WALFREDO CHERUBINI FOGAÇA

**Análise da integração do aloenxerto ósseo de crânio
criopreservado e irradiado, adicionado de medula óssea autógena :
estudo experimental em coelhos**

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

Área de concentração: Cirurgia Plástica

Orientador: Prof. Dr. Henri Friedhofer

SÃO PAULO
2007

*Muito, ó poeta, o engenho pode dar-te,
mas muito mais que o engenho,
o tempo e estudo.*

Luís de Camões

À minha mãe **Elza** e ao meu pai

Walfredo

exemplos da minha vida.

Minha gratidão pela criação que me
deram e meu orgulho de ser seu filho.

À minha esposa **Juliana**,
doce equilíbrio da minha vida,
minha gratidão e meu amor pelo esforço realizado
em conjunto para materialização desta tese.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Marcus Castro Ferreira**, Professor Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo apoio em todos estes anos de minha vida profissional.

Ao **Prof. Dr. Henri Friedhofer**, meu orientador neste trabalho, meus sinceros agradecimentos por ter me aceito como orientando e pela amizade sempre demonstrada.

Ao **Prof. Dr. Rolf Gemperli**, pelo respeito e consideração sempre demonstrados.

À **Dra. Marisa Roma Herson**, pelo auxílio na padronização dos procedimentos de banco de tecidos utilizados neste trabalho.

À **Dra. Mônica Mathor**, pela irradiação dos aloenxertos e pela atenção a mim dispensada.

À **Dra. Vanda Jorgetti**, por ter me ensinado os passos da análise histomorfométrica e ter disponibilizado os equipamentos para sua realização.

À **Dra. Marcela Aldrovani** pelo prestimoso auxílio nas correções deste trabalho.

Ao **Dr. Antônio Roberto Bozola**, Chefe do Serviço de Cirurgia Plástica do Hospital de Base de São José do Rio Preto, pelo carinho e respeito com que me recebeu em seu serviço.

Ao Acadêmico **Rodrigo Astolfi** pelo indispensável auxílio nas cirurgias e preparo dos ossos dos coelhos.

A **Márcia e Ricardo Alahmar** pelo apoio logístico incomensurável nestes últimos anos.

Ao **Sr. Itamar Alves de Oliveira** pelo auxílio na obtenção dos anestésicos utilizados neste protocolo.

Às **Sras. Edna Maria Rodrigues dos Santos e Maria Aparecida Moreira**, por todo apoio na fase experimental deste trabalho.

Aos **colegas da Disciplina de Cirurgia Plástica** da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Siglas

Lista de Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Figuras (Anexos)

Lista de Gráficos

Lista de Tabelas

Lista de Tabelas (Anexos)

Resumo

Summary

1.	INTRODUÇÃO	02
1.1	– Estrutura óssea	06
1.2	– Enxerto ósseo	14
1.2.1	– BMP	16
1.2.2	– Incorporação do enxerto ósseo	19
1.2.3	– Aloenxerto ósseo	22
1.2.3.1	– Imunidade dos aloenxertos ósseos	24
1.2.3.2	– Irradiação dos aloenxertos ósseos	28
1.3	– Uso de medula óssea autógena	32

1.4 – Objetivo.....	35
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	37
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
3.1 – Material.....	49
3.2 – Métodos.....	50
3.2.1 – Doadores de ossos.....	50
3.2.2 – Processamento ósseo.....	52
3.2.3 – Irradiação.....	53
3.2.4 – Receptores dos aloenxertos.....	54
3.2.5 – Eutanásia.....	62
3.2.6 – Observação Macroscópica.....	62
3.2.6.1 – Adesão ao leito receptor.....	62
3.2.6.2 – Aferição das medidas visuais do enxerto.....	62
3.2.6.3 – Bordas do enxerto.....	63
3.2.7 – Preparação histológica e histomorfometria.....	64
3.2.8 – Análise estatística.....	68
3. RESULTADOS.....	70
4. DISCUSSÃO.....	105
5. CONCLUSÕES.....	118
6. ANEXOS.....	120
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	128

LISTA DE ABREVIATURAS

BV/TV	volume ósseo
OV/BV	volume osteóide
O.Th	espessura osteóide
OS/BS	superfície osteóide
Ob.S/BS	superfície osteoblástica
ES/BS	superfície de reabsorção
Oc.S/BS	superfície osteoclástica
Fb.V/TV	volume de fibrose
Fb.Th	espessura de fibrose
Fb.I/BS	superfície de fibrose
ed.	edição
et al.	e outros
i.e.	isto é
p.	página
v.	volume

LISTA DE SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
BMP	Proteínas morfogenéticas do osso
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CTR	Centro de Tecnologia das Radiações
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	Antígenos leucocitários humanos
HTLV	Vírus T-linfotrópicos humanos
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
MSC	Célula-tronco mesenquimal
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
SMAD*	Proteína intracelular mediadora de TGFβ (Smaller mother against decapentaplegic)
TGFβ	Fator de crescimento transformante beta

* Não há tradução para o português do significado de SMAD, portanto ele foi mantido no original em inglês.

Todas as demais siglas são referentes aos seus significados em inglês, contudo eles foram traduzidos para o português.

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	centímetro
cm ³	centímetro cúbico
°C	grau centígrado
⁶⁰ Co	cobalto 60
kDa	kilodalton
kGy	kilogray
kg	kilograma
mg	miligrama
mg/kg	miligrama por kilo
ml	mililitro
mm	milímetro
mm ²	milímetro quadrado
mm ³	milímetro cúbico
nº	número
pH	potencial hidrogeniônico
v/v	volume por volume
µm	micrômetro
$\bar{X}$	média aritmética
SD	desvio padrão
%	por cento
®	registrado
+	mais
-	menos
=	igual
>	maior
<	menor

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01	Exposição dos ossos parietais.....	51
FIGURA 02	Osteotomia e retirada do fragmento ósseo.....	52
FIGURA 03	Ultrassom e aspecto dos tubos após o uso do mesmo.....	53
FIGURA 04	Retirada do aloenxerto irradiado e criopreservado da embalagem tripla.....	54
FIGURA 05	Aloenxertos no soro fisiológico.....	55
FIGURA 06	Colheita de medula óssea autógena.....	56
FIGURA 07	Colocação do aloenxerto ósseo direito em medula óssea....	56
FIGURA 08	Aloenxerto ósseo e medula óssea em estufa.....	57
FIGURA 09	Confecção dos retalhos periosteais.....	58
FIGURA 10	Marcação dos defeitos na calota craniana dos coelhos.....	59
FIGURA 11	Defeitos confeccionados na calota craniana do receptor.....	59
FIGURA 12	Aloenxertos ósseos posicionados, à direita acrescido de medula óssea autógena.....	60
FIGURA 13	Aproximação dos retalhos periosteais.....	61
FIGURA 14	Enxertos no crânio do coelho nº 10.....	64
FIGURA 15	Mesa de análise histomorfométrica equipada com sistema Osteomeasure e microscópio Nikon Labophot-2ª.....	66
FIGURA 16	Tela de análise histomorfométrica.....	66
FIGURA 17	Corte histológico de coelho do grupo de duas semanas.....	72
FIGURA 18	Corte histológico de coelho do grupo de cinco semanas	73
FIGURA 19	Corte histológico de coelho do grupo de dez semanas.....	73

LISTA DE FIGURAS (ANEXOS)

FIGURA 01	Corte histológico normal de crânio de coelho.....	124
FIGURA 02	Corte histológico de crânio de coelho após processamento, criopreservação e irradiação.....	124
FIGURA 03	Corte histológico do coelho do grupo de cinco semanas.....	125

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	Distribuição dos pontos individuais que representam os volumes ósseos (%) dos enxertos com medula e de seus respectivos pares (sem medula).....	79
GRÁFICO 2	Distribuição dos pontos individuais que representam os volume do osteóide (%) dos enxertos com medula e de seus respectivos pares (sem medula).....	80
GRÁFICO 3	Distribuição dos pontos individuais que representam os volumes da fibrose (%) dos enxertos com medula e de seus respectivos pares (sem medula).....	81
GRÁFICO 4	Distribuição dos pontos individuais que representam as superfícies do osteóide (%) dos enxertos com medula e de seus respectivos pares (sem medula).....	83
GRÁFICO 5	Distribuição dos pontos individuais que representam as superfícies da fibrose (%) dos enxertos com medula e de seus respectivos pares (sem medula).....	84
GRÁFICO 6	Distribuição dos pontos individuais que representam as superfícies osteoblásticas (%) dos enxertos com medula e de seus respectivos pares (sem medula).....	85
GRÁFICO 7	Distribuição dos pontos individuais que representam as superfícies de reabsorção (%) dos enxertos com medula e de seus respectivos pares (sem medula).....	86
GRÁFICO 8	Distribuição dos pontos individuais que representam as superfícies osteoclásticas (%) dos enxertos com medula e de seus respectivos pares (sem medula).....	87
GRÁFICO 9	Distribuição dos pontos individuais que representam as espessuras do osteóide (μm) dos enxertos com medula e de seus respectivos pares (sem medula).....	89
GRÁFICO 10	Distribuição dos pontos individuais que representam as espessuras da fibrose (μm) dos enxertos com medula e de seus respectivos pares (sem medula).....	90

GRÁFICO 11	Distribuição dos pontos individuais que representam as áreas totais (mm ²) dos enxertos com medula e de seus respectivos pares (sem medula).....	91
GRÁFICO 12	Distribuição dos pontos individuais que representam as áreas de osso (mm ²) dos enxertos com medula e de seus respectivos pares (sem medula).....	92
GRÁFICO 13	Distribuição dos pontos individuais que representam as áreas de vazio (mm ²) dos enxertos com medula e de seus respectivos pares (sem medula).....	93
GRÁFICO 14	Histograma de alterações nos volumes ósseos dos grupos de enxertos estudados em função do tempo de vida dos coelhos, após a enxertia.....	95
GRÁFICO 15	Histograma de alterações nos volumes do osteóide dos grupos de enxertos estudados em função do tempo de vida dos coelhos, após a enxertia.....	95
GRÁFICO 16	Histograma de alterações nos volumes da fibrose dos grupos de enxertos estudados em função do tempo de vida dos coelhos, após a enxertia.....	97
GRÁFICO 17	Histograma de alterações superfícies do osteóide dos grupos de enxertos estudados em função do tempo de vida dos coelhos, após a enxertia.....	97
GRÁFICO 18	Histograma de alterações nas superfícies da fibrose dos grupos de enxertos estudados em função do tempo de vida dos coelhos, após a enxertia.....	98
GRÁFICO 19	Histograma de alterações nas superfícies osteoblásticas dos grupos de enxertos estudados em função do tempo de vida dos coelhos, após a enxertia.....	98
GRÁFICO 20	Histograma de alterações nas superfícies de reabsorção dos grupos de enxertos estudados em função do tempo de vida dos coelhos, após a enxertia.....	100
GRÁFICO 21	Histograma de alterações nas superfícies osteoclásticas dos grupos de enxertos estudados em função do tempo de vida dos coelhos, após a enxertia.....	100

GRÁFICO 22	Histograma de alterações nas espessuras do osteóide (μm) dos grupos de enxertos estudados em função do tempo de vida dos coelhos, após a enxertia.....	101
GRÁFICO 23	Histograma de alterações nas espessuras da fibrose (μm) dos grupos de enxertos estudados em função do tempo de vida dos coelhos, após a enxertia.....	101
GRÁFICO 24	Histograma de alterações no percentual de áreas totais cobertas por osso dos grupos de enxertos estudados em função do tempo de vida dos coelhos, após a enxertia.....	102

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Quantidade de bordas visíveis observadas nos enxertos com medula em comparação aos seus respectivos pares.....	71
TABELA 2	Médias dos parâmetros histomorfométricos do grupo submetido à eutanásia duas semanas após a enxertia.....	75
TABELA 3	Médias dos parâmetros histomorfométricos do grupo submetido à eutanásia cinco semanas após a enxertia.....	76
TABELA 4	Médias dos parâmetros histomorfométricos do grupo submetido à eutanásia dez semanas após a enxertia.....	77
TABELA 5	Percentual (%) de áreas totais cobertas por osso.....	103

LISTA DE TABELAS (ANEXOS)

TABELA 01	Medidas Gerais.....	120
TABELA 02	Medidas Histomorfométricas – Grupo 2 semanas – Grupo Caso (Com Medula).....	121
TABELA 03	Medidas Histomorfométricas – Grupo 2 semanas – Grupo Controle (Sem Medula).....	121
TABELA 04	Medidas Histomorfométricas – Grupo 5 semanas – Grupo Caso (Com Medula).....	122
TABELA 05	Medidas Histomorfométricas – Grupo 5 semanas – Grupo Controle (Sem Medula).....	122
TABELA 06	Medidas Histomorfométricas – Grupo 10 semanas – Grupo Caso (Com Medula).....	123
TABELA 07	Medidas Histomorfométricas – Grupo 10 semanas – Grupo Controle (Sem Medula).....	123

INTRODUÇÃO

1 – INTRODUÇÃO

Reparar defeitos ósseos extensos do crânio tem-se mostrado um desafio para a cirurgia reconstrutiva. Isso porque o formato particular da calota craniana e suas limitações de áreas doadoras, na maioria das vezes, dificultam a utilização dos ossos autógenos. Dessa forma, tem aumentado o número de estudos que visam desenvolver materiais capazes de satisfatoriamente substituir o enxerto ósseo autógeno nas reconstruções craniofaciais.

A história da reconstrução da calota craniana é curiosa, tendo sido utilizados os mais diversos tipos de materiais, desde os bizarros até os muito simples, como por exemplo, o ouro e a prata, utilizados pelos incas e pelos europeus durante a renascença, e a casca de coco, usada por cirurgiões na Polinésia (CHIM; SCHANTZ, 2005). Atualmente, materiais absorvíveis e não-absorvíveis têm sido utilizados nas cranioplastias. Os materiais não-absorvíveis são classificados em orgânicos e não-orgânicos. O grupo dos orgânicos abrange basicamente os enxertos ósseos (autógenos, alógenos ou xenógenos) e o grupo dos inorgânicos abrange os metais, as cerâmicas e os polímeros.

Os enxertos autógenos, que tradicionalmente são usados nas cranioplastias, são extremamente vantajosos em comparação aos demais enxertos, se considerada a ausência de resposta imunológica quando implantados, porém eles também apresentam desvantagens, como a quantidade limitada de material que fornece, o que dificulta a reconstrução de grandes defeitos, e a morbidade da área doadora.

Devido à necessidade de se obter osso suficiente para a correção de grandes deformidades craniais, inúmeros métodos inovadores foram testados, tais como a bipartição da calota craniana usando-se a cortical externa como enxerto, o uso de osso desmineralizado em pequenos fragmentos ou em pasta, e o uso de tecidos alógenos como cartilagem e crânio de cadáver.

Com o advento dos bancos de tecidos e, principalmente, dos bancos de ossos, o uso de enxertos ósseos alógenos nas reconstruções ortopédicas e craniofaciais tornou-se uma prática comum (ZORICI et al., 2002). Dentre as modalidades de processamento ósseo, aquelas onde o enxerto ósseo alógeno é criopreservado (*deep frozen*) ou liofilizado (*freeze-dried*) tornaram-se populares na rotina clínica. Porém, com o tempo, o uso desses enxertos revelou uma série de riscos e complicações, incluindo rejeição, instabilidades e infecções.

Após a descoberta do HIV e de outros retrovírus, o risco da transmissão viral por meio do transplante de enxertos ósseos criopreservados, tornou-se preocupante (NEMZEK et al., 1996). Desde o dia em que o primeiro caso de transmissão do HIV por enxerto ósseo alógeno criopreservado foi descrito, o

número de transplantes desta modalidade diminuiu significativamente (SIMONDS et al., 1992). Neste meio tempo, algumas associações medicamentosas foram introduzidas na tentativa de reduzir o risco de transmissão viral. Diversos protocolos foram desenvolvidos na intenção de se conseguir uma inativação viral adequada sem comprometer as propriedades biológicas dos aloenxertos ósseos (KNAEPLER et al., 1992; BETTIN et al., 1993; SCHRATT et al., 1996).

Estudos mostraram que o HIV e outros retrovírus não são sensíveis às baixas temperaturas e, portanto, não são inativados pelo processo de criopreservação. Porém, numerosas publicações evidenciaram a eficácia do uso de agentes químicos e térmicos e de irradiação gama e delta, como métodos alternativos para a desinfecção viral (TOMFORD et al., 1986). Embora estes métodos sejam eficazes na desativação viral, eles apresentam como desvantagens a alteração das propriedades físicas e do potencial osteogênico dos aloenxertos (ASPENBERG et al., 1990).

Na última década, houve uma tendência em se explorar materiais bioabsorvíveis potencialmente capazes de substituir os enxertos ósseos utilizados nos implantes. Estes materiais proveriam uma estrutura rígida até que ocorresse a cicatrização dos tecidos e, então, seriam reabsorvidos pelo organismo, eliminando a necessidade de novas cirurgias para remoção de materiais de fixação e o risco da migração interna dos mesmos a longo prazo (HABAL; PIETRZAK, 1999). Apesar do potencial, estes materiais ainda não são de uso rotineiro na prática clínica.

Recentemente, os protocolos científicos têm atribuído grande destaque à engenharia de tecidos, que abrange um campo interdisciplinar onde princípios de engenharia e ciências biológicas são utilizados para o desenvolvimento de substitutos biológicos capazes de restaurar, manter ou melhorar a função dos tecidos (LANGER; VACANTI, 1993). Um rápido progresso na adaptação dos métodos industriais para a engenharia de tecidos permitiu a manufatura de moldes (*scaffolds*). Contudo, a aplicação de métodos baseados na engenharia de tecidos apresenta como desvantagem a necessidade da realização de dois procedimentos cirúrgicos, o primeiro para obter osteoblastos e o segundo para implantar o elemento construído. Neste sentido, o advento da utilização de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea e potencialmente capazes de originar osso, cartilagem, músculo e gordura trouxeram esperança para a solução desta questão.

Um dos principais problemas para a reconstrução da calota craniana é a necessidade de uma imediata integridade estrutural do implante (PARK et al., 2001). Quando o osso autógeno é enxertado, o processo de osteointegração consiste inicialmente no acúmulo de células inflamatórias, seguido por estímulos quimiotáticos que atraem as células mesenquimais do hospedeiro para o local do enxerto; então estas células sob a ação de fatores osteoindutores diferenciam-se em osteoblastos, concomitantemente, neste período ocorre revascularização e reabsorção de necroses ósseas do enxerto. Finalmente, os osteoblastos produzem matriz óssea na direção do

enxerto, seguindo-se remodelação óssea em resposta aos estímulos mecânicos (GOLDBERG; STEVENSON, 1993).

Quando implantes bioabsorvíveis são utilizados em humanos, o processo de remodelação tecidual persiste por mais de um ano até que o tecido do hospedeiro infiltre o implante de modo a proporcionar estabilidade mecânica (HABAL, 1992).

Diante do exposto, torna-se evidente que um implante ideal deve prover todos os elementos necessários para sua incorporação ao tecido hospedeiro, além de ser produzido com um material altamente biocompatível, que não cause reação imunológica severa e que seja capaz de suportar as forças mecânicas as quais estará sujeito desde o seu implante até a sua total reabsorção. Assim, este material deve possuir uma matriz com propriedades osteocondutoras (que sirva como molde e permita a invasão de vasos sanguíneos e células progenitoras) e osteoindutoras (que induza a transformação das células progenitoras em osteoblastos) e células com propriedades osteogênicas (que se transforme em osteoblastos funcionantes quando implantadas).

1.1 - Estrutura Óssea

O osso é uma estrutura rígida capaz de suportar forças de tensão e de compressão intensas, apresentando um comportamento marcadamente dinâmico. Ele é constituído por um tecido conjuntivo especial e provê proteção para órgãos vitais e frágeis, como aqueles contidos nas cavidades

craniana, torácica e no canal raquidiano, formando o arcabouço de suporte para a posição ortostática e para a locomoção. Além disso, o osso aloja e protege a medula óssea, produtora das células sanguíneas e mesenquimais, e funciona como depósito de cálcio, fosfato e outros íons, armazenando-os e liberando-os de maneira controlada, mantendo constante a concentração destes nos líquidos corporais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A observação macroscópica da superfície de um osso serrado revela que estruturalmente ele é composto por dois tipos de tecidos: o compacto ou cortical e o esponjoso. O tecido compacto situa-se na superfície externa e o tecido esponjoso, que é trabeculado, situa-se na porção interna dos ossos. A diferença entre os dois tecidos se dá pelo tamanho e pelo número de espaços em seu interior.

Microscopicamente, dois tipos de tecido ósseo são observados: o tecido ósseo primário, imaturo ou trabecular e o tecido ósseo secundário, maduro ou lamelar. O tecido ósseo primário é uma forma imatura de osso, visto que é o primeiro osso a se formar durante o desenvolvimento fetal e durante a reparação óssea, sendo muito pouco freqüente no indivíduo adulto, onde persiste apenas próximos às suturas dos ossos do crânio, nos alvéolos dentários e em alguns pontos de inserção dos tendões. Possui abundantes osteócitos e feixes de colágeno sem direção definida. Seu conteúdo mineral é muito menor que o do tecido ósseo secundário (GARTNER; HIATT, 1999).

O tecido ósseo secundário é a variedade freqüentemente encontrada nos adultos. Possui fibras colágenas organizadas em lamelas de 3 a 7 μm

de espessura, dispostas paralelas umas às outras ou em camadas concêntricas ao redor de canais com vasos, formando o sistema de Havers ou ósteons. Cada sistema de Havers corresponde a um cilindro longo, às vezes bifurcado, orientado paralelo à diáfise e formado por um número variável (de quatro a vinte) de lamelas ósseas concêntricas. No centro deste cilindro ósseo, existe um canal revestido de endóstio, denominado canal de Havers, que contém vasos e nervos. Os canais de Havers comunicam-se entre si, com a cavidade medular e com a superfície externa dos ossos por meio de canais transversais ou oblíquos, denominados canais de Volkmann, que se distinguem dos anteriores por não apresentarem lamelas ósseas concêntricas e atravessarem as lamelas ósseas. Todos os canais vasculares existentes no tecido ósseo originam-se quando a matriz óssea se forma ao redor dos vasos preexistentes (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). As lacunas contendo os osteócitos estão, em geral, situadas entre as lamelas ósseas, porém algumas vezes estão dentro delas. Separando grupos de lamelas, existe um acúmulo de substância cimentante que consiste em matriz mineralizada, porém com muito pouco colágeno. Na diáfise dos ossos longos, as lamelas ósseas se organizam em arranjos típicos, constituindo além dos sistemas de Havers, os sistemas circunferenciais externos, internos e intermediários. O sistema circunferencial externo situa-se logo abaixo do perióstio, forma a região mais externa da diáfise e contém fibras de Sharpey que ligam o perióstio ao osso. O sistema circunferencial interno, análogo ao externo, mas não tão extenso quanto ele, circunda completamente a cavidade medular. Trabéculas de osso esponjoso se

estendem do sistema circunferencial interno até a cavidade medular, interrompendo o revestimento de endósteo do sistema circunferencial interno (GARTNER; HIATT, 1999). Entre os dois sistemas circunferenciais encontram-se inúmeros sistemas de Havers e grupos irregulares de lamelas, geralmente de forma triangular, denominadas lamelas intersticiais ou sistema intermediário, que provêm de restos de sistemas de Havers que foram destruídos durante o crescimento do osso. O tecido ósseo secundário que contém sistemas de Havers é característico da diáfise de ossos longos, embora sistemas de Havers pequenos possam ser encontrados em osso compacto de outros locais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O osso é circundado, exceto nas superfícies articulares, por uma membrana fibrosa denominada periósteo, através da qual vasos sanguíneos, linfáticos e fibras nervosas penetram no tecido ósseo. O periósteo é composto de duas camadas, sendo a externa constituída principalmente de tecido conjuntivo rico em colágeno e fibroblastos e a interna (cambium), mais delgada, composta principalmente por fibras elásticas e células osteoprogenitoras responsáveis pela ossificação da superfície externa do osso imaturo. O periósteo do osso imaturo é espesso, vascularizado e muito aderente, já o do osso maduro é fino, pouco vascularizado e contém baixa concentração de fibroblastos em sua camada externa.

A superfície interna da camada cortical é revestida por uma fina membrana chamada endósteo, que geralmente contém uma camada de células achatadas com potencial osteogênico.

As principais funções do endóstio e do perióstio são a nutrição do tecido ósseo e o fornecimento de novos osteoblastos para o crescimento e a recuperação do osso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Histologicamente o osso é composto de:

A) Uma fase inorgânica mineral sólida, constituída principalmente por cálcio e sais de fósforo, havendo também bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato em pequenas quantidades (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). O cálcio e o fósforo formam cristais com a mesma estrutura da hidroxiapatita com a seguinte composição: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. A1 Esta fase corresponde de 50 a 65% do peso do osso e provê dureza ao mesmo;

B) Uma matriz orgânica extracelular que contém colágeno tipo I e pequena quantidade de proteoglicanos e glicoproteínas, que corresponde de 20 a 35% do peso do osso e que provê sua flexibilidade e força tênsil;

C) Células. As células ósseas são os osteócitos, os osteoblastos, os osteoclastos e as células osteoprogenitoras.

Os osteócitos são células encontradas no interior da matriz óssea, ocupando as lacunas. Das lacunas partem canalículos, dentro dos quais os prolongamentos dos osteócitos estabelecem contatos através de junções comunicantes, o que permite a passagem de pequenas moléculas e íons de um osteócito para outro. Cada lacuna contém apenas um osteócito de morfologia achatada (em formato de amêndoa) que exibe reduzido citoplasma perinuclear com pequena quantidade de retículo endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi pouco desenvolvido. Os osteócitos são essenciais para a manutenção da matriz óssea e sua morte é seguida por

reabsorção da matriz. São osteoblastos transformados que se incorporaram à matriz. Ambas são células mononucleares derivadas do mesênquima.

As células osteoprogenitoras estão localizadas na camada celular interna do periósteo, revestindo os canais Havers e no endósteo. São células derivadas do mesênquima embrionário, capazes de sofrer divisão mitótica e de se diferenciarem em osteoblastos. Quando impostas a condições de baixa oxigenação, estas células podem se diferenciar em células condrogênicas. São células fusiformes que possuem núcleo oval e citoplasma escasso com retículos endoplasmáticos rugosos esparsos e um complexo de Golgi pouco desenvolvido. Estas células são mais ativas em períodos de intenso crescimento ósseo (GARTNER; HIATT, 1999).

Os osteoblastos são as células que sintetizam a parte orgânica da matriz óssea (colágeno tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas). Eles são capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz, e são derivados das células osteoprogenitoras. Dispõem-se na superfície óssea lado a lado, num arranjo que lembra um epitélio simples. Quando em intensa atividade sintética são cubóides com o citoplasma muito basófilo; em estado pouco ativo, tornam-se achatados e a basofilia citoplasmática diminui. Uma vez aprisionado pela matriz óssea recém-sintetizada, o osteoblasto passa a ser denominado osteócito. A matriz óssea recém-formada, adjacente aos osteoblastos ativos, e que ainda não está calcificada, recebe o nome de osteóide (ROSS; ROMRELL, 1993; GARTNER; HIATT, 1999; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Os osteoclastos são células multinucleadas, móveis e gigantes que se localizam, principalmente, sobre a superfície endóstica do córtex e, às vezes, ao redor das trabéculas, sendo encarregados da absorção óssea. São ricos em fosfatase ácida, collagenase, desidrogenase, protease e anidrase carbônica. Derivam das células precursoras mononucleadas provenientes da medula óssea. Frequentemente, nas áreas de reabsorção de tecido ósseo encontram-se porções dilatadas dos osteoclastos, situadas em depressões da matriz escavada por sua atividade, as quais é dado o nome de lacunas de Howship. Os osteoclastos têm o citoplasma granuloso, algumas vezes com vacúolos, fracamente basófilo nos osteoclastos jovens e acidófilo nos maduros. A atividade dos osteoclastos é coordenada por citocinas e por hormônios como a calcitonina e o paratormônio.

Embriologicamente o tecido ósseo é derivado do mesênquima e sua formação se inicia como condensações de células mesenquimais que podem sofrer dois tipos de ossificação: endocondral e intramembranosa.

A) Endocondral: inicia-se com a proliferação e a agregação de células mesenquimais no local de formação do futuro osso. Estas células se diferenciam em condroblastos que produzem matriz cartilaginosa do tipo hialina. A cartilagem hialina produzida, neste estágio inicial, possui forma idêntica a do osso que será formado (ROSS; ROMRELL, 1993). Posteriormente, a cartilagem sofre inúmeras modificações, dentre elas hipertrofia dos condrócitos, redução de sua matriz a finos tabiques, seguindo-se a mineralização da mesma e, por fim, morte dos condrócitos por apoptose. As lacunas, previamente, ocupadas pelos condrócitos são, então,

invadidas por capilares sangüíneos que trazem células osteogênicas provenientes do conjuntivo adjacente. Estas células diferenciam-se em osteoblastos que depositam matriz óssea sobre os tabiques de cartilagem calcificada, formando tecido ósseo onde antes havia tecido cartilagenoso. Este tipo de ossificação é o principal responsável pela formação dos ossos curtos e longos.

B) Intramembranosa: o tecido ósseo se forma através da diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos. Em humanos, a primeira evidência de ossificação intramembranosa ocorre por volta da oitava semana de gestação. As células mesenquimais alongadas situadas no mesênquima frouxo migram e se agregam em áreas específicas, onde o osso será formado. Esta condensação de células no interior do tecido mesenquimal é a “membrana”, a qual a denominação ossificação intramembranosa se refere (ROSS; ROMRELL, 1993). O local da membrana conjuntiva, onde ocorre o início da ossificação é denominado centro de ossificação primária. O processo continua com a diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos que sintetizam o osteóide (matriz óssea não mineralizada composta de colágeno e proteoglicanos) que logo se mineraliza e aprisiona alguns osteoblastos que se diferenciam em osteócitos. Como vários destes grupos surgem simultaneamente no centro de ossificação, há confluência das traves ósseas formadas, dando ao osso um aspecto esponjoso. Entre as traves, formam-se cavidades que são penetradas por vasos sanguíneos e células mesenquimais indiferenciadas que originarão a medula óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Concomitantemente, as

células primitivas circundantes situadas na “membrana” proliferam, dando origem a uma população de células denominadas osteoprogenitoras. Essas células, através de atividade mitótica contínua, se mantêm em número e, portanto, constituem uma fonte constante de osteoblastos para o crescimento das espículas ósseas (os osteoblastos são células diferenciadas e não se dividem) (ROSS; ROMRELL, 1993). Os vários centros de ossificação crescem radialmente, substituindo totalmente a membrana conjuntiva preexistente. A palpação do crânio dos recém-nascidos revela áreas moles denominadas fontanelas, onde a membrana conjuntiva ainda não foi substituída por tecido ósseo. Nos ossos chatos do crânio verifica-se um predomínio acentuado da formação sobre a reabsorção de tecido ósseo nas superfícies internas e externas, assim formam-se duas tábuas de osso compacto (cortical), enquanto o centro permanece esponjoso (díploe). A parte da membrana que não sofre ossificação passa a constituir o endóstio e o perióstio. Este processo de ossificação é o responsável pela formação dos ossos frontal, parietal e de partes do occipital, do temporal, da maxila e da mandíbula.

1.2 – Enxerto Ósseo

A enxertia óssea é um procedimento muito antigo. O primeiro registro do uso de enxerto ósseo data de 1668, quando os enxertos eram usados no tratamento de patologias diversas como a consolidação óssea tardia, a não consolidação de fraturas, as pseudoartroses congênitas, os defeitos ósseos

pós-traumatismo, as infecções e os tumores (CHAPMAN; RODRIGO, 2001). O primeiro registro de experiência clínica com enxerto de osso craniano relata um xenoenxerto realizado em 1682. Job Janszoon van Meekeren corrigiu um defeito no crânio de um soldado russo, usando um segmento de osso obtido do crânio de um cachorro. Embora o procedimento tenha obtido sucesso, o soldado foi excomungado da igreja devido ao implante de origem animal. Desejando reconquistar seu *status* religioso, o paciente solicitou a retirada do implante dois anos mais tarde. O paciente morreu em decorrência do segundo procedimento, porém teve um enterro nos mais perfeitos moldes dos ritos de sua igreja (BREIDAHN et al., 2005).

O transplante de osso só é menos freqüente que o transplante sangüíneo no tratamento de patologias que acometem a espécie humana. Aproximadamente duzentos e cinquenta mil transplantes ósseos são realizados anualmente nos Estados Unidos (CHAPMAN; RODRIGO, 2001).

Os enxertos podem ser divididos de acordo com a sua natureza e denominados conforme a terminologia moderna em: 1) autoenxertos quando a origem é o próprio indivíduo; 2) aloenxertos quando originado de indivíduo da mesma espécie, porém com características genéticas diferentes; 3) isoenxertos ou enxertos singênicos quando oriundos de indivíduos geneticamente idênticos; 4) e xenoenxertos quando advindos de indivíduos de espécies diferentes (O'MALLEY, 1992). Podem ser classificados ainda em ortotópico, quando transplantado no receptor para o mesmo lugar que ocupava no doador; heterotópico, quando transplantado no receptor para um local diferente do que ocupava no doador, porém ocupando o mesmo tipo de

tecido; e ectópico, quando transplantado para um local ocupado por um tipo de tecido diferente de seu tecido de origem (CHAPMAN; RODRIGO, 2001). Considerando os enxertos ósseos, estes podem ser enxerto de osso cortical, de osso esponjoso ou de osso total (O'MALLEY, 1992).

O sucesso ou insucesso do enxerto ósseo é influenciado por propriedades específicas do osso enxertado:

A) Osteogênese – é a capacidade de produção direta de tecido ósseo pelas células vivas presentes no osso transplantado. O osso esponjoso, que possui maior superfície coberta por células, tem um maior potencial de osteogênese que o osso cortical (GOLDBERG; STEVENSON, 1987)

B) Osteocondução – é o processo pelo qual o leito receptor infiltra o enxerto com capilares, levando precursores osteogênicos, dentre eles células osteoprogenitoras que se diferenciarão em osteoblastos, para o novo tecido.

C) Osteoindução - é o processo através do qual um tecido atua no outro para induzir a diferenciação celular (URIST et al., 1967). O osso possui esta propriedade graças a uma série de proteínas conhecidas como BMPs (bone morphogenic proteins).

1.2.1 - BMPs

A BMP humana é um polipeptídeo com peso molecular de 17.500 kDa e está associada a duas outras proteínas de menor peso molecular. Age induzindo a diferenciação das células mesenquimais perivasculares, ou

pericitos, em células osteoprogenitoras, que depois de estimuladas por vários fatores de crescimento, dão início ao processo de condrogênese que é seguido pela osteogênese.

SENN (1889), *apud* RENGACHARY (2002), observou que o osso descalcificado é capaz de cicatrizar defeitos ósseos. Assim, ele tratava defeitos ósseos devido a osteomielite, usando resíduos descalcificados de osso bovino com iodoforme. Inicialmente, seu objetivo era usar o iodoforme como antisséptico no tratamento da osteomielite; o osso descalcificado seria apenas um carreador do iodoforme. Curiosamente ele notou que não somente a infecção era controlada, mas havia a formação de osso novo no defeito. LEVANDER (1934), *apud* RENGACHARY (2002), notou que extrato alcoólico de osso fresco induzia a formação de osso, quando injetado em músculo. SHARRARD; COLLINS (1961) descreveram o uso de aloenxerto ósseo descalcificado com ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA) para fusão espinhal em crianças. URIST (1965) observou que pedaços de osso cortical desmineralizado possuem uma característica única: eles são capazes de formar osso ectópico, depois de implantados no tecido muscular de ratos; eventualmente, formando uma unidade óssea completa com sua própria medula óssea funcionante. O componente ósseo responsável pela característica supramencionada recebeu o nome de *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs). Após esta pesquisa, a busca pela substância osteoindutora presente na matriz óssea se intensificou. URIST et al. (1984) demonstraram que proteínas de baixo peso molecular com potencial osteoindutor (BMP) poderiam ser extraídas da matriz óssea bovina desmineralizada. SAMPATH;

REDDI (1981) relataram que quando o componente protéico era dissociado da matriz óssea, esta perdia a capacidade de induzir formação óssea; por outro lado, quando a matriz era reconstituída com a proteína, tornava-se novamente capaz de induzir a formação de osso. Este estudo provou que não era a matriz óssea, sim a proteína nela contida quem respondia pela formação de osso ectópico.

As BMPs são membros de uma superfamília de fatores de crescimento conhecida como TGF β (*transforming grow factor β*). O nome TGF β é uma referência a elevada capacidade que seus membros possuem de induzir a transformação de fibroblastos em cultura. Inicialmente, sete BMPs (de 1 a 7) foram descobertas, destas seis pertencem à superfamília TGF β (BMP2 a BMP7). A BMP1 pertence a uma classe de proteínas responsáveis pelo processamento do procolágeno durante a biossíntese dos colágenos fibrilares. Mais recentemente, outras BMPs foram descobertas, totalizando mais de vinte. As BMPs de 2 a 7 são classificadas em três subgrupos, com base na seqüência homóloga dos produtos finais. O subgrupo 1 contém as BMPs 2 e 4, o subgrupo 2 abrange as BMPs 5, 6 e 7 e o subgrupo 3 compreende a BMP 3 (KEARNEY; LOMAS, 1997).

Dentre todos os fatores de crescimento atualmente conhecidos, apenas as BMPs tem a capacidade de induzir a diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos e condroblastos. Portanto, as BMPs são os únicos fatores que induzem o processo de formação de osso ectópico, nos vertebrados. Todos os demais fatores induzem, apenas, a multiplicação das

células, mas não sua diferenciação (RENGACHARY, 2002; KATAGIRI; TAKAHASHI, 2002).

Os receptores de BMPs, localizados na superfície celular, foram classificados em Tipo I e Tipo II (serina/treonina kinase). Estes receptores são específicos para a superfamília TGF β . A ligação da proteína aos receptores tipo I e II, resulta na formação de um complexo heterotetrâmero e na ativação de uma cascata de sinalização. Imediatamente após a ligação da proteína ao receptor tipo II, ocorre a fosforilação do receptor tipo I, que por sua vez, promove a fosforilação de moléculas de sinalização citoplasmáticas denominadas SMADs (apenas as SMADs 1, 5 e 8 são fosforiladas pelo receptor tipo I). Uma vez fosforiladas, as SMADs 1, 5 e 8 se associam a SMAD 4, formando um complexo que é translocado para o núcleo celular, onde ativa a maquinaria transcricional responsável pela síntese das BMPs. Deste modo, as SMADs são as moléculas chaves da via de sinalização que se inicia na membrana celular e termina no núcleo. Até o momento, nove SMADs foram identificadas nos vertebrados, e classificadas em 3 grupos: 1) *Receptor Regulated* SMAD (R-SMAD) que inclui as SMADs 1, 2, 3, 5 e 8; 2) coSMAD que inclui a SMAD 4; 3) e *Inhibitory* SMAD (I-SMAD) que inclui as SMADs 6 e 7 (RENGACHARY, 2002).

1.2.2 - Incorporação do enxerto ósseo

A incorporação de qualquer tipo de enxerto ósseo ocorre por um processo reconstrutivo e cicatricial dinâmico denominado *creeping*

substitution, descrito primeiramente por Barth, em 1893. Esse processo consiste, basicamente, na reabsorção do enxerto e sua substituição por osso novo do hospedeiro. O enxerto de osso esponjoso, geralmente, é completamente reabsorvido e substituído por osso do hospedeiro, porém o enxerto de osso cortical pode não ser totalmente reabsorvido e quase sempre se torna uma mistura do osso necrótico original e do osso viável, originado do hospedeiro. Entretanto, é muito difícil definir o ponto final exato do processo de incorporação (GOLDBERG; STEVENSON, 1987).

O processo de incorporação é uma função do leito receptor e depende de um contato muito próximo com o tecido enxertado, de uma seqüência de etapas e do equilíbrio dos seguintes processos: 1) proliferação das células osteoprogenitoras; 2) diferenciação das células osteoprogenitoras em osteoblastos; 3) osteoindução; 4) osteocondução; 5) e restauração das propriedades biomecânicas do osso enxertado (BURCHARDT, 1983).

Durante as duas primeiras semanas pós-enxertia, os ossos esponjoso e cortical apresentam as mesmas características de incorporação. Um coágulo se forma no leito do enxerto, causando uma resposta inflamatória caracterizada pela migração de células polimorfonucleares (macrófagos, linfócitos e monócitos) e fibroblastos. Então, o leito do enxerto é invadido por brotos vasculares, o que induz a formação de um tecido de granulação e a migração de células mesenquimais que se diferenciam em osteoblastos e começam a sintetizar matriz óssea (GOLDBERG; STEVENSON, 1987). Esta primeira fase é fortemente influenciada por fatores de crescimento, como o TGF β e o PDGF, e por prostaglandinas (KALFAS, 2001; ZIPFEL et al.,

2003). Ao redor da segunda semana, o tecido de granulação se torna dominante no leito do enxerto, o número de células inflamatórias diminui e a atividade osteoclástica aumenta, intensificando a reabsorção óssea.

No enxerto de osso esponjoso, a medula óssea que inicialmente parecia ser viável, rapidamente se torna necrótica e é invadida por tecido de granulação do hospedeiro. O enxerto é, rapidamente, revascularizado, o que conduz osteoblastos e osteoclastos para a sua estrutura. A penetração dos vasos sangüíneos marca o início da fase de reabsorção do enxerto, o que ocorre em paralelo com a deposição de osso novo pelos osteoblastos. Nesta fase, mediadores químicos e, principalmente a BMP, induzem a migração de células mesenquimais para o enxerto e a posterior diferenciação dessas células em osteoblastos efetivos. O processo de reabsorção e deposição óssea ocorre progressivamente, culminando em total substituição do osso enxertado por osso hospedeiro. Nesta fase, os osteoblastos se dispõem linearmente nas bordas das trabéculas do osso enxertado, onde depositam osteóide (matriz óssea não mineralizada), formando um núcleo de osso enxertado circundado por osso do hospedeiro. Isto geralmente causa aumento da espessura da referida trabécula. Concomitantemente, células hematopoiéticas se acumulam dentro do osso transplantado, formando uma medula óssea viável. A fase final da incorporação do osso esponjoso, caracterizada pela transformação do enxerto em uma estrutura que suporte forças mecânicas, ocorre ao redor de seis meses, período no qual o enxerto está completamente reabsorvido e substituído por osso do hospedeiro.

No enxerto de osso cortical, a velocidade de revascularização é significativamente menor que a do osso esponjoso. Até o sexto dia, o osso cortical não é penetrado por vasos sanguíneos e dependendo do tamanho do enxerto a revascularização completa pode não acontecer. A penetração vascular, neste enxerto, depende da ocorrência de reabsorção óssea periférica pelos osteoclastos e da infiltração vascular dos canais de Havers. Portanto, a incorporação do osso cortical é iniciada pelos osteoclastos e não pelos osteoblastos. O progresso desta reabsorção, ao longo do enxerto, se inicia em duas semanas, intensifica-se até a sexta semana e, gradualmente, diminui ao ritmo normal no final de um ano. Esta reabsorção resulta em um enfraquecimento do enxerto a partir da sexta semana até seis meses pós-enxertia. Após três semanas de enxertia, ocorre deposição aposicional de osso no enxerto, fato que progride lentamente. O enxerto ósseo cortical, diferentemente do esponjoso, corresponde a uma mistura de osso necrótico e osso viável (GOLDBERG; STEVENSON, 1987).

1.2.3 – Aloenxerto ósseo

Não há dúvida de que o osso autógeno fresco é o melhor material para a realização de enxerto ósseo. O enxerto de osso autógeno se revasculariza e se incorpora rapidamente, pois possui propriedades de osteocondução, osteoindução e osteogênese, além de não estimular a reação imunológica (PRACHAPORN et al., 2002). Porém, em algumas circunstâncias, a quantidade necessária de osso autógeno ou a morbidade da área doadora

contra-indicam o seu uso. Nestas situações, lança-se mão de outros materiais, dentre eles o osso alógeno.

A história do uso dos aloenxertos começa na antiguidade, mais precisamente em uma lenda. Os patronos do uso de aloenxertos são Cosme e Damião, gêmeos que nasceram no século III em uma ilha próxima a Celicia. Cosme era médico e Damião era cirurgião. A dupla realizou diversos procedimentos não usuais àquela época, o que irritou o imperador de Roma Deocleciano, que os condenou à morte por decapitação, no ano de 287. No século V, um fervoroso membro do comando da igreja, portador de um tumor na perna e exausto pelo seu sofrimento, adormeceu durante suas preces. Os gêmeos apareceram em seu sonho e realizaram uma cirurgia. Ressecaram o membro doente e o substituíram pelo membro inferior de um mouro que havia morrido naquele dia, curando assim o religioso (MANKIN et al., 1983).

A primeira utilização bem-sucedida de aloenxerto ósseo foi descrita por Maceween em 1880, quando realizou um enxerto ósseo alógeno em uma criança de quatro anos (MOREAU et al., 2000).

Nos tempos modernos, a primeira grande série de uso de aloenxertos foi descrita por LEXER (1908), *apud* MOREAU et al. (2000). O autor relata o transplante de vinte e três articulações totais e onze hemiarticulações em joelhos. Os pacientes foram, posteriormente, avaliados e houve 50% de sucesso.

Uma série de outros relatos sucedeu-se, mas foi em 1960 que descrições de diversas casuísticas apareceram. O motivo do novo interesse

no procedimento foi a descoberta por HERNDON; CHASE (1954), BONFIGLIO et al. (1955) e CURTISS et al. (1959) de que a imunogenicidade do aloenxerto poderia ser reduzida por meio da congelação dos mesmos. Num curto período de tempo, uma série de casos relatados por OTTOLENGHI (1972) e PARRISH (1973) demonstrou que não só o procedimento era possível, como poderia se esperar bons resultados em mais da metade dos casos, em curto período de seguimento.

Em 1971, os membros da Unidade de Ortopedia Oncológica do Hospital Geral de Massachusetts, baseados no conhecimento do mecanismo imune e em estudos de animais, tentaram definir o comportamento ideal para um aloenxerto ósseo. Os autores descreveram que o osso a ser implantado deveria: a) ser desvitalizado através da crioconservação, estocando-se o osso fresco criopreservado por longos períodos; b) conservar resistência suficiente *in vivo* para prover estabilidade ao esqueleto; c) unir-se ao receptor nos locais de anastomose; d) ser substituído por osso do receptor de maneira vagarosa, porém contínua; e) e desencadear limitada ou nenhuma reação imune, devido a sua prévia crioconservação.

1.2.3.1 - Imunidade dos aloenxertos ósseos

A rejeição da maioria dos órgãos sólidos transplantados envolve as imunidades celular e humoral, necessitando do reconhecimento do enxerto pelo hospedeiro. Os principais antígenos responsáveis por este

reconhecimento e pela rejeição dos transplantes são os do complexo HLA tendo como suas moléculas mais importantes as de Classe I e Classe II, expressadas em todas as células nucleadas. Deste modo, o transplante de um aloenxerto ósseo fresco irá desencadear uma reação imunológica do hospedeiro ao enxerto. Porém, diversos estudos mostram que há uma boa integração dos aloenxertos ósseos ao seu leito hospedeiro, quando as diferenças de histocompatibilidade são diminuídas por meio de técnicas que reduzem a imunogenicidade dos aloenxertos. FRIEDLAENDER et al. (1976) demonstraram que, em animais, a resposta imune aos aloenxertos ósseos pode ser significativamente diminuída pela criopreservação do aloenxerto.

Em estudos animais há fortes evidências de que o aloenxerto ósseo induz uma reação imune (HALLORAN et al., 1979; STEVENSON, 1987; STEVENSON et al., 1996), porém a significância clínica desta reação, em humanos, não é clara. Segundo BAUER; MUSCHLER (2000), biópsias realizadas nos locais contendo aloenxertos ósseos revelam, algumas vezes, a presença de células de processo inflamatório crônico, porém a aparência histológica destas células não é específica e é difícil relacioná-las com certeza a uma reação imune. FRIEDLAENDER (1983) identificou anticorpos anti-HLA no sangue de nove pacientes, de um grupo de quarenta e quatro, que haviam sido submetidos a tratamento com aloenxertos liofilizados, porém nenhum deles apresentou resultados clínicos desfavoráveis. ENNEKING; MINDELL (1991), estudando a microestrutura de dezesseis grandes aloenxertos ósseos que foram removidos de pacientes, após permanecerem no local implantado por um período de quatro a sessenta e

cinco meses, observaram que mesmo nos dois aloenxertos retirados por suposto processo de rejeição, havia apenas áreas superficiais de reabsorção com raros linfócitos; nenhum dos aloenxertos estudados apresentou padrão histológico típico de rejeição. Estes relatos corroboram com as observações de KELLY; FRIEDLAENDER (1977) de que pacientes que recebem aloenxertos ósseos não experimentam episódios clínicos de rejeição imunológica. Segundo HEIPLE et al. (1963) e BURCHARDT (1983), os processos de criopreservação e liofilização causam a morte das células da medula óssea e do osso, reduzindo a reação imunológica específica contra o aloenxerto ósseo quando comparada com o enxerto ósseo fresco.

THORÉN et al. (1995) estudaram a integração dos enxertos ósseos, relatando que a extração dos lipídios presentes na medula óssea dos aloenxertos ósseos criopreservados melhora a sua incorporação. ASPENBERG; THORÉN (1990) compararam, em tíbia de coelhos, a integração de enxertos ósseos alógenos criopreservados com a integração de enxertos ósseos alógenos criopreservados, cujos lipídios foram extraídos através do desengorduramento com solução de clorofórmio e metanol. Por meio de análise cintilográfica com tecnécio e cálcio radiativos, os referidos autores observaram que houve uma atividade maior dos radiofármacos no grupo que recebeu o aloenxerto desengordurado. Assim, eles concluíram que a extração dos lipídios, nos aloenxertos ósseos, reduz as reações imunes específicas e o processo inflamatório geral que dificultam a integração do enxerto ósseo. THORÉN et al. (1993) realizaram um experimento muito semelhante ao descrito anteriormente, porém

comparando a integração de autoenxertos ósseos criopreservados com autoenxertos ósseos criopreservados desengordurados, não encontrando diferenças cintilográficas entre o osso desengordurado e o osso não desengordurado. Contudo, realizando análise histológica, eles notaram que no osso desengordurado havia mais osso neoformado e menos osso necrótico. Analisando os resultados dos dois trabalhos descritos, os autores sugeriram que o processo usado para extrair lipídios remove os antígenos de superfície celular através da destruição da membrana celular, e isso desempenha um papel importante na integração dos aloenxertos.

THORÉN et al. (1995), com o conhecimento dos resultados descritos acima, realizaram um novo protocolo comparando bilateralmente, por meio de cintilografia e análise histológica, a integração de diferentes tipos de enxertos ósseos em tíbias de cinco grupos de coelhos: Grupo I - aloenxerto ósseo criopreservado e aloenxerto ósseo criopreservado e desengordurado; Grupo II - autoenxerto e aloenxerto ósseos, ambos desengordurados e criopreservados; Grupo III - aloenxerto criopreservado e defeito ósseo sem enxertia; Grupo IV - aloenxerto desengordurado e defeito ósseo sem enxertia; Grupo V - autoenxerto desengordurado e autoenxerto criopreservado. Os autores observaram que a incorporação novamente foi melhor nos enxertos desengordurados. Histologicamente observou-se que os enxertos desengordurados, na primeira semana, apresentaram um aumento da invasão de células mesenquimais indiferenciadas e de reabsorção osteoclástica nas trabéculas do enxerto ósseo. Nenhuma diferença histológica foi observada entre os cinco grupos ao redor da terceira

semana, apesar da atividade cintilográfica ter indicado um aumento na remodelação dos enxertos ósseos alógenos desengordurados. Concluíram os autores, que os aloenxertos ósseos desengordurados são melhores incorporados que os não desengordurados.

1.2.3.2 - Irradiação dos aloenxertos ósseos

Uma das principais críticas feitas ao uso dos aloenxertos ósseos refere-se a possibilidade de transmissão de doenças infecciosas através do tecido transplantado. Produzir tecidos seguros em quantidade suficiente para atender à crescente demanda tem sido um desafio para todos os bancos de tecido. Atualmente, inúmeras medidas têm sido adotadas, pelos bancos de tecido, para minimizar o risco da transmissão de doenças. Essas medidas incluem: avaliação da história social e médica do doador; realização de sorologias para detecção de diversas infecções virais como HIV-I, HIV-2, hepatite B, hepatite C, HTLV-I, HTLV-II e sífilis; e controle de infecção bacteriana na coleta dos tecidos e em cada fase do processamento.

A maior limitação no processo de seleção do doador está no período inicial de viremia (janela imunológica), no qual o nível de vírus infectantes ou a quantidade de anticorpos ao vírus estão em um nível abaixo da sensibilidade dos exames de detecção. Esta limitação foi observada em 1985, quando quatro receptores de enxerto ósseo de um indivíduo soronegativo infectado pelo HIV tornaram-se HIV positivos, e novamente em 2002, quando cinco receptores contraíram hepatite C de um doador no qual

a infecção viral não havia sido detectada. Baseado nestas evidências, a procura por métodos de esterilização do enxerto ósseo aumentou. Diversos métodos foram testados, dentre eles a esterilização em autoclave, a pasteurização, a esterilização por microondas, a esterilização por óxido de etileno e a irradiação. Das modalidades acima citadas, a esterilização por irradiação gama é a mais utilizada pelos bancos de tecidos mundiais (MOREAU et al., 2000).

Esterilizar aloenxertos com doses baixas ou moderadas de irradiação gama, é uma prática freqüente nos bancos de tecidos. A dose total de irradiação usada pela maioria dos bancos de tecidos americanos varia entre 10 e 25 kGy. Uma dose de 25kGy provê um nível de esterilização de 10^{-9} para a maioria das bactérias, porém é insuficiente para a inativação do vírus HIV, de outros vírus radio-resistentes e de alguns esporos de bactéria. BUCK et al. (1990) confirmaram que o HIV pode ser isolado em culturas de ossos e tendões de pessoas com AIDS. FIDELER et al. (1994), estudando o efeito de diferentes doses de irradiação gama, variando entre 20 e 40 kGy, em osso de patela, observaram que o DNA do vírus HIV não foi destruído com irradiação em doses de 25 kGy, entretanto o DNA do HIV não foi detectado em enxertos irradiados com doses de 30 a 40 kGy. Concluíram os autores, que a dose de irradiação necessária para a esterilização de osso patelar criopreservado deveria ser de 30kGy ou mais.

Diversos estudos conflitantes foram publicados na tentativa de avaliar os eventuais efeitos da esterilização por radiação gama nas propriedades osteoindutivas e mecânicas dos aloenxertos ósseos. O índice de fratura dos

aloenxertos esterilizados por irradiação gama varia de seis a vinte e um por cento, na literatura (KOMENDER, 1976; PELKER et al., 1984; ITOMAN; NAKAMURA, 1991; HAMER et al., 1996; STEVENSON et al., 1997). KOMENDER (1976) relatou que a resistência à curvatura, compressão e torção em fragmentos de diáfise femoral humana são importantemente comprometidas quando irradiados com 60 kGy, mas não se comprometem quando irradiadas com 30kGy. HAMER et al. (1996) mostraram uma significativa redução da resistência à curvatura em fragmentos de fêmures humanos quando irradiados com 28 kGy. ANDERSON et al. (1992), estudando as propriedades mecânicas de ossos corticais obtidos da tíbia de cadáveres submetidos à irradiação gama, não encontraram diferenças significativas, na resistência à compressão, entre fragmentos ósseos irradiados com 10, 31 e 51kGy e fragmentos não-irradiados. Contudo, a resistência à compressão mostrou-se significativamente comprometida em ossos irradiados com doses acima de 60kGy. Diversos outros estudos foram realizados, porém nenhum deles conseguiu determinar qual é a dose de irradiação capaz de comprometer as propriedades mecânicas dos enxertos ósseos. Mesmo assim, todos os trabalhos reconhecem os efeitos deletérios dose-dependentes da irradiação nos aloenxertos ósseos (KOMENDER, 1976; ANDERSON et al., 1992; LOTY et al., 1994; GODETTE et al., 1996).

Embora as considerações sobre as alterações mecânicas observadas em aloenxertos ósseos corticais irradiados sejam importantes, em se tratando de ossos a serem utilizados para reconstruções craniofaciais, elas não possuem grande relevância, uma vez que neste segmento, com

exceção da mandíbula, os ossos não são submetidos a forças de tração, torção ou compressão intensas. VARGEL et al. (2004) utilizaram aloenxerto ósseo irradiado de crânio em 24 pacientes, entre os anos de 1988 e 2002. Analisando os resultados, após um período médio de trinta meses, relataram que 71% dos pacientes (15 pacientes) não apresentaram nenhuma reabsorção do enxerto com fusão completa do aloenxerto, que um paciente teve reabsorção quase total do enxerto e que cinco pacientes apresentaram de 10 a 25% de reabsorção dos enxertos. A conclusão desse achado foi que o aloenxerto ósseo irradiado é um molde (*scaffold*) ósseo estéril capaz de suportar, até a sua integração, as forças externas às quais o crânio está submetido.

As técnicas de preservação e irradiação também afetam as propriedades biológicas dos aloenxertos ósseos. Já foi discutido que a criopreservação e a irradiação com doses baixas reduzem a imunogenicidade, porém podem destruir as propriedades osteoindutivas dos aloenxertos ósseos (URIST; HERNANDEZ, 1974). O conceito para os aloenxertos ósseos extensos irradiados é de que estes sejam apenas osteocondutores e não osteoindutores, embora KATZ et al. (1990) não tenham observado alterações no componente colagênico de ossos irradiados, acreditando terem preservado seu poder osteoindutivo. Acredita-se que o efeito deletério da irradiação, sobre as propriedades biológicas dos aloenxertos ósseos, seja fortemente dependente da temperatura na qual a irradiação é aplicada. GALEA; KEARNEY (2005) afirmam que aloenxertos ósseos criopreservados e irradiados a 35kGy induzem formação óssea

quando implantados, semelhante à induzida por ossos não-irradiados usados como controle. HAMER et al. (1996) afirmam que os aloenxertos ósseos tornam-se quebradiços, após irradiação, devido à destruição das cadeias alfa do colágeno, provavelmente mediada pela geração de radicais livres das moléculas de água. A criopreservação reduz a mobilidade das moléculas de água e, portanto, diminui a produção de radicais livres. Os autores acima mencionados, comparando discos ósseos de fêmures humanos, concluíram que os irradiados a uma temperatura de -78°C tornaram-se menos quebradiços e apresentaram menos alterações colagênicas em comparação aos discos irradiados à temperatura ambiente. DZIEDZIC-GOCLAWSKA et al. (1991) e GRIEB et al. (2004) concordam com os autores anteriores, no conceito de que a irradiação de ossos criopreservados diminui a geração de radicais livres com menor destruição biomecânica do osso irradiado.

Diversos experimentos visando à melhoria das características biológicas dos aloenxertos ósseos processados estão descritos na literatura, dentre eles o enriquecimento dos aloenxertos com medula óssea autógena, fornecedora de células indiferenciadas precursoras de osteoblastos (WINTROUB et al., 1989; TAGUCHI et al., 1995; KREBSBACH et al., 1998).

1.3 - Uso de medula óssea autógena

GOUJON (1869), *apud* BURWELL (1985), observou que quando a medula óssea autógena era transplantada para uma região heterotópica,

havia a formação de osso. Atualmente, atribui-se este poder observado por Goujon às células-tronco (*stem cell*), presentes em praticamente todos os tecidos.

Por definição, as células-tronco são quiescentes, i.e. se mantêm por longo período de tempo na fase G_0 do ciclo celular, estão presentes em pequeno número nos tecidos normais, ocupando nichos específicos, e possuem duas características fundamentais: a capacidade de divisão assimétrica e a capacidade de auto-renovação. Quando a célula-tronco é ativada por algum sinal ou evento, ela abandona seu estado de quiescência e avança ao longo do ciclo celular, se dividindo. Essa divisão mitótica é do tipo assimétrica, pois origina duas células com características diferenciadas. Uma delas possui as mesmas características (genótipo e fenótipo) da célula-mãe e permanece no nicho para manter constante a população de células-tronco (i.e., auto-renovação). A outra célula (diferente da célula-mãe) se prolifera por divisão simétrica, originando uma abundante prole de células progenitoras altamente capazes de se diferenciarem nas células que constituem os tecidos maduros. A explicação para o fato de apenas uma célula-filha ser progenitora é a necessidade de se manter constante o número de células-tronco, uma vez que os processos de remodelação e reparação tecidual (onde células-tronco estão envolvidas) persistem por toda a vida. Se as duas células filhas resultantes da divisão das células-tronco fossem progenitoras, não haveria auto-renovação e o número de células-tronco diminuiria drasticamente com o tempo, até o momento em que elas se esgotariam (MUSCHLER; MIDURA, 2002).

Durante o desenvolvimento embrionário, as células da massa interna do blastocisto possuem a capacidade de se diferenciar em qualquer outro tipo celular, podendo originar ou regenerar todos os tecidos fundamentais. A essa capacidade é dado o nome de totipotência (daí vem o nome células totipotentes). As proles das células totipotentes são determinadas a se dispersarem para os tecidos ou órgãos, onde progressivamente completam seu processo de diferenciação. Com o desenvolvimento, algumas células-tronco tornam-se pluripotentes, i.e., capazes de se diferenciar em uma ou várias linhagens de células; outras se tornam progressivamente limitadas, gerando proles com a capacidade de originar apenas um tipo de célula diferenciada (unipotência). Considera-se que as células unipotentes são restritas ou determinadas, restrição esta que ocorre junto com alterações adaptativas irreversíveis no núcleo celular. Como exemplos de células-tronco unipotentes, podem ser citadas aquelas envolvidas com a regeneração da pele, da mucosa intestinal, do fígado e do endotélio (MUSCHLER; MIDURA, 2002).

Estruturas ricas em tecidos conjuntivos como ossos, cartilagens, tendões e ligamentos também possuem um sistema de células-tronco bem definido e caracterizado. BURWELL (1964) atribuiu às células osteogênicas primitivas da medula óssea a eficácia biológica dos enxertos ósseos esponjosos. FRIEDENSTEIN (1976) mostrou que células proliferativas tipo fibroblasto, oriundas da medula óssea e que sobreviveram *in vitro*, após a morte das células hematopoiéticas, eram capazes de sintetizar tecido ósseo. Diversos estudos posteriores mostraram que estas células são pluripotentes

e podem se diferenciar em osso, cartilagem, tecido conjuntivo fibroso, gordura ou músculo. A estas células, residentes na medula óssea, foram dados os nomes de células-tronco estromais da medula óssea, células progenitoras do tecido conjuntivo, células-tronco esqueléticas ou células-tronco mesenquimais (mesenchymal stem cells – MSCs) (MUSCHLER; MIDURA, 2002; FIBBE; NOORT, 2003).

As células-tronco mesenquimais estão presentes na medula óssea pós-natal e também na medula óssea adulta, havendo evidências de que sua frequência declina com a idade. Embora a medula óssea seja a reserva destas células, sua presença foi observada em diversos outros tecidos, como perióstio, músculo, fígado, sangue e tecido adiposo (FIBBE; NOORT, 2003).

1.4 – Objetivo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a integração de aloenxerto ósseo de crânio criopreservado e irradiado, enriquecido com a adição de medula óssea autógena, em crânio de coelho. Para esta avaliação foram utilizados dados macroscópicos e medidas histomorfométricas.

REVISÃO DE LITERATURA

2 – REVISÃO DE LITERATURA

BURWELL (1961) foi o primeiro a notar o efeito benéfico da impregnação de células de medula óssea autógena na integração de enxertos ósseos não autógenos. Desde então, o uso de medula óssea autógena para iniciar e facilitar a osteogênese em aloenxertos e xenoenxertos ósseos tem sido estudado em modelos animais e em algumas seqüências clínicas (WIENTROUB et al., 1989).

SALAMA; WEISSMAN (1978) descreveram uma série clínica, onde xenoenxertos ósseos tipo Kiel (osso de boi desproteínizado, desengordurado e esterilizado por irradiação gama), adicionados de medula óssea autógena, foram utilizados em trinta e um enxertos ósseos. Tais enxertos foram executados em pacientes ortopédicos submetidos à ressecção de tumores ósseos benignos, à artrodeses, à correção de pseudoartrose e à correção de perdas ósseas traumáticas. Os autores relataram sucesso em todos os enxertos e explicaram que o enxerto composto por eles usado, era constituído de células vivas da medula óssea autógena com um xenoenxerto servindo como molde (*scaffold*), que embora sem células viáveis, teve a osteogênese estimulada pela presença das células da medula óssea.

LINDHOLM; URIST (1980) estabeleceram que quando um osso de banco de tecidos criopreservado ou liofilizado é misturado à medula óssea autógena ou a osso esponjoso autógeno e, posteriormente, implantado em um procedimento cirúrgico reconstrutivo, este enxerto é denominado de enxerto composto. Realizando um estudo experimental em ratos, os referidos autores utilizaram enxertos compostos de matriz desmineralizada de diáfise óssea e medula óssea autógena implantados no músculo abdominal dos animais. Eles ainda utilizaram como grupo controle, ratos que receberam implante da mesma matriz óssea, porém autolizada e sem medula óssea autógena. Comparando os resultados obtidos por análise radiográfica e histológica, encontraram osso radio-opaco em 10% dos casos dos dois grupos, em duas semanas. Em um período de quatro semanas, a área de radiopacidade aumentou 60% nos enxertos compostos e somente 9% nos controles. A análise histológica revelou que o grupo com enxerto composto apresentou, em duas semanas, deposição de osso nas superfícies de reabsorção e, em quatro semanas, o osso formado já substituía mais da metade da matriz implantada. Concluíram os autores que a atuação dos fatores osteoindutores da matriz com a medula óssea implantada eram responsáveis pela osteogênese observada.

LINDHOLM et al. (1982), em estudo envolvendo ratos, utilizaram matriz óssea alógena desmineralizada e liofilizada combinada com diluições de medula óssea autógena nas proporções de 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8, em enxertos realizados no músculo abdominal. Após a comparação cintilográfica com controles constituídos pelo implante da matriz óssea sem adição de medula,

eles notaram que os implantes adicionados com a diluição de medula óssea autógena na proporção de 1:2, apresentaram mais do que o dobro de atividade cintilográfica em relação ao grupo controle, isso em um período de três semanas. Adicionalmente, a análise histológica revelou que este grupo apresentou formação de osso em quantidade duas vezes superior ao grupo controle, em três semanas.

TAKAGI; URIST (1982), estudando a correção de defeitos ósseos segmentares em fêmures de ratos adultos, instalavam uma barra de fixação intramedular, a fim de manter o tamanho do defeito e ocluir a cavidade da medula no local do estudo, excluindo assim, a participação do endóstio e da medula local na reparação óssea. Constituíram, então, oito grupos de observação, colocando nos defeitos ósseos: I) 10mg de albumina bovina (grupo controle); II) 3mm³ de medula óssea autógena; III) 10mg de BMP bovina purificada; IV) 20mg de BMP bovina purificada; V) BMP bovina purificada e medula óssea autógena; VI) autoenxerto da diáfise ressecada para confecção do defeito; VII) aloenxerto ósseo fresco; VIII) e matriz óssea desmineralizada em pó. Os autores observaram, através de radiografias, que em seis semanas, o grupo V apresentava união óssea em todos os casos, enquanto nos outros grupos, apenas o VI e o VIII apresentavam união óssea em dois animais cada. Histologicamente, eles observaram que os implantes de BMP somente apresentavam formação de pequenas ilhas ósseas no décimo quarto dia e que os implantes de 20mg de BMP apresentavam cinco vezes mais osso do que o de 10mg. O grupo que recebeu medula óssea autógena somente apresentava duas vezes mais

osso em relação ao que recebeu 20mg de BMP e o grupo que recebeu BMP e medula óssea aos vinte e um dias apresentava muito mais osso do que o que recebeu medula óssea somente. Discutem os autores, que a associação de BMP e medula óssea autógena é uma opção viável para o reparo de grandes defeitos ósseos.

WIENTROUB et al. (1989) relataram os resultados do tratamento de diversas patologias ortopédicas apresentadas por vinte e três indivíduos com idade variando entre cinco e dezessete anos, usando o modelo proposto anteriormente por SALAMA; WEISSMAN em 1978. Para tanto, utilizaram enxertos compostos de osso Kiel com medula óssea autógena. A evolução dos pacientes foi acompanhada por um período de dois a quinze meses. Os autores descreveram que, em todos os casos, o procedimento resultou em cura com boa formação óssea e que não houve qualquer reação adversa nos pacientes operados.

HEALEY et al. (1990), afirmando que a medula óssea é fonte de células osteoprogenitoras, indispensáveis nos processos de formação óssea e de cicatrização das fraturas, trataram oito pacientes que haviam sido submetidos à ressecção de osteossarcomas em bloco, com reconstrução com fixação interna e evoluído com não união óssea. O tratamento consistiu de injeção de medula óssea autógena no local do defeito ósseo. Referiram os autores, que em sete pacientes ocorreu formação óssea após a injeção e em cinco pacientes foi obtida a cicatrização óssea.

CONNOLLY et al. (1989); TIEDEMAN et al. (1991) e SHARMA et al. (1992) trataram não união de fraturas ósseas, em modelos animais, usando

injeção percutânea com medula óssea, comprovando assim a eficácia do método.

TAGUCHI et al. (1995) testaram, em coelhos, a utilização de osso submetido à esterilização em autoclave associado ou não com medula óssea autógena. O experimento consistiu na realização de um defeito ósseo de 20mm no terço médio da tíbia de cem coelhos. Os animais foram divididos em quatro grupos, os quais foram submetidos à reconstrução utilizando modalidades diversas de enxertos: Grupo I - autoenxerto autoclavado; Grupo II - autoenxerto autoclavado combinado com enxerto fibular vascularizado; Grupo III - autoenxerto autoclavado adicionado de medula óssea autógena e Grupo IV - autoenxerto autoclavado combinado com enxerto fibular vascularizado, adicionado de medula óssea autógena. Foi observado, que em dezesseis semanas pós-operatória, todos os enxertos do grupo I não obtiveram união óssea, ao passo que os grupos II, III e IV apresentaram, em quatro semanas, formação de osso novo ao longo de todo o comprimento do enxerto, além de união óssea nas junções proximais e distais.

CONNOLLY (1995) propôs que centrifugação da medula óssea antecederse a injeção nos locais de não união óssea, visando ampliar o poder osteogênico da medula óssea através do aumento da densidade de células osteoprogenitoras no composto injetado.

LOKIEC et al. (1996) relataram o tratamento de dez crianças portadoras de cistos ósseos simples de úmero, fêmur e tíbia através da aspiração do fluido do cisto e injeção de medula óssea autógena. Os autores observaram

alívio da dor e retorno às atividades habituais em seis semanas e, em quatro meses, consolidação radiológica e remodelação óssea. A revisão dos pacientes num período de doze a quarenta e oito meses mostrou cicatrização dos cistos sem complicações. Declararam os autores, tratar-se de um tratamento simples e efetivo para os cistos ósseos em crianças.

CONNOLLY (1998), revisando quinze anos de pesquisas com técnicas de utilização de células osteoprogenitoras de medula óssea em patologias ósseas diversas, relatou que as técnicas são eficientes. Analisando os estudos com injeção percutânea de medula óssea em não união óssea e a utilização de alo e xenoenxertos compostos com medula óssea autógena, concluiu que os métodos oferecem vantagens em relação à enxertia óssea autógena de osso de crista ilíaca na prevenção das dores e das complicações na área doadora.

KREBSBACH et al. (1998) estudaram a reparação de defeitos de craniotomia usando células estromais da medula óssea. Utilizando ratos imunossuprimidos, eles trataram defeitos em crânio de 5mm de espessura total usando esponja de gelatina contendo células estromais de medula óssea derivadas de camundongos transgênicos, carreadoras de gene colágeno tipo I-cloranfenicol-acetiltransferase que possibilita o seguimento das células transplantadas. Observaram que, em duas semanas, as células transplantadas resultaram em osteogênese, reparando 99% do defeito original. Em contrapartida, o grupo controle tratado com fibroblastos esplênicos e veículo apresentou reparo ósseo mínimo, i.e., limitado às margens cirúrgicas. Concluíram que células da medula óssea, expandidas

mitoticamente em laboratório, servem como uma fonte abundante de células osteoprogenitoras capazes de reparar defeitos ósseos em ratos sem a necessidade de adição de fatores de crescimento ou fatores morfogenéticos.

SHANG et al. (2001) afirmando que os defeitos em crânio continuam sendo um desafio para o cirurgião craniofacial, devido à quantidade limitada de osso autólogo disponível para a enxertia e à morbidade na área doadora após sua retirada, afirmaram que através de técnicas de engenharia de tecidos, pode-se fabricar grande quantidade de tecido ósseo usando pequenas quantidades de células autógenas. Utilizando células-tronco mesenquimais retiradas da medula óssea de ovelhas, cultivadas e expandidas em laboratório, associadas à suspensão de alginato de cálcio, preencheram defeitos com 20mm de diâmetro, de espessura total, criados em região parietal esquerda do crânio de oito ovelhas adultas. Como grupo controle, utilizaram defeitos do mesmo tamanho criados no lado direito do crânio das mesmas ovelhas, que eram preenchidos somente com a suspensão de alginato de cálcio (grupo I) ou mantidos vazios (grupo II). A análise histológica, em dezoito semanas de pós-operatório, mostrou que osso com estrutura típica de osso maduro havia se formado no lado experimental, contrariamente aos lados controle onde nenhuma atividade osteogênica foi observada. A análise radiológica por meio de tomografia computadorizada mostrou que, em dezoito semanas, o defeito ósseo dos lados experimentais estavam quase completamente cicatrizados, ao passo que os lados controle permaneciam abertos.

HERNIGOU; BEAUJEAN (2002) relataram o uso de medula óssea autógena concentrada, através de separação celular, no tratamento de cento e dezesseis pacientes com necrose de cabeça de fêmur. Os pacientes eram submetidos à descompressão do núcleo central da cabeça do fêmur, seguida de injeção de células nucleadas obtidas da medula óssea. Os autores descreveram obtenção de sucesso no tratamento, que postergou a realização de cirurgia para colocação de prótese de cabeça de fêmur em 60% dos casos.

LIU et al. (2004) afirmaram que as células-tronco da medula óssea são a maior fonte fornecedora de células para a bioengenharia. Ainda relataram que a produção de ossos longos é um desafio maior que a produção de ossos chatos, uma vez que os ossos longos devem ser capazes de suportar cargas mecânicas. Os autores também discutiram que um dos princípios da bioengenharia óssea é a utilização de material que contenha células vivas em um molde (*scaffold*) que seja reabsorvido sincronicamente com a formação de osso novo, para que quando a reabsorção se complete, haja osso maduro no local do implante.

Em um trabalho realizado no Brasil, RIZZO et al. (2005) estudaram a utilização de matriz óssea alógena desmineralizada associada à medula óssea autógena fresca no tratamento de artrodese vertebral dorsolateral lombar, em vinte e quatro coelhos. Observaram que em nove semanas, 100% dos animais apresentavam artrodese à palpação. No mesmo período, em estudo radiográfico, apenas 75% dos animais apresentavam artrodese. Histologicamente, em cinco semanas, havia característica de

osteointegração da medula com os processos transversos das vértebras. Nas semanas seguintes, a ossificação endocondral evoluiu, havendo substituição da medula óssea autógena por osso trabecular, e formação de uma ponte óssea entre os processos transversos adjacentes, o que propiciou ao seguimento operado resistência mecânica.

DALLARI et al. (2006) estudaram o tratamento de defeitos ósseos bilaterais em fêmures de coelhos, usando diversos materiais: Grupo I - tratado no lado direito com células estromais de medula óssea concentradas através de centrifugação e no lado esquerdo com plasma rico em plaquetas; Grupo II - aloenxerto ósseo liofilizado adicionado de medula óssea autógena no lado direito e aloenxerto ósseo liofilizado adicionado de plasma rico em plaquetas no lado esquerdo; Grupo III - aloenxerto ósseo liofilizado à direita e plasma rico em plaquetas e medula óssea autógena à esquerda; Grupo IV - e aloenxerto ósseo liofilizado adicionado de medula óssea autógena e plasma rico em plaquetas à direita e sem tratamento à esquerda. Os animais foram sacrificados em duas, quatro e doze semanas, sendo os ossos removidos e submetidos à análise histológica. Em duas semanas, nenhuma diferença foi observada na taxa de cicatrização óssea dos grupos tratados com plasma rico em plaquetas, medula óssea autógena e aloenxerto ósseo liofilizado. Em doze semanas, a utilização do plasma rico em plaquetas não levou a total cicatrização do defeito. O resultado do tratamento com células de medula óssea isolada foi insatisfatório, porém, quando foram adicionados o aloenxerto ósseo liofilizado e o plasma rico em plaquetas, a cicatrização do defeito ósseo foi muito superior, o que sugere que o aloenxerto ósseo

lioofilizado ou o plasma rico em plaquetas podem funcionar como carreadores de células de medula óssea.

RUST et al. (2007) afirmaram que os aloenxertos ósseos possuem um potencial osteoindutivo diminuído devido ao seu processamento. Visando melhorar as propriedades biológicas dos aloenxertos ósseos, os autores testaram a combinação destes com células-tronco mesenquimais, acreditando que elas se diferenciariam em osteoblastos e produziram matriz extracelular quando cultivadas em aloenxertos ósseos. Para isto, isolaram células-tronco mesenquimais colhidas da medula óssea de dez pacientes, e cultivaram-nas com blocos de 1cm³ de aloenxertos ósseos esponjosos liofilizados e irradiados com 25kGy de cinco doadores, produzindo cinquenta aloenxertos compostos. Estes aloenxertos foram divididos em três grupos: Grupo I - o aloenxerto era aquecido a 60° C, por uma hora, para desnaturar as proteínas bioativas do enxerto sem afetar sua osteocondutividade e as células mesenquimais eram cultivadas em meio padrão para cultura de células; Grupo II - os aloenxertos eram incubados com as células mesenquimais em meio padrão sem nenhum aquecimento; Grupo III - o aloenxerto era incubado com as células mesenquimais e suplementos osteogênicos (dexametasona, beta glicerol fosfato e ácido ascórbico) que eram adicionados ao meio padrão. Os enxertos preparados foram incubados por catorze dias, em meio para cultura osteogênica. Em períodos de sete e catorze dias, observaram maior diferenciação osteoblástica nos enxertos que não foram aquecidos a 60°C (grupos II e III). Uma camada de matriz extracelular colagênica foi identificada apenas no grupo tratado com

suplementos osteogênicos (grupo III). Células foram observadas nos três grupos, porém sua densidade era menor no grupo cujo aloenxerto foi aquecido (grupo I), intermediária no grupo padrão (grupo II) e maior no grupo com suplementos osteogênicos (grupo III). Concluíram os autores que células mesenquimais quando cultivadas com aloenxertos ósseos liofilizados e irradiados se diferenciam em osteoblastos, e isto pode ser intensificado com a utilização de suplementos osteogênicos. Sendo assim, o aloenxerto ósseo é um molde (*scaffold*) ideal, pois diferentemente de outros moldes descritos, possui estrutura e propriedades mecânicas semelhantes às do osso vivo, além de já serem largamente utilizados na prática médica.

MATERIAL E MÉTODOS

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Material

No presente estudo, quarenta e dois coelhos da raça Nova Zelândia, brancos, adultos, fêmeas, pesando aproximadamente 3,25kg foram aleatoriamente divididos em dois grupos (21 animais em cada grupo). Os animais do grupo 1 serviram como doadores de ossos parietais. Os animais do grupo 2 receberam os aloenxertos ósseos.

Todos os coelhos do grupo 2 foram individualmente mantidos em gaiolas de ferro, no biotério do Laboratório de Cirurgia Plástica e Microcirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Durante o período em que estiveram no biotério, os coelhos receberam água e ração balanceada *ad libitum*.

3.2 – Métodos

Todos os procedimentos envolvendo coelhos foram aprovados pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Protocolo nº 381/06) e estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.2.1 - Doadores de ossos

Os 21 coelhos do grupo doador de ossos parietais (grupo 1) foram submetidos à eutanásia com injeção endovenosa de Pentobarbital Sódico, na dose de 200mg/kg, através de acesso venoso estabelecido em veia marginal da orelha dos animais.

A remoção dos ossos ocorreu em condições cirúrgicas assépticas. A saber, o primeiro procedimento efetuado foi a tricotomia do crânio do coelho, seguindo-se da antisepsia com solução de clorexidina alcoólica, colocação de campo estéril e realização de uma incisão cirúrgica, medindo 5cm de extensão, na linha média do crânio, interessando todos os planos anatômicos até o periósteo. Após, os retalhos foram descolados em direção lateral no plano subperiosteal para exposição crânio (*figura 01*). Uma osteotomia quadrangular foi realizada nos ossos parietais, respeitando-se uma distância de 2mm das suturas sagital, lambdoídea e coronal,

interessando a cortical externa, a díploe e a cortical interna. Para a osteotomia, um motor de baixa rotação tipo Rotomatic (Western) com broca de ponta esférica nº 2 foi utilizado; esse procedimento foi acompanhado de irrigação abundante com soro fisiológico para evitar lesão térmica nas bordas do enxerto e finalizada com o auxílio de um escopro de ponta cortante nº 2 e martelo, quando da retirada dos fragmentos ósseos (*figura 02*). Os ossos coletados foram limpos de todo o resquício de periósteo e com a mesma broca supracitada foram feitas cinco perfurações em suas superfícies interessando a cortical externa e a díploe. Os ossos foram, então, processados de acordo com a técnica de processamento ósseo de banco de tecidos descrita por TOMFORD; MANKIN (1999).

Figura 01 - Exposição dos ossos parietais

Figura 02 - Osteotomia e retirada do fragmento ósseo

3.2.2 - Processamento ósseo

Após coleta e limpeza, os ossos foram medidos com paquímetro estéril e armazenados em tubo tipo Falcon de 15ml, o qual foi adicionado 9ml de peróxido de hidrogênio 3%. Em seguida, os tubos foram levados a um agitador de tubos (Phoenix, modelo AT.56) ajustado em velocidade média, por cinco minutos. Transcorrido o tempo, o peróxido de hidrogênio foi substituído por uma mistura de clorofórmio-metanol PA 2:1 (v/v). Os tubos foram, novamente, levados ao agitador de tubos, por mais cinco minutos. Após, os tubos foram colocados em aparelho de ultrassom Ultrasonic Cleaner (Unic, modelo USC 1450) por trinta minutos (*figura 03*). Na seqüência, a mistura de clorofórmio-metanol foi substituída por soro fisiológico, e os tubos foram novamente agitados por cinco minutos. Após o processamento, os ossos doados foram individualmente embalados, de acordo com as normas de embalagem para produtos a serem irradiados, i.e.,

embalagens triplas, plásticas, apirogênicas, impermeáveis ao ar e a água, (passíveis de irradiação), identificados de acordo com os lados do crânio de onde foram retirados (direito e esquerdo), numerados de 1 a 21 e, finalmente, armazenados em freezer Sanyo Vip Series -80°C (Sanyo, modelo U71V) por sete dias.

Figura 03 – Ultrassom e aspecto dos tubos após o uso do mesmo

3.2.3 – Irradiação

Os sacos plásticos, contendo os ossos processados, foram colocados em isopor contendo gelo seco e levados ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), para serem irradiados.

A irradiação do material foi feita no Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) do IPEN, no período de 28 a 30/11/2006. As amostras, em ambiente de gelo seco, receberam radiação gama (Cobalto-60), em irradiador Multipropósito, na dose média de 55,7 kGy. As doses mínima e máxima de irradiação recebidas foram 50,9 e 59,9 kGy, respectivamente,

com taxa de dose de 2,10 kGy por hora, conforme Certificado de Irradiação de Produto nº: CTR-CI-LTB-013/06 em anexo.

Após irradiação, os ossos foram mantidos a -80°C em freezer ThermoForma (Forma Scientific, modelo -86C ULT Freezer) por um período mínimo de uma semana, e utilizados como aloenxertos no crânio dos coelhos receptores.

3.2.4 - Receptores dos aloenxertos

O primeiro procedimento para a realização da enxertia dos ossos foi retirar os mesmos da embalagem (*figura 04*), colocando-os em cuba de inox contendo soro fisiológico em temperatura ambiente (25° C), por vinte minutos (*figura 05*).

Figura 04 – Retirada do aloenxerto irradiado e criopreservado da embalagem tripla

Figura 05 – Aloenxertos no soro fisiológico

O coelho receptor foi totalmente anestesiado com injeção intramuscular de cloridrato de xilazina na dose de 5mg/kg e cloridrato de cetamina na dose de 35mg/kg, misturados na mesma seringa. Quando, durante a cirurgia, o prolongamento do período anestésico fez-se necessário, um quarto da dose original de cloridrato de cetamina foi injetada nos animais.

Após a anestesia, realizaram-se as tricotomias das regiões cefálica e posterior das cristas ilíacas. O coelho foi posicionado em decúbito ventral sobre a mesa operatória, e as regiões das cristas ilíacas direita e esquerda foram preparadas com solução alcoólica de clorexidina. Com um bisturi de lâmina 15 realizou-se uma incisão de 0,5cm na região dorsal da crista ilíaca (direita ou esquerda) em pele e subcutâneo. Uma agulha de punção de coluna vertebral para anestesia raqui nº 16 com trocater foi introduzida na região das cristas ilíacas e após a retirada do trocater, 5ml de medula óssea foram aspirados com seringa heparinizada (*figura 06*).

Figura 06 – Colheita de medula óssea autógena

O aloenxerto identificado como do lado direito do crânio do doador foi retirado do soro fisiológico, transferido para a seringa contendo a medula óssea (*figura 07*) e incubado em estufa (Fanem, modelo 320-SE) a 39°C (temperatura corporal do coelho), por trinta minutos (*figura 08*).

Figura 07 – Colocação do aloenxerto ósseo direito em medula óssea

Figura 08 – Aloenxerto ósseo e medula óssea em estufa

Os procedimentos subsequêntes foram a antissepsia do crânio do coelho receptor com solução alcoólica de clorexidina e a infiltração do local da incisão com 2ml de solução de lidocaína 0,2% acrescida de adrenalina em uma concentração de 1:200.000. Seguindo-se a colocação de campo estéril, procedeu-se uma incisão cirúrgica de 5cm de extensão na linha média, em sua porção média e posterior em todos os planos teciduais acima do periósteo, utilizando-se bisturi de lâmina 15. Após a divulsão do retalho miocutâneo bilateralmente com tesoura de íris de ponta curva, uma incisão de mesma extensão e posicionamento foi feita sobre o periósteo do crânio, seguindo-se o seu descolamento bilateral com o auxílio de um descolador de periósteo tipo Joseph, de modo a confeccionar dois retalhos periosteais (um de cada lado) (*figura 09*).

Figura 09 – Confeção dos retalhos periosteais

Expostas as regiões parietais direita e esquerda do crânio do coelho, foram realizadas as marcações dos defeitos a serem confeccionados, utilizando para isto lápis preto nº 2 estéril (*figura 10*). A seguir foi confeccionado em cada região, um defeito ósseo quadrangular em plano ósseo total medindo 9mm de lado, com auxílio de motor de baixa rotação tipo Rotomatic e broca esférica nº 2, acompanhada de irrigação abundante com soro fisiológico para evitar lesão térmica nas bordas do defeito, tendo-se a cautela de não causar nenhuma lesão na dura-máter (*figura 11*).

Figura 10 – Marcação dos defeitos na calota craniana dos coelhos

Figura 11 – Defeitos confeccionados na calota craniana do receptor

A adaptação do aloenxerto foi feita adequando seu tamanho ao defeito criado, utilizando para isto o motor e a broca acima citados. As dimensões definitivas dos ossos a serem implantados (comprimento, largura e espessura) foram medidas com paquímetro estéril e registradas em tabelas.

Os enxertos alógenos criopreservados e irradiados foram posicionados nos defeitos confeccionados no crânio do coelho receptor, sendo que no lado direito enxertou-se o osso que foi incubado com o material aspirado da medula óssea (grupo caso) e no lado esquerdo enxertou-se o osso não-incubado com medula óssea, i.e., grupo controle (*figura 12*). Os enxertos foram fixados às áreas receptoras através da sutura dos retalhos de periósteos por sobre os mesmos com pontos simples de fio de nylon 4.0 (*figura 13*). Após, o retalho miocutâneo foi aproximado em dois planos com fio de nylon 4.0.

Figura 12 – Aloenxertos ósseos posicionados, à direita acrescido de medula óssea autógena

Figura 13 – Aproximação dos retalhos periosteais

Imediatamente e 24 horas após a cirurgia, os coelhos receptores receberam antibiótico Enrofloxacino (Baytril®), por via intramuscular, na dose de 5mg.

Os vinte e um coelhos receptores, por meio de sorteio simples, foram divididos em três grupos (de sete coelhos cada). O primeiro grupo (coelhos 1 a 7) foi submetido à eutanásia 2 semanas após receber o enxerto ósseo. O segundo grupo (coelhos 8 a 14) foi submetido à eutanásia 5 semanas após a enxertia. Finalmente, o terceiro grupo (coelhos 15 a 21) foi submetido à eutanásia 10 semanas após o recebimento do enxerto, conforme protocolo para análise da integração de enxertos ósseos em coelhos estabelecido por BODEN et al. (1995).

3.2.5 - Eutanásia

Os três grupos de coelhos receptores foram submetidos à eutanásia com injeção endovenosa de Pentobarbital Sódico, na dose de 200mg/kg através de acesso venoso estabelecido em veia marginal da orelha do animal. Os ossos parietais foram coletados, retirando-se não apenas os aloenxertos, mas também uma porção de osso autógeno de aproximadamente 2mm ao redor deles.

3.2.6 - Observação macroscópica

3.2.6.1 – Adesão ao leito receptor

A adesão do enxerto ao leito receptor foi testada por meio do pressionamento do mesmo, visando observar se haveria deslocamento ou descolamento.

3.2.6.2 – Aferição das medidas visuais do enxerto

A região do osso enxertado visualmente identificável foi medida em seu comprimento, largura e espessura com auxílio de paquímetro.

3.2.6.3 – Bordas do enxerto

As interfaces entre as bordas do enxerto e o osso autógeno dos coelhos foram analisadas e classificadas como visíveis ou não-visíveis. As interfaces visíveis foram aquelas em que se conseguia distinguir total ou parcialmente a borda do enxerto, e as não-visíveis foram aquelas cuja distinção referida não foi possível. Essa metodologia foi usada para verificar integração do enxerto ao leito ósseo receptor; para isso foi considerado que um enxerto no qual as bordas fossem visíveis estaria menos integrado do que um enxerto onde não fosse possível visualizar claramente suas bordas.

Cada enxerto observado (dos três grupos receptores, totalizando 21 coelhos), recebeu uma classificação de zero a quatro, de acordo com a quantidade de bordas visíveis. Assim, nos enxertos classificados como zero não se distinguiram as bordas do mesmo, enquanto nos classificados como um distinguia-se uma das quatro bordas, nos classificados como dois distinguia-se duas das quatro bordas, nos classificados como três distinguia-se três das quatro bordas e nos classificados como quatro distinguia-se as quatro bordas (sendo este o menos integrado) (*figura 14*).

Figura 14 – Fragmento de crânio do coelho nº 10 (lado esquerdo classificado como zero e direito classificado como dois)

Após a observação das bordas, os segmentos ósseos foram divididos ao meio na região da sutura sagital, alocados em coletores plásticos com tampa contendo etanol 70% e identificados com o número do coelho receptor e o lado do crânio ao qual pertenciam.

3.2.7 - Preparação histológica e histomorfometria

O processamento dos fragmentos de osso foi efetuado de acordo com o protocolo a seguir:

- a) Fixação em etanol 70% por sete dias.
- b) Permanência em etanol 100% por sete dias.
- c) Permanência em Tolueno por um dia.
- d) Permanência em solução A (metilmetacrilato 75% + dibutilftalato 25%) por sete dias.

e) Permanência em solução A + peróxido de benzoíla 1% por sete dias.

f) Permanência em solução A + peróxido de benzoíla 2% por sete dias.

g) Inclusão em metacrilato. Para essa etapa, os fragmentos de tecido foram transferidos para frascos de vidros contendo metacrilato e colocados em estufa a 37°C por 24 horas (para polimerizar o meio de inclusão).

Após inclusão, os fragmentos de osso foram seccionados em 5 µm de espessura com micrótomo de impacto JUNG Policut S (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha) equipado com navalha de tungstênio. Os cortes obtidos foram corados com solução de azul de toluidina 0,1%, pH 6.4 (Sigma Chemical, St. Louis, EUA). De cada fragmento de osso, foram confeccionadas três lâminas de sua região central. O melhor preparado histológico de cada fragmento foi usado para a análise histomorfométrica, sendo que essa foi feita percorrendo-se todo o corte (foram analisados aproximadamente sessenta campos por lâmina).

A análise histomorfométrica avaliou parâmetros estruturais, de formação e de reabsorção óssea. Ela foi feita usando microscópio Nikon Labophot-2^a equipado com objetiva de 10x (esse aumento permitiu identificar os detalhes morfológicos e diferenciar os tipos celulares presentes no tecido ósseo) e programa Osteomeasure (Osteometrics, Inc, Atlanta, EUA) (*figuras 15 e 16*).

Figura 15 – Mesa de análise histomorfométrica equipada com sistema Osteomeasure e microscópio Nikon Labophot-2^a

Figura 16 – Tela de análise histomorfométrica

Os parâmetros histomorfométricos, avaliados no presente estudo, foram divididos em estáticos e estruturais e seguiram a nomenclatura padronizada pela *American Society of Bone and Mineral Research*, traduzida para o português, com exceção das abreviações.

a) Parâmetros Estruturais

Volume ósseo (BV/TV%): volume ocupado pelo osso trabecular, mineralizado ou não, expresso em porcentagem do volume ocupado pelas traves e pela medula óssea.

b) Parâmetros de formação óssea

Volume osteóide (OV/BV%): volume ocupado pelo osso não mineralizado (osteóide), expresso em porcentagem do volume ocupado pelas traves e pela medula óssea.

Espessura osteóide (O.Th μ m): a espessura, em micrômetro, da matriz osteóide depositada.

Superfície osteóide (OS/BS%): porcentagem da superfície óssea trabecular recoberta por matriz osteóide.

Superfície osteoblástica (Ob.S/BS%): porcentagem da superfície trabecular recoberta por osteoblastos ativos, em relação à superfície total de traves ósseas.

c) Parâmetros de reabsorção óssea

Superfície de reabsorção (ES/BS%): porcentagem da superfície trabecular recoberta por lacunas de Howship.

Superfície osteoclástica (Oc.S/BS%): porcentagem da superfície trabecular em contato com osteoclastos, em relação à superfície total de traves ósseas.

Além dos parâmetros acima descritos, foi realizada também a análise da medula, através das seguintes medidas:

Volume de fibrose (Fb.V/TV%): volume ocupado por fibrose na medula óssea.

Espessura de fibrose (Fb.Th μm): espessura em micrômetro da fibrose.

Superfície de fibrose (Fb.I/BS%): porcentagem da superfície da medula ocupada por fibrose.

3.2.8 - Análise Estatística

Todos os cálculos e comparações estatísticas foram feitos usando o programa Minitab12™ (State College, PA, USA) e envolveram análise de variância (ANOVA) e gráficos de dispersão e tendência. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0.05$.

RESULTADOS

4 – RESULTADOS

Os resultados do presente estudo informaram sobre a integração dos enxertos aos leitos ósseos receptores e os parâmetros histomorfométricos dos ossos parietais. Todos os enxertos, aqui analisados, se aderiram completamente ao leito receptor, conforme testado pelo pressionamento do mesmo.

Cada enxerto do grupo caso (com medula) foi comparado ao seu respectivo par (grupo controle, sem medula), em relação à quantidade de bordas visíveis. Os enxertos foram classificados de zero a quatro, de acordo com a quantidade de bordas nítidas. A *tabela 1* descreve a quantidade de bordas apresentadas pelos enxertos com medula e seu respectivo par. Dos 21 enxertos com medula, nove diferiram de seu par (sem medula) quanto ao número de bordas. Nenhum dos enxertos com medula do grupo de coelhos submetido à eutanásia dez semanas após a enxertia (coelhos 15 a 21) apresentou bordas visíveis. Por outro lado, todos os enxertos sem medula do grupo submetido à eutanásia duas semanas após a enxertia (coelhos 1 a 7) exibiram nitidamente suas quatro bordas.

Apesar de nove dos enxertos com medula terem diferido de seu respectivo par quanto ao número de bordas visíveis, a análise estatística revelou que não há diferença significativa entre o número de bordas observadas nos enxertos com e sem medula (21 enxertos com medula: $\bar{X} = 1.467$, SD = 1.750; 21 enxertos sem medula: $\bar{X} = 2.190$, SD = 1.750; P = 0.193; $\bar{X}$, média aritmética; SD, desvio padrão; ANOVA).

TABELA 1 - QUANTIDADE DE BORDAS VISÍVEIS OBSERVADAS NOS ENXERTOS COM MEDULA EM COMPARAÇÃO AOS SEUS RESPECTIVOS PARES

Identificação dos coelhos	Bordas visíveis Grupo controle (sem medula)	Bordas visíveis Grupo Caso (com medula)
1	4	2
2	4	4
3	4	0
4	4	3
5	4	4
6	4	4
7	4	4
8	4	2
9	1	1
10	2	0
11	3	3
12	4	4
13	1	0
14	0	0
15	1	0
16	0	0
17	0	0
18	1	0
19	0	0
20	1	0
21	0	0

NOTA: De acordo com o número de bordas visíveis, os enxertos foram classificados de zero a quatro, sendo zero o menos integrado e quatro o mais integrado ao leito ósseo receptor. Coelhos 1 a 7 foram submetidos à eutanásia duas semanas após a enxertia; coelhos 8 a 14 foram submetidos à eutanásia cinco semanas após a enxertia; coelhos 15 a 21 foram submetidos à eutanásia dez semanas após a enxertia.

A análise microscópica das amostras estudadas (2, 5 e 10 semanas; com e sem medula) revelou que em todas elas houve formação de pontes de osso não-lamelar, e que essas pontes conectam o enxerto ao osso receptor (*figura 17*). Nas amostras provenientes de coelhos sacrificados 10 semanas após a enxertia, as pontes de osso não-lamelar ligaram definitivamente o osso receptor ao aloenxerto.

Todos os enxertos, independente do período pós-operatório e da adição de medula, continham osteoblastos, osteoclastos e fibrose com vitalidade em sua microestrutura (*figura 18*). Nos aloenxertos provenientes de coelhos sacrificados na décima semana de pós-operatório, sinais de medula óssea viva foram observados (*figura 19*).

Figura 17 – Corte histológico de coelho do grupo de duas semanas (10X)

A – Osso do coelho receptor

B – Aloenxerto ósseo

C – Ponte óssea neoformada entre osso do receptor e aloenxerto

Figura 18 – Corte histológico do coelho do grupo de cinco semanas (40X)

OB – Osteoblastos
OS – Osteóide

OSC – Osteoclasto
FB – Fibrose

Figura 19 – Corte histológico de coelho do grupo de dez semanas (10X)

MO – Medula Óssea
OS – Osteóide

Em relação aos parâmetros histomorfométricos, os avaliados no presente estudo foram: volume ósseo (%), volume de osteóide (%), volume de fibrose (%), superfície de osteóide (%), superfície de fibrose (%), superfície osteoblástica (%), superfície de reabsorção (%), superfície osteoclástica (%), espessura de osteóide (μm), espessura de fibrose (μm), área total (mm^2), área de osso (mm^2) e área de vazio (mm^2).

As *tabelas 2, 3 e 4* descrevem os valores de média aritmética obtidos para cada parâmetro e grupo de coelhos estudados, i.e., submetido à eutanásia duas, cinco e dez semanas após a enxertia. Nenhum dos parâmetros avaliados, por grupo de coelhos, diferiu estatisticamente entre os enxertos com e sem medula ($P > 0.05$).

Desde que a comparação estatística dos grupos não acusou diferenças significativas entre eles, decidiu-se verificar se houve diferenças entre parâmetros histomorfométricos de enxertos com e sem medula provenientes de um mesmo coelho, ou seja, cada enxerto com medula foi comparado ao seu respectivo par (sem medula). Para isso, gráficos de distribuição (ou dispersão) dos valores obtidos por parâmetro foram construídos (*gráficos 1 a 13*). Para todos os parâmetros, a maioria dos enxertos com medula diferiu de seus respectivos pares, em alguns casos significativamente. Quando houve sobreposição de pontos, no mesmo coelho, considerou-se que o enxerto com medula não diferiu de seu controle (sem medula), em relação ao parâmetro estudado.

TABELA 2 - MÉDIAS DOS VALORES DOS PARÂMETROS HISTOMORFOMÉTRICOS DO GRUPO SUBMETIDO À EUTANÁSIA DUAS SEMANAS APÓS A ENXERTIA

Parâmetros analisados	SEM MEDULA		COM MEDULA		Valor P
	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	
Volume ósseo (%)	46.340	4.759	44.569	6.967	0.413
Volume de osteóide (%)	1.090	0.396	1.221	0.657	0.676
Volume de fibrose (%)	4.218	3.532	3.459	1.876	0.629
Superfície de osteóide (%)	13.809	6.213	13.874	6.720	0.983
Superfície de fibrose (%)	0.928	1.472	0.257	0.166	0.269
Superfície osteoblástica (%)	7.029	3.114	9.093	3.375	0.364
Superfície de reabsorção (%)	3.945	1.664	4.299	4.146	0.811
Superfície osteoclástica (%)	2.109	1.017	1.904	0.336	0.757
Espessura do osteóide (μm)	10.088	2.776	9.333	2.567	0.529
Espessura da fibrose (μm)	54.508	17.123	48.085	12.581	0.492
Área total (mm^2)	36.773	4.323	38.004	6.888	0.670
Área de osso (mm^2)	16.928	1.737	16.624	1.518	0.762
Área de vazio (mm^2)	0.950	0.428	0.822	0.131	0.499

$\bar{X}$, ANOVA; SD, desvio padrão; teste estatístico: ANOVA.

TABELA 3 – MÉDIAS DOS VALORES DOS PARÂMETROS HISTOMORFOMÉTRICOS DO GRUPO SUBMETIDO À EUTANÁSIA CINCO SEMANAS APÓS A ENXERTIA

Parâmetros analisados	SEM MEDULA		COM MEDULA		Valor P
	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	
Volume ósseo (%)	50.239	5.056	48.457	6.821	0.486
Volume de osteóide (%)	1.358	0.438	1.260	0.484	0.769
Volume de fibrose (%)	2.654	0.988	6.979	12.164	0.381
Superfície de osteóide (%)	17.283	4.827	17.862	5.808	0.857
Superfície de fibrose (%)	5.809	7.388	3.974	5.899	0.638
Superfície osteoblástica (%)	9.920	6.116	8.850	5.247	0.767
Superfície de reabsorção (%)	14.887	7.962	11.534	6.909	0.413
Superfície osteoclástica (%)	2.957	0.999	3.634	1.722	0.413
Espessura do osteóide (μm)	8.857	3.620	8.334	2.904	0.795
Espessura da fibrose (μm)	44.400	22.694	54.156	30.336	0.467
Área total (mm^2)	30.293	7.069	27.520	4.137	0.369
Área de osso (mm^2)	15.069	3.049	13.180	1.596	0.228
Área de vazio (mm^2)	0.971	0.309	0.849	0.381	0.595

$\bar{X}$, ANOVA; SD, desvio padrão; teste estatístico: ANOVA.

TABELA 4 – MÉDIAS DOS VALORES DOS PARÂMETROS HISTOMORFOMÉTRICOS DO GRUPO SUBMETIDO À EUTANÁSIA DEZ SEMANAS APÓS A ENXERTIA

Parâmetros analisados	SEM MEDULA		COM MEDULA		Valor P
	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	
Volume ósseo (%)	43.995	4.773	43.531	2.850	0.810
Volume de osteóide (%)	1.817	0.843	1.999	1.078	0.770
Volume de fibrose (%)	0.923	0.349	2.295	2.426	0.228
Superfície de osteóide (%)	21.580	7.780	25.290	11.267	0.541
Superfície de fibrose (%)	0.114	0.299	0.331	0.713	0.513
Superfície osteoblástica (%)	6.272	3.213	7.741	3.853	0.566
Superfície de reabsorção (%)	9.411	3.291	8.293	3.019	0.548
Superfície osteoclástica (%)	2.890	1.044	2.505	1.435	0.656
Espessura do osteóide (µm)	12.171	0.963	10.961	1.544	0.222
Espessura da fibrose (µm)	45.919	10.108	52.150	18.838	0.363
Área total (mm ²)	35.631	4.878	32.491	4.733	0.333
Área de osso (mm ²)	15.679	2.747	14.173	2.497	0.944
Área de vazio (mm ²)	0.468	0.119	0.476	0.174	0.920

$\bar{X}$, ANOVA; SD, desvio padrão; teste estatístico: ANOVA.

Para facilitar a exposição dos resultados, preferiu-se construir gráficos separados para os coelhos de cada grupo estudado (eutanásia duas, cinco e dez semanas após a enxertia).

No *gráfico 1*, os volumes ósseos dos enxertos com medula foram comparados aos de seus respectivos pares (sem medula). Cada ponto do gráfico representa o volume ósseo, em porcentagem, obtido para cada enxerto. Dos 21 coelhos estudados, apenas três apresentaram sobreposição dos pontos que representam os volumes ósseos dos enxertos com e sem medula (coelhos 1, 2 e 17), evidenciando que não houve diferença entre eles. Os demais coelhos diferiram quanto à distribuição dos pontos representativos dos volumes ósseos dos enxertos com medula e seus respectivos pares.

No *gráfico 2*, enxertos com medula foram comparados aos seus pares, quanto aos seus volumes de osteóide. Dois dos 21 casos estudados, apresentaram sobreposição dos pontos que representam os enxertos com e sem medula (coelhos 4 e 16). Dezenove enxertos com medula diferiram, em alguns casos significativamente (3, 10 e 21), de seus pares, evidenciando diferentes volumes de osteóide entre eles.

No *gráfico 3*, os volumes de fibrose dos enxertos com medula foram comparados aos de seus respectivos pares (sem medula). Sobreposição dos pontos que representam os enxertos com e sem medula foi observada em quatro casos (coelhos 8, 13, 15 e 17). No coelho identificado como 18, observou-se uma diferença significativa, em volume de fibrose, entre o enxerto com medula e seu controle.

GRÁFICO 1 - DISTRIBUIÇÃO DOS PONTOS INDIVIDUAIS QUE REPRESENTAM OS VOLUMES ÓSSEOS (%) DOS ENXERTOS COM MEDULA E DE SEUS RESPECTIVOS PARES (SEM MEDULA)

GRÁFICO 2 - DISTRIBUIÇÃO DOS PONTOS INDIVIDUAIS QUE REPRESENTAM O VOLUME DO OSTEÓIDE (%) DOS ENXERTOS COM MEDULA E DE SEUS RESPECTIVOS PARES (SEM MEDULA)

GRÁFICO 3 - DISTRIBUIÇÃO DOS PONTOS INDIVIDUAIS QUE REPRESENTAM OS VOLUMES DA FIBROSE (%) DOS ENXERTOS COM MEDULA E DE SEUS RESPECTIVOS PARES (SEM MEDULA).

No *gráfico 4*, as superfícies de osteóide dos enxertos com medula e de seus pares (sem medula) foram comparados. Dezoito coelhos apresentaram diferentes valores de superfície de osteóide para enxertos com medula e seus pares. Essa diferença foi mais acentuada no coelho 15.

No *gráfico 5*, o parâmetro analisado foi a superfície de fibrose. Nove casos exibiram sobreposição de pontos representativos dos enxertos com medula e seus controles. Nos coelhos 1, 10 e 18, a diferença, em superfície de fibrose, entre os enxertos com medula e seus pares foi acentuada.

No *gráfico 6*, as superfícies osteoblásticas dos enxertos com medula foram comparados aos de seus respectivos pares (sem medula). Os coelhos 3, 12 e 15 apresentaram diferença significativa também na porcentagem de superfície osteoblástica dos enxertos com medula e seus controles.

O *gráfico 7* se refere à superfície de reabsorção. Quatro coelhos (2, 5, 7, 14) apresentaram pontos sobrepostos. Os demais diferiram na distribuição dos pontos que representam os enxertos com medula e seus respectivos pares.

No *gráfico 8*, as superfícies osteoclásticas dos enxertos com medula foram comparadas a de seus respectivos pares (sem medula). Nenhum caso exibiu sobreposição de pontos, demonstrando que todos os enxertos com medula diferiram de seus respectivos pares. Em quatro casos (8, 12, 14 e 15) a diferença foi modesta.

GRÁFICO 4 - DISTRIBUIÇÃO DOS PONTOS INDIVIDUAIS QUE REPRESENTAM AS SUPERFÍCIES DO OSTEÓIDE (%) DOS ENXERTOS COM MEDULA E DE SEUS RESPECTIVOS PARES (SEM MEDULA).

GRÁFICO 5 - DISTRIBUIÇÃO DOS PONTOS INDIVIDUAIS QUE REPRESENTAM AS SUPERFÍCIES DA FIBROSE (%) DOS ENXERTOS COM MEDULA E DE SEUS RESPECTIVOS PARES (SEM MEDULA).

GRÁFICO 6 - DISTRIBUIÇÃO DOS PONTOS INDIVIDUAIS QUE REPRESENTAM AS SUPERFÍCIES OSTEOLÁSTICAS (%) DOS ENXERTOS COM MEDULA E DE SEUS RESPECTIVOS PARES (SEM MEDULA).

GRÁFICO 7 - DISTRIBUIÇÃO DOS PONTOS INDIVIDUAIS QUE REPRESENTAM AS SUPERFÍCIES DE REABSORÇÃO (%) DOS ENXERTOS COM MEDULA E DE SEUS RESPECTIVOS PARES (SEM MEDULA).

GRÁFICO 8 - DISTRIBUIÇÃO DOS PONTOS INDIVIDUAIS QUE REPRESENTAM AS SUPERFÍCIES OSTEOCLÁSTICAS (%) DOS ENXERTOS COM MEDULA E DE SEUS RESPECTIVOS PARES (SEM MEDULA).

O *gráfico 9* se refere à espessura de osteóide. Apenas os coelhos 1, 9 e 18 não apresentaram diferenças entre enxertos com medula e seus pares.

No *gráfico 10*, as espessuras de fibrose dos enxertos com medula e de seus pares foram comparadas. Três dos pontos representativos dos enxertos com medula se sobrepuseram aos respectivos controles (*gráfico 10*).

Em termos de área total, todos os enxertos com medula, exceto o 11, diferiram de seus controles na distribuição de pontos (*gráfico 11*).

Quando a área de osso foi avaliada, dois (9 e 19) dos pontos que representam os enxertos com medula se sobrepuseram aos pontos que representam os controles (*gráfico 12*). Nos casos 4, 14 e 17, os enxertos com medula diferiram acentuadamente, em área de osso, de seus respectivos pares.

As diferenças observadas em áreas de vazios, entre enxertos com medula e seus pares foi discreta em todos os casos (*gráfico 13*). Em dois casos (2 e 9), houve sobreposição de pontos.

Para todos os parâmetros, observou-se que quando havia diferença entre o enxerto com medula e seu respectivo par, na maioria dos casos, os pontos representantes dos enxertos com medula se distribuíram em valores (no eixo y do gráfico) mais elevados que o controle.

GRÁFICO 9 - DISTRIBUIÇÃO DOS PONTOS INDIVIDUAIS QUE REPRESENTAM AS ESPESSURAS DO OSTEÓIDE (μm) DOS ENXERTOS COM MEDULA E DE SEUS RESPECTIVOS PARES (SEM MEDULA).

GRÁFICO 10 - DISTRIBUIÇÃO DOS PONTOS INDIVIDUAIS QUE REPRESENTAM AS ESPESSURAS DA FIBROSE (μm) DOS ENXERTOS COM MEDULA E DE SEUS RESPECTIVOS PARES (SEM MEDULA).

GRÁFICO 11 - DISTRIBUIÇÃO DOS PONTOS INDIVIDUAIS QUE REPRESENTAM AS ÁREAS TOTAIS (mm²) DOS ENXERTOS COM MEDULA E DE SEUS RESPECTIVOS PARES (SEM MEDULA).

GRÁFICO 12 - DISTRIBUIÇÃO DOS PONTOS INDIVIDUAIS QUE REPRESENTAM AS ÁREAS DE OSSO (mm²) DOS ENXERTOS COM MEDULA E DE SEUS RESPECTIVOS PARES (SEM MEDULA).

GRÁFICO 13 - DISTRIBUIÇÃO DOS PONTOS INDIVIDUAIS QUE REPRESENTAM AS ÁREAS DE VAZIO (mm²) DOS ENXERTOS COM MEDULA E DE SEUS RESPECTIVOS PARES (SEM MEDULA).

As médias dos valores obtidos para cada parâmetro foram plotadas contra a sobrevivência dos grupos de coelhos, após a enxertia. Dessa forma, foram construídos gráficos de tendência demonstrando as mudanças que ocorreram nos parâmetros histomorfométricos avaliados (dinamismo tecidual) em função do tempo. Os parâmetros obtidos para o grupo de coelhos submetido à eutanásia duas semanas após a enxertia foram considerados como sendo inicial. Os parâmetros obtidos para o grupo de coelhos submetido à eutanásia cinco semanas após a enxertia foram considerados como sendo de transição. E os parâmetros obtidos para o grupo de coelhos submetido à eutanásia dez semanas após a enxertia foram considerados como sendo final.

Tanto os enxertos com medula quanto os enxertos sem medula apresentaram volume ósseo com mesma tendência de comportamento ou modificações ao longo do tempo (*gráfico 14*). Em ambos os casos, o volume ósseo com cinco semanas foi maior que o inicial. Contudo, esse volume aumentado não se manteve ao longo do tempo e tão logo declinou, de modo que com dez semanas, o volume ósseo final foi menor até mesmo que o inicial (com duas semanas).

O volume de osteóide (*gráfico 15*) observado com cinco semanas foi similar ao observado com duas semanas, havendo apenas uma discreta tendência ao aumento desses valores nos enxertos sem medula. Com dez semanas, o volume de osteóide de todos os enxertos foi maior que os observados com duas e cinco semanas.

GRÁFICO 14 - HISTOGRAMA DE ALTERAÇÕES NOS VOLUMES ÓSSEOS DOS GRUPOS DE ENXERTOS ESTUDADOS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE VIDA DOS COELHOS, APÓS A ENXERTIA.

GRÁFICO 15 - HISTOGRAMA DE ALTERAÇÕES NOS VOLUMES DO OSTEÓIDE DOS GRUPOS DE ENXERTOS ESTUDADOS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE VIDA DOS COELHOS, APÓS A ENXERTIA.

Enxertos com medula e sem medula diferiram nas modificações em volume de fibrose (*gráfico 16*) observadas entre duas e cinco semanas. Os enxertos sem medula tenderam a uma diminuição do volume de fibrose entre duas e cinco semanas, enquanto nos enxertos com medula verificou-se o contrário. Apesar dessa diferença, no final (com dez semanas) todos os enxertos apresentaram volume de fibrose menor que o observado com duas semanas.

Em relação à superfície de osteóide (*gráfico 17*), um aumento gradativo nos valores que representam esse parâmetro foi observado ao longo do tempo, em enxertos com e sem medula.

Os dois grupos de enxertos (com e sem medula) apresentaram maior superfície de fibrose (*gráfico 18*) com cinco semanas em comparação a inicial. Esse aumento não se manteve com o tempo, conforme observado na décima semana.

A superfície osteoblástica (*gráfico 19*) do enxerto com medula diminuiu discretamente entre duas e cinco semanas. Nos enxertos sem medula, a superfície osteoblástica entre duas e cinco semanas aumentou. Ambos os casos apresentaram diminuição da superfície osteoblástica entre cinco e dez semanas. Essa diminuição foi mais acentuada no grupo de enxertos sem medula.

GRÁFICO 16 - HISTOGRAMA DE ALTERAÇÕES NOS VOLUMES DA FIBROSE DOS GRUPOS DE ENXERTOS ESTUDADOS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE VIDA DOS COELHOS, APÓS A ENXERTIA.

GRÁFICO 17 - HISTOGRAMA DE ALTERAÇÕES SUPERFÍCIES DO OSTEÓIDE DOS GRUPOS DE ENXERTOS ESTUDADOS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE VIDA DOS COELHOS, APÓS A ENXERTIA.

GRÁFICO 18 - HISTOGRAMA DE ALTERAÇÕES NAS SUPERFÍCIES DA FIBROSE DOS GRUPOS DE ENXERTOS ESTUDADOS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE VIDA DOS COELHOS, APÓS A ENXERTIA.

GRÁFICO 19 - HISTOGRAMA DE ALTERAÇÕES NAS SUPERFÍCIES OSTEOLÁSTICAS DOS GRUPOS DE ENXERTOS ESTUDADOS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE VIDA DOS COELHOS, APÓS A ENXERTIA.

No que se refere à superfície de reabsorção (*gráfico 20*), nos dois grupos de enxertos, ela aumentou entre duas e cinco semanas e diminuiu após cinco semanas. Apesar dessa diminuição, as superfícies de reabsorção com dez semanas foram maiores que as observadas em duas semanas. O mesmo fenômeno foi observado para a superfície osteoclástica (*gráfico 21*) dos grupos de enxertos, exceto que nos enxertos sem medula, a superfície osteoclástica se manteve estável entre cinco e dez semanas.

A espessura do osteóide (*gráfico 22*) dos dois grupos de enxertos diminuiu discretamente entre duas e cinco semanas e aumentou entre cinco e dez semanas, de tal modo que as espessuras finais do osteóide (dez semanas) foram maiores que as iniciais (duas semanas).

Modificações na espessura da fibrose (*gráfico 23*) em função do tempo foram observadas entre os grupos de enxertos com e sem medula, no período de duas a cinco semanas. O grupo de enxertos com medula apresentou aumento na espessura da fibrose entre duas e cinco semanas, enquanto o contrário foi observado no grupo sem medula.

GRÁFICO 20 - HISTOGRAMA DE ALTERAÇÕES NAS SUPERFÍCIES DE REABSORÇÃO DOS GRUPOS DE ENXERTOS ESTUDADOS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE VIDA DOS COELHOS, APÓS A ENXERTIA.

GRÁFICO 21 - HISTOGRAMA DE ALTERAÇÕES NAS SUPERFÍCIES OSTEOCLÁSTICAS DOS GRUPOS DE ENXERTOS ESTUDADOS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE VIDA DOS COELHOS, APÓS A ENXERTIA.

GRÁFICO 22 - HISTOGRAMA DE ALTERAÇÕES NAS ESPESSURAS DO OSTEÓIDE (μm) DOS GRUPOS DE ENXERTOS ESTUDADOS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE VIDA DOS COELHOS, APÓS A ENXERTIA.

GRÁFICO 23 - HISTOGRAMA DE ALTERAÇÕES NAS ESPESSURAS DA FIBROSE (μm) DOS GRUPOS DE ENXERTOS ESTUDADOS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE VIDA DOS COELHOS, APÓS A ENXERTIA.

Desde que o parâmetro área total representa as dimensões (ou tamanho) do corte histológico, um histograma demonstrando as diferenças desse parâmetro em função do tempo não pôde ser construído (pois não há influência do tempo).

Em adição, como as áreas de osso e de vazio, variam em função da área do corte histológico, o percentual de área total coberta por osso foi calculada. As médias do percentual obtidas para cada grupo de coelhos e enxertos (com e sem medula) foram usadas para construir o gráfico de alterações no parâmetro *versus* tempo (gráfico 24)

GRÁFICO 24 - HISTOGRAMA DE ALTERAÇÕES NO PERCENTUAL DE ÁREAS TOTAIS COBERTAS POR OSSO DOS GRUPOS DE ENXERTOS ESTUDADOS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE VIDA DOS COELHOS, APÓS A ENXERTIA.

O percentual de áreas totais cobertas por osso obtido para enxertos com e sem medula por coelho, estão descritos na tabela abaixo:

TABELA 5 - PERCENTUAL (%) DE ÁREAS TOTAIS COBERTAS POR OSSO

Identificação dos coelhos	(%)	(%)
	Grupo controle (sem medula)	Grupo Caso (com medula)
1	44.8	44.3
2	41.9	43.4
3	42.6	36.4
4	49.1	42.6
5	54.6	48.2
6	44.4	41.6
7	50.6	59.0
8	46.4	40.0
9	48.1	50.9
10	58.4	54.8
11	48.9	56.9
12	60.0	48.8
13	51.0	53.6
14	46.2	39.0
15	47.3	44.1
16	38.7	41.9
17	41.5	42.4
18	44.1	40.7
19	41.3	47.9
20	43.7	46.2
21	52.6	46.1

NOTA: Coelhos 1 a 7 foram submetidos à eutanásia duas semanas após a enxertia; coelhos 8 a 14 foram submetidos à eutanásia cinco semanas após a enxertia; coelhos 15 a 21 foram submetidos à eutanásia dez semanas após a enxertia.

DISCUSSÃO

5 – DISCUSSÃO

As anomalias do esqueleto craniofacial comprometem severamente a aparência e o bem estar psicossocial dos seus portadores. Em razão disto, diversas estratégias, buscando a correção dessas anomalias, surgiram com o decorrer do tempo.

Atualmente, há um consenso entre os autores de que o melhor procedimento nas reconstruções craniofaciais é aquele que utiliza ossos do próprio paciente. As vantagens oferecidas por este procedimento são inúmeras, dentre elas a rápida revascularização e a existência de um número significativo de células viáveis (i.e., sobreviventes ao processo de transplante) no osso, o que contribui para uma rápida cicatrização do local enxertado (GOLDBERG; STEVENSON, 1992).

Apesar das vantagens oferecidas, utilizar ossos do próprio paciente nem sempre é possível devido à particularidade da anatomia craniofacial, à quantidade limitada de áreas doadoras de osso autógeno, à morbidade e às seqüelas observadas nas áreas doadoras. Assim, inúmeros estudos têm buscado desenvolver ou testar materiais potencialmente capazes de satisfatoriamente substituir o osso autógeno. Neste sentido, o osso alógeno

criopreservado e irradiado, aparentemente, é um material viável, uma vez que ele é de fácil obtenção e possui estrutura similar e origem embriológica idêntica (ossificação intramembranosa) a do tecido que será substituído.

Neste estudo, nós utilizamos aloenxertos criopreservados e irradiados para reparar defeitos ósseos experimentalmente produzidos no crânio de coelhos adultos. Esses animais foram usados como modelo experimental por serem dóceis, de manutenção bem-estabelecida em biotério e, principalmente, por apresentarem um ritmo acelerado de cicatrização óssea (BODEN, 1995). No que se refere à escolha dos aloenxertos ósseos, dois critérios amplamente descritos na literatura foram considerados: 1) a origem embriológica; 2) e a composição cortical do aloenxerto.

Discute-se na literatura, se a origem embriológica e/ou a composição cortical do aloenxerto são fatores capazes de influenciar na sua integração ao leito ósseo receptor. Vários são os trabalhos que descrevem a manutenção de um maior volume do enxerto de osso de origem intramembranosa em relação ao endocondral em reconstruções craniais (ZINS et al., 1984; HARDESTY; MARSH, 1990; LIN et al., 1990 e CHEN et al., 1994). Dentre esses trabalhos, em nosso meio destaca-se o de ALONSO (1992) que comparou enxertos ósseos autógenos de crânio e de crista ilíaca, em relação ao comportamento por eles apresentados, após implantação no osso nasal de coelhos. Ele observou que os ossos de crânio apresentaram maior relação peso inicial/ final, maior formação óssea e maior quantidade de osso formado fora da região trabecular que os ossos de crista ilíaca, onde a taxa de reabsorção foi maior.

Em relação à influência da composição do aloenxerto na sua integração, destaca-se o trabalho de OZAKI; BUCHMAN (1998). Esses autores não somente demonstraram que a composição do aloenxerto influencia na sua integração, como também discordaram dos autores que prezam pela influência da origem embriológica. Em seu experimento, os autores mencionados, compararam a evolução de autoenxertos ósseos de crânio com enxertos corticais de crista ilíaca e com enxertos esponjosos de crista ilíaca. Eles não encontraram diferença estatisticamente significativa entre a manutenção do volume e a taxa de reabsorção dos ossos corticais estudados. Por outro lado, eles observaram que o enxerto esponjoso apresentou menor volume e maior taxa de reabsorção em comparação aos enxertos corticais. Diante dessas observações, a conclusão foi a de que o uso de osso cortical, em reconstrução craniana, oferece vantagens em relação ao uso de osso esponjoso, independente da origem embriológica.

Buscando respeitar as conclusões dos autores citados tanto em relação à origem embriológica dos ossos quanto à composição cortical do enxerto, no presente estudo utilizamos aloenxerto de osso craniano.

Os procedimentos de criopreservação e irradiação, os quais os aloenxertos usados neste estudo foram submetidos, tiveram por objetivo diminuir a imunogenicidade e o risco da transmissão de doenças infecciosas, respectivamente. Os princípios desses procedimentos foram desenvolvidos na década de 50 pelo *US Navy Tissue Bank* do centro médico da marinha americana (em Bethesda, Maryland) e persistem até os dias atuais (STRONG, 2004).

Embora, raramente os aloenxertos ósseos sejam completamente rejeitados, a reação imunológica aumenta o tempo de incorporação e altera a qualidade do enxerto (KEARNEY; LOMAS, 1997), daí a importância em diminuí-la. HERNDON; CHASE (1954), BONFIGLIO et al. (1955) e CURTISS et al. (1959) foram os primeiros a relatarem que a criopreservação é capaz de reduzir a imunogenicidade dos aloenxertos. Na época eles especularam que a criopreservação eliminava as células viáveis do aloenxerto; mais tarde isso foi experimentalmente confirmado por FRIEDLAENDER et al. (1976). Atualmente, a proposta de que a eliminação das células viáveis do enxerto reduziria a imunogenicidade persiste, porém outro fator imunogênico – lipídios da medula óssea – foi descoberto e considerado relevante, sendo, portanto, também eliminado do aloenxerto. ASPENBERG; THORÉN (1990) relataram os efeitos imunogênicos dos lipídios da medula óssea sobre os aloenxertos. Eles também demonstraram que a remoção desses lipídios diminui as reações imunes específicas e o processo inflamatório, ambos prejudiciais à integração do aloenxerto ósseo ao leito receptor, conforme anteriormente mencionado.

Com base na evolução do conhecimento sobre os fatores que respondem pela imunogenicidade dos aloenxertos, os utilizados neste estudo foram submetidos a um protocolo de extração lipídica durante seu processamento e a criopreservação a -80° C.

Visando a diminuição dos riscos da transmissão de doenças infecciosas pelos aloenxertos ósseos, os bancos de tecidos realizam uma seleção rigorosa dos doadores, com observação de comportamentos de riscos,

detalhamento dos antecedentes clínicos e estudo sorológico. Ainda, temendo o período de janela imunológica, a maioria dos bancos utilizam métodos de esterilização de tecidos, como por exemplo, a irradiação gama. Até o momento não há um consenso entre os autores sobre a dose de irradiação efetiva para a esterilização viral dos aloenxertos.

Não foram localizados em literatura corrente trabalhos mencionando ou sugerindo doses de irradiação efetivas para aloenxertos de ossos do crânio. Dessa forma, neste estudo, a dose de irradiação foi escolhida com base em observações feitas por KOMENDER (1976); DZIEDZIC-GLOCLAWSKA et al. (1991) e FIDELER et al. (1994) em ossos não-cranianos.

FIDELER et al. (1994) investigaram qual dose de irradiação era efetiva na esterilização de ossos patelares criopreservados infectados com HIV. Eles observaram que apenas as doses de 30 kGy ou superiores foram capazes de esterilizar os ossos. DZIEDZIC-GLOCLAWSKA et al. (1991) relataram que matrizes ósseas criopreservadas irradiadas com doses de 35 e 50 kGy a -72°C , induziam formação óssea comparável a controles não irradiados. KOMENDER (1976) relatou que a resistência à curvatura, compressão e torção dos fragmentos de diáfise femoral humana são significativamente comprometidas, após irradiação com 60 kGy, porém são preservadas quando irradiadas com 30kGy. Com base no exposto foi usada a dose de 50 kGy para irradiar os aloenxertos usados neste estudo. Considerando que uma das principais alterações que a irradiação excessiva provoca nos aloenxertos referem-se às propriedades mecânicas dos mesmos, é possível que a ausência de estudos visando descrever os efeitos

da irradiação sobre os ossos cranianos esteja associado ao fato do crânio não estar sujeito a cargas mecânicas intensas.

Neste estudo, todos os aloenxertos foram irradiados à temperatura de aproximadamente -70 °C. Esse procedimento teve por objetivo preservar as propriedades osteocondutivas do osso. Desde o estudo de URIST (1965), sabe-se que os principais responsáveis pela osteoindução são as proteínas de matriz óssea denominadas BMPs. Essas proteínas são sensíveis às altas temperaturas e às radiações ionizantes que freqüentemente acompanham os processos de esterilização (ZORICI et al., 2002); porém preservam sua estrutura funcional (propriedades osteoindutivas) quando submetidas à esterilização em baixas temperaturas (DZIEDZIC-GOCLAWSKA et al., 1991; FIDELER et al., 1994 e HAMER et al., 1996).

Alguns dos aloenxertos usados neste estudo foram enriquecidos com medula óssea total fresca, na tentativa de explorar o potencial osteogênico das células mesenquimais presentes na medula óssea, verificando se sua adição aos aloenxertos seria capaz de melhorar a osteogenicidade dos mesmos. Ressalta-se que o aloenxerto ósseo criopreservado e irradiado não possui células viáveis nem poder osteogênico. Diversos autores, previamente, utilizaram medula óssea fresca ou células mesenquimais purificadas para promover cicatrização óssea, consolidação de fraturas, integração de enxertos ósseos e confecção de bioenxertos por engenharia tecidual (SALAMA; WEISSMAN, 1978; LINDHOLM; URIST, 1980; WIENTROUB et al., 1989; HEALEY et al., 1990; LOKIEC et al., 1996; SHANG et al., 2001 e RUST et al., 2007).

A análise macroscópica dos aloenxertos realizados neste estudo revelou que todos eles estavam fixados ao seu leito, independente do período pós-operatório e da adição de medula autógena. Além disso, não houve diferença na integração dos aloenxertos com e sem medula aos leitos receptores, conforme revelado pela análise das quantidades de bordas visíveis. Nesta análise, nós consideramos que quanto menos bordas visíveis tivessem os aloenxertos, mais integrados eles estariam aos leitos receptores. Nos aloenxertos estudados, a análise macroscópica revelou que houve remodelação das bordas e regularização de suas superfícies, o que sugere incorporação dos enxertos.

A análise microscópica revelou que todos os enxertos, independente do período pós-operatório e da adição de medula, continham osteoblastos, osteoclastos e fibrose, demonstrando que células envolvidas na formação e reabsorção óssea estavam presentes e viáveis em todos os períodos analisados. Nos aloenxertos provenientes de coelhos sacrificados na décima semana de pós-operatório, a integração óssea pode ser melhor detectada, com evidências inclusive de medula óssea sem fibrose e com aspecto normal.

Os enxertos exibiram pontes de osso não-lamelar conectando-os aos ossos receptores. Com o tempo, essas pontes aumentaram em tamanho, integrando definitivamente o osso receptor ao aloenxerto, na décima semana. Este achado concorda com as observações de CHO et al. (2002). Os referidos autores analisaram a integração de autoenxerto ósseo de origem intramembranosa em mandíbula de cães, observando que, em duas

semanas, houve atividade osteoblástica com formação de osso primário ou não-lamelar no espaço compreendido entre o enxerto e o osso receptor.

Os parâmetros analisados por histomorfometria foram os de formação óssea, os de reabsorção óssea e os de quantificação de fibrose medular. A análise estatística desses parâmetros revelou que eles não diferiram entre os enxertos com e sem medula. Dois fatores poderiam explicar esse achado: 1) a estrutura do osso craniano; 2) e o protocolo usado para obtenção e tratamento da medula óssea.

Grande parte dos trabalhos, onde os autores adicionaram medula óssea ou células dela isolada em aloenxertos ósseos, o fizeram com moldes de osso desmineralizado ou com matriz óssea desmineralizada. Neste sentido, podem ser citados os estudos de WITTBGER et al. (1983) que usaram osso cortical desmineralizado; de CHEN; WANG (2002) que usaram matriz óssea alógena desmineralizada e perfurada; de LINDHOLM; URIST, (1980) e RIZZO et al. (2005) que usaram matriz óssea desmineralizada; e de RUST et al. (2007) que estudaram aloenxerto ósseo esponjoso. Considerando o osso do crânio, usado neste estudo, ele apresenta uma estrutura predominantemente cortical, com pequena porção de componente esponjoso na sua dípole. Essa estrutura pode ter dificultado a penetração das células mesenquimais no interior do aloenxerto. No presente trabalho, optou-se por usar enxerto cortical de crânio ao invés dos anteriormente mencionados, porque apenas ele apresenta rigidez adequada para proteger o encéfalo imediatamente após seu implante.

Em relação à medula óssea, neste estudo, ela não foi submetida aos processos de separação, concentração ou cultura celular, amplamente recomendados pela literatura, sendo usada fresca (*in natura*), imediatamente após sua coleta. Dessa forma, pode ser que a concentração de células mesenquimais presentes na medula tenha sido muito baixa e, conseqüentemente, incapaz de melhorar a osteogenicidade dos aloenxertos. Embora BURWELL (1961), SALAMA; WEISSMAN (1978), RIZZO et al. (2005) e SMILLER et al. (2007) tenham utilizado medula óssea fresca em seus estudos, sabe-se que a concentração de células mesenquimais osteoprogenitoras presentes na medula óssea fresca é muito baixa, sendo na proporção de uma célula mesenquimal para cada 2.200.000 células da medula. Para coelhos, a concentração de células mesenquimais presentes na medula fresca é desconhecida, porém acredita-se que seja da mesma ordem descrita para humanos.

BUDENZ; BERNARD (1980) sugeriram que, em coelhos, a medula óssea fresca produz menor quantidade de osso que a medula submetida ao protocolo de separação celular por gradiente. Desde então, a maioria dos estudos envolvendo células mesenquimais osteoprogenitoras utilizam-se de células que foram replicadas e expandidas em cultura. KRESBACH et al. (1998) repararam defeitos de craniotomia em ratos, usando células mesenquimais derivadas de medula óssea. Esses autores relataram ter obtido 99% de sucesso em defeitos de 5mm, duas semanas após a reparação. Entretanto, as células por ele usadas foram, previamente,

expandidas em cultura, de modo que aproximadamente 5.000.000 de células mesenquimais osteoprogenitoras foram depositadas no local do defeito.

Apesar do exposto, nós optamos em utilizar medula óssea fresca pois buscávamos um protocolo simples, de baixo custo, que não necessitasse de recursos laboratoriais sofisticados e, principalmente, fosse realizado em um único ato operatório.

A análise dos gráficos de tendência informou sobre a dinâmica dos parâmetros aqui analisados em função dos tempos de pós-operatório. Os parâmetros obtidos para o grupo de coelhos submetido à eutanásia duas semanas após a enxertia foram considerados como sendo inicial. Os parâmetros obtidos para o grupo de coelhos submetido à eutanásia cinco semanas após a enxertia foram considerados como sendo de transição. E os parâmetros obtidos para o grupo de coelhos submetido à eutanásia dez semanas após a enxertia foram considerados como sendo final. Tanto os grupos de enxertos adicionados com medula quanto os grupos sem medula apresentaram parâmetros com comportamento semelhante ao longo dos tempos de pós-operatório.

As superfícies de reabsorção e de osteoclastos, inicialmente pequenas, aumentaram significativamente na quinta e decaíram na décima semana, porém mantiveram-se maiores que as observadas na segunda semana. Por outro lado, a superfície de osteóide apresentou um crescimento contínuo ao longo dos três tempos de pós-operatório; e a espessura e o volume de osteóide mantiveram-se praticamente constantes nos períodos iniciais e

aumentaram na décima semana, fato este que refletiu uma maior funcionalidade dos osteoblastos neste tempo de pós-operatório.

A dinâmica tecidual revelada pelos gráficos de tendência e acima descrita é um indicativo da substituição do osso enxertado pelo osso do hospedeiro, por meio de um processo bem-estabelecido que envolve reabsorção e deposição óssea, o *creeping substitution* descrito por Barth, em 1893.

Chama atenção, o gráfico de tendência construído para o volume ósseo. Isto porque ele aumenta ao redor da quinta semana indicando que nessa fase a reabsorção óssea é mais lenta que a deposição, e diminui por volta da décima semana, onde tende a haver um equilíbrio entre os dois processos.

Em relação à quantificação da fibrose na medula óssea, indicativo de atividade inflamatória, observa-se que a superfície de fibrose aumenta em proporções diferentes, nos dois grupos de enxertos (com e sem medula), por volta da quinta semana; porém após esse período, ambas as superfícies de fibrose diminuem significativamente e na décima semana são similares.

Nossos achados concordam com as observações descritas por GOLDEMBERG; STEVENSON (1987). Esses autores observaram que a incorporação do enxerto ósseo cortical, ao contrário do que ocorre nos enxertos de osso esponjoso, se inicia pela ação dos osteoclastos. A reabsorção do osso cortical que se inicia por volta da segunda semana de pós-operatório, se dissemina pelo enxerto até a sexta semana e diminui gradualmente até alcançar taxas normais, por volta de um ano.

Paralelamente a isto, os osteoblastos depositam matriz óssea e a medula óssea do enxerto é rapidamente substituída por fibrose, que por sua vez é substituída por medula normal ao redor de nove meses de pós-operatório.

Do presente estudo podemos concluir que os aloenxertos ósseos criopreservados e irradiados, de origem cortical, se integraram aos leitos receptores, independente da adição de medula óssea. Todos os enxertos preservaram, após os processos de criopreservação e irradiação, suas propriedades osteocondutivas e osteoindutivas, e isso propiciou que eles fossem integrados aos crânios dos coelhos. O fenômeno observado neste estudo foi semelhante ao reportado por BREIDAHN et al. (2005). Estes autores utilizaram aloenxertos ósseos criopreservados e irradiados para reconstruir o crânio de dezoito coelhos; e por meio de radiografia demonstraram que, em doze semanas, ocorria à união do enxerto ao osso hospedeiro e a revascularização.

Nós acreditamos que novos estudos testando o potencial osteogênico de células mesenquimais da medula em aloenxertos ossos de crânio devam ser realizados em diferentes modelos experimentais, utilizando outros protocolos de coleta e de processamento da medula também devem ser testados.

CONCLUSÕES

6 – CONCLUSÕES

- ❖ Os aloenxertos ósseos criopreservados e irradiados, usados no presente estudo, se integraram aos leitos receptores, independente da adição de medula óssea.
- ❖ Os enxertos preservaram, após os processos de criopreservação e irradiação, suas propriedades osteocondutivas e osteoindutivas, o que propiciou que eles fossem integrados aos crânios dos coelhos;
- ❖ O processo de reabsorção óssea marcou o início da incorporação dos aloenxertos ósseos de crânio ao leito, seguindo-se deposição de matriz, substituição da medula por fibrose e, finalmente, substituição da fibrose por uma nova medula viável;
- ❖ A adição de medula óssea autógena fresca (*in natura*) aos aloenxertos ósseos não alterou o processo de incorporação dos enxertos aos crânios dos coelhos receptores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO, N. **Estudo comparative entre enxertos autógenos de crânio e de crista ilíaca. Correlação entre dados macroscópicos e dados histológicos. Estudo experimental em coelhos.** São Paulo, 1992. 70p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- ANDERSON, M.J.; KEYAK, J.H.; SKINNER, H.B. Compressive mechanical properties of human cancellous bone after gamma irradiation. **J. Bone Joint Surg.**, v.74, p.747-52, 1992.
- ASPENBERG, P.; JOHNSON, E.; THORNGREN, K.G. Dose-dependent reduction of bone inductive properties by ethylene oxide. **J. Bone Joint Surg. Br.**, v.72, p.1036-7, 1990.
- ASPENBERG, P.; THORÉN, K. Lipid extraction enhances bank bone incorporation. An experiment study in rabbits. **Acta Orthop. Scand.**, v.61, p.546-8, 1990.
- BAUER, T.W.; MUSCHLER, G.F. Bone graft materials: an overview of the basic science. **Clin. Orthop.**, v.371, p.10-27, 2000.

BETTIN, D.; DETHLOFF, M.; POLSTER, J.; STEINBECK, J.; FIEDLER, R.

HIV – screening in bone transplantation. **Unfallchirurg**, v.96, p.636-40, 1993.

BODEN, S.D; SCHIMANDLE, J.H.; HUTTON, W.C. The use of

osteoinductive growth factor for lumbar spinar fusion. Part I: Biology of spinal fusion. **Spine**, v.20, p.2626-32, 1995.

BONFIGLIO, M.; JETER, W.S.; SMITH, C.L. The immune concept: its

relation to bone transplantation. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v.59, p.417-33, 1955.

BREIDAHN, A.F.; KLUG., G.L.; HOLMES, A.D. Allogeneic membranous

bone grafting for a large calvarial defect. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.115, p.43-9, 2005.

BUCK, B.E.; RESNICK, L.S.; SHAH,S.M.; MALININ, T.I. Human

immunodeficiency virus cultured from bone. Implications for transplantation. **Clin. Orthop.**, v. 251, p.249-53, 1990.

BUDENZ, R.W.; BERNARD, G.W. Osteogenesis and leucopoiesis within

diffusion-chamber implants of isolated bone marrow subpopulations. **Am. J. Anat.**, v.159, p.455-74, 1980.

BURCHARDT, H. The biology of bone graft repair. **Clin. Orthop.**, v.174,

p.28-42, 1983.

BURWELL, R.G. A study of homologous cancellous bone combined with

autologous red marrow after transplantation to a muscular site. **J. Anat.**, v.95, p.613-6, 1961.

- BURWELL, R.G. Studies in the transplantation of bone: VII. The composite homograft-autograft of cancellous bone: an analysis of factors leading to osteogenesis in marrow transplants and marrow containing bone graft. **J. Bone Joint Surg.**, v.46, p.110-40, 1964.
- CHAPMAN, M.W.; RODRIGO, J.J. Bone grafting, bone graft substitutes and growth factors. In: CHAPMAN, M.W., **Chapman's Orthopaedic Surgery**. Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
- CHEN, N.T.; GLOWASCKI, J.; BUCKY, L.P.; HONG, H.Z.; KIM, W.K.; YAREMCHUCK, M.J. The roles of revascularization and resorption on endurance of craniofacial onlay bone grafts in the rabbits. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.93, p.714-22, 1994.
- CHEN; T.M.; WANG, H.J. Cranioplasty using allogeneic perforated demineralized bone matrix with autogenous bone past. **Ann. Plast. Surg.**, v.49, p.272-9., 2002.
- CHIM, H.; SCHANTZ, J.T. New frontiers in calvarial reconstruction: integrating computer-assited design and tissue engineering in Cranioplasty. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.116, p.1726-41, 2005.
- CHO, B.C.; CHUNG, H.Y.; SHIN, D.P.; PARK, J.W.; BAIK, B.S. Early Revascularization of membranous inlay bone graft in canine mandible model. **J. Craniofac. Surg.**, v.13, p.251-7, 2002.
- CONNOLLY, J.; GUSE, R.; LIPPIELLO, L.; DEHNE,R. Development of an osteogenic bone-marrow preparation. **J. Bone Joint Surg.**, v.71, p.684-91, 1989.

- CONNOLLY, J.F. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. **Clin. Orthop.**, v.313, p.8-18, 1995.
- CONNOLLY, J.F. Clinical use of marrow osteoprogenitor cells to stimulate osteogenesis. **Clin. Orthop.**, v.355S, p.S257-66, 1998.
- CURTISS, P.H.,Jr.; POWELL, A.E.; HERNDON, C.H. Immunological factors in homogeneous-bone transplantation. III - The inability of homogeneous rabbit bone to induce circulating antibodies in rabbits. **J. Bone Joint Surg.**, v.41, p.1482-8, 1959.
- DALLARI, D.; FINI, M.; STAGNI, C.; TORRICELLI, P.; ALDINI, N.N.; GIAVARESI, G.; CENNI, E.; BALDINI, N.; CENACCHI, A.; BASSI, A.; GIARDINO, R.; FORNASARI, P.M., GIUNTI, A. In vivo study on the healing of bone defects treated with bone marrow stromal cells, platelet-rich plasma, and freeze-dried bone allografts, alone and in combination. **J. Orthop. Res.**, v.24, p.877-88, 2006.
- DZIEDZIC-GOCLAWSKA, A.; OSTROWSKI, K.; STACHOWICZ, W.; MICHALIK, J.; GRZESIK, W. Effect of radiation sterilization on the osteoinductive properties and the rate of remodeling of bone implants preserved by lyophilization and deep-freezing. **Clin. Orthop.**, v. 272, p.30-7, 1991.
- ENNEKING, W.F.; MINDELL, E.R. Observations on massive retrieved human allografts. **J. Bone Joint Surg.**, v.73, p.1123-42, 1991.
- FIBBE, W.E.; NOORT, W.A. Mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cell transplantation. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v.996, p.235-44, 2003.

FIDELER, B.M.; VANGSNESS, C.T., Jr.; MOORE, T.; LI, Z.; RASHEED, S.

Effects of gamma irradiation on the human immunodeficiency virus. A study in frozen human bone-patellar ligament-bone grafts obtained from infected cadavera. **J. Bone Joint Surg.**, v.76, p.1032-5, 1994.

FRIEDENSTEIN, A.J. Precursor cells of mechanocytes. **Int. Rev. Cytol.**, v.47, p.327-59, 1976.

FRIEDLAENDER, G.E.; STRONG, D.M.; SELL, K.W. Studies on the antigenicity of bone. I. Freeze-dried and deep-frozen bone allografts in rabbits. **J. Bone Joint Surg.**, v.58, p.854-8, 1976.

FRIEDLAENDER, G.E. Immune responses to osteochondral allografts. Current knowledge and future directions. **Clin. Orthop.**, v.174, p.58-66, 1983.

GALEA, G.; KEARNEY, J.N. Clinical effectiveness of processed and unprocessed bone. **Transfusion Medicine**, v.15, p. 165-74, 2005.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Tratado de histologia**. Rio de Janeiro, Guanabara, 1999. p.108-23

GODETTE, G.A.; KOPTA, J.A.; EGGLE, D.M. Biomechanical effects of gamma irradiation on fresh frozen allografts in vivo. **Orthopedics**, v.19, p.649-53, 1996.

GOLDBERG, V.M.; STEVENSON, S. Natural history of autografts and allografts. **Clin. Orthop.**, v.225, p.7-16, 1987.

GOLDBERG, V.M.; STEVENSON, S. Biology of bone and cartilage allografts. In: CZITROM, A.A.; GROSS, A.E. **Allografts in orthopaedic practice**. New York, Williams and Wilkins, 1992. p.1-13.

GOLDBERG, V.M.; STEVENSON, S. The biology of bone grafts. **Semin Arthroplasty**, v. 4, p.58-63, 1993.

GOUJON, E. Recherches experimentales sur les proprietes physiologiques de la moelle des os. **Journal de l'Anatomie et de Physiologie Normales et Pathologiques de l'Homme et des Animaux**, v.6, p.399, 1869 apud BURWELL, R.G. The function of bone marrow in the incorporation of a bone graft. *Clin. Orthop.*, n.200, p.125-41, 1985.

GRIEB, T.A.; FORNG, R.Y.; STAFFORD, R.E.; LIN, J.; ALMEIDA, J.; BOGDANSKY, S.; RONHOLDT, C.; DROHAN, W.N.; BURGESS, W.H. Effective use of optimized, high-dose (50 kGy) gamma irradiation for pathogen inactivation of human bone allografts. Disponível em: www.sciencedirect.com

Acesso em:17/01/2007.

HABAL, M.B. Craniofacial surgery. In: HABAL, M.B.; REDDI, H.D. **Bone Grafts and Bone Substitutes**. Philadelphia: Saunders, 1992. p.316.

HABAL, M.B.; PIETRZAK, W.S. Key points in the fixation of the craniofacial skeleton with absorbable biomaterial. **J. Craniofac. Surg.**, v.6, p.491-9, 1999.

HALLORAN, P.F.; LEE, E.H.; ZIV, I.; LANGER, F.; GROSS, A. Orthotopic bone transplantation in mice. II - Studies of the alloantibody response. **Transplantation**, v.27, p.420-6, 1979.

HAMER, A.J.; STRACHAN, J.R.; BLACK, M.M. Biochemical properties of cortical allograft bone using a new method of bone strength

measurement. A comparison of fresh, fresh-frozen and irradiated bone.

J. Bone Joint Surg., v.78, p.363-8, 1996.

HARDESTY, R.A.; MARSH, J.L. Craniofacial onlay bone grafting: a prospective evaluation of graft morphology, orientation, and embryonic origin. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.85, p.5-14, 1990.

HEALEY, J.H.; ZIMMERMAN, P.A.; MCDONNELL, J.M.; LANE, J.M.

Percutaneous bone marrow grafting of delayed union and nonunion in cancer patients. **Clin. Orthop.**, v.256, p.280-5, 1990.

HEIPLE, K.G.; CHASE, S.W.; HERNDON, C.H. A comparative study of the healing process following different types of bone transplantation. **J. Bone Joint Surg.**, v.45, p.1593-611, 1963.

HERNDON, C.H.; CHASE, S.W. The fate of massive autogenous and homogenous bone grafts including articular surfaces. **Surg. Gynecol. Obstet.**, v.98, p.273-90, 1954.

HERNIGOU, P.; BEAUJEAN, F. Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. **Clin. Orthop.**, v.405, p.14-23, 2002.

ITOMAN, M.; NAKAMURA, S. Experimental study on allogenic bone grafts. **Int. Orthop.**, v.15, p.161-5, 1991.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10.ed. Rio de Janeiro, Guanabara, 2004. Cap. 8, p.136-50: Tecido Ósseo.

KALFAS, I.H. Principles of bone healing. **Neurosurg. Focus**, v.10, p.1-4, 2001.

KATAGIRI, T.; TAKAHASHI, N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. **Oral Diseases**, v.8, p.147-59, 2002.

KATZ, R.W.; FELTHOUSEN, G.C.; REDDI, H. Radiation sterilized insoluble collagenous bone matrix as a functional carrier of osteogenin for bone induction. **Calcif. Tissue Int.**, v.47, p.183-5, 1990.

KEARNEY, J.J.; LOMAS, R.J. **Advances in Tissue Banking**. Singapore, World Scientific, 1997. Cap. 3.1, p.43-71: The osteoinductive properties of demineralised bone matrix grafts.

KELLY, J.F.; FRIEDLAENDER, G.E. Preprosthetic bone graft augmentation with allogeneic bone: a preliminary report. **J. Oral Surg.**, v.35, p.268-75, 1977.

KNAEPLER, H.; VON GARREL, T.; SEIPP, H.M.; ASCHERL, R. Experimental studies of thermal disinfection and sterilization of allogeneic bone transplants and their effects on biological viability. **Unfallchirurg**, v.95, p.477-84, 1992.

KOMENDER, A. Influence of preservation on some mechanical properties of human haversian bone. **Mater Med. Pol.**, v.8, p.13-7, 1976.

KREBSBACH, P.H.; MANKANI, M.H.; SATOMURA, K.; KUZNETSOV, S.A.; ROBEY, P.G. Repair of craniotomy defects using bone marrow stromal cell. **Transplantation**, v.66, p.1272-8, 1998.

LANGER, R.A.; VACANTI, J.P. Tissue engineering. **Science**, v.260, p.920, 1993.

LEVANDER, G. On the formation of new bone in bone transplantation. **Acta Chir. Scand.**, v.74, p.425-6, 1934 apud RENGACHARY, S.S., 2002.

LEXER, E. Die verwendung der freien knochenplastik nebst versuchen uber gelenkversteifung und gelenktransplantation. **Archiv. Kin. Chir.**, v.86,

p.939-54, 1908 apud MOREAU, M.F.; GALLOIS, Y.; BASLÉ; M.F.;

CHAPPARD, D., 2000, p.369.

LIN, K.Y.; BARTLETT, S.P.; YAREMCHUK, M.J.; FALLON, M.;

GROSSMAN, R.F.; WHITAKER, L.A. The effect of rigid fixation on the survival of onlay bone grafts: an experimental study. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.86, p.449-56, 1990.

Surg., v.86, p.449-56, 1990.

LINDHOLM, T.S.; URIST M.R. A quantitative analysis of new bone formation by induction in composite grafts of bone marrow and bone matrix. **Clin. Orthop.**, v.150, p.288-300, 1980.

Orthop., v.150, p.288-300, 1980.

LINDHOLM, T.S.; NILSSON, O.S.; LINDHOLM, T.C. Extrasketal and intrasketal new bone formation induced by demineralized bone matrix combine with bone marrow cells. **Clin. Orthop.**, v.171, p.251-5, 1982.

LIU, W.; CUI, L.; CAO, Y. Recent advances in tissue engineering of cartilage, bone, and tendon. **Curr. Opin. Orthop.**, v.15, p.364-8, 2004.

LOKIEC, F.; EZRA, E.; KHERMOSH, O; WIENTROUB, S. Simple bone cysts treated by percutaneous autologous marrow grafting. **J. Bone Joint Surg.**, v.78, p.934-7, 1996.

LOTY, B.; TOMENO, B.; EVRARD, J.; POSTEL, M. Infection in massive bone allografts sterilized by irradiation. **Int. Orthop.**, v.18, p.164-71, 1994.

MANKIN, H.J.; DOPPELT, S.; TOMFORD, W. Clinical experience with allograft implantation. The first ten years. **Clin. Orthop.**, v.174, p.69-86, 1983.

- MOREAU, M.F.; GALLOIS, Y.; BASLÉ; M.F.; CHAPPARD, D. Gamma irradiation of human bone allografts alters medullary lipids and releases toxic compounds for osteoblast-like cells. **Biomaterials**, v.21, p.369-76, 2000.
- MUSCHLER, G.F.; MIDURA, R.J. Connective tissue progenitors: practical concepts for clinical applications. **Clin. Orthop.**, v. 395, p.66-80, 2002.
- NEMZEK, J.A.; ARNOCKY, S.P.; SWENSON, C.L. Retroviral transmission in bone allotransplantation. The effects of tissue processing. **Clin. Orthop.**, v.324, p.275-82, 1996.
- O'MALLEY, B.W. Free Bone Grafts. **Baylor College of Medicine**, 1992.
- Disponível em: www.bcm.edu/oto/grand/81392.html
- Acesso em: 15/03/2007.
- OZAKI, W.; BUCHMAN, S. Volume maintenance of onlay bone grafts in the craniofacial skeleton: microarchitecture versus embryologic origin. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.102, p.291-9, 1998.
- OTTOLENGHI, C.E. Massive osteo and osteo-articular bone grafts: technique and results of 62 cases. **Clin. Orthop.**, v.87, p.156-64, 1972.
- PARK, H.K.; DUJOVNY, M.; AGNER, C.; DIAZ, F.G. Biomechanical properties of calvarium prosthesis. **Neurol. Res.**, v.23, p.267, 2001.
- PARRISH, F.F. Allograft replacement of part of the end of a long bone following excision of a tumor: report of twenty-one cases. **J. Bone Joint Surg.**, v.55, p.1-22, 1973.

PELKER, R.R.; FRIEDLAENDER, G.E.; MARKHAM, T.C.; PANJABI, M.M.;

MOE, C.J. Effects of freezing and freeze-drying on the biomechanical properties of rat bone. **J. Orthop. Res.**, v.1, p.405-11, 1984.

PRACHAPORN, S.; PATTAYAKORN, S.; FOOJAREONYOS, T.;

CHOTANAPHUTI, T. Bone incorporation and immunologic reaction to various types of bone graft substitutes. **The Thai Journal of Orthopaedic Surgery**, v.27, p.1-7, 2002.

RENGACHARY, S.S. Bone morphogenetic proteins: basic concepts.

Neurosurg. Focus, v. 13, p.1-6, 2002.

RIZZO, D.; DEL CARLO, R.J.; SILVA, A.S.A.; VILORIA, M.I.V.; SILVA,

P.S.A.; PAGANI, F.F. Matriz óssea homóloga desmineralizada associada à medula óssea autógena fresca na artrodese vertebral dorsolateral lombar em coelhos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.57, p.163-70, 2005.

ROSS, M.H.; ROMRELL, L.J. **Histologia: texto e atlas**. 2.ed. São Paulo, Panamericana, 1993. Cap.8, p.141-78: Osso.

RUST, P.A.; KALSI, P.; BRIGGS, T.W.R.; CANNON, S.R.; BLUNN, G.W.

Will mesenchymal stem cells differentiate into osteoblasts an allograft?

Clin. Orthop., v.457, p.220-6, 2007.

SALAMA, R.; WEISSMAN, S.L. The Clinical use of combined xenografts of bone and autologous red marrow. **J. Bone Joint Surg.**, v.60, n.1, p.111-5, 1978.

SAMPATH, T.K.; REDDI, A.H. Dissociative extraction and reconstitution of bone matrix components involved in local bone differentiation. **Proc.**

Natl. Acad. Sci. USA, v.78, p.7599-603, 1981.

SCHRATT, H.E.; REGEL, G.; LOBENHOFFER, P.; TSCHERNE, H.

Organisation of a bone and tissue banks after HIV and hepatitis C infections. **Unfallchirurg**, v.99, p.880-8, 1996.

SENN, N. On the healing of aseptic bone cavities by implantation of

antiseptic decalcified bone. **Am. J. Med. Sci.**, v.98, p.219-43, 1889 apud
RENGACHARY, W.W., 2002.

SHANG, Q.; WANG, Z.; LIU, W.; SHI, Y.; CUI, L.; CAO, Y. Tissue-

engineered bone repair of sheep cranial defects with autologous bone
marrow stromal cells. **J. Craniofac. Surg.**, v.12, p.586-93, 2001.

SHARMA, S.; GARG, N.K.; VELIATH, A.J.; SUBRAMANIAN, S.;

SRIVASTAVA, K.K. Percutaneous bone-marrow grafting of osteotomies
and bony defects in rabbits. **Acta Orthop. Scand.**, v.63, p.166-9, 1992.

SHARRARD, W.J.; COLLINS, D.H. The fate of human decalcified bone

grafts. **Proc. Roy. Soc. Med.**, v.54, p.1101-2, 1961.

SIMONDS, R.J.; HOLMBERG, S.D.; HURWITZ, R.L.; COLEMAN, T.R.;

BOTTENFIELD, S.; CONLEY, L.J.; KOHLENBERG, S.H.; CASTRO,
K.G.; DAHAN, B.A.; SCHABLE, C.A.; RAYFIELD, M.A.; ROGERS, M.F.

Transmission of human immunodeficiency virus type I from a
seronegative organ and tissue donor. **N. Engl. J. Med.**, v.326, p.726-32,
1992.

SMILER, D.; SOLTAN, M.; LEE, J.W. A histomorphogenic analysis of bone

grafts augmented with adult stem cells. **Implant Dentistry**, v.16, p.42-53,
2007.

STEVENSON, S. The immune response to osteochondral allografts in dogs.

J. Bone Joint Surg., v.69, p.573-82, 1987.

STEVENSON, S.; SHAFFER, J.W.; GOLDBERG, V.M. The humoral

response to vascular and nonvascular allografts of bone. **Clin. Orthop.**,
v.323, p.86-95, 1996.

STEVENSON, S.; LI, X.Q.; DAVY, D.T.; KLEIN, L.; GOLDBERG, V.M.

Critical biological determinants of incorporation of non-vascularized
cortical bone grafts. Quantification of a complex process and structure.

J. Bone Joint Surg., v.79, p.1-16, 1997.

STRONG, D.M. The US navy tissue bank: 50 years on the cutting edge.

Cell Tissue Bank., v.1, p.9-16, 2000.

TAGUCHI, Y.; PEREIRA, B.P.; KOUR, A.K.; PHO, R.W.H.; LEE, Y.S.

Autoclaved autograft bone combined with vascularized bone and bone
marrow. **Clin. Orthop.**, v.320, p.220-30, 1995.

TAKAGI, K.; URIST, M.R. The role of bone marrow in bone morphogenetic
protein-induced repair of femoral massive diaphyseal defects. **Clin.**

Orthop., v.171, p.224-31, 1982.

THORÉN, K.; ASPENBERG, P.; THORNGREN, K.G. Lipid extraction

decreases the specific immunologic response to bone allografts in rabbits.

Acta Orthop. Scand., v.64, p.44-6, 1993.

THORÉN, K.; ASPENBERG, P.; THORNGREN, K.G. Lipid extracted bank

bone. **Clin. Orthop.**, v.311, p.232-46, 1995.

TIEDEMAN, J.J.; CONNOLLY, J.F.; STRATES, B.S.; LIPPIELLO, L.

Treatment of nonunion by percutaneous injection of bone marrow and

demineralized bone matrix. An experimental study in dogs. **Clin.**

Orthop., v.268, p.294-302, 1991.

TOMFORD, W.W.; PLOETZ, J.E.; MANKIN, H.J. Bone allografts of femoral heads: procurement and storage. **J. Bone Joint Surg.**, v.68, p.534-7, 1986.

TOMFORD, W.W.; MANKIN, H.J. Bone banking. Update on methods and materials. **Orthop. Clin. North Am.**, v.30, p.565-70, 1999.

URIST, M.R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, v.150, p.893-9, 1965.

URIST, M.R.; SILVERMAN, B.F.; BURING, K.; DUBUC, F.L.; ROSENBERG, J.M. The bone induction principle. **Clin. Orthop.**, v. 53, p.243-83, 1967.

URIST, M.R.; HERNANDEZ, A. Excitation transfer in bone. Deleterious effects of cobalt 60 radiation-sterilization of bank bone. **Arch. Surg.**, v.109, p.486-93, 1974.

URIST, M.R.; HUO, Y.K.; BROWNELL, A.G.; HOHL, W.M.; BUYSKE, J.; LIETZE, A.; TEMPST, P.; HUNKAPILLER, M.; DELANGE, R.J.

Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v.81, p.371-5, 1984.

VARGEL, I.; TUNCBILEK, G.; MAVILI, E.; CILA, A.; RUACAN, S.; BENLI, K.; ERK, Y. Solvent-dehydrated calvarial allografts in craniofacial surgery. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.114, p.298-306, 2004.

WIENTROUB, S.; GOODWIN, D.; KHERMOSH, O.; SALAMA, R. The Clinical use of autologous marrow to improve osteogenic potential of bone grafts in pediatric orthopedics. **J. Pediatric Orthop.**, v.9, p.186-90, 1989.

WITTBGER, J.; PALMER, B.; ROHLIN, M.; THORNGREN, K.G.

Osteogenetic activity in composite grafts of demineralized compact bone and marrow. **Clin. Orthop.**, v.173, p.229-38, 1983.

ZINS, J.E.; KUSIAK, J.F.; WHITAKER, L.A.; ENLOW, D.H. The influence of the recipient site on bone grafts to the pace. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.73, p.371-81, 1984.

ZIPFEL, G.J.; GUIOT, B.H.; FESSLER, R.G. Bone Grafting. **Neurosurg. Focus**, v.14, p.1-8, 2003.

ZORICI, S.; BOBINAC, D.; LAH, B.; MARIC, I.; CVIJANOVIC, O.; BAJEK, S.; GOLUBOVIC, V.; MIHELIC, R. Study of Healing Process after transplantation of Pasteurized Bone Grafts in Rabbits. **Acta Med. Okayama**, v.56, p.121-8, 2002.