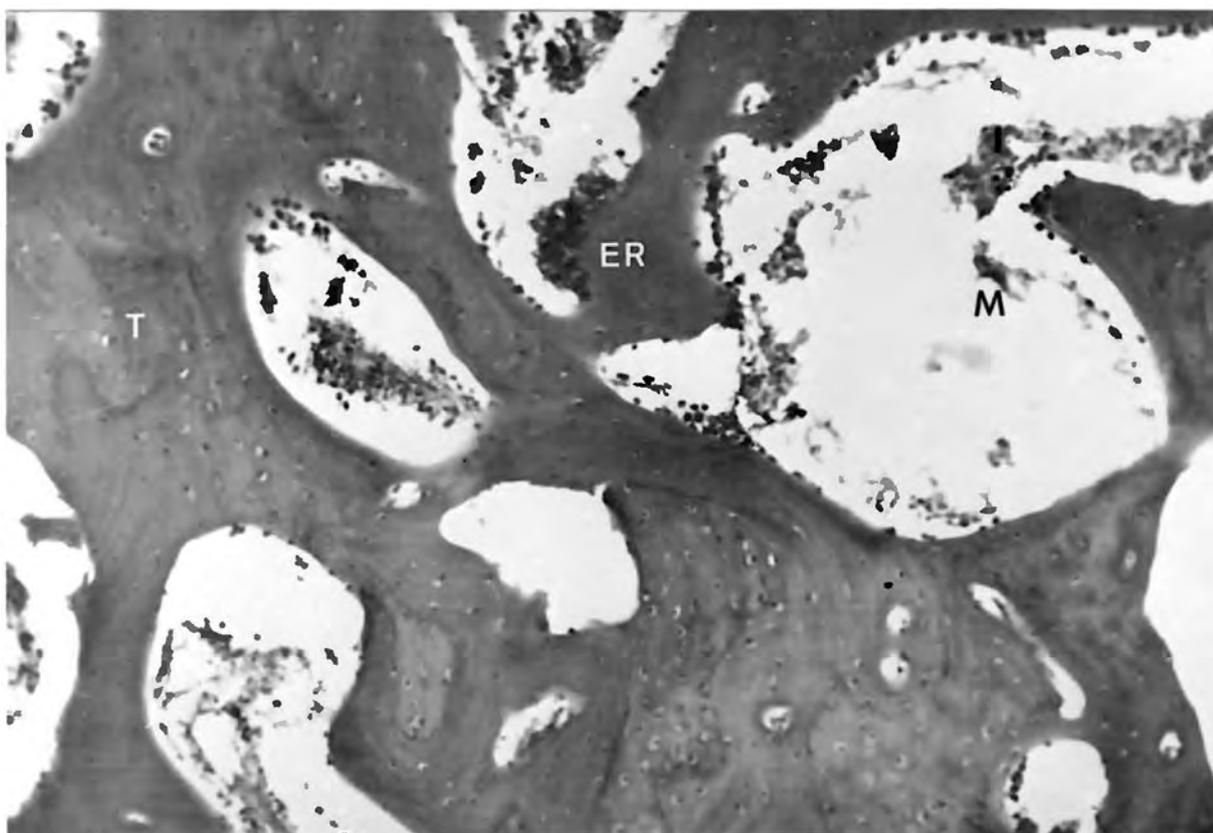


Fig. 15: Detalhe da fig. 14 - notar que o tecido ósseo ne formado trabeculado (T) substituiu totalmente o enxerto re tardado nesta área, oito semanas após o transplante. Vêem-se amplos espaços medulares (M) em meio ao trabeculado. (H.E.125X).

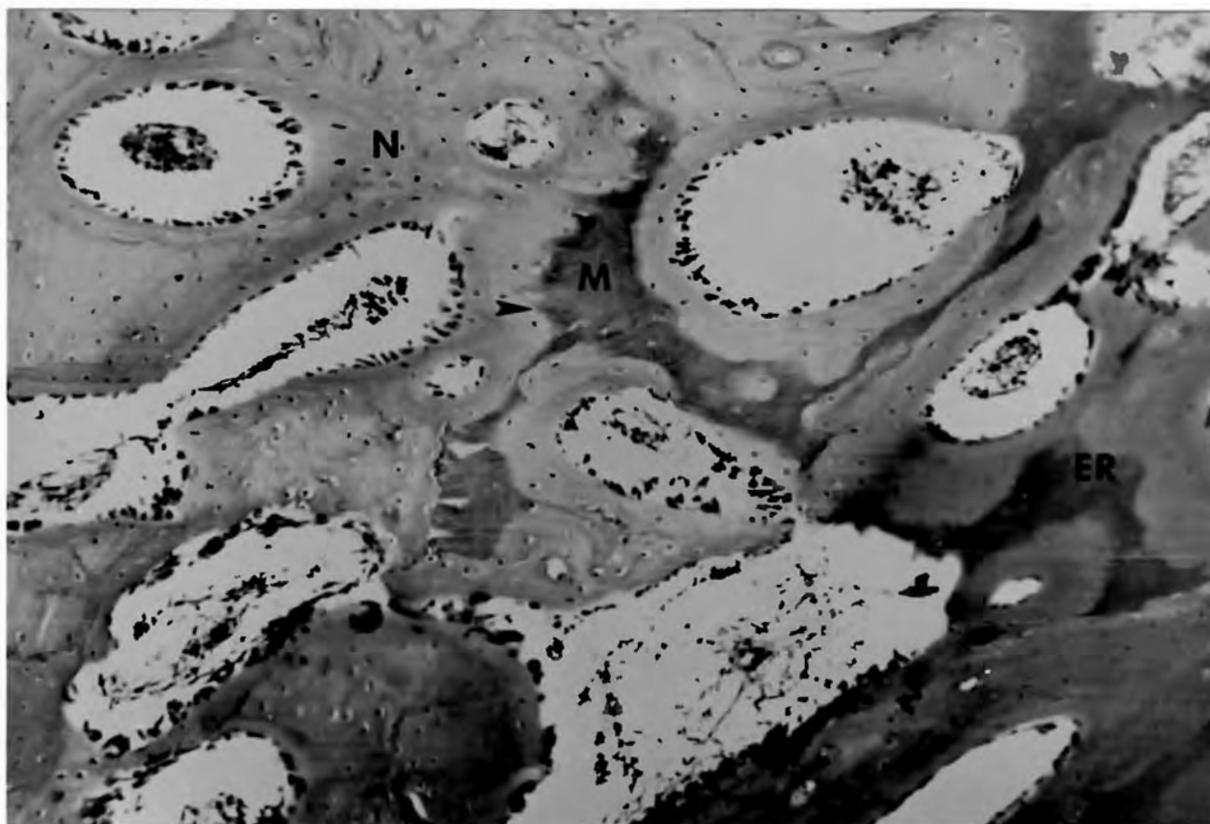


Fig. 16: Outro detalhe da fig. 14. Nesta área observam-se ilhas de osso necrótico (M), remanescentes do enxerto retardado, envoltas pelo trabeculado de osso neoformado (N), em meio a amplos espaços medulares. A seta indica a transição nítida entre o tecido ósseo necrótico e o neoformado (H.E.125X).

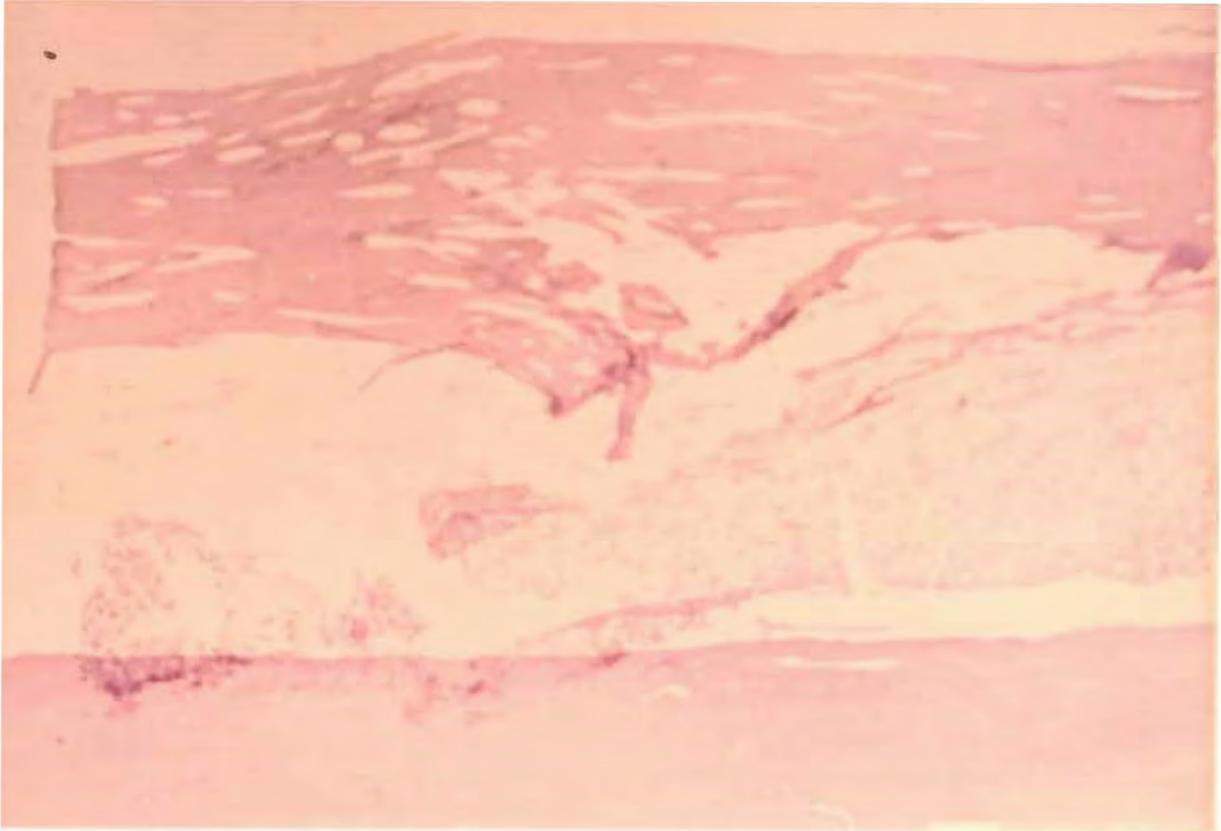


Fig. 17: Fotomicrografia de enxerto fresco, com 8 semanas após o transplante. Ainda se notam os limites do EF que exhibe várias fendas longitudinais (espaços medulares alargados). Comparar este aspecto com o da fig. 14. (H.E. ca4X).

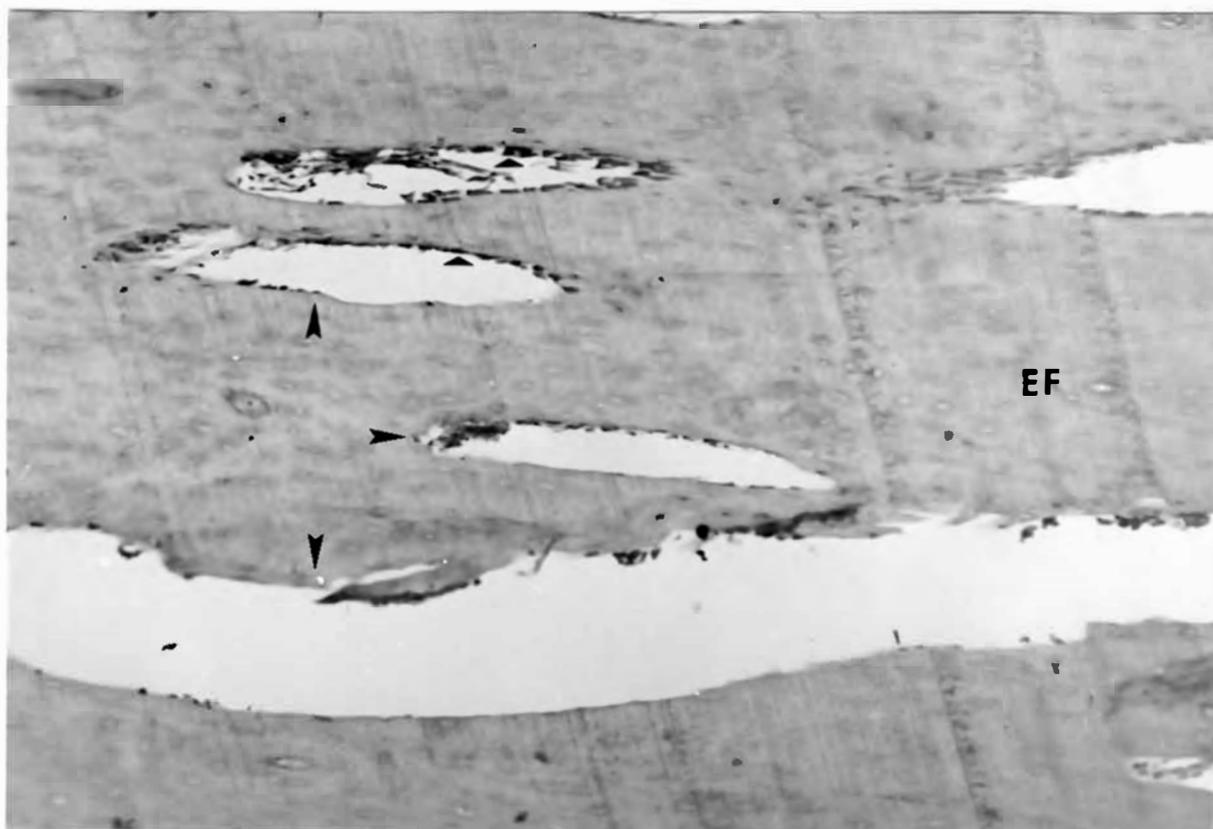


Fig.18: Detalhe da fig.17 - As fendas visíveis são espaços medulares alargados, em cujas paredes se notam osteoblastos que não estão produzindo novo osso. O EF se constitui essencialmente de tecido cortical necrótico. (H.E.100X).

Grupo I - Resultados do Exame da Fluorescência da Tetraciclina:

Os resultados aqui observados foram satisfatórios no sentido de que houve uma razoável homogeneidade na intensidade de impregnação dentro de cada grupo, no lado de teste e no de controle. Parece não ter havido influência do sexo e da idade dos animais.

Observou-se que, com raras exceções, a cortical normal do osso receptor apresentava sempre vários ósteons fluorescentes, o que significa a atividade osteoblástica. Esses ósteons, todavia, apresentavam uma distribuição difusa que não parecia obedecer a uma regra fixa e foram mais facilmente observados nos animais que receberam 4 injeções de Tetraciclina. Nos animais que receberam apenas 2 injeções, a frequência com que esses ósteons apareciam era bem menor. Este fato pode, apenas, estar significando que o maior número de injeções apresenta maior possibilidade de coincidir com o momento de proliferação osteogênica de determinados ósteons, dentro do fenômeno normal de "turn-over" ósseo.

Todavia, não foi possível perceber nenhuma relação entre os eventos do "turn-over" normal e os eventos que caracterizavam a capacidade osteogênica do enxerto, tanto no ER como no EF.

Sub-Grupo Ia - Com 2 semanas após o transplante e 2 injeções de Tetraciclina observou-se que enquanto a cortical receptora mostrava um ou outro ósteon com evidente fluorescência de cor amarelo-ouro; o enxerto, tanto o ER como o EF, não mostravam nenhum ósteon. Na maioria das vezes notou-se apenas uma fraca atividade fluorescente de cor amarelo-esverdeada nas paredes dos canais de Havers e Volkmann. (Fig. 19). A intensidade da fluorescência era ligeiramente maior no ER em 2 casos. Embora o novo osso periostal produzido nas bordas do leito receptor já mostrasse razoável fluorescência amarela, tal fenômeno não ocorria na face periostal de ambos os tipos de enxertos.

Sub-Grupo Ib - Com 4 semanas, notava-se clara faixa de fluorescência de Tetraciclina em vasos do interior

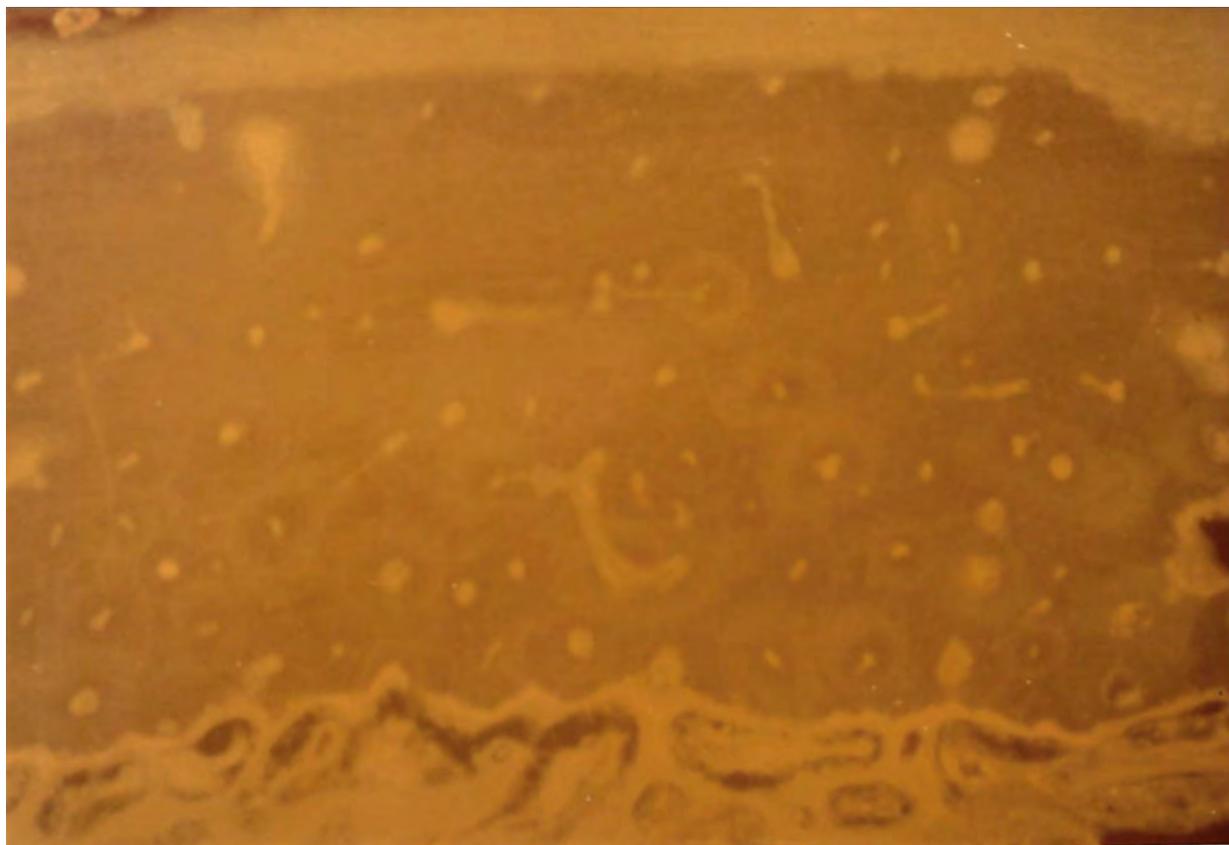


Fig. 19: Fotomicrografia de corte desgastado de um espécime de enxerto retardado, com 2 semanas após o transplante. Notar a tênue fluorescência em alguns canalículos de Havers e Volkmann. Observar que o osso neoformado na face medular do enxerto (abaixo) já mostra regular fluorescência e que não ocorre neoformação óssea às custas do periosteio (acima), embora este esteja espessado. (Impregnação com Tetraciclina, 20X).

do ER. Esses vasos, todavia, não configuravam osteons adultos, mas deviam corresponder às fendas vasculares observadas nos exames histológicos. Eles se situavam na metade medular da espessura do enxerto e eram relativamente calibrosos, comparados com os canalículos de Volkmann.

No EF era possível perceber um ou outro vaso logo acima da face medular, esporadicamente; o restante do enxerto era preenchido pelos canalículos de Volkmann que mostravam a tênue fluorescência vista no sub-grupo Ia.

Havia aqui, então, um nítido predomínio de impregnação de Tetraciclina no ER, cuja fluorescência era bem mais intensa do que no EF, onde ela se limitava, praticamente, à superfície medular do enxerto. (Fig. 20).

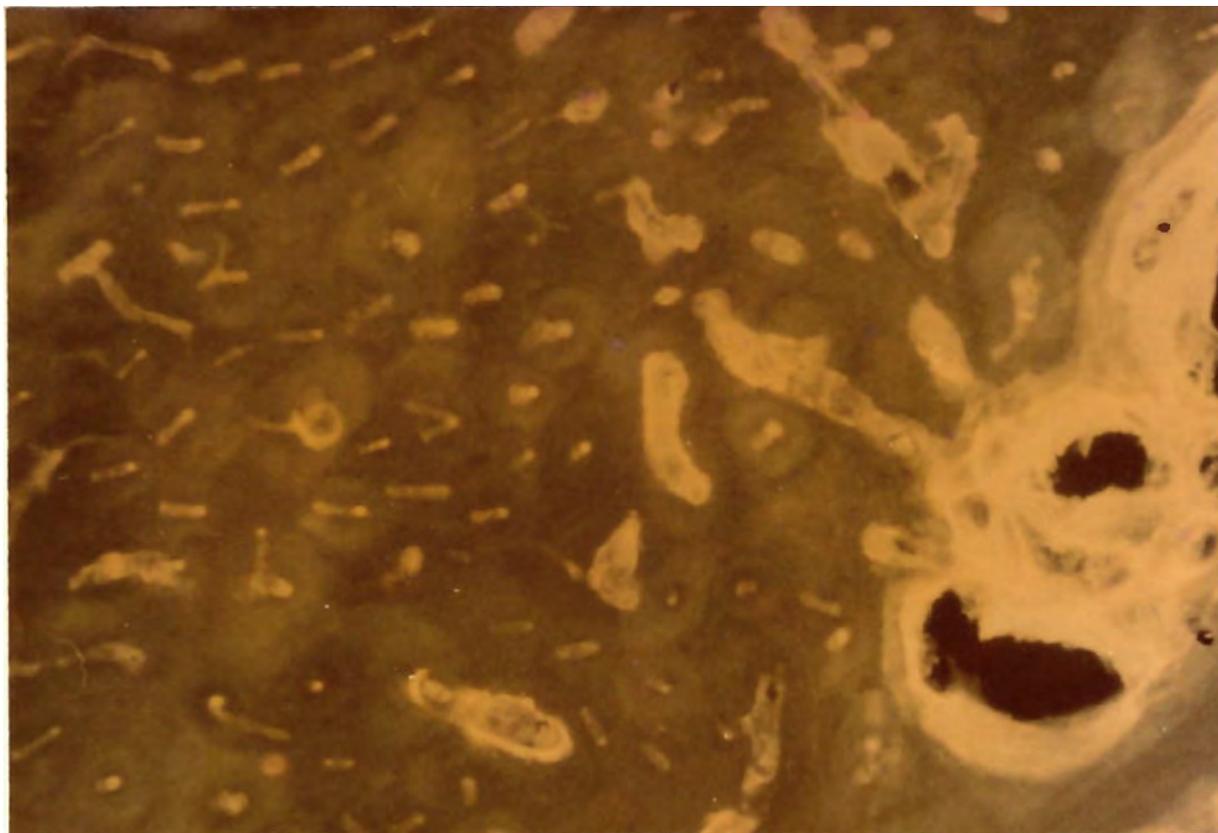
Sub-Grupo Ic - Com 8 semanas, vasos apresentando intensa fluorescência ocupavam, praticamente, toda a espessura do ER. Embora não de forma maciça, eles se distribuíam por todo o enxerto, desde a sua face medular até à periosteal.

Muitos desses vasos apresentavam 2 faixas de deposição de Tetraciclina, o que evidenciava que, em torno deles, já estavam se dispondo estruturas lamelares semelhantes a osteons (Fig. 21).

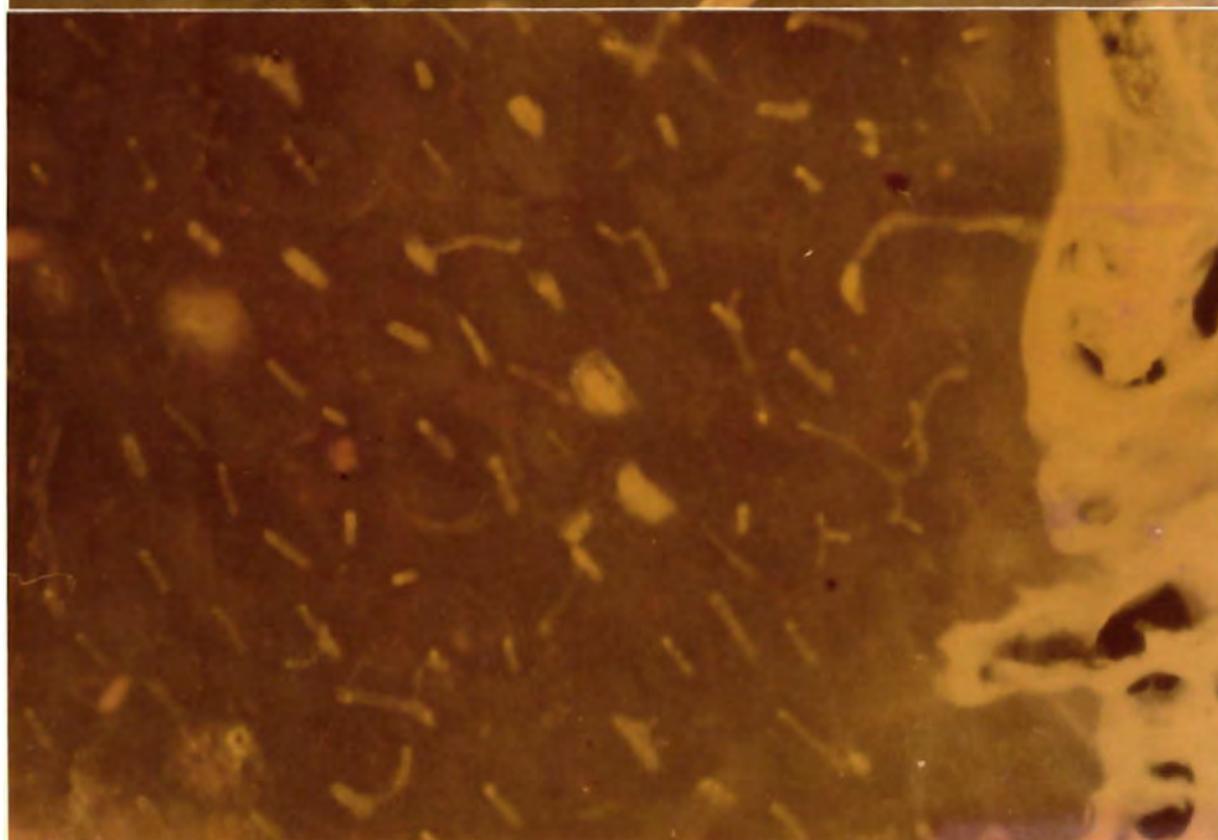
Em algumas lâminas foi possível observar nitidamente um vaso penetrando no enxerto pela sua face medular (Fig. 22); bem como agrupamentos de vasos próximos à sua face periosteal. (Fig. 23).

Vários dos enxertos, plenos de vasos fluorescentes, mostravam um aspecto que lembrava o da cortical receptora normal, diametralmente oposta.

Já no EF, embora houvesse vasos de calibre semelhante aos do ER, eles se situavam mais próximos à face medular, raramente ultrapassando a metade do enxerto. Além do calibre semelhante, o aspecto desses vasos não diferia muito dos vasos do ER, no que se refere à intensidade da fluorescência. Alguns, inclusive, mostravam 2 faixas de deposição de Tetraciclina. (Fig. 21).



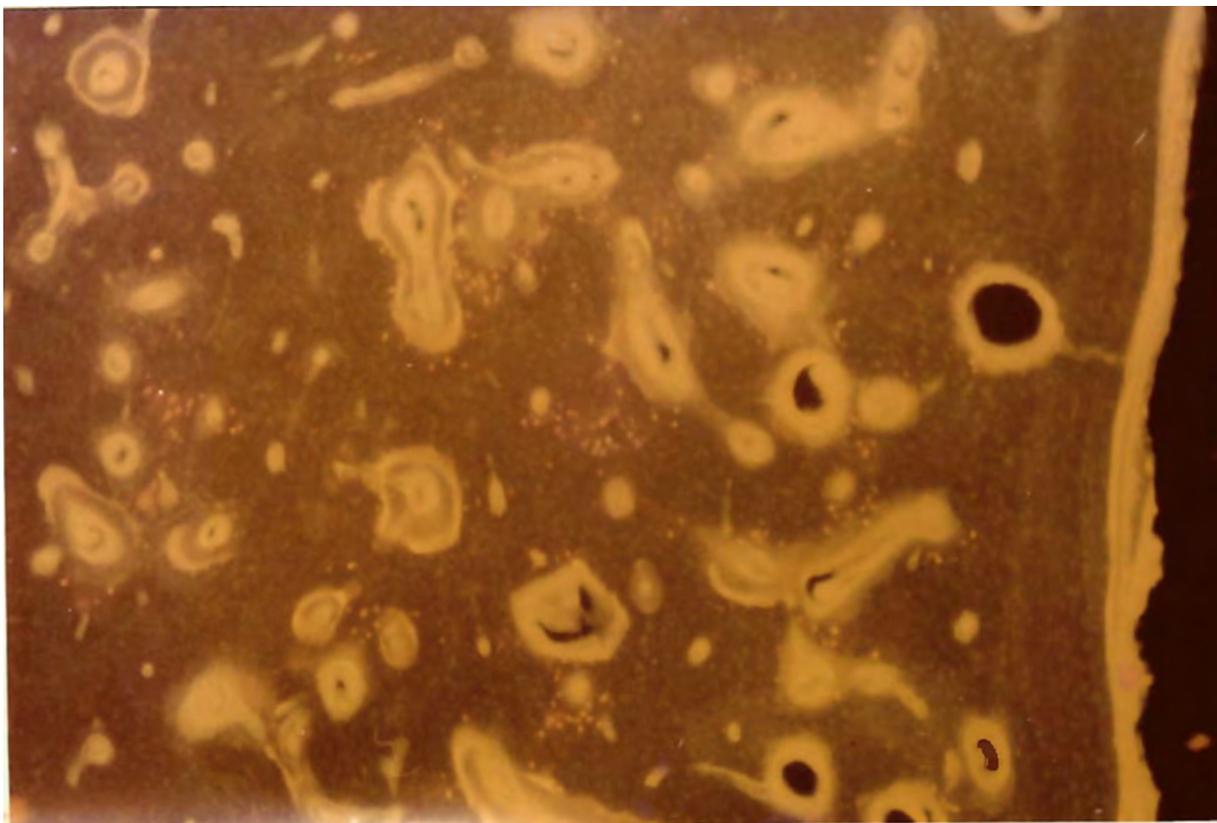
A



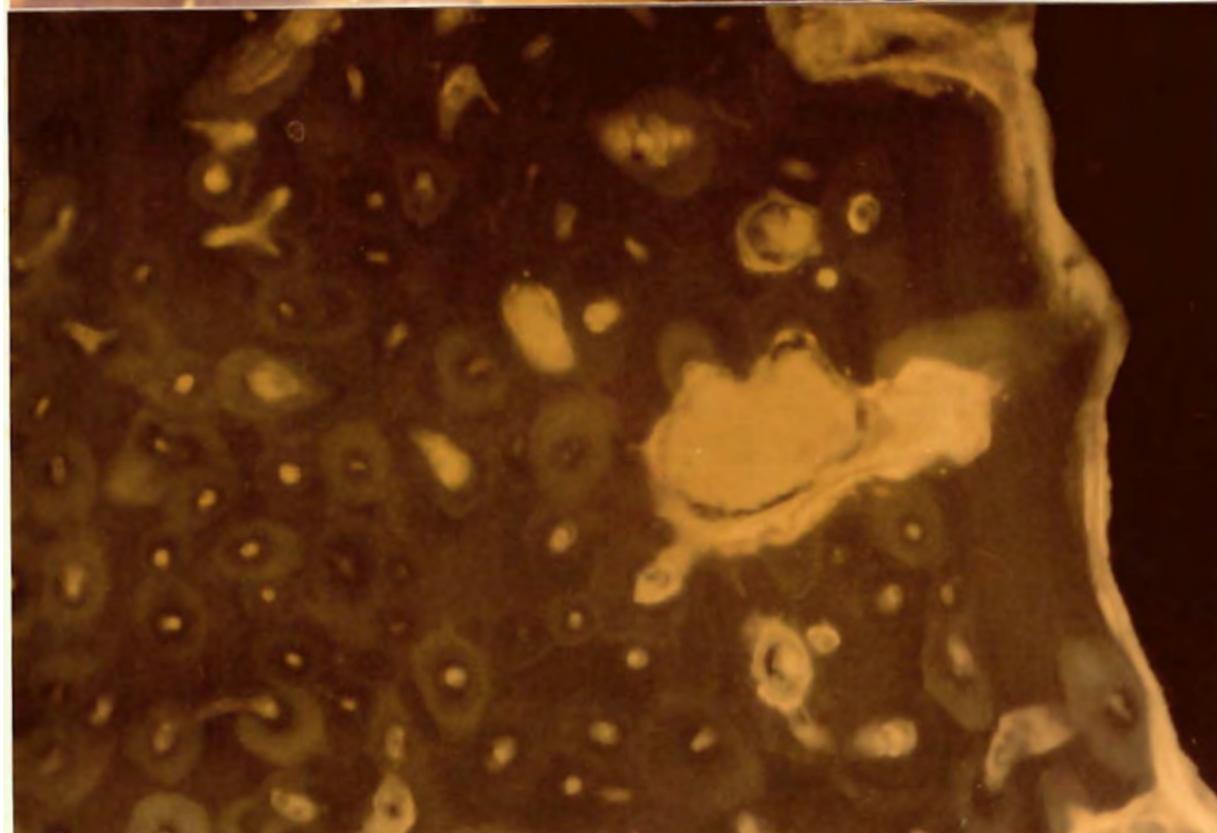
B

Fig. 20: Fotomicrografia de cortes desgastados de espécimes de ER e EF com 4 semanas após o transplante.

- A - ER: notar os vasos de calibre regular que aparecem já profundamente situados no enxerto. A frequência desses vasos é evidentemente maior aqui do que na fig. B.
- B - EF: notar que o enxerto apresenta apenas canalículos com tênue fluorescência. (Impregnação com Tetraciclina, 40X).



A



B

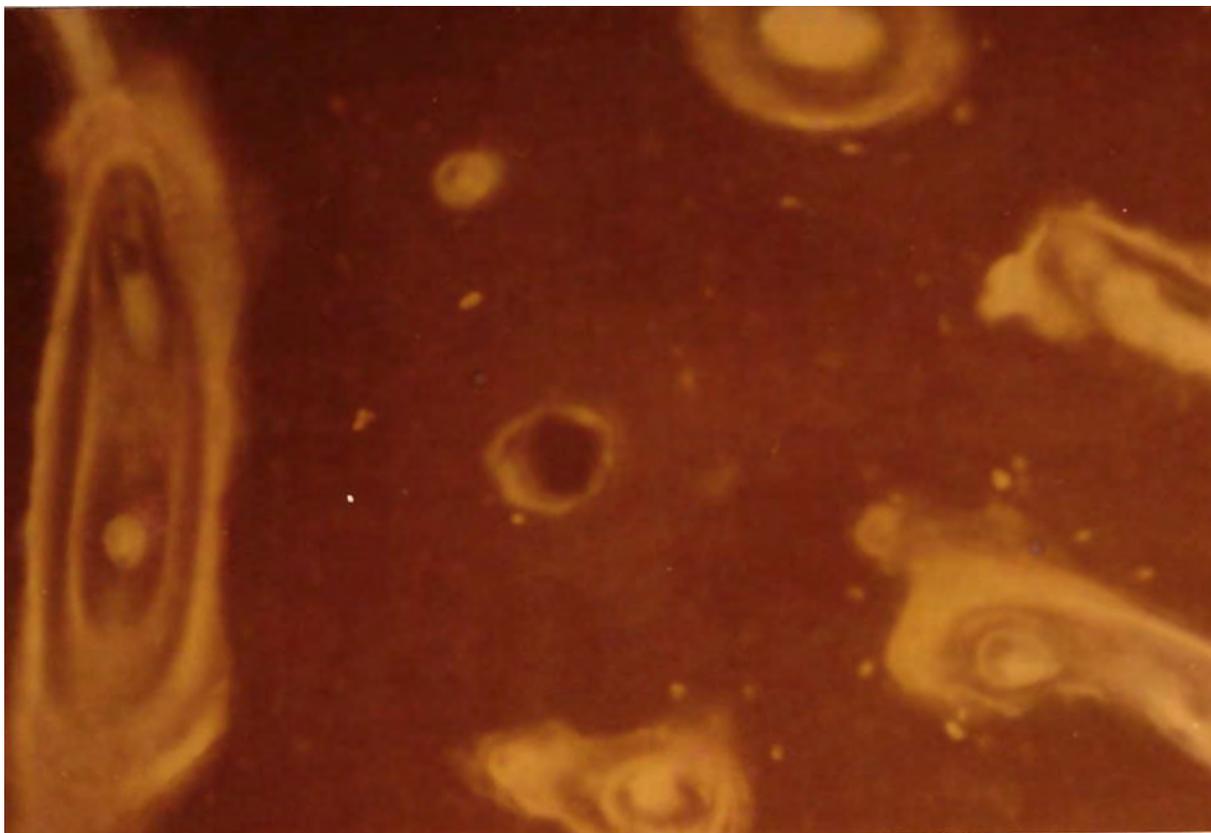
Fig. 21: Fotomicrografia de cortes desgastados de espécimes de ER e EF, com 8 semanas após o transplante.

A - ER: notar a presença de numerosos vasos de grande calibre, alguns já com disposição lamelar, ocupando toda a espessura do enxerto.

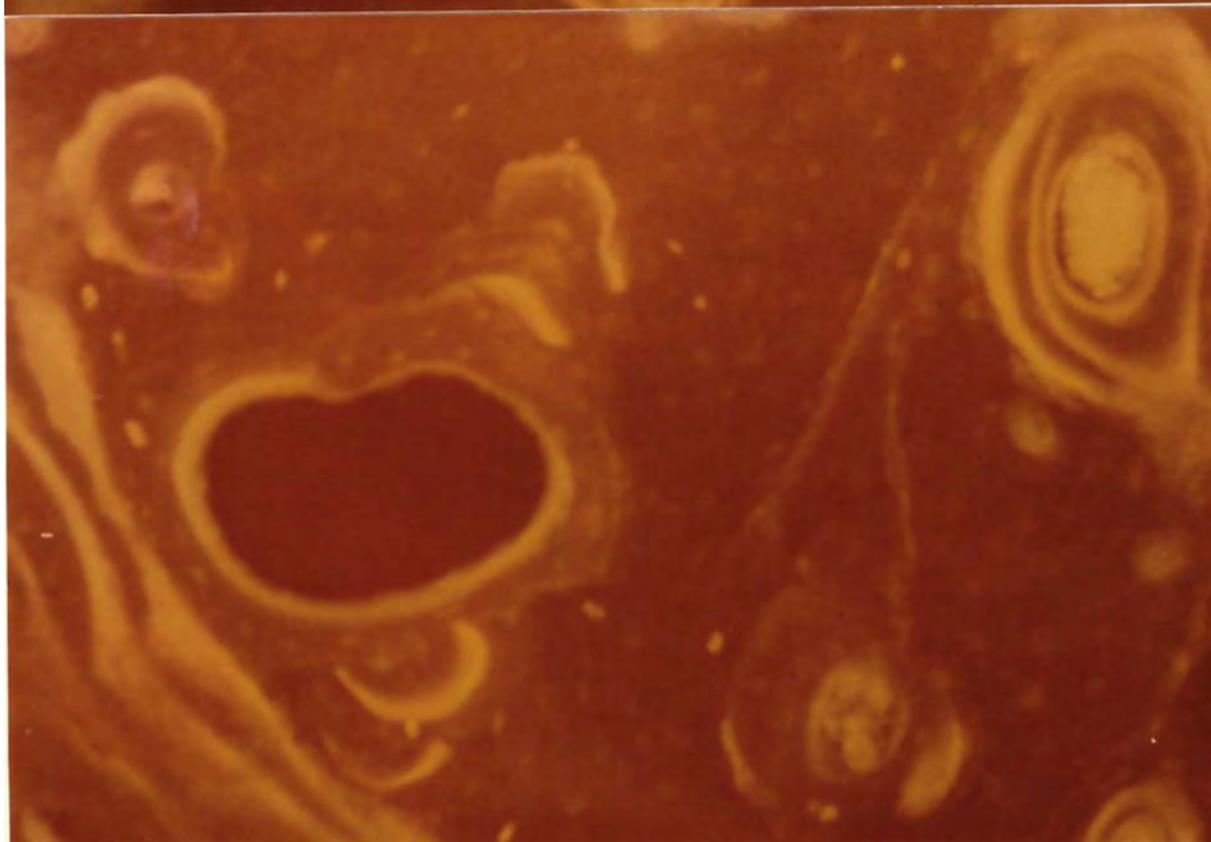
B - EF: vasos de grande calibre só existem junto à face medular do enxerto, predominando aqui apenas canais de Havers alargados.  
(Impregnação com Tetraciclina, 40X).



Fig. 22: Fotomicrografia de corte desgastado de um enxerto retardado com 8 semanas após o transplante. Detalhe de um vaso penetrando no ER a partir da face medular; é possível identificar a camada de osso produzida entre 2 faixas de fluorescência. (Impregnação com Tetraciclina , 100X).



A



B

Fig. 23: Fotomicrografia de cortes desgastados de espécimes de enxerto retardado, após 8 semanas de transplante.

A - Detalhe de vasos situados próximos à face periosteal do enxerto e nos quais se notam 2 faixas fluorescentes.

B - Detalhe de vasos situados próximos à região de vizinhança entre o enxerto e a cortical receptora; notar que disposição do osso neoformado no interior dos vasos se assemelha à de um sistema lamelar. (Impregnação com Tetraciclina, 100X).

Como ocorreu nos grupos anteriores, aqui também se observou que o periosteio, não evidenciado nas figuras, tanto no ER como no EF, estava em aparente inatividade, por duas razões: primeiro, não se observou nenhum vaso proveniente da superfície periosteal que penetrasse no enxerto; segundo, não se observou novo osso produzido pelo periosteio do enxerto, embora o periosteio do osso receptor, no limite do leito para o enxerto, mostrasse grande proliferação de osso densamente fluorescente.

A cortical do osso receptor, nas vizinhanças do leito para o enxerto, mostrava intenso processo reparativo, caracterizado pelo grande número de osteons com até 3 faixas de fluorescência de Tetraciclina. (Fig. 24).

Em alguns casos, a cortical do enxerto, tanto ER como EF, apresentava uma fratura que o dividia em 2 ou mais fragmentos grandes. Nesses casos, percebeu-se que a revascularização, denotada pelos vasos com fluorescência em suas paredes ocorria, independentemente em cada fragmento e de maneira aparentemente mais acelerada.

O Quadro I sintetiza os resultados obtidos no estudo da impregnação pela Tetraciclina. Convencionamos um processo semiquantitativo para a avaliação das lâminas, através da atribuição de cruzes, de uma a quatro, conforme a fluorescência fosse Mínima ou Nenhuma (+), Escassa (++), Regular (+++) e Abundante (+++), como preconizou Puranen (1966).

#### Grupo II - Resultados de Exames Cintilográficos:

Os resultados da contagem da radioatividade nas áreas doadora e receptora dos enxertos encontram-se no Quadro II, onde se observa, inicialmente, que não houve uma uniformidade de nível de captação de isótopo em todos os cães. Assim, o nível de contagem variou significativamente de um cão para outro, bem como no mesmo cão, na primeira e na segunda contagem.

Desse modo, por exemplo, enquanto no cão nº371 a contagem da radioatividade na tíbia esquerda (local do ER) e no 15º dia foi de 57890cpm, no cão nº 387 a contagem em local

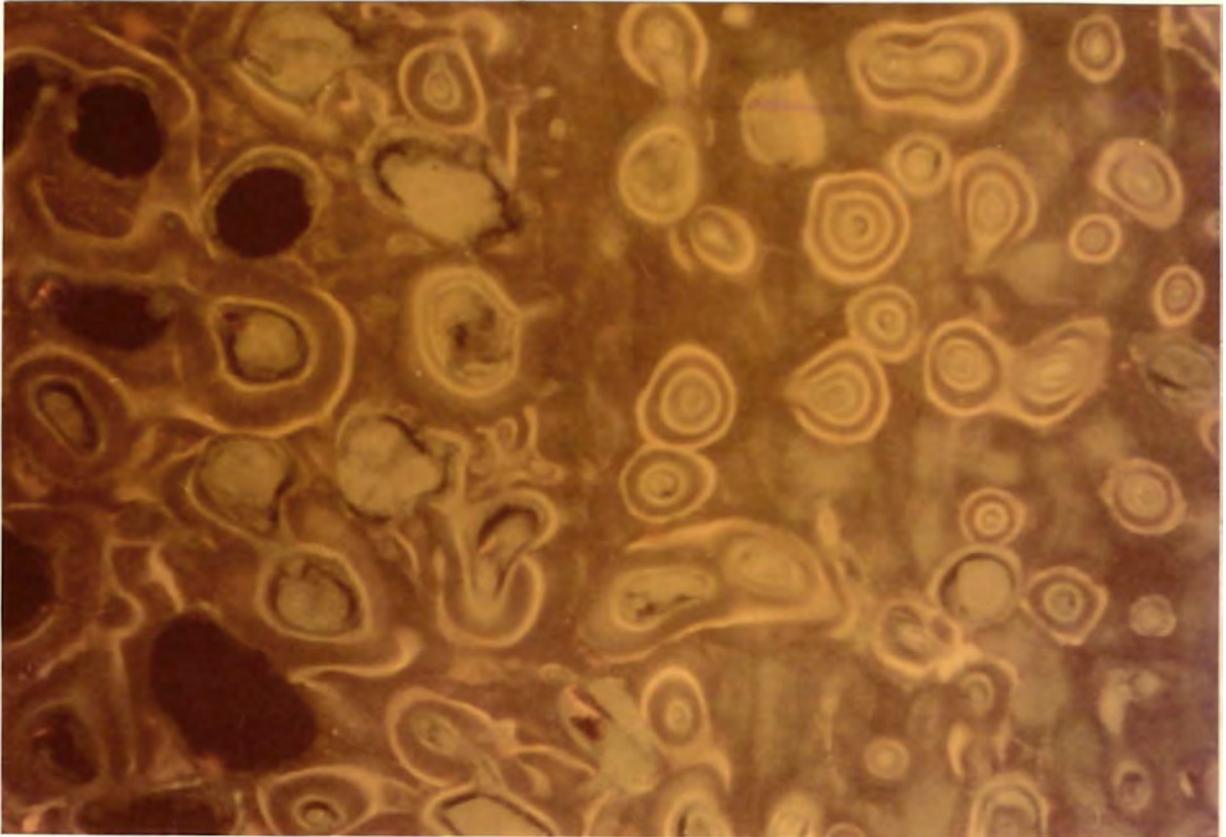


Fig. 24: Fotomicrografia de corte desgastado de um espécime de ER, com 8 semanas após o transplante. Detalhe da borda da cortical receptora onde se notam muitos vasos que exibem conformação osteônica, alguns com até 3 faixas fluorescentes, na metade direita da fotografia. A metade esquerda da fotografia retrata o osso neoformado que une a cortical receptora ao enxerto, que não aparece. Comparar este aspecto com o da fig. 21-A. (Impregnação com Tetraciclina, 40X).

QUADRO I

INTENSIDADE DA FLUORESCÊNCIA  
DE ENXERTO RETARDADO E DE ENXERTO FRESCO DO GRUPO I,  
SEGUNDO O TEMPO DE OBSERVAÇÃO E O NÚMERO DE INJEÇÕES DE TETRACICLINA

SUB-GRUPO	Nº DO CÃO	TEMPO DE TRANSPLANTE (SEMANAS)	Nº DE INJEÇÕES	INTENSIDADE DA FLUORESCÊNCIA										
				ENXERTO RETARDADO				ENXERTO FRESCO						
				MÍNIMA OU NENHUMA	ESCASSA	REGULAR	ABUNDANTE	MÍNIMA OU NENHUMA	ESCASSA	REGULAR	ABUNDANTE			
a	1	2	2	+						+				
	2	2	2		+					+				
	3	2	2	+						+				
	4	2	2	+						+				
	5	2	2	+						+				
	6	2	2		+					+				
	7	2	2	+						+				
	8	2	2		+					+				
b	9	4	4							+				
	10	4	4							+				
	11	4	4							+				
	12	4	4							+				
	13	4	4							+				
	14	4	4							+				
c	15	8	4											+
	16	8	4											+
	17	8	4											+
	18	8	4											+
	19	8	4											+

correspondente foi de 9163cpm.

Semelhante disparidade é vista também entre os cães n° 371 e n° 373, no lado direito e no lado esquerdo, nas contagens realizadas no 45° dia e, entre vários outros animais.

Para o mesmo animal, nota-se que o cão de n° 426 apresentou, na tíbia esquerda, no 15° dia, a contagem de 42560cpm; já no 45° dia, a contagem no mesmo local baixou para 4687cpm.

Os valores percentuais das diferenças entre as contagens do lado de teste (E) e do lado controle (D) expressam melhor os eventos que ocorriam nas áreas receptora e doadora, respectivamente, de ambos os tipos de enxertos.

Assim é que, no cômputo geral, essa diferença se situou entre um mínimo de 23,17% e um máximo de 49,43%, com média de 37,33%, no 15° dia, e um mínimo de 31,22% e um máximo de 39,36%, com média de 35,29%, no 45° dia para os ER. Houve, então, um decaimento médio de 2,04% do nível das contagens entre o 15° e o 45° dias.

Para os EF, o percentual da diferença teve um mínimo de 5,55% e um máximo de 7,24%, com média de 6,08%, no 15° dia, e um mínimo de 13,71% e um máximo de 19,39%, com média de 16,55%, no 45° dia. Aquí, ao contrário do observado nos ER, houve um incremento médio de 10,47% do nível das contagens entre o 15° e o 45° dias.

Todavia, nota-se que no grupo dos ER, um real decaimento ocorreu em 2 casos, enquanto que nos outros 2 houve um aumento do nível das contagens tão significativo quanto o decaimento dos anteriores. (Veja Quadro II).

Comparando-se os níveis médios de contagem entre os grupos dos ER e dos EF, no 15° dia, percebe-se que a diferença entre ambos é acentuada, ou seja, 37,33% nos ER e 6,08% nos EF. Já no 45° dia, a diferença entre os níveis médios de contagem caiu um pouco, mas permaneceu elevada, ou seja, de 35,29% nos ER para 16,55% nos EF.

Os cintilogramas têm valor para a avaliação dos resultados quando olhados comparativamente, no mesmo animal, o lado de teste e o lado controle. Assim, na fig. 25, que repre

-presenta o cintilograma do cão n° 426 (ER) obtido no 15º dia, nota-se a concentração nitidamente maior dos pontos no lado de teste (esquerdo) em relação ao lado controle (direito).

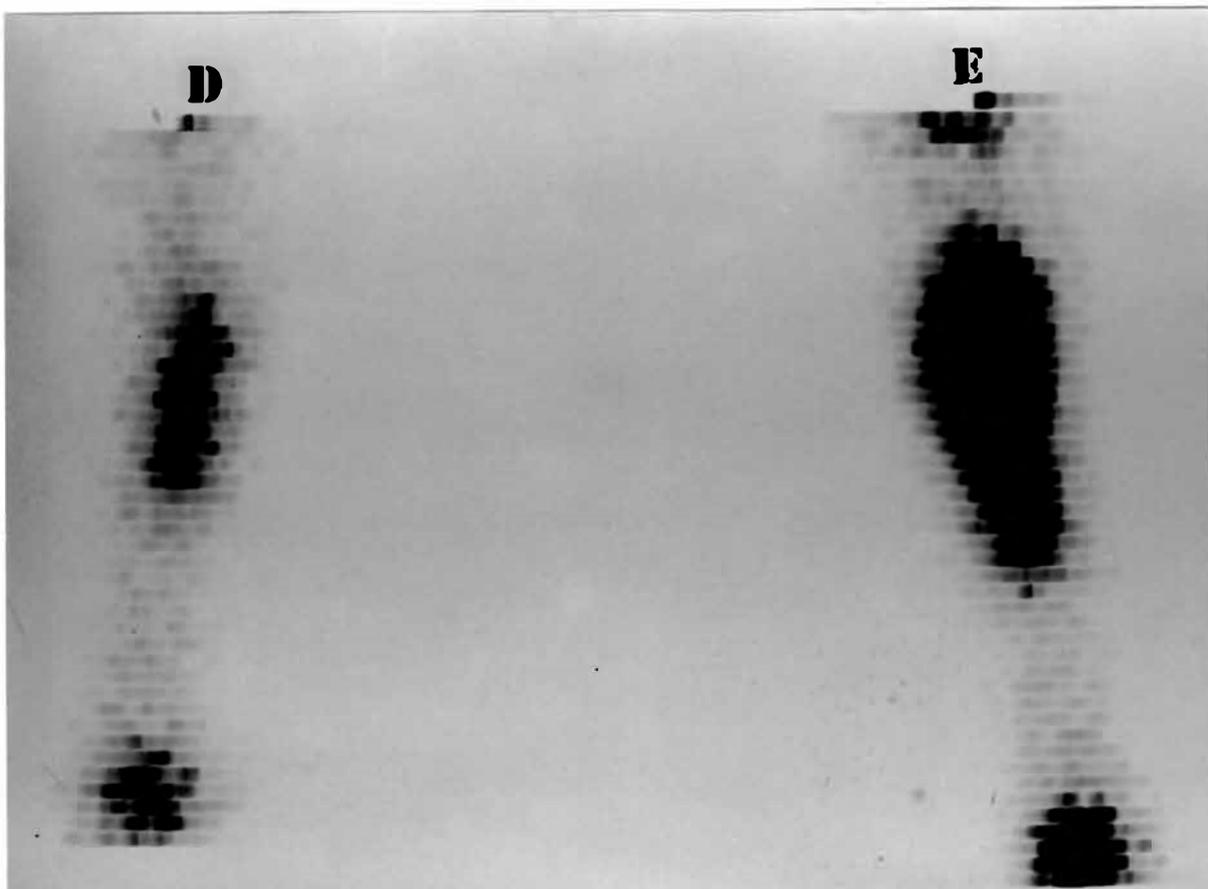


Fig. 25: Fotografia de um cintilograma obtido no 15º dia após o transplante de um Enxerto Retardado (cão n°426) Observar a concentração de pontos nitidamente maior na tíbia esquerda, local receptor do ER.

Q U A D R O   I I

VALORES DA RADIOATIVIDADE VERIFICADOS NAS ÁREAS  
DOADORA (D) E RECEPTORA (E) DE ENXERTOS ÓSSEOS DO GRUPO II,  
SEGUNDO O TIPO DE ENXERTO E O TEMPO DE OBSERVAÇÃO

GRUPO	Nº CÃO	TIPO DE ENXERTO	RADIOATIVIDADE (CONTAGEM POR MINUTO)					
			15º DIA			45º DIA		
			D	E	%(E-D)	D	E	%(E-D)
a	1	RETARDADO	40090	57890	44,44	30560	40100	31,22
	2	RETARDADO	36840	48730	32,27	9830	13690	39,36
	3	RETARDADO	7439	9163	23,19	15420	20830	35,08
	4	RETARDADO	28480	42560	49,43	3540	4687	35,50
b	5	FRESCO	70651	75773	7,24	115880	134179	15,79
	6	FRESCO	40141	42637	6,21	32921	38623	17,32
	7	FRESCO	19779	20860	5,55	4440	5049	13,71
	8	FRESCO	43324	46108	6,31	10610	12668	19,39

D I S C U S S Ã O

V - DISCUSSÃO -

A avaliação histológica dos espécimes obtidos no Experimento I forneceu dados importantes. Os mesmos foram enriquecidos pelas informações provenientes da análise da impregnação com Tetraciclina. Posteriormente, graças ao Experimento II foram acrescentados novos dados que vieram completar os encontrados no Experimento I.

Os exames histológicos mostraram serem os eventos praticamente semelhantes, tanto no EF como no ER, com a diferença que neste último eles eram mais rápidos, ou precoces.

Conforme o que se observou no Grupo I, o calo ósseo ou tecido de granulação óssea, aderido ao ER estava vivo e em franco processo de proliferação, ficando evidenciado pelo grande número de osteoblastos que o circundavam. A atividade osteoblástica que era acentuada nesse grupo incidia, inclusive, sobre o calo ósseo circundante do enxerto. Embora não se tenham notado áreas de necrose aí, na 2a. semana, tal fenômeno pode ter ocorrido antes desse prazo.

O fato de o calo ósseo aderido ao enxerto não ter se necrosado após o transplante, está em desacordo com o que foi referido por Siffert e Barash (1961), ao afirmarem que o calo ósseo sempre morre, não contribuindo para a neo-osteogênese após o transplante.

Quanto ao perióstio do enxerto em nenhum momento se notou que ele estivesse em atividade proliferativa considerável, nem ao menos discreta, embora estivesse presente na maioria dos cortes. Estes dados também estão em desacordo com os de G.Axhausen (1907-1909) e de W.Axhausen (1956), que têm sido aceitos como verdadeiros.

A ideia de que o ER leva consigo grande quantidade de tecido de granulação óssea, ou osteóide, e que este tecido tem ampla participação no processo de integração do enxerto, como observaram Orell (1937), Moore (1949), Lima (1965) e Nelson (1972), pareceu se confirmar. Verificamos a presença de tecido osteóide em franca proliferação osteoblástica, inclusi-

-ve com áreas de metaplasia cartilaginosa, como se viu nos espécimes do Grupo Ib, constituindo o próprio calo ósseo.

No Grupo Ib, o tecido de granulação óssea ao redor do ER era mais volumoso que no Grupo Ia e parecia invadir o enxerto, ocupando algumas das fendas vasculares, de tal maneira que se tornou difícil distinguir se esse tecido era derivado de células sobreviventes do próprio enxerto ou se era resultante da invasão do enxerto por células mesenquimais indiferenciadas do leito receptor.

Parece-nos mais provável este último mecanismo, porque, como havia muitas fendas vasculares no interior do enxerto, e essas fendas são abertas pelos osteoclastos a partir da periferia, é válido raciocinar que elas próprias tenham carregado as células mesenquimais para o interior do enxerto. Aí elas proliferariam e depositariam novo osso nas paredes das fendas, reduzindo seu diâmetro e conservando pequena luz para a circulação sanguínea, como que refazendo um osteon centrado por um canalículo de Havers, conforme concluíram Urist (1952), W. Axhausen (1956), e Enneking e Morris (1972).

O EF nos Grupos Ia e Ib mostrava um grau de revascularização e de proliferação osteoblástica bem menor que o ER. Todavia, a existência já no Grupo Ia, de uma camada de novo osso ao redor atesta ter ocorrido, claramente, um mecanismo de estimulação de células mesenquimais indiferenciadas do leito receptor, no sentido da sua diferenciação, e este dado está de acordo com as idéias de Levander (1934-1935), Urist (1952); W. Axhausen (1956), Goldhaber (1961) e outros.

O mecanismo de indução que foi possível observar no EF não pode ser visto claramente no ER, por causa da grande proliferação de tecido neo-formado que mascarava aquele mecanismo. O mecanismo que tornou a integração dos ER mais rápida, deve ter sido resultante da somatória de efeitos da presença do osteóide aderido ao enxerto e da ocorrência de estimulação de células mesenquimais indiferenciadas a partir do leito receptor. Este duplo mecanismo explicaria a formação de um maior volume de novo osso ao redor do ER nos Grupos Ia e Ib.

Os espécimes do Grupo Ic mostraram conclusivamente, que o ER se integra e se refaz mais rapidamente que o EF. Assim, na 8a. semana após o transplante o ER já não se mostrava como um elemento individualizado, mas fazia parte integrante da cortical receptora, embora sua arquitetura ainda fosse a de um osso esponjoso, trabeculado, entre cujas malhas existia tecido medular.

A observação microscópica com maior aumento desse tecido trabeculado revelava a existência de ilhas de tecido ósseo morto, envoltas pelo osso neo-formado, um achado coincidente com o de Enneking e Morris (1972). Isto significava que a reabilitação do ER não fugia aos padrões clássicos observados para a reorganização de enxertos ósseos corticais, fazendo-se, em resumo, em dois passos principais:

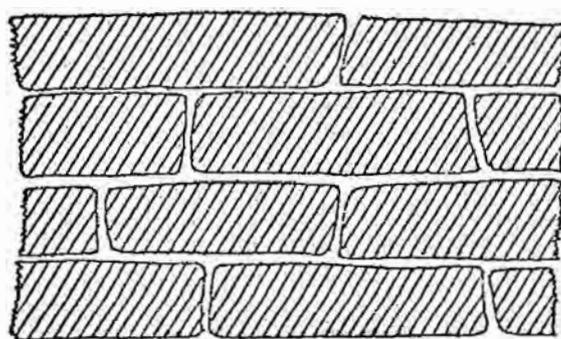
- 1 - Alargamento dos canais de Havers e de Volkmann, por meio da atividade osteoclástica, transformando-os em largos condutos que apareciam nos cortes longitudinais como fendas.
- 2 - Invasão desses condutos por células mesenquimais do leito receptor, as quais depositam osso neo-formado em suas paredes.

O osso neo-formado depositado nos múltiplos condutos resultantes do alargamento dos canais de Havers e de Volkmann, progressivamente vai isolando, então, ilhotas de tecido morto, como procuramos esquematizar na fig. 26.

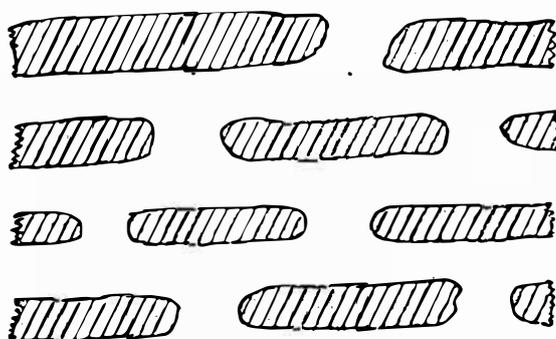
O aspecto do EF na 8a. semana correspondia ao do ER na 4a. semana. Tendo em vista que a defasagem entre ambos os grupos era de 4 semanas, pode-se avaliar o atraso na integração do EF em relação ao ER.

Os dados fornecidos pelo estudo da impregnação com a Tetraciclina confirmaram o observado nos exames histológicos. Na Quadro I se percebe claramente uma tendência em os resultados da leitura semiquantitativa da intensidade de fluorescência nos ER se agruparem à direita, isto é, do lado das classes de maior intensidade.

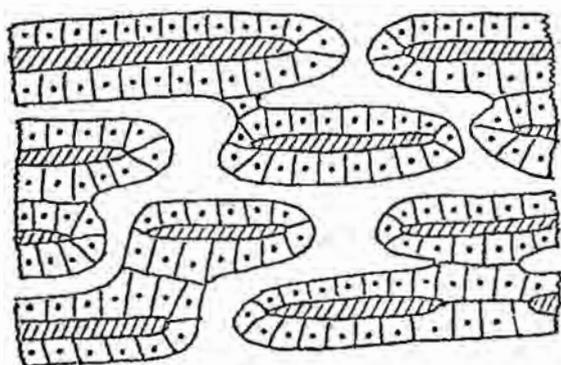
No Grupo Ia, com 2 semanas de transplante, o fato



a



b



c

FIG. 26: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REABITAÇÃO DO ENXERTO CORTICAL.

- A) SUPERFÍCIE DE CORTE DE UM SEGMENTO LONGITUDINAL DE OSO CORTICAL. VÊEM-SE CANALÍCULOS DE HAVERS E VOLKMANN.
- B) OS CANALÍCULOS FORAM ALARGADOS PELA ATIVIDADE OSTEOCLÁSTICA.
- C) O OSO NEOFORMADO SE DEPOSITOU SOBRE ILHAS DE OSO NECRÓTICO.

de não se haver observado nenhum vaso de calibre significativo penetrando nos enxertos, nem profundamente situados neles, tanto no ER como no EF, significava que ambos ainda não estavam sendo convenientemente perfundidos nessa época. A tênue fluorescência observada nas paredes dos canalículos de Havers e de Volkmann deve ser natural ou decorrente de artefato de técnica, não se devendo à impregnação com Tetraciclina, como demonstraram Milch e cols. (1957). Não houve, então, diferenças significativas entre o ER e o EF neste grupo, demonstráveis pela impregnação, embora histologicamente houvesse.

A partir do Grupo Ib, todavia, a presença de vasos já situados na metade medular do enxerto, no ER, demonstrava que a irrigação desse último já era satisfatória no final da 4a. semana do transplante; este achado tornava-se compatível com os achados histológicos nesse mesmo grupo, pois era a demonstração de que as fendas vasculares lá observadas estavam realmente sendo perfundidas e preenchidas por osso neoformado.

Por sua vez, o EF nesse grupo também mostrava vasos com paredes fluorescentes; esse achado era compatível com os dos exames histológicos e o fato de a fluorescência aqui ser mais discreta quando confrontada com o ER mostrou, igualmente estar o último, na 4a. semana, melhor integrado no leito receptor.

No Grupo Ic, os dados evidenciados pela fluorescência da Tetraciclina confirmaram o fato observado no Grupo Ib, ou seja, o ER se integra mais precocemente que o EF.

Assim, com 8 semanas o ER já mostrava vasos ocupando toda a sua espessura e não restritos a sua metade medular, significando que todo ele estava sendo perfundido integralmente e produzindo osso neoformado, de maneira compatível com o seu estágio de evolução histológica. Em vários casos a intensidade da fluorescência era de tal ordem que a irrigação do enxerto apresentava-se praticamente igual à do osso normal.

Mas, quanto à formação de ósteons, o ER nessa época, ainda se distanciava do osso normal, já que apresentava dispo

-sição lamelar (Fig.23) sem formar ósteons. Estes, em contrapartida, eram bem evidentes nas bordas do osso receptor (Fig. 24), que se mantivera vivo durante toda a experiência.

Faltou nos nossos experimentos prosseguir com a investigação por um período maior, para poder determinar em que época o ER assumiria a capacidade de formar ósteons.

O EF mostrava uma razoável intensidade de fluorescência; todavia, ela ainda estava restrita à metade medular do enxerto, lembrando o ER do Grupo Ib, atestando o atraso com que o EF se integra.

Do cômputo geral dos dados histológicos e da fluorescência da Tetraciclina ficou a certeza de que o ER se revasculariza e se reintegra cerca de 2 vezes mais rapidamente que o EF. A revascularização dos enxertos foi avaliada indiretamente, por meio dos dados histológicos e da impregnação com a Tetraciclina, que é considerado um bom processo, tanto para avaliar a atividade metabólica como a perfusão dos enxertos.

Não foi possível determinar a ocorrência ou não de penetração de vasos neo-formados através de orifícios vasculares pré-existentes, como referiram Stringa (1965) e Nelson (1972). Ficou bem evidente que o perióstio não contribuiu para a revascularização, a qual se fez, em todos os enxertos dos dois tipos, a partir da face endostal ou medular e, das regiões do enxerto vizinhas à cortical do leito receptor. Este achado pode significar que as partes moles que cobriam o enxerto, principalmente os tecidos musculares, contribuem pouco para a sua revascularização, quando comparados ao próprio osso.

A capacidade de firme adesão dos dois tipos de enxerto deve, também diferir. Embora não se tenha realizado estudos mecânicos para testá-la, a imbricação do enxerto com o osso neo-formado, e deste com o osso receptor, pode dar uma idéia de quanto ela vale. Como essa imbricação sempre foi maior no ER, desde os estádios iniciais de sua integração, pode-se supor que sua adesão tenha sido sempre maior.

Este último fator parece ser importante quando se trata de substituir grandes segmentos ósseos por algum enxer-

-to, pois quanto mais rapidamente o enxerto aderir ao osso receptor mais rapidamente ocorrerá imobilidade completa entre os vários segmentos, facilitando a continuação dos processos de revascularização e reintegração.

A colocação dos enxertos no leito receptor da maneira como se fez no Experimento I deu-lhes alto grau de imobilidade, de modo que este também pode ter sido um dos fatores que levou à rápida integração de ambos.

O emprego de radioisótopos, visando a obtenção de imagens cintilográficas de enxertos em processos de integração, pareceu, pelo que pudemos apurar dos trabalhos consultados, um método de grande potencial ainda não totalmente explorado (haja visto o pequeno número de trabalhos existentes a respeito).

Os trabalhos de Stevenson e cols. (1974) e de Kelly, e cols. (1975-1976) mostram, sem deixar margem à dúvida, que os dados fornecidos pela cintilografia podem ser mais precoces e mais confiáveis que os das radiografias convencionais, no estudo da integração de enxertos ósseos de vários tipos. Possivelmente, essa precocidade de imagem visual se deve ao fato de que nos enxertos em integração há um volume considerável de tecido jovem em intensa proliferação e portanto, com uma alta atividade metabólica.

De acordo com Thrall e cols. (1974) são justamente nessas áreas de alta atividade metabólica que o  $Tc99^m$  tende a se concentrar dando imagens visuais com excelente definição de contornos, devido ao contraste com as áreas de menor captação de isótopo.

No nosso Experimento II não tivemos a intenção de comparar os achados cintilográficos com as radiografias, mas, baseados nos dados dos autores anteriormente citados, apenas comparamos a imagem cintilográfica da área doadora com a área receptora de ambos os tipos de enxerto.

O traumatismo cirúrgico do periosteio da área doadora dos enxertos dos 2 tipos testados produziu uma reação periosteal que pareceu nítida tanto nos cortes histológicos como nos cortes desgastados para o estudo da impregnação com Tetra

-ciclina. Apesar de a área doadora do ER ter sofrido 2 traumas cirúrgicos, o primeiro para o preparo e o segundo para a retirada do ER, não houve evidência histológica de que a reação periosteal aí fosse muito maior do que na área do EF. Por isso, acreditamos que usar essa área como controle para o que se passava na área receptora, onde sem dúvida também há reação periosteal pelo trauma cirúrgico, foi uma conduta adequada à situação. Assim, a contagem da radioatividade e a imagem cintilográfica na perna direita (controle) se devem exclusivamente à reação periosteal do osso doador, enquanto que na perna esquerda (teste) são resultantes da somatória da atividade da reação periosteal do osso receptor, acrescida à do próprio enxerto.

Em todo o experimento, a concentração de isótopos na área receptora sempre foi sensivelmente maior do que na área doadora. No nosso entender, este achado é uma prova inconteste de que ambos os enxertos, por apresentarem maior atividade metabólica, estavam em franca integração e já produzindo novo osso no 15º e no 45º dias.

Vale lembrar aqui que o traumatismo cirúrgico na área receptora e na área doadora, tanto do ER como do EF, foram contemporâneos. Embora a análise dos cortes histológicos tenha mostrado pequena quantidade de novo osso apostado ao EF, ao final da 2a. semana de observação, os dados do exame cintilográfico e da contagem da radioatividade, mostraram que a deposição desse novo osso é um processo ativo de proliferação osteogênica. Sob esse ângulo, os dados da cintilografia dos EF no 45º dia mostraram que além de um processo ativo, a deposição de novo osso no EF também é progressiva.

A queda observada na média dos percentuais de diferença de contagem da radioatividade entre o lado de teste e o de controle no ER, do 15º dia para o 45º dia de observação, embora pequeno, mostra-se significativo. Da mesma forma, o incremento observado na média dos percentuais para o EF, numericamente maior, foi igualmente significativo.

Se compararmos os estudos histológicos com os dados

da cintilografia é fácil entender que o ER na 8a. semana (56º dia) por estar já totalmente integrado, como mostra o quadro histológico, deverá apresentar atividade metabólica diminuída. Pelo mesmo raciocínio o EF nessa mesma época, ainda em fase de integração, deverá demonstrar elevada atividade metabólica, patente na cintilografia.

Por essa razão, a pequena queda observada nos ER significaria justamente que eles já atingiram um determinado equilíbrio entre a absorção e a neo-formação de tecido ósseo, comportando-se como se fosse um osso adulto normal. Seguindo esse mesmo raciocínio, o razoável incremento observado nos EF significa que estes ainda não atingiram tal equilíbrio, de modo que a tendência é que os percentuais de diferença entre os lados de teste e de controle continuem a aumentar até atingi-lo, como nos ER.

A análise em conjunto de todos os dados (fornecidos pelos exames histológicos, pela fluorescência da Tetraciclina e pela contagem da radioatividade e cintilografia,) mostra com evidência que o Enxerto Cortical Retardado se revasculariza e se integra muito antes do que o Enxerto Cortical Fresco o faz, de tal modo que os resultados experimentais encorajam ainda mais o seu emprego clínico, principalmente quando também se necessita de apoio mecânico que um enxerto esponjoso certamente proveria.

Outra grande vantagem desse tipo de enxerto é que ele é autólogo e esse fato se torna importante quando se vê, na literatura médica moderna, cada vez mais acesa a polêmica entre os defensores dos enxertos homólogos e os defensores dos enxertos autólogos, sendo que os estudos experimentais realizados, como o nosso, demonstram a excelência destes últimos.

Quando analisamos os enxertos quanto à fonte ou origem de obtenção, as informações bibliográficas revelaram a existência de uma grande polêmica em torno da questão, principalmente nas décadas de 50 e 60. Nessa época, numerosos autores defendiam os enxertos autólogos como os mais cabíveis de serem usados em cirurgia de enxertia óssea (Sieber, 1954 e outros), enquanto por outro lado, muitos outros batiam-se pe-

-los enxertos homólogos, argumentando serem eles praticamente idênticos aos autólogos, do ponto de vista do estímulo da neo-osteogênese (Magnolfi, 1958 e outros).

Todavia, trabalhos experimentais bem conduzidos realizados por Axhausen (1962) e Puranen (1966) mostraram, sem deixar margem à dúvidas, que os enxertos autólogos são inegavelmente superiores a qualquer outro tipo de enxerto. Sherk e Nicholson (1971), ao analisarem o comportamento dos enxertos homólogos, demonstraram que estes não alteraram a evolução da consolidação de fraturas de fêmur em ratos, ao passo que os enxertos autólogos participavam ativamente do processo.

Estudos de caráter eminentemente imunológico como os de Burwell e cols. (1961 a 1964), de Bonfiglio e Wayburn (1972) e de Elves e Salama (1974), mostraram que o sistema imunológico do receptor reage vivamente à presença de enxertos ósseos homólogos e, principalmente, heterólogos, de modo que esses tipos de enxertos podem ser considerados como agentes agressores.

Tendo em vista o que foi exposto, podemos afirmar que o enxerto cortical retardado é superior a qualquer outro tipo de enxerto homólogo, ou mesmo heterólogo como o do tipo testado por Baadsgaard (1971), na realidade um enxerto retardado de Osso de Kiel. Aqui, o osso neo-formado sobre as placas de Osso de Kiel, portanto autólogo, se integrava muito bem, mas o destino final da placa de osso de Kiel não era muito diferente de qualquer outro implante desse tipo, pouco ou nenhum sinal de real integração ocorria.

O enxerto cortical retardado, na forma por nós desenvolvida, apresenta não só a vantagem inicial de ser autólogo, como suas virtudes parecem suplantar de longe, a desvantagem que representaria a necessidade da cirurgia prévia para o seu preparo.

C O N C L U S Õ E S

VI - CONCLUSÕES -

O esquema experimental utilizado e os métodos de avaliação empregados se coadunam com as seguintes conclusões:

- 1 - O Enxerto Cortical Autólogo Retardado se revasculariza e se integra no leito receptor cerca de duas vezes mais rapidamente do que o Enxerto Cortical Autólogo Fresco. Os fenômenos que caracterizam a integração dos dois tipos de enxertos são comuns a ambos porém, mais precoces e rápidos no primeiro.
- 2 - O periosteó parece não desempenhar papel importante na reabilitação do Enxerto Retardado, nem na do Enxerto Fresco.
- 3 - A revascularização dos dois tipos de enxerto pareceu ser proveniente apenas das faces endostal e marginais da cortical receptora. Houve predomínio da revascularização longitudinal, através do alargamento dos canais de Havers, com a subsequente penetração de células formadoras de novo osso.

B I B L I O G R A F I A

VII - BIBLIOGRAFIA -

1. ABBOTT LC, SCHOTTSTAEDT ER, SAUNDERS JBCM & BOST FC: The evaluation of cortical and cancellous bone as grafting material. J Bone Joint Surg 29: 381, 1947.
2. ALBEE FH: Fundamentals in bone transplantation. Experiences in three thousand bone graft operations. JAMA 81: 1429, 1923.
3. ARENS W: Erfahrungen und Folgerung aus 500 Knochenverpflanzungen. Langenbecks Arch Klin Chir 308: 1024, 1964.
4. AXHAUSEN G: Histologische Untersuchungen über knochentransplantation am Menschen. Deutsch Z Chir 91: 388, 1907.
5. AXHAUSEN G: Die histologischen und klinischen Gesetze der freien Osteoplastik auf Grund von Thierversuchen. Langenbecks Arch Klin Chir 88: 23, 1909.
6. AXHAUSEN W: The osteogenetic phases of regeneration of bone. A histological and experimental study. J Bone Joint Surg 38-A: 593, 1956.
7. AXHAUSEN W: Die Bedeutung der Individual- und Artsspezifität der Gewebe für die freie Knochenüberpflanzung. Mschr Unfallheilk, Heft 72, 1962.
8. BAADSGAARD K: Transplantation of callus-invaded Kiel bone to defect pseudoarthrosis. An experimental study. Acta Orthop Scand 42: 122, 1971.
9. BARRETT JJ, SMITH PHS: Bone imaging with  $^{99}\text{Tc}^{\text{M}}$ -polyphosphate: a comparison with  $^{18}\text{F}$  and skeletal radiography. Br J Radiol 47: 387, 1974.
10. BARTH A: Über histologische Befunde nach Knocheimplantation. Langenbecks Arch Klin Chir 46: 409, 1893.
11. BARTH A: Cited by Chase SW, Herndon CH: The fate of autogenous and homogenous bone grafts. A historical review. J Bone Joint Surg 37-A: 809, 1955.
12. BASSETT CAL, HURLEY LA & STINCHFIELD FE: The fate of long term anorganic bone implants. Transplant Bull 29: 423, 1962.

13. BASSETT CAL, CREIGHTON KD Jr: A comparison of host response to cortical autografts and processed calf heterografts. *J Bone Joint Surg* 44-A: 842, 1962a.
14. BERTINI G: La vascolarizzazione negli innesti ossei autoplastici. *Arch Ital Chir* 16: 105, 1926.
15. BONFIGLIO M & JETER WS: Immunological responses to bone. *Clin Orthop* 87: 19, 1972.
16. BASSETT CAL: Clinical implications of cell function in bone grafting. *Clin Orthop* 87: 49, 1972a.
17. BOSWORTH DM, WRIGHT HA, FIELDING JW & GOODRICH R: A study in the use of Bank Bone for spine fusion in tuberculosis. *J Bone Joint Surg* 35-A: 329, 1953.
18. BÜRING K & URIST MR: Transfilter bone induction. *Clin Orthop & Related Research* 54: 235, 1967.
19. BÜRKE de la CAMP H: Knochentransplantationen. *Verhandlungsbericht d. XVIII Congr Società International de Chirurgie* S 169, Impr Med et Scient, Bruessel, 1959.
20. BURWELL RG & GOWLAND G: Studies in the transplantation of bone. I-Assessment of antigenicity. Serological studies. *J Bone Joint Surg* 43-B: 814, 1961.
21. BURWELL RG & GOWLAND G: II-The changes occurring in the lymphoid tissue after homografts and autografts of fresh cancellous bone. *J Bone Joint Surg* 43-B:820,1961.
22. BURWELL RG & GOWLAND G: III-The immune responses of lymph nodes draining components of fresh homologous cancellous bone and homologous bone treated by different methods. *J Bone Joint Surg* 44-B: 131, 1962.
23. BURWELL RG: IV- The immune responses of lymph nodes draining second-set homografts of fresh cancellous bone. *J Bone Joint Surg* 44-B: 688, 1962.
24. BURWELL RG: V-The capacity of fresh and treated homografts of bone to evoke transplantation immunity. *J Bone Joint Surg* 45-B: 386, 1963.
25. BURWELL RG, GOWLAND G & DEXTER F: VI-Further observation concerning the antigenicity of homologous cortical and cancellous bone. *J Bone Joint Surg* 45-B: 597, 1963.

26. BURWELL RG: 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 46-B: 110, 1964.
27. BUSER P: Erfahrungen mit Kältekonservierten Knochenpflanzungen. Langenbecks Arch Klin Chir 290: 289, 1959.
28. CAMPANACCI M, GIUNTI A, LEONESSA C, PAGANI P & TRENTANI C: Infantile pseudarthrosis of the tibia. Ital J Orthop Traumatol suppl. 1: 27, 1975 (Proceedings).
29. CAMPBELL CJ, BROWER T, MACFADDEN G, PAYNE EB & DOHERTY J: Experimental study of the fate of bone grafts. J Bone Joint Surg 35-A: 332, 1953.
30. CARNESALE PL & SPANKUS JD: A clinical comparative study of autogenous and homogenous-bone grafts. J Bone Joint Surg 41-A: 887, 1959.
31. CASTRONOVO FP Jr & CALAHAN RJ: New bone scanning agent:  $^{99m}\text{Tc}$ -labelled 1-hydroxy-ethylidene-1, 1-disodium phosphonate. J Nucl Med 13: 823, 1972.
32. CHALMERS J: Transplantation immunity in bone homografting. J Bone Joint Surg 41-B: 160, 1959.
33. CHARKES ND & SKLAROFF DM: Early diagnosis of metastatic bone cancer by photoscanning with strontium-85. J Nucl Med 5: 168, 1964.
34. CHARKES ND, SKLAROFF DM & BIERLY J: Detection of metastatic cancer to bone by scintiscanning with strontium-87<sup>m</sup>. Am J Roentg Radium Ther Nucl Med 91: 1121, 1964.
35. CHARKES ND, SKLAROFF DM & YOUNG I: A critical analysis of strontium bone scanning for detection of metastatic cancer. Am J Roentg 96: 647, 1966.
36. CHASE SW & HERNDON CH: The fate of autogenous and homogenous bone grafts. A historical review. J Bone Joint Surg 37-A: 809, 1955.
37. CITRIN DL, GREIG WR, CALDER JF, BESSENT RG, TUOHY JB & BLUMGART LH: Preliminary experiences of bone scanning with  $^{99m}\text{Tc}$ -labelled polyphosphate in malignant diseases. Br J Surg 61: 73, 1974.

38. CLAWSON KD: in Proceedings of the XXVI annual meeting of the Western Orthop Association. J Bone Joint Surg 45-A: 656, 1963.
39. CLEATON-JONES PE, RETIEF DH & MAIER G: The effect of frozen irradiated bone homografts of the healing of defects in the mandible and femur of the rat. J Bone Joint Surg 53-B: 532, 1971.
40. DANIS A: Après une greffe de tissue squelettique ostéogène c'est a partir de cellules transplantées que se constitue l'os de nouvelle formation. Bull Soc Int Chir 19: 647, 1960.
41. DAVIS JB & TAYLOR AN: Muscle pedicle bone grafts. An Experimental study. Arch Surg 65: 330, 1952.
42. DAVIS JB: The muscle-pedicle bone graft in hip fusion. J Bone Joint Surg 36-A: 790, 1954.
43. DAVIS JB, FAGAN TE & BEALS RK: Follow-up notes on articles previously published in the journal. Muscle-Pedicle bone graft in hip fusion. J Bone Joint Surg 53-A: 1645, 1971.
44. DE TOMASI L: Gli innesti d'osso: ulteriore contributo clinico e sperimentale alla banca dell'osso. Arch Orthop 68: 242, 1955.
45. DELEU J & TRUETA J: Vascularization of bone grafts in the anterior chamber of the eye. J Bone Joint Surg 47-B: 319, 1965.
46. DUHAMEL HL: Citado por Chase SW & Herndon CH.
47. DUTHIE RB: A histochemical study of transplanted skeletal tissue during tissue culture in vivo. Br J Plast Surg 11: 1, 1958.
48. ELVES MW & SALAMA R: A study of the development of cytotoxic antibodies produced in recipients of xenografts (heterografts) of iliac bone. J Bone Joint Surg 56-B: 331, 1974.
49. ELVES MW & PRATT LM: The pattern of new bone formation in isografts of bone. Acta Orthop Scand 46: 549, 1975.

50. ENGSTRÖM H & ORELL S: "Über regeneration rings um subcutane Knochen-implantate. Z Mikr Anat Forsch 53:283, 1943.
51. ENOKI S: Estudos de alguns aspectos da calcificação e do crescimento dos dentes incisivos de ratos diabéticos aloxâmicos. Tese apresentada à Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto, para obtenção do grau de Doutor em Ciências (Bioquímica), Ribeirão Preto, 1971.
52. ENNEKING WF & MORRIS JL: Human autologous cortical bone transplants. Clin Orthop 87: 28, 1972.
53. EYRE-BROOK AL, BAILY RAJ & PRICE CHG: Infantile pseudoarthrosis of the tibia (3 cases treated successfully by delayed autogenous by-pass graft). J Bone Joint Surg 51-B: 604, 1969.
54. FLEMING WH, MCILRAITH JD & KING ER: Photoscanning of bone lesions utilizing strontium-85. Radiology 77:635, 1961.
55. FLOWERS WM JR:  $^{99m}\text{Tc}$ -polyphosphate uptake within pulmonary and soft-tissue metastases from osteosarcoma. Radiology 112: 377, 1974.
55. FLURENS D: Citado por Chase SW & Herndon CH.
56. FROST HM: Preparation of thin undecalcified bone sections by rapid manual method. Stain Technol 33: 773, 1959a.
57. FROST HM: Staining of fresh undecalcified thin bone sections. Stain Technol 34: 135, 1959b.
58. FROST HM, VILLANUEVA AR & ROTH H: Tetracycline staining of newly forming bone and mineralizing cartilage in vivo. Stain Techn 35: 135, 1960.
59. FROST HM: Measurement of human bone formation by means of tetracycline labelling. Can J Bioch Phys 41:31, 1963.
60. FLETCHER JW, SOLARIC-GEORGE E, HENRY HE & DONATI RM: Evaluation of  $^{99\text{Tc}}\text{m}$ -pyrophosphate as a bone imaging agent. Radiology 109: 467, 1973.
61. GOLDHABER P: Osteogenic induction across millipore filters in vivo. Science 133: 2065, 1961.
62. HARRIS WH: A microscopic method of determining rates of bone growth. Nature 188: 1038, 1960.
63. HARRIS WH, TRAVIS DF, FRIBERG V & RADIN E: The in vivo inhibition of bone formation by Alizarin red S. J Bone Joint Surg 46-A: 493, 1964.

64. HEINEN JH, DABBS GH & MASON HA: The experimental production of ectopic cartilage and bone in the muscles of rabbits. *J Bone Joint Surg* 31-A: 765, 1949.
65. HEIPLE KG, CHASE SW & HERNDON CH: A comparative study of the healing process following different types of bone transplantation. *J Bone Joint Surg* 45-A: 1593, 1963.
66. HOSAIN P: Technetium-99<sup>m</sup> labelled pyrophosphate: a simple and reproducible bone scanning agent. *Br J Radiology* 46: 724, 1973.
67. HURIET C, GAUCHER A, ROBERT J, NAOUN A, KESSLER M & GUILLEMIN P: Depistage isotopique de l'ostéonécrose. *Nouv Press Med* 2: 583, 1973.
68. HURLEY LA, STINCHFIELD FE, BASSETT AL & LYON WH: The role of soft tissue in osteogenesis. An experimental study of canine spine fusion. *J Bone Joint Surg* 41-A: 1243, 1959.
69. IBSEN KH & URIST MR: The biochemistry and the physiology of the tetracyclines: with special reference to mineralized tissues. *Clin Orthop* 32: 143, 1964.
70. INCLAN A: The use of preserved bone graft in orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg* 24: 81, 1942.
71. JUDET R, JUDET J, LORD G, ROY-CAMILLE R & LETOURNEL E: Treatment of fractures of the femoral neck by pedicled graft. *Presse Med* 69: 2452, 1961.
72. KELLI JF, CAGLE JD, STEVENSON JS & ADLER GJ: Technetium-99<sup>m</sup> radionuclide bone imaging for evaluating mandibular osseous allografts. *J Oral Surg* 33: 11, 1975.
73. KELLI JF, CAGLE JD, ADLER GJ & DONOVAN RL: Radionuclide study of bone allografts. *Transpl Proceeding* 7 (2): Suppl 1, 1976.
74. KIEHN C, CEBUL F, BERG M, GUTENTAG J & GLOVER DM: A study of the vascularization of experimental bone graft by means of radioactive phosphorus and the transparent chamber. *Ann Surg* 136: 404, 1952.
75. KÜPPERMAN W: Erfahrungen mit heteroplastischen Knochen bei der Knochenbruchbehandlung. *Langenbecks Arch Klin Chir* 298: 246, 1961.

76. LACROIX P: Organizers and the growth of bone. J Bone Joint Surg 29: 292, 1947.
77. LANDRY M & FLEISCH H: The influence of immobilisation on bone formation as evaluated by osseous incorporation of tetracyclines. J Bone Joint Surg 46-B: 764, 1964.
78. LAVENDER JP, MERRICK MV, BURN JI & WITT J: Bone scanning with technetium-labelled polyphosphate. Lancet 2:1143, 1972.
79. LEE WR, MARSHALL JH & SISSONS HA: Calcium accretion and bone formation in dogs. An experimental comparison between the results of Ca<sup>45</sup> kinetics analysis and tetracycline labelling. J Bone Joint Surg 47-B: 157, 1965.
80. LEE WR: Bone formation in Paget's disease. A quantitative microscopic study using tetracycline markers. J Bone Joint Surg 49-B: 146, 1967.
81. LEVANDER G: On the formation of new bone in bone transplantation. Acta Chir Scand 74: 425, 1934.
82. LEVANDER G: A study of bone regeneration. Surg y Gynecol Obstet 67: 705, 1938.
83. LEXER E: Die freien Transplantationen. F Enke, Stuttgart, 1924.
84. LIMA C: A comparative study of cortical bone grafting using fresh autografts and fresh delayed autografts. J Bone Joint Surg 48-A: 381, 1966.
85. LINDAHL O & ORELL S: Experiments with bone extracts. Acta Chir Scand 101: 136, 1951.
86. MAATZ R & BAUERMEISTER A: Klinische Erfahrungen mit dem Kieler Span, Langenbecks Arch Klin Chir 298: 239, 1961.
87. MAGNOLFI R: La terapia delle cisti ossee solitarie giovanili con innesti ossei. Arch Orthop 71: 63, 1958.
88. MANUAL OF HISTOLOGIC STAINING METHODS OF THE ARMED FORCES INSTITUTE OF PATHOLOGY - 3rd Ed. American Registry of Pathology. Ed by Lee G Luna (ASCP). The Blakiston Division, McGraw-Hill Book Company - New York 1968.
89. MARCONDES DE SOUZA JP, BRANDÃO HJS, CAMPOS JCP & OLIVEIRA LG: Incorporação óssea experimental da Tetraciclina

- na pelas vias percutâneas, intrarticular e através aleitamento. Rev Bras Ortop 1: 53, 1966.
90. MAY H: The regeneration of bone transplants. Ann Surg 106: 441, 1937.
  91. MCAFEE JG & SUBRAMANIAN G: Radiopharmaceuticals (in) Clinical Scintillation Scanning, ed by L M Freeman and P M Johnson New York - Harper & Row 1969.
  92. MCFARLAND B: "Birth fracture" of tibia. Br J Surg 27:706, 1939/40.
  93. MEYERS MH, HARVEY JD & MOORE TM: Treatment of displaced subcapital and transcervical fractures of the femoral neck by muscle-pedicle-bone graft and internal fixation. A preliminary report on One Hundred and Fifty Cases. J Bone Joint Surg 55-A: 257, 1973.
  94. MEYERS MH, HARVEY JD & MOORE TM: The muscle pedicle bone graft in the treatment of displaced fractures of the femoral neck: indications operative technique and results. Orthop Clin N Amer 5: 779, 1974.
  95. MILCH RA, RALL DP & TOBIE JE: Fluorescence of tetracycline antibiotics in bone. J Bone Joint Surg 40-A: 897, 1958.
  96. MOORE JR: Delayed autogenous bone graft in the treatment of congenital pseudo arthrosis. J Bone Joint Surg 31-A: 23, 1949.
  97. MUZII E: Detection by fluorescence of oxytetracycline bound to bone. Nature 189: 934, 1961.
  98. NELSON CL: The effect of delay on cortical and cancellous autogenous bone transplants (a synopsis). XII<sup>o</sup> Cong of Intern Soc Orth Surg Traum, ed by J Delchef, R DeMarneffe and E. Vander Elst, 1972.
  99. OLERUD S & LORENZI GL: Triple fluorochrome labelling in bone formation and bone resorption. J Bone Joint Surg 52-A: 274, 1970.
  100. OLLIER E: Citado por Chase SW & Herndon CH.
  101. ORELL S: Studien über Knochenimplantation und Knochenneubildung. Implantation von "Os Purum" sowie transplantation von "Os Novum". Acta Chir Scand suppl 31, 1934.

102. ORELL S: Surgical bone grafting with "Os Purum", "Os Novum" and "Boiled Bone". J Bone Joint Surg 19: 873, 1937.
103. ÖSTERMAN K: Operative elimination of partial premature epiphyseal closure. An experimental study. Acta Orthop Scand suppl 147, 1972.
104. ÖSTRUP LT & PREDRICKSON JM: Distant transfer of a free, living bone graft by microvascular anastomoses: An experimental study. Plast Reconstr Surg 54 (3): 274, 1974.
105. PAPANIMITROU J, VEZERIDIS M, CONSTANTINIDIS M, CHIOTELIS E, CONSTANTINIDIS C & TOUNTAS C: The value of Tc<sup>99m</sup>-Diphosphonate (HEDSPA) as a skeletal scanning agent. Am J Roentg Radium Ther Nucl Med 121: 735, 1974.
106. PEREZ R, COHEN Y, HENRY R & PANNECIERE C: A new radiopharmaceutical for 99<sup>m</sup>Tc bone scanning. (Abstract) J Nucl Med 13: 788, 1972.
107. PHEMISTER DB: The fate of transplanted bone and regenerative power of its various constituents. Surg Gynec & Obst 19: 303, 1914.
108. PLENK HJ, HOLLMANN K & WILFER KH: Experimental bridging of osseous defects in rat by the implantation of Kiel bone containing fresh autologous marrows. J Bone Joint Surg 54-B: 735, 1972.
109. PURANEN J: Reorganization of fresh and preserved bone transplants. An experimental study in rabbits using tetracycline labelling. Acta Orthop Scand suppl 92, 1966.
110. RAIN JD, KUNTZ D & NAJEAN Y: Importantes progrès en scintigraphie osseuse grâce à l'emploi de pyrophosphate de technetium (99<sup>m</sup>Tc). Nouv Press Med 2; 186, 1973.
111. RAY RD & SABET TY: Bone grafts: cellular survival versus induction. An experimental study in mice. J Bone Joint Surg 45-A: 337, 1963.
112. RAY RD: Vascularization of bone grafts and implants. Clin Orthop & Related Research 87: 43, 1972.
113. REHN J: Indikationen zur verwendung von Auto- und Homio-transplantaten am Knochen. Langenbecks Arch Klin Chir 308: 1021, 1964.

114. ROSENFELD N & TRENES S: Osseus and extraosseus uptake of Fluorine-18 and Technetium-99<sup>m</sup>-polyphosphate in children with Neuroblastoma. Radiology 111: 127, 1974.
115. SALAMA R, BURWELL RG & DICKSON IR: Recombined grafts of bone and marrow. The beneficial effect upon osteogenesis of impregnating xenograft (Heterograft) bone with autologous red marrow. J Bone Joint Surg 55-B:402, 1973.
116. SAXEN L: Tetracycline - Effects on osteogenesis in vitro. Science 149: 870, 1965.
117. SCHWEMMER G & CONTZEN H: Einheilungszeit bei Auto- Homo - und Heteroplastischen Knochenspänen. Langenbecks Arch Klin Chir 308: 1031, 1964.
118. SCHOCH J: Kritisches zur Knochentransplantation. Z.Orthop 88: 69, 1956.
119. SEDLIN ED & FROST HM: Variations in rate of human osteoformation. Can J Bioch Phys 41: 19, 1963.
120. SHERK HH & NICHOLSON JT: Fracture healing and the allograft reaction. Clin Orthop 76: 94, 1971.
121. SIEBER E: Ergebnisse mit Kältekonservierten homoioplastischen Knochenspänen, speziell bei der Pseudarthrosenoperation nach Phemister. Langenbecks Arch Klin Chir 279: 69, 1954.
122. SIFFERT RS: Experimental bone transplants. J Bone Joint Surg 37-A: 742, 1955.
123. SIFFERT, RS & BARASH ES: Delayed bone transplantation; an experimental study of early host-transplant relationships. J Bone Joint Surg 43-A: 1961.
124. SISSONS HA: The growth of bone. In Biochemistry and Physiology of bone (chapter 15) ed by G H Bourne Academic Press Inc - New York, 1956.
125. SKLAROFF DM & CHARKES ND: Studies of metastatic bone lesions with strontium-85. Radiology 80: 270, 1963.
126. SKLAROFF DM & CHARKES ND: Diagnosis of bone metastasis by photoscanning with strontium-85. JAMA 188: 1, 1964.
127. SMBENK D, van der SLUYSVEER J & van der HEUL RRO: Quantitative measurements of tetracycline labelling in bone

- of patients with hyperparathyroidism and of controls .  
J Bone Joint Surg 45-B, 220, 1963.
128. STEVENSON JS, BRIGHT RW, DUNSON GL & NELSON FR: Technetium-99<sup>m</sup> Phosphate bone imaging: A method for assessing bone graft healing. Radiology 110: 391, 1974.
  129. STRINGA G: Studies of the vascularisation of bone grafts. J Bone Joint Surg 39-A: 395, 1957.
  130. SUBRAMANIAN G & MCAFEE JG: A new complex of 99Tc<sup>m</sup> for skeletal imaging. Radiology 99: 192, 1971.
  131. SUBRAMANIAN G, MCAFEE JG, BELL EG, BLAIR RJ, O'MARA RE & RALSTON PH: 99Tc<sup>m</sup>-labelled polyphosphate as a skeletal imaging agent. Radiology 102:701, 1972a.
  132. SUBRAMANIAN G, MCAFEE JG, BLAIR RJ, MEHTER A & CONNOR T: 99<sup>m</sup>Tc-EHDP: A potential radiopharmaceutical for skeletal imaging. J Nucl Med 12: 947, 1972b.
  133. TAPP E: The effects of hormones on bone in growing rats . J Bone Joint Surg 48-B: 526, 1966.
  134. TAPP E: Tetracycline labelling methods of measuring the growth of bones in the rat. J Bone Joint Surg 48-B:517, 1966.
  135. TAYLOR GI, MILLER GDH & HAM FJ: The free vascularized bone graft. Plast Reconstr Surg 55 (5): 533, 1975.
  136. THRALL JH, GHAEED N, GESLIEN GE, PINSKY SM & JOHNSON MC: Pitfall in Tc99<sup>m</sup> polyphosphate skeletal imaging. Am J Roentg Radium Ther Nucl Med 121: 739, 1974.
  137. TREADWELL AG, LOW-BEER BVA, FRIEDEL HL & LAWRENCE JH: Metabolic studies on neoplasm of bone with the aid of radioactive strontium. Am J Med Sc 204: 521, 1942.
  138. URIST MR, MCLEAN FC: Osteogenetic potency and new-bone formation by induction in transplants to the anterior chamber of the eye. J Bone Joint Surg 34-A: 443, 1952.
  139. URIST MR: Physiologic basis of bone-graft surgery with special reference to the theory of induction. Clin Orthop 1: 207, 1953.
  140. URIST MR & MCLEAN FC: Recent advances in physiology of bone: Part I, an instructional course lecture A.A.O.S. J Bone Joint Surg 45-A: 1305, 1963.

141. URIST MR: Bone: formation by autoinduction. Science 150: 893, 1965.
142. URIST MR: Surface-decalcified allogeneic bone implants. Clin Orthop 56: 37, 1968.
143. VAINIO S: Transplantation of bone. An experimental study. Ann Chir Gynaec Fenn Suppl 67, 1957.
144. VANDERHOEFT PJ, KELLY PJ & PETERSON LF: Determination of growth rates in canine bone by means of tetracycline-la belled patterns. Lab Invest 11: 714, 1962.
145. VANDERHOEFT PJ, KELLY PJ, JANES JM & PETERSON LFA: Growth and structure of bone distal to an arteriovenous fistula: quantitative analysis of tetracycline-induced transverse growth patterns. J Bone Joint Surg 45-B:582,1963.
146. YANO Y, MCRAE J, VAN DYKE DC & ANGER HO: Technetium-99<sup>m</sup> labelled stannous ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphanate: a new bone scanning agent. J Nucl Med 14: 73, 1973.
147. WEBER DA, KEYES JW Jr, BENEDETTO WJ & WILSON GA: <sup>99m</sup>Tc Pyrophosphate for diagnostic bone imaging. Radiology 113: 131, 1974.
148. WEBER DA, KEYES JW, LANDMAN S & WILSON GA: Comparison of Tc<sup>99m</sup> polyphosphate and F<sup>18</sup> for bone imaging. Am J Roentg Radium Ther Nucl Med 121: 184: 1974.
149. WEILAND AJ, DANIEL RK & RILEY LH Jr: Application of the free vascularized bone graft in the treatment of malignant or aggressive bone tumors. Johns Hopkins Med J 140 (3): 85, 1977.
150. WILSON PD: Experience with a bone bank. Ann Surg 126: 932, 1947.
151. WILSON PD: Experience with the use of refrigerated homogeneous bone. J Bone Joint Surg 33-B: 301, 1951.
152. WILSON PD: Follow-up study of the use of refrigerated homogeneous-bone transplants in orthopaedic operations. J Bone Joint Surg 33-A: 307, 1951.

R E S U M O

VIII - RESUMO -

Com a finalidade precípua de avaliar a velocidade de integração e atividade metabólica do Enxerto Ósseo Autólogo Retardado, em relação ao Enxerto Ósseo Autólogo Fresco, foram realizados dois grupos de experimentos, utilizando-se cães adultos como animal de investigação.

No primeiro grupo, dividido em 3 sub-grupos, conforme o tempo de observação após o transplante fosse 2, 4 ou 8 semanas, analisou-se os eventos sob o ponto de vista histológico e da impregnação com Tetraciclina. Aquí, o experimento foi do tipo auto-controle, em que um enxerto obtido de uma das tíbias era transplantado para a tíbia oposta, e vice-versa.

No segundo grupo, dividido em 2 sub-grupos, conforme o tipo de enxerto (Retardado ou Fresco), avaliou-se a atividade metabólica dos enxertos utilizando-se a captação de radioisótopo (Tc99m) e o mapeamento linear como processo de investigação. Aquí o experimento foi do tipo hétéro-controle, tendo sido um sub-grupo de Enxerto Retardado e outro de Enxerto Fresco.

Os resultados mostraram claramente que o Enxerto Retardado se revasculariza e se integra cerca de 2 vezes mais rapidamente do que o Enxerto Fresco, como se depreendeu da análise dos dados histológicos e de impregnação com Tetraciclina. Talvez por isso mesmo, atinge um estado de equilíbrio entre reabsorção e neoformação óssea muito antes do Enxerto Fresco, como mostrou a análise dos dados cintilográficos e de captação do radioisótopo.

S U M M A R Y

IX - SUMMARY -

With the aim of evaluating the healing process and the metabolic activity of the Delayed Autogenous Bone Graft, two groups of experiments were performed. Adult dogs were used.

In the first group divided in three sub-groups according to the timing after transplantation of the grafts (2, 4 or 8 weeks), histological changes were observed as well as those concerning to the fluorescence of tetracycline deposited in the newly formed bone within the graft. This first experiment was of the auto-control type, in which the graft obtained from the right tibia was transplanted to the left one and vice versa.

In the second group, divided in two sub-groups according to the type of the graft used (Delayed or Fresh) the metabolic activity of both types was evaluated by means of bone scanning and radioactivity counting in a linear scanner, employing Technetium-99m-pyrophosphate as bone-seeking isotopic compound. This experiment was of the hetero-control type.

The results show that the delayed bone graft re-vascularizes and heals about two times faster than the fresh one, as seen by the histological and fluorescence data. That might be the reason why the delayed graft reaches a status of balance between bone resorption and bone formation much before the fresh graft as shown by the scintillographic studies.