UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INTERUNIDADES BIOENGENHARIA

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**ENXERTO CÓRTICO-ESPONJOSO HOMÓGENO
PROCESSADO QUIMICAMENTE E ESTERILIZADO
EM ÓXIDO DE ETILENO, EM CÃES**

Análise mecânica e estudo da integração por meio de radiografias

VITOR APARECIDO CASTANIA

RIBEIRÃO PRETO

2002

ENXERTO CÓRTICO-ESPONJOSO HOMÓGENO
PROCESSADO QUIMICAMENTE E ESTERILIZADO
EM ÓXIDO DE ETILENO, EM CÃES

Análise mecânica e estudo da integração por meio de radiografias

Vitor Aparecido Castania

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia / Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Bioengenharia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. José B. Volpon

Ribeirão Preto
2002

FICHA CATALOGRÁFICA

Castania, Vitor Aparecido

Enxerto córtico-esponjoso homogêneo processado quimicamente e esterilizado em óxido de etileno, em cães - Análise mecânica e estudo da integração por meio de radiografias / Vitor Aparecido Castania. - São Carlos, 2002.

Dissertação (Mestrado) -- Interunidades Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo, 2002.

Área: Bioengenharia.

Orientador: Prof. Dr. José B. Volpon

1.Enxerto. 2.Óxido de etileno. 3.Integração óssea.
4.Cão. I.Título

"A vida é um banquete de oportunidades,
mas, é self-service"

Calunga

Àqueles "irmãos de pelos", filhos do mesmo criador, que na sua inocência cederam suas vidas em benefício da ciência, o meu respeito e carinho...

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José B. Volpon pela imensa colaboração, paciência, confiança e ensinamentos não só na realização deste trabalho, mas, também para exemplo de vida.

Ao Prof. Dr. José Baptista P. Paulin pela amizade e incentivo durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Antonio Carlos Shimano, pela dedicação, aconselhamentos e amizade durante todo o tempo.

Ao amigo de infância, Francisco Carlos Mazzocato, pela ajuda e sugestão do Laboratório de Bioengenharia como local de realização deste trabalho.

Ao amigo Marcos Massao Shimano, pela amizade, companheirismo, auxílio nas pesquisa e realização do trabalho e lições de informática.

Aos amigos *Adriano, Luis Carlos, Marcos Lara, Claudia, Elisabete, Eloísa, Rita, Adriana Clemente, Adriana Valadares, Adriana Gonçalves, Marinheiro, Cristiane Graminha, Patrícia Vieste, Carmem, Vanessa, Rosângela, Marcelo, Cristina Endo, Paulo de Tarso, Ana Rosa, Ana Regina, Edson, Kissiner, Ricardo, Ricardo Tribioli, Marangoni, Vera, Fernando e Djalma* pelo companheirismo e incentivo durante nossa convivência como pós-graduandos.

Aos funcionários do Laboratório de Bioengenharia, *Luiz Henrique, Engº Moro e Terezinha*, pela colaboração e amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Cirurgia Experimental e Técnica Cirúrgica do Departamento de Anatomia e Cirurgia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, *Sebastião, Wagner, Paulo, Carlos e Jorge Forjaz*, pelos serviços prestados na realização das radiografias e preparação histológica.

Aos funcionários do departamento de radiologia pela colaboração nas revelações das radiografias.

Aos funcionários do Biotério Central, *Antonio, João Sergio, Carlos Magno, Lourdes*, Méd.Vet. *Helder*, Méd. Vet. *Eduardo Laus* e *Rinaldo* pelo fornecimento dos animais para a experimentação.

Aos funcionários da Oficina de Precisão da Prefeitura do Campus da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em especial ao *Otávio, Osvaldo, Edimilson e Moacir*, pelos serviços prestados.

Às senhoras *Janete e Marielza*, secretárias do Departamento de Bioengenharia, da USP de São Carlos pelos favores prestados durante o período de mestrado.

A todas pessoas, que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Aos meus pais Victor João (in memorian)
e Paulina, pelo exemplo de vida e pelo
carinho, eu dedico este trabalho.

À minha esposa Fátima e às minhas
filhas Taís e Mayara, pelo carinho e por
compreender a minha ausência durante a
realização deste trabalho, eu ofereço.

SUMÁRIO¹

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE SÍMBOLOS.....	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	VI
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O osso	1
1.1.1 <i>Tipos de osso.....</i>	3
1.1.2 <i>Vascularização e inervação.....</i>	6
1.1.3 <i>Composição microscópica do osso.....</i>	7
1.2 Enxerto ósseo.....	9
1.2.1 <i>Classificação dos enxertos ósseos.....</i>	10
1.2.2 <i>Osteoindução .....</i>	12
1.2.3 <i>Osteocondução.....</i>	13
1.2.4 <i>Antigenicidade e rejeição nos enxertos homogêneos .....</i>	14
1.3 Considerações sobre ensaios mecânicos	15
1.3.1 <i>Tensão x Deformação .....</i>	15
1.3.2 <i>O osso e a Mecânica.....</i>	18
1.3.3 <i>Medidas in vitro.....</i>	19
1.4 Objetivo.....	21
2 MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1 Animal.....	22
2.2 Preparo dos corpos de prova para ensaio mecânico do osso processado e esterilizado em óxido de etileno e do osso preservado a -20°C	22
2.3 Preparo do enxerto ósseo homogêneo.....	23
2.4 Fase de ensaio	25
2.4.1 <i>Ensaio mecânico do osso processado e esterilizado em óxido de etileno e do osso preservado a -20°C.....</i>	25
2.4.2 <i>Ensaio clínico em cães .....</i>	27
2.4.3 <i>Avaliação radiográfica.....</i>	32
2.4.4 <i>Resumo da execução da parte experimental .....</i>	33
3 RESULTADOS.....	34
3.1 Corpos de prova	34
3.2 Resultados dos ensaios Mecânicos.....	35
3.2.1 <i>Tensão no limite elástico (σ_e).....</i>	36
3.2.2 <i>Deformação relativa no limite elástico (ϵ).....</i>	37
3.2.3 <i>Módulo de elasticidade (E).....</i>	38

---

¹ De acordo com as normas da ABNT

3.3	Achados radiográficos	39
3.3.1	<i>Enxertos autógenos</i>	39
3.3.2	<i>Enxerto homogêno</i>	41
4	DISCUSSÃO.....	43
4.1	O enxerto homogêno.....	43
4.2	A experimentação	46
4.2.1	<i>O modelo animal</i>	46
4.2.2	<i>Avaliação radiográfica</i>	48
4.2.3	<i>Dos ensaios mecânicos</i>	48
5	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Modelo teórico de um gráfico tensão $\times$ deformação.	17
FIGURA 2 – Amostras dos corpos de provas fresco (A) e processado (B).	23
FIGURA 3 – Trefinas usadas para obtenção do enxerto do osso doador e para criação do leito no osso receptor. A trefina de maior diâmetro permite obter um cilindro ósseo cujo diâmetro, é exatamente o daquele confeccionado com a trefina de menor diâmetro no osso receptor.	24
FIGURA 4 – Cilindro de enxerto córtico-esponjoso obtido da epífise femoral, embalado e esterilizado em óxido de etileno.	25
FIGURA 5 – Radiografia de 2 pares de corpos de prova (um par rejeitado e outro aceito para os ensaios). Pode-se observar que o par mostrado na parte superior da figura apresenta baixa densidade radiográfica.	26
FIGURA 6 – Detalhes da obtenção da medula óssea por aspiração. Puncionamento do osso ilíaco (A) com aspiração da medula que foi coletada em cuba onde foi colocado o enxerto processado, de modo que ele ficasse completamente embebido em medula óssea (B).	29
FIGURA 7 – Detalhes do procedimento cirúrgico para implante do enxerto córtico-esponjoso processado e esterilizado. Incisão da pele (A); incisão da cápsula articular e seu afastamento (B); perfuração do osso com a trefina de menor diâmetro acoplada ao perfurador elétrico (C); leito após a retirada do cilindro ósseo (D); colocação do enxerto previamente embebido em medula óssea autóloga (E); detalhe do enxerto já colocado no leito do osso receptor (F); detalhe da sutura de pele com fio de náilon (G).	30
FIGURA 8 - Radiografias de alguns pares de cilindros ósseos que foram usados como corpos de prova. Aumento de radiopacidade devido a presença de osso cortical (A); baixa densidade (B).	35
FIGURA 9 – Comparação entre as médias dos valores da tensão do limite elástico dos corpos de prova de ossos frescos e preservados.	36
FIGURA 10 – Comparação entre as médias dos valores da deformação relativa do limite elástico dos corpos de prova de ossos frescos e preservados.	37
FIGURA 11 – Comparação entre as médias dos valores do módulo de elasticidade dos corpos de prova de ossos frescos e preservados.	38
FIGURA 12 – Radiografia mostrando o local de implante e o enxerto delimitado por um contorno circular radiodenso.	39
FIGURA 13 – Radiografias do enxerto autógeno. Seis dias pós-implante pode se notar um discreto anel na interface enxerto-leito receptor provocado pela impactação do enxerto	

---

contra a parede do leito receptor (A); 21 dias pós-implante, pode notar um espessamento do anel (aumento da radiopacidade) e diminuição da área circular do enxerto em relação à área circular da radiografia anterior (B).....	40
FIGURA 14 – Radiografias do enxerto autólogo. Seis dias pós-implante (A); 42 dias pós-implante, houve uma diminuição do anel em torno do enxerto e o osso do leito receptor apresenta quase o mesmo padrão radiográfico em relação ao enxerto (B).	40
FIGURA 15 – Radiografias do enxerto homogêneo. 6 dias pós-implante. Notar que existe diferença entre o padrão radiográfico do osso do leito e do enxerto(A). Notar a persistência do anel entre o leito receptor e o enxerto, que se apresenta mais radiodenso, 21 dias após a cirurgia. Entretanto, ocorreu uma diminuição bastante discreta da área circular do enxerto em relação à radiografia anterior (B).	41
FIGURA 16 – Radiografias do enxerto homogêneo. 6 dias pós-implante,mostrando um anel radiodenso entre o enxerto e o leito receptor,ocasionado provavelmente pela impactação do enxerto contra o leito receptor (A); 42 dias pós-implante; nota-se o quase desaparecimento do enxerto (B), porém em relação ao enxerto autólogo ele ainda é mais evidente.	41

LISTA DE SÍMBOLOS

σ	-Tensão
F	-Força aplicada
A	-Área de seção transversal do corpo de prova
ϵ	-Deformação
ΔL	-Variação do comprimento do corpo de prova
L_0	-Comprimento inicial do corpo de prova
σ_e	-Tensão de escoamento
E	-Módulo de elasticidade ou de Young
Kgf	-Quilograma-força
mmHg	-Milímetros de mercúrio
MPa	-Mega Pascal
G	-Aceleração da gravidade

RESUMO

O principal propósito da enxertia óssea é estimular a osteogênese, mas é útil que o enxerto apresente outras propriedades tais como a resistência mecânica, possibilidade de estocagem e de ser usado em diferentes quantidades.

Nesta pesquisa nós estudamos algumas propriedades mecânicas e o desempenho biológico de uma amostra de enxerto ósseo homogêneo quimicamente processado e esterilizado em óxido de etileno.

Primeiramente, amostras cilíndricas de tal enxerto, foram ensaiadas mecanicamente em compressão. Em uma segunda instância, o enxerto foi implantado em cães adultos. Trinta animais foram divididos em dois grupos. No grupo I, dez cães receberam um bloco cilíndrico de osso homogêneo quimicamente preparado que foi implantado num leito cilíndrico confeccionado na epífise distal do fêmur direito. Três semanas após, o mesmo animal foi submetido à mesma cirurgia, desta vez no fêmur esquerdo. Seis semanas após a primeira operação, o cão foi sacrificado. O grupo II consistiu de vinte cães que receberam um enxerto autólogo cilíndrico que foi obtido do fêmur esquerdo e implantado no fêmur direito, da mesma forma que no grupo I. Dez animais (subgrupo A) foram sacrificados três semanas após o implante e dez animais (subgrupo B) foram sacrificados seis semanas após o implante. Os animais foram acompanhados clinicamente, e a integração do enxerto foi avaliada com raio-x obtidos seis dias após a operação e imediatamente após o sacrifício.

Nossos resultados mostraram que o osso tratado mostrou menores valores para a Tensão, Deformação, e Módulo de Elasticidade, no limite elástico, quando comparado com o osso fresco. Os estudos radiográficos mostraram boa integração do enxerto tratado, entretanto, com menor desempenho quando comparado com o enxerto autógeno.

O enxerto homogêneo processado quimicamente e esterilizado em óxido de etileno, pode ser usado, como alternativa para o enxerto autógeno, tanto na medicina veterinária, quanto na medicina humana.

Palavras chave: enxerto;óxido de etileno ; integração óssea; cão.

ABSTRACT

The main purpose of bone grafting is to stimulate osteogenesis but, sometimes, it is useful that the graft present other properties such as mechanical resistance, stocking, and possibility of being used in different amounts.

In this investigation we studied some mechanical properties and the biological performance of a kind of a homogenous graft chemically prepared and sterilized in ethylene oxide.

Previously, cylindrical samples of such graft were tested mechanically in compression. In a second instance, the graft was implanted in mature dogs. Thirty adults animals were divided into two groups. In group I, ten dogs received a cylindrical block of homogenous chemically prepared bone that was implanted in a cylindrical hollow created in distal epiphysis of the right femur. Three weeks later the same animal was operated on and the same operation was performed on the left femur. Six weeks after the first operation the dog was killed. The group II consisted of twenty dogs that received a cylindrical autologous graft that was harvested from the left femur and implanted in the right femur, as performed for group I. Ten animals (subgroup A) were killed tree weeks after the grafting operation and ten animals (subgroups B) were killed six weeks later. The animals were followed-up clinically and the graft integration was evaluated with x-ray taken six days after the operation and before the sacrifice.

Ours results showed that the treated bone displayed smaller values for the tension, deformation and modulus of elasticity at yielding point, when compared with the fresh bone. The radiographic studies showed good integration of the treated graft, although with less performance when compared with the autologous graft.

Homogenous graft, chemically prepared and sterilized in ethylene oxide, can be used as substitute to autologous graft both in veterinary and human medicine.

Key-words: graft; ethylene oxide; bone integration; dog

1 INTRODUÇÃO

1.1 O osso

O osso é considerado um tecido estrutural e também metabólico. No que concerne à sua função estrutural, pode-se incluir o fato do osso atuar como suporte, agindo como um rígido sistema de alavanca para a ação muscular, além de servir, também, como cobertura protetora para estruturas vitais, tais como coração, pulmões, cérebro e medula espinhal.

A função metabólica primária do osso diz respeito à sua capacidade de servir como depósito e promover a reciclagem principalmente do cálcio, que é necessário para a condução nervosa, contração muscular, formação do coágulo e secreção celular.

A partir da oitava semana do desenvolvimento embrionário o osso pode ser detectado no indivíduo da espécie humana. Seu desenvolvimento provém de dois caminhos; a formação óssea intramembranosa e a endocondral. A primeira acontece diretamente num arcabouço de tecido conjuntivo primitivo condensado, ou mesênquima, e é característico de ossos da abóbada craniana. Dentro da massa do mesênquima, algumas células diferenciadas em osteoblastos iniciam a produção e secreção de matriz orgânica de osso ou osteóide, que sofre calcificação originando o centro de ossificação. Desta maneira o osso continua sendo formado pelos osteoblastos, e continuamente diferenciado fora da massa de tecido conjuntivo primitivo ao redor do centro. Alguns destes osteoblastos tornam-se envolvidos por osteóides sendo, então, referidos como osteócitos. Logo o tecido conjuntivo primitivo torna-se invadido por vasos sangüíneos que dão suporte metabólico para as células ósseas e transporte de elementos formadores de sangue dentro da região do centro de ossificação.

Estes elementos sangüíneos passam a colonizar os espaços entre as espículas ósseas recém-formadas. Desta forma é estabelecida a relação entre a medula óssea e o osso.

A formação endocondral do osso se dá indiretamente sobre o mesênquima condensado via um modelo composto de cartilagem. Os ossos longos são exemplos clássicos onde ocorre este tipo de formação óssea. Durante a formação óssea endocondral, ao invés da diferenciação diretamente a partir dos osteoblastos, as células mesenquimais diferenciam-se a partir dos condroblastos que, ao se diferenciarem, passam a secretar a matriz característica de cartilagem, que será um modelo para o futuro osso longo. O modelo tem reconhecíveis expansões nas extremidades denominadas epífises e uma cobertura externa de células de tecido conjuntivo formando o pericôndrio. Na região central ou diáfise, as células do pericôndrio diferenciam-se em osteoblastos e começam a depositar um anel ósseo ao redor do feixe. As células cartilaginosas abaixo do anel degeneram-se assim como aquelas ao redor da matriz calcificada. Esta área é logo invadida por vasos sangüíneos que trazem elementos formadores de sangue, da mesma forma como acontece na formação óssea intramembranosa. O anel ósseo central na diáfise é conhecido como centro primário de ossificação. O próximo passo na formação endocondral do osso leva ao desenvolvimento do centro secundário de ossificação na epífise. As células cartilaginosas na epífise hipertrofiam-se, e a matriz circundante a ela se calcifica; os vasos sangüíneos outra vez a invadem, desta vez trazendo células percussoras de tecido ósseo, bem como células sangüíneas. Em cada extremidade óssea duas regiões de células cartilaginosas permanecem. Uma compreendida entre os centros de ossificação primário e secundário que origina a placa de crescimento e que perdura até quando o crescimento final é atingido. A segunda, encontrada na extremidade final de cada osso, origina a cartilagem articular cuja função é revestir a extremidade óssea e prover movimento articular durante a vida. Entre a epífise e a diáfise existe uma região de transição denominada metáfise que é o local de modelação óssea extensiva para manter a forma do osso durante o crescimento (BOUVIER, 1989).

1.1.1 Tipos de osso

As células ósseas produzem dois tipos de tecidos. Um altamente organizado e orientado conhecido como osso lamelar, e outro menos organizado, com orientação variada conhecido como osso entrelaçado (*woven bone*). O osso entrelaçado ou primário está associado a períodos de rápida formação tal como acontece nos casos de crescimento ativo ou nos casos de reparação de fraturas. Quando comparado ao lamelar, o osso entrelaçado tem menor quantidade de mineral e, geralmente, é substituído por tecido mais maduro, exceto em certos locais como os de implantação dentária e na sutura cranial. O osso lamelar é um tecido formado mais lentamente, que contém fina camada de osso com as fibras de colágeno orientadas em ângulos retos. Sobre a superfície externa ou periosteal do osso, numerosas camadas de osso lamelar são acumuladas, formando uma espessa placa cortical. Sobre a superfície interna ou endosteal do osso, geralmente, duas ou três camadas de osso lamelar estão presentes, em algum momento. O osso endosteal tende a ser formado como finas espículas ou trabéculas ósseas que se projetam em direção da cavidade medular. O osso endosteal pode, posteriormente, ser preenchido ou compactado com ósteon primário (BOUVIER, 1989).

A substância compacta difere em espessura em várias situações, na dependência das pressões e tensões a que o material está sujeito. Nos ossos longos ela é mais espessa na parte média da diáfise, tornando-se mais delgada nas extremidades. Nas extremidades a camada de substância compacta é muito delgada; sendo especialmente densa e lisa nas superfícies articulares. Nos pontos sujeitos à pressão e tração especiais, encontram-se espessamentos circunscritos.

O osso compacto é composto especialmente de uma substância intersticial calcificada, que é a matriz óssea, que é depositada em camadas denominadas lamelas.

Espalhadas por toda a substância intersticial do osso encontram-se cavidades especiais denominadas lacunas, que são ocupadas pelos osteócitos. De cada lacuna partem finas passagens tubulares que penetram na substância intersticial das lamelas, chamadas canalículos. Cada um deles acaba por se anastomosar com outros provenientes de lamelas adjacentes, formando um sistema contínuo de cavidades ou vias essenciais para a nutrição das células ósseas. Por outro lado, as células cartilagíneas são nutridas por intermédio da matriz hialina gelatinosa. A necessidade de canais vasculares para a nutrição do osso ocorre devido à grande deposição de sais de cálcio, o que reduz a permeabilidade do tecido. A maioria das lamelas de osso compacto é arranjada concentricamente em torno dos canais vasculares longitudinais que formam unidades cilíndricas, conhecidas como sistema de Havers ou osteônio. Seus diâmetros são variados, e são vistas como anéis concêntricos ao redor de uma abertura circular, no corte transversal.

Os canais vasculares dos ossos são orientados sempre em relação à estrutura lamelar do osso circundante. Os canais longitudinais no centro dos sistemas de Havers são chamados de canais haversianos ou nutritivos, apresentam um ou dois vasos sanguíneos e estão unidos a outros se comunicando com a cavidade medular e com a superfície via canais de Volkmann, que atravessam o osso em ângulo perpendicular às lamelas.

A substância esponjosa é formada por lâminas e espículas muito delicadas que partem em várias direções e se entrecruzam. Esta disposição está em consonância com a solicitação mecânica. Os intervalos entre as lâminas são preenchidos por medula óssea e são denominados espaços medulares.

A substância esponjosa forma a massa dos ossos curtos e das extremidades dos ossos longos, sendo que nos últimos ela não está restrita às extremidades, mas estende-se também, em distâncias variáveis ao longo da diáfise.

Nas aves, as substâncias compactas ao invés de conter osso esponjoso e medula óssea, contêm espaços aéreos, sendo, por isto, denominados ossos pneumáticos.

Os ossos da abóbada craniana são formados por uma camada externa de substância compacta, conhecida por lâmina externa e por uma camada interna de osso bastante denso denominado lâmina interna. Entre as duas lâminas encontra-se uma quantidade variável de osso esponjoso denominado díploe.

O perióstio é uma membrana que reveste a superfície externa do osso, exceto nos locais onde o osso está coberto pela cartilagem. O perióstio é uma lâmina de tecido conjuntivo especializado dotado de potencial osteogênico. A lâmina osteogênica é ativa durante o crescimento ativo, porém, torna-se reduzida quando cessa o crescimento. A aderência do perióstio ao osso difere intensamente de um local para outro no osso. Em locais onde ele é recoberto por massa muscular espessa com pouca ou nenhuma inserção, ele é delgado e facilmente destacável.

O endóstio é uma camada fina e fibrosa que limita a cavidade medular e os canais haversianos.

A medula óssea ocupa os interstícios dos ossos esponjosos e a cavidade medular dos ossos longos.

A medula óssea existe sob duas variáveis nos adultos; a vermelha e a amarela, sendo que nos indivíduos jovens existe somente a primeira que, terminado o crescimento, é substituída pela medula amarela. A medula vermelha apresenta muitos tipos celulares característicos e tem como peculiaridade o fato de ser um elemento formador de sangue, enquanto que a medula amarela é praticamente tecido adiposo comum. A medula óssea amarela é formada por trocas regressivas na medula óssea vermelha, incluindo infiltração gordurosa e degeneração das células características. Por isso é comum se encontrar formas de transição ou estágios no processo. Em indivíduos senis ou mal nutridos a medula óssea pode sofrer degeneração e formar a medula óssea gelatinosa (GETTY, 1981).

1.1.2 Vascularização e inervação

Os ossos são ricamente supridos por vasos sangüíneos. Basicamente dois grupos de artérias são responsáveis pela sua nutrição: as artérias periosteais e as medulares. As periosteais ramificam-se no perióstio, emitem inúmeros pequenos ramos, que penetram nos canais de Volkmann superficiais e, por fim, atingem os canais de Havers. Outros ramos penetram nas extremidades dos ossos longos para suprir o osso esponjoso e sua medula óssea. No caso dos ossos longos, a grande artéria medular ou nutrícia entra através do forâmen nutrício, atravessa toda a substância compacta e ramifica-se pela medula óssea. Pequenos ramos dos vasos periosteais irrigam também o osso compacto da diáfise. Os vasos metafisários e epifisários que se originam de artérias próximas de articulações, as artérias articulares, suprem os ossos esponjosos e a medula óssea das extremidades do osso.

Há evidências clínicas e experimentais que a corrente sangüínea faz-se do sistema arterial medular para os capilares da substância compacta, dali para os capilares do perióstio e às inserções musculares.(GETY, 1981)

As veias maiores do osso esponjoso, geralmente não acompanham as artérias, mas emergem principalmente próximo das superfícies articulares. Nos ossos elas são desprovidas de válvulas.(GETY, 1981)

Os vasos linfáticos apresentam-se como canais perivasculares no perióstio e nos canais de Havers da substância compacta e formam, também, uma delicada rede subperiosteal da qual encontram-se vasos maiores juntamente com algumas veias. Espaços linfáticos existem na periferia da medula óssea.

As fibras nervosas acompanham os vasos sangüíneos do osso. Algumas são vasomotoras, outras são sensitivas para o perióstio, que se torna sensível ao arrancamento e à tensão. Algumas terminações encapsuladas no perióstio são proprioceptivas e,

provavelmente, estão relacionadas com o posicionamento e sensibilidade muscular (GETTY, 1981).

1.1.3 Composição microscópica do osso

O osso é composto de células ao longo da matriz extracelular que possui duas fases, uma orgânica ou osteóide composta por colágeno e glicosaminoglicans e uma inorgânica ou mineral que consiste primariamente de cristais de fosfato de cálcio. As células do osso incluem os osteoblastos ou células formadoras de osso, osteoclastos ou células destruidoras de osso e os osteócitos, ou células de manutenção óssea. Os osteoblastos e os osteócitos originam-se dos fibroblastos, enquanto os osteoclastos originam-se de células sanguíneas precursoras, especificamente os monócitos ou fagócitos.(BOUVIER, 1989)

-Osteoblasto

Os osteoblastos são células tipicamente cuboidais, com núcleo arredondado e único, geralmente envolvido por retículo endoplasmático rugoso, que dá ao citoplasma uma pronunciada basofilia (afinidade pela hematoxilina) e está associado à produção de proteínas. Os osteoblastos têm, também, um proeminente aparelho de Golgi para armazenamento e transformação de proteínas para secreção. Estas células são encontradas como uma camada contínua sobre as superfícies ósseas, sofrendo deposição ativa. Histoquimicamente, os osteoblastos reagem fortemente para a fosfatase alcalina, uma enzima freqüentemente correlacionada com a mineralização.

-Osteoclasto

Os osteoclastos são células gigantes, multinucleadas com um aspecto ondulado, bordas membranosas ao longo da superfície óssea. Podem ter acima de 100µm de diâmetro e conter até cinquenta núcleos. As mitocôndrias são abundantes e o citoplasma pode exibir alguns vacúolos contendo partículas ósseas previamente fagocitadas. Histoquimicamente, os osteoclastos reagem fortemente para a fosfatase alcalina o que evidencia o seu alto conteúdo lisossomal.

-Osteócito

Os osteócitos são osteoblastos que se tornaram aprisionados pelo tecido osteóide, em pequenos espaços denominados lacunas. Tendem a ser células achatadas com poucas organelas celulares e um único núcleo contendo heterocromatina condensada. Entretanto, essas células mantêm uma extensiva rede de contato com as células adjacentes via canalículos que provêm um meio para a difusão metabólica e são necessárias para manter viáveis os osteócitos e o osso. O bloqueio desta rede canalicular pode resultar na morte celular. Os osteócitos, juntamente com os osteoblastos, provavelmente participam na regulação dos níveis de cálcio do plasma via troca iônica com os fluidos ósseos sob controle do hormônio da paratireóide (PTH).

-Fase orgânica

A fase orgânica ou osteóide é produzida e secretada pelos osteoblastos. Os osteóides compreendem aproximadamente 50% do volume ósseo (25% do peso) e contém 90% de colágeno (tipo 1) e 10% de substâncias amorfas (primariamente glicoproteínas e glicosaminoglicanos). O alto conteúdo de colágeno contido na fase orgânica permite ao osso apresentar resistência à tensão.

-Fase inorgânica

A fase inorgânica ou mineral constitui aproximadamente 50% do volume ósseo (75% do peso) e é composta por cristais de cálcio primariamente na forma de hidroxiapatita. Durante a formação, tanto o osteóide intramembranoso, quanto o endocondral, é secretado pelos osteoblastos acostumadamente ao redor das fibras de colágeno presente nos osteóides. Aproximadamente 70% dos osteóides tornam-se rapidamente calcificados após poucos dias, com calcificação máxima ocorrendo somente após vários meses. A fase mineral confere ao osso uma excelente resistência à força compressiva.

1.2 Enxerto ósseo

A evolução da cirurgia ortopédica tem possibilitado a preservação de membros amplamente afetados pela destruição óssea, mediante o uso de enxertos ósseos. Em suas formas e aplicações, estes enxertos representam um dos mais duradouros métodos de abordagem reconstrutivas do sistema músculo-esquelético, estando entre os mais comuns procedimentos de uso em ortopedia (FRIEDLAENDER, 1987). Problemas tais como falhas na consolidação óssea, doenças osteometabólicas, pseudoartroses, malformações congênitas e tumores ósseos requerem, muitas vezes, a enxertia óssea, vez que estas afecções podem resultar em falhas ou defeitos, por perda de substância ou fratura que não se consolida.

A chave para o sucesso do transplante ósseo envolve vários aspectos. Um deles relaciona-se com a vitalidade do tecido do leito receptor e ausência de necrose do enxerto.

Experiência clínica e experimental com enxertos no interior de leito irradiado e submetido à quimioterapia demonstraram a importância da qualidade e quantidade de células e dos vasos no sítio receptor para a incorporação do enxerto (FRIEDLAENDER, 1987).

PHEMISTER (1914) estudou a capacidade osteogênica dos constituintes ósseos transplantados e recomendou que se deve preservar viáveis as células e os meios de nutrição

dos enxertos. Após a obtenção e a implantação de um enxerto, é possível que elementos tais como o periósteo, endósteo, medula, diferentes osteócitos ou osteoblastos possam sobreviver. Assim, o enxerto ideal seria uma porção viva de um osso autógeno que mantém a função celular em seu novo sítio. Em 1977, TAYLOR et al. descreveram o primeiro enxerto ósseo microvascularizado bem sucedido, mostrando que, através do restabelecimento do suprimento sanguíneo, é possível transplantar grandes segmentos de osso cortical.

1.2.1 Classificação dos enxertos ósseos

Os enxertos ósseos podem ser classificados com base nos aspectos morfológicos e imunológicos. De acordo com o aspecto morfológico são nomeados: esponjoso, cortical ou córtico-esponjoso. O osso esponjoso apresenta finas trabéculas separadas por grandes espaços preenchidos por células hematopoiéticas, o que facilita a migração de vasos, células e deposição de tecido ósseo, porém não proporciona suporte mecânico significativo (WEIGEL, 1993). O enxerto de osso esponjoso é vascularizado mais rapidamente e de maneira mais completa que o de osso cortical, sendo que a substituição do tecido ósseo, inicialmente, envolve uma fase de formação óssea aposicional seguida pela fase de reabsorção, com substituição completa do material enxertado com o passar do tempo.

O enxerto ósseo cortical é obtido do córtex dos ossos longos. Apresenta uma microarquitetura bastante compacta, formada por lâminas justapostas, intensamente mineralizadas, dispostas concentricamente ao redor dos canais de Havers, que são túneis por onde arteríolas penetram para nutrir os osteócitos. Este enxerto permanece mesclado ao osso neoformado pelo hospedeiro por muito tempo. Isto pode ser explicado pelo fato do osso ser muito denso, não possibilitando a difusão de nutrientes e células, o que atrasa o processo de reabsorção (GOLDBERG & STEVENSON, 1987).

Imunologicamente, os enxertos ósseos dividem-se em: autógenos, homogêneos e xenógenos (ALEXANDER, 1987).

O enxerto autógeno, uma vez obtido, é transplantado de um sítio a outro no mesmo indivíduo, ou entre gêmeos idênticos o que não causa imuno-incompatibilidade, favorecendo os processos de revascularização e reparação (BLOOMBERG et al., 1984). Nestes casos, a fonte de osso reside no próprio indivíduo, e a obtenção do osso a ser enxertado implica em cirurgia adicional que aumenta o tempo operatório, expõe o paciente à dor, provoca maior perda sangüínea e apresenta possibilidade de contaminação local. Um outro fator que poderá tornar-se um problema é a quantidade requerida de osso para preencher falhas ósseas extensas (FRIEDLAENDER, 1983; DEFINO et al., 1998). Estes aspectos tornam-se mais críticos no paciente pediátrico.

O enxerto homogêneo envolve dois indivíduos da mesma espécie com códigos genéticos diferentes, sujeitos a respostas imunes diretamente relacionadas à diferença genética entre ambos (ALEXANDER, 1987; WEIGEL, 1993). Uma outra desvantagem dos enxertos homogêneos é o risco potencial de transmissão de doenças (FRIEDLAENDER, 1987).

O enxerto homogêneo apresenta ampla aplicação em situações em que se pretende preencher grandes falhas ósseas, visto a facilidade de ser obtido em vários tamanhos, sem a necessidade de dois ou mais procedimentos cirúrgicos (MANKIN et al., 1983).

O enxerto ósseo xenógeno é aquele proveniente de um indivíduo de espécie diferente daquela do receptor, portanto, sem compatibilidade genética (ALEXANDER, 1987).

Em termos de incorporação e de atividade osteogênica, o enxerto autólogo é superior aos demais (PARRISH, 1966). Atualmente, com o advento das técnicas de microcirurgia para anastomose vascular, surgiu o chamado enxerto autólogo pediculado, onde por meio da manutenção das conexões vasculares do segmento ósseo a ser transplantado e sua anastomose aos vasos do leito receptor, pode-se melhorar a nutrição do enxerto a ser

transplantado, o que favorece a sua aceitação junto ao leito receptor (BARBIERI & MAZER, 1984).

Deve-se, sempre que possível, preferir os enxertos autógenos aos alógenos, porém as vezes torna-se impossível a obtenção de ossos em quantidade suficiente para um dado procedimento, tornando-se necessário lançar mão de técnicas de processamento para a estocagem do osso em banco de ossos. A principal função do processamento do osso a ser estocado é aumentar a taxa de incorporação, segurança, garantia da esterilidade e facilitar o manuseio do material (THORÉN et al., 1995).

1.2.2 Osteoindução

A atividade osteoindutora de alguns enxertos ósseos pôde ser demonstrada pela primeira vez, quando em 1965, URIST implantando fragmentos de osso descalcificado na musculatura de animais evidenciou a neoformação óssea, após um período de quatro a seis semanas do implante.

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

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

Segundo URIST et al. (1967), logo após a primeira semana do implante de um fragmento ósseo, leucócitos polimorfonucleares, linfócitos e histiócitos distribuem-se ao redor do enxerto. A partir da segunda semana inicia-se uma neovascularização do enxerto,

sendo o mesmo invadido por células mesenquimais e evidencia-se uma grande proliferação de fibroblastos os quais originarão os condroblastos e os osteoblastos.

Muitos fatores podem influenciar a osteogênese. URIST & DOWELL (1968) demonstraram a influencia da granulometria e geometria das partículas do enxerto.

Segundo BROWN & CRUESS (1982), a conservação do osso pelo congelamento, liofilização e descalcificação não interfere na osteoindução.

O tratamento do osso com solução fraca de ácido clorídrico produz um aloenxerto livre de antígenos, que induz as proteínas da matriz óssea a estimular a incorporação e também a osteoindução.(URIST, 1965).

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

ARIZONO et al. (1994) acreditaram que uma concentração residual mínima de óxido de etileno possa aumentar a capacidade osteoindutiva, porém ASPENBERG et al. (1990) relataram um acentuado comprometimento da osteoindução.

1.2.3 Osteocondução

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

Os enxertos de osso esponjoso apresentam melhor capacidade osteogênica que o cortical. Em contrapartida, este último apresenta melhor resistência mecânica. Esta

propriedade pode ser útil quando o enxerto atua também como espaçador mecânico ou necessita ser fixado por placas e parafusos. Há uma forma híbrida desses dois tipos que é o enxerto córtico-esponjoso que apresenta associação das propriedades das duas modalidades anteriores.

Outra propriedade bastante útil dos enxertos ósseos é a possibilidade de serem estocados de modo a constituírem bancos de tecidos. Um método de preservação ideal é aquele que não requer equipamento especial, que possa ser mantido à temperatura ambiente e permita o livre transporte dos enxertos (VOLPON et al., 2000).

O enxerto córtico-esponjoso homogêneo preparado por limpeza, com retirada da gordura, desidratado, esterilizado pelo óxido de etileno e embalado individualmente, em tase, apresenta as propriedades atrás mencionadas e foi objeto de pesquisa neste estudo.

1.2.4 Antigenicidade e rejeição nos enxertos homogêneos

O fenômeno da rejeição aos enxertos homogêneos foi reconhecido há muitos anos. Entretanto nos anos 50, a participação do sistema imune foi confirmada (FRIEDLAENDER, 1983).

A resposta imune do organismo receptor é diferente conforme o tipo em que as células se apresentam. As células em suspensão desencadeiam uma resposta do tipo humoral, sendo que nos tecidos sólidos a resposta é predominantemente celular.

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

Pode-se avaliar a aceitação de um enxerto por um determinado receptor, mediante a qualidade e a quantidade do infiltrado celular. No entanto este não pode ser diferenciado daquele proveniente da reação inflamatória inespecífica.

1.3 Considerações sobre ensaios mecânicos

Os ensaios mecânicos têm a finalidade de determinar as propriedades mecânicas dos diversos tipos de materiais. Basicamente, há dois tipos de ensaios: destrutivos e não-destrutivos. Os primeiros promovem a ruptura ou inutilização do material. Nesta categoria estão incluídos os ensaios de tração, impacto, flexão, torção, fadiga, compressão e outros. Nos ensaios não-destrutivos estão as utilizações de raios-x, ultra-som, magnoflux, além de outros que podem determinar algumas propriedades físicas ou mecânicas (SOUZA, 1974).

O tipo de ensaio mecânico empregado depende em muito do tipo de material a ser utilizado, bem como da finalidade a que se destina, do tipo de esforços a que estará submetido e das propriedades mecânicas a serem medidas.

O tamanho e a quantidade de amostras a serem testadas são, sem dúvida, os dois fatores mais importantes quando se quer realizar um ensaio mecânico. A forma de retirar as amostras para o teste deve ser padronizada quanto à forma e ao tamanho e deve ser respeitada uma mesma região para a obtenção da amostra, de maneira a torná-la representativa.

1.3.1 Tensão x Deformação

A tensão é definida genericamente como a resistência interna de um corpo contra uma força externa sobre ele aplicada por unidade de área. Matematicamente:

$$\sigma = \frac{F}{A}$$

Onde:

σ = Tensão

F = Força aplicada

A = Área da seção transversal do corpo de prova

A deformação é representada como deformação relativa (ϵ). Ela é definida como a variação de uma dimensão qualquer desse corpo por unidade da mesma dimensão quando o corpo recebe um esforço. Assim:

$$\epsilon = \frac{\Delta L}{L_0}$$

Onde:

L_0 = é comprimento inicial do corpo de prova

ΔL = a variação do comprimento, ou seja, o quanto ele aumentou (no caso da tração) ou diminuiu (no caso da compressão), em relação ao seu comprimento inicial.

-Lei de Hooke

Do ensaio mecânico (tração, compressão, flexão e torção) de um corpo de prova, pode ser construído um gráfico tensão $\times$ deformação pelas medidas diretas da carga e da deformação (FIGURA 1).

FIGURA 1 – Modelo teórico de um gráfico tensão x deformação.

Pelo gráfico verifica-se que a fase linear (elástica) é representada pela equação:

$$E = \frac{B}{\sigma_e}$$

Essa equação corresponde a Lei de Hooke, sendo que a constante E é conhecida como módulo de elasticidade ou de Young.

A região AO na curva da figura 1 é denominada região de deformação elástica, e nota-se nela que existe uma proporcionalidade entre σ e ϵ . Nesta fase o material não sofre deformação permanente, retornando ao seu tamanho original após a retirada da carga. A região AC é conhecida como região plástica onde, após a retirada da carga, o material não recupera suas características originais e sofre uma deformação permanente.

Do gráfico podem ser extraídas algumas propriedades mecânicas do material, tais como a ductilidade, fragilidade e rigidez. Uma zona plástica mais extensa indica que o material é mais dúctil que o outro. Ele é mais frágil se uma pequena deformação plástica provocar a ruptura. O módulo de Young (E) é uma característica que fornece a rigidez do material e é inversamente proporcional à deformação ϵ . Em outras palavras, quanto maior o módulo, menor será a deformação elástica resultante da aplicação de uma carga, e mais rígido será o material.

1.3.2 O osso e a Mecânica

A Mecânica é uma ciência que trata dos efeitos das forças sobre os objetos, entre eles a mecânica da deformação do osso que por si só é um objeto deformável.

O osso como outros tantos objetos físicos obedecem às leis da Mecânica e entre elas a lei de Newton e a lei da elasticidade dos materiais sólidos descrito por Robert Hooke, em 1678.

As leis de Newton apóiam-se em três pontos básicos da mecânica clássica:

Um corpo permanece em repouso ou move-se em velocidade constante em linha reta, a menos que alguma força aja sobre ele. Isto é o que assegura um dos princípios da inércia.

O total das forças que agem sobre o corpo é igual ao produto da sua massa pela aceleração, onde a força e a aceleração são orientadas na mesma direção.

Se um corpo exerce uma força sobre um segundo corpo, este por sua vez passa a exercer uma força sobre o primeiro, que é de mesma intensidade e direção oposta ao primeiro. Esta é a lei de ação e reação.

A lei de Hooke estabelece que há uma relação linear entre a força e a deformação de um objeto sólido, dentro de certos limites e dependendo da natureza do material.

As leis de Newton e Hooke formam a base da mecânica dos objetos elásticos. O comportamento mecânico do osso em situações fisiológicas normais é similar ao comportamento mecânico de um objeto elástico.

1.3.3 Medidas in vitro

-Preservação do osso

As propriedades mecânicas *in vitro* do osso podem variar significativamente, das propriedades *in vivo*, dependendo de certas condições das quais podemos citar a idade, o frescor do material e o método pelo qual o tecido é conservado. As propriedades elásticas, densidade, conteúdo mineral do osso e resistência variam significativamente, sendo comuns mudanças na ordem de 10%.

Os ossos são compostos pela fase mineral, representada pela hidroxiapatita, pelo colágeno, e pela água. Algum tratamento que muda a natureza ou composição relativa destes componentes pode mudar as propriedades. O congelamento, a hidratação, estocagem em soluções com certa salinidade, e o embalsamamento, têm sido mostrado afetar as propriedades do osso (ASHMAN, 1989).

Para medir as propriedades acima mencionadas os seguintes métodos de estocagem são recomendados. O mais importante deles é manter osso umedecido com salina. As propriedades do tecido fresco podem variar em fração de minuto, se o osso se mantiver seco (ASHMAN, 1989).

Para períodos longos de estocagem, o osso úmido deve ser congelado. Se todos os músculos forem removidos antes do congelamento, o osso deverá ser envolvido em gaze embebida em salina e colocado em bolsas plásticas podendo, então, ser congelado a -20°C , dentro de uma hora após a excisão (ASHMAN, 1989).

Após a remoção do “freezer” o osso deve ser mantido úmido em salina durante todos os estágios futuros de preparação do tecido. Para períodos de tempo acima de três meses, pequenas amostras (menos que 10mm), podem ser preservadas em câmaras frias em uma solução a 50% de salina e álcool ou em salina biostática.

Alguns autores relataram que o osso embalsamado exibe diferentes valores de resistência e elasticidade quando comparados com o tecido fresco. Quando possível, o tecido deve ser testado no estado não embalsamado. Se embalsamado, o tecido deve ser tratado de maneira similar ao não embalsamado para prevenir a possibilidade de se tornar quebradiço devido a degradação da fase orgânica como resultado da desidratação ou desintegração (ASHMAN, 1989).

-Corte e usinagem do osso

Os cortes dos ossos podem ser feitos com serras em fitas, serras para metais, ou serra tipo “tico-tico”. Os cortes feitos com estas serras são muito grosseiros e difíceis de se manter úmido. O uso de serra de fita predispõe o osso à queimadura. Acredita-se que estes métodos de cortes grosseiros afetem uma área de somente um a dois milímetros para dentro do corte do osso. A área afetada pode ser lixada com uso de lixas d’água com granulações sucessivas e decrescentes. Cortes mais finos podem ser feitos com uso de uma serra tipo “tico-tico” ultrafino ou disco diamantado. Os discos diamantados são particularmente melhores por permitirem cortes paralelos. Para usinagem mais complexa pode-se fazer uso de uma fresa ou torno.

Durante todo o procedimento deve-se ficar atento para a irrigação das peças com solução salina para manter osso refrigerado (ASHMAN, 1989).

1.4 Objetivo

O objetivo geral deste trabalho, foi estudar o desempenho biológico do enxerto córtico-esponjoso processado e esterilizado em óxido de etileno, quando implantado em defeitos ósseos no fêmur distal do cão. Como objetivo específico o trabalho visou a avaliar as propriedades mecânicas do enxerto e também seu processo de integração por meios de radiografias.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi dividido em duas etapas. A primeira compreendeu o ensaio mecânico de blocos de ossos córtico-esponjoso tratado quimicamente, comparado com osso sem tratamento.

A segunda etapa envolveu o uso desses enxertos em cães, comparado com o enxerto autógeno.

2.1 Animal

Os animais utilizados no trabalho foram cães (*Canis familiaris*) adultos mestiços, com peso de 12 a 25 Kg, de ambos os sexos, procedentes do Biotério Central da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto – USP. Foram selecionados os animais de porte semelhante e em bom estado de saúde, com idade variando de um ano e meio até nove anos, e que foram alocados em dois grupos.

2.2 Preparo dos corpos de prova para ensaio mecânico do osso processado e esterilizado em óxido de etileno e do osso preservado a –20°C

Os corpos de prova, da mesma forma que os ossos destinados à enxertia, foram obtidos da porção medial da metáfise distal dos fêmures de cães doadores sacrificados pelo Biotério Central da Prefeitura do Campus de Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP

e no laboratório de Cirurgia Experimental e Técnica Cirúrgica do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Os blocos cilíndricos oriundos dos membros direitos foram processados segundo a mesma técnica de preparação dos enxertos. Aqueles obtidos dos membros esquerdos foram armazenados em “freezer” com temperatura média de -20°C . Os corpos de prova processados e esterilizados em óxido de etileno e os preservados em “freezer”, foram aparados no tamanho de 1cm de diâmetro por 1cm de comprimento no formato cilíndrico (FIGURA 2).

FIGURA 2 – Amostras dos corpos de provas fresco (A) e processado (B).

2.3 Preparo do enxerto ósseo homogêneo

Os enxertos ósseos homogêneos foram obtidos de cães doadores considerados saudáveis, sacrificados no Biotério Central da Prefeitura do Campus da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Destes animais foram retirados ambos os fêmures e estocados em “freezer” a -20°C . De cada fêmur foi retirado da metáfise distal, com o uso de uma trefina (FIGURA 3), um bloco ósseo cilíndrico de 1,0 cm de diâmetro por 1,0 cm de altura.

FIGURA 3 – Trefinas usadas para obtenção do enxerto do osso doador e para criação do leito no osso receptor. A trefina de maior diâmetro permite obter um cilindro ósseo cujo diâmetro, é exatamente o daquele confeccionado com a trefina de menor diâmetro no osso receptor.

Ambos os blocos foram processados como descrito por VOLPON & COSTA (2000).

Os resquícios de partes moles aderidas ao bloco ósseo foram removidos. Depois, foram aparados e padronizados nas dimensões de 1cm de diâmetro por 1cm de comprimento e fixados em álcool absoluto por dois dias, e, em seguida, mantidos em água oxigenada 40 volumes até o clareamento das peças. A gordura foi extraída com éter etílico, em trocas sucessivas, até o desengorduramento total dos ossos, o que foi conseguido quando não surgiam mais gotículas de gordura como sobrenadante. Em seguida, os ossos foram desidratados em álcool absoluto por 48 horas. Os blocos ósseos foram acondicionados individualmente e esterilizados em óxido de etileno, identificados segundo o número do animal doador e o lado e, desta forma estocados, estando preparados para serem implantados (FIGURA 4). A utilização do osso não excedeu seis meses do período de esterilização.

FIGURA 4 – Cilindro de enxerto córtico-esponjoso obtido da epífise femoral, embalado e esterilizado em óxido de etileno.

2.4 Fase de ensaio

2.4.1 Ensaio mecânico do osso processado e esterilizado em óxido de etileno e do osso preservado a -20°C

O tipo de ensaio mecânico utilizado foi o de compressão. Foram ensaiados ossos preservados a -20°C e os ossos processados quimicamente e esterilizados em óxido de etileno, como descrito.

Os ossos preservados pelo congelamento foram retirados 12 horas antes do ensaio e mantidos sob refrigeração a temperatura média de 0°C . No dia do teste foram retirados do refrigerador 1 hora antes, para entrarem em equilíbrio térmico com o meio.

Para o ensaio do osso processado, os corpos de prova foram hidratados em solução fisiológica duas horas antes.

Previamente, todos os blocos de enxertos (20 pares) foram colocados sobre um “chassis” radiográfico, tamanho 32 x 25cm e radiografados em exposição única. Na radiografia foram excluídas as peças muito radiotransparente e que destoavam em relação às demais (FIGURA 5).

FIGURA 5 – Radiografia de 2 pares de corpos de prova (um par rejeitado e outro aceito para os ensaios). Pode-se observar que o par mostrado na parte superior da figura apresenta baixa densidade radiográfica.

Os ensaios foram realizados em máquina universal de ensaios do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Foi utilizada uma célula de carga KRATOS® modelo KM com capacidade de medir até 200kgf, e as leituras foram realizadas com uma ponte de extensometria SODMEX® modelo CAE 201. As deformações foram medidas por um relógio comparador MITUTOYO® com precisão de 0,01 mm.

As propriedades mecânicas obtidas na fase elástica foram a tensão (σ_e) no limite elástico, a deformação relativa (ϵ) do limite elástico e o módulo de elasticidade (E), para ambos os tipos de corpos de prova, os frescos e os processados e esterilizados em óxido de etileno.

Para a análise estatística dos resultados foi utilizado o *Teste t de Student pareado*, com nível de significância de 5%

2.4.2 Ensaio clínico em cães

-Agrupamento

Os animais foram divididos de acordo com o tipo de enxerto que receberam.

GRUPO I – Enxerto homogêneo

Dez animais receberam um bloco cilíndrico de enxerto processado e esterilizado em óxido de etileno implantado na metáfise distal do fêmur direito. Três semanas após, os mesmos animais receberam o mesmo enxerto no fêmur esquerdo.

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

GRUPO II – Enxerto autógeno.

Vinte animais receberam, na metáfise distal do fêmur direito, um bloco ósseo retirado da metáfise distal do fêmur contra-lateral.

Em dez deles (Subgrupo II-A) o sacrifício ocorreu após três semanas e, nos dez restantes (Subgrupo II-B), após seis semanas. Só foi avaliado o lado receptor (fêmur direito).

Nos dois grupos as características gerais dos animais, técnica cirúrgica, pós-operatório e avaliação foram semelhantes.

-Procedimento pré-operatório para o implante dos enxertos ósseos

O procedimento pré-operatório foi o mesmo para os animais pertencentes aos dois grupos. Os animais foram mantidos em jejum hídrico e alimentar de 12 horas antes de serem submetidos à cirurgia.

Os cães foram pré-anestesiados com clorpromazina (Amplictil®) na dose de 1mg/kg de peso. O membro a ser operado foi submetido à tricotomia, que se estendeu desde a região da crista ilíaca, até o maléolo tibial. Após 10 minutos da aplicação do pré-anestésico foi feita

a anestesia com a injeção intravenosa de Tiopental® na dose de 15mg/kg de peso, dose suficiente para atos cirúrgicos de aproximadamente 1 hora de duração.

Na região tricotomizada foi feita a anti-sepsia com solução degermante à base de iodo povidona 10% e, depois, com álcool iodado 3%.

-Procedimento cirúrgico para o implante do enxerto ósseo

a) Grupo I (enxerto córtico-esponjoso homogêneo preservado)

Com o animal em decúbito lateral, através da palpação, foi delimitada a crista ilíaca onde foi introduzida uma agulha 40x16 provida de um mandril que foi retirado quando a extremidade da agulha atingia a medula, que fluía pela agulha. Foi adaptada então, uma seringa de 10ml, previamente umedecida com uma gota de EDTA para evitar a coagulação e aspirada a medula óssea (FIGURA 6A). Mais duas gotas de EDTA foram colocadas numa cuba, e o enxerto foi embebido pela medula óssea e mantido nela até o momento do implante (FIGURA 6B). Procedeu-se, então, à colocação dos campos cirúrgicos.

Os animais foram operados inicialmente no membro posterior direito. Uma incisão retilínea na pele de aproximadamente 5cm, sobre a porção distal e medial do fêmur direito, tendo como referência o epicôndilo medial, foi feita de maneira a expor a cápsula articular que foi incisada e afastada, juntamente com a patela. Com a trefina de menor diâmetro acoplada a um perfurador elétrico em baixa rotação, foi preparado o leito receptor, criando-se uma cavidade cilíndrica com 1 centímetro de profundidade, que correspondeu ao tamanho exato do enxerto a ser implantado. O enxerto foi colocado sob pressão no leito receptor sendo, posteriormente, realizada a sutura de aproximação das partes moles com categut 3-0 e a sutura da pele com fio de náilon 3-0 (FIGURA 7).

FIGURA 6 – Detalhes da obtenção da medula óssea por aspiração. Puncionamento do osso íliaco (A) com aspiração da medula que foi coletada em cuba onde foi colocado o enxerto processado, de modo que ele ficasse completamente embebido em medula óssea (B).

FIGURA 7 – Detalhes do procedimento cirúrgico para implante do enxerto córtico-esponjoso processado e esterilizado. Incisão da pele (A); incisão da cápsula articular e seu afastamento (B); perfuração do osso com a trefina de menor diâmetro acoplada ao perfurador elétrico (C); leito após a retirada do cilindro ósseo (D); colocação do enxerto previamente embebido em medula óssea autóloga (E); detalhe do enxerto já colocado no leito do osso receptor (F); detalhe da sutura de pele com fio de náilon (G).

Seis dias após a cirurgia, o joelho operado foi radiografado em perfil, com os raios X direcionados no sentido medial para lateral do fêmur.

Três semanas após a primeira cirurgia, os animais foram re-operados, desta vez no membro posterior esquerdo, seguindo os mesmos procedimentos empregados na primeira cirurgia, e também implantando o enxerto processado. Seis dias após a cirurgia, foram radiografados.

Os animais foram sacrificados seis semanas após a primeira cirurgia, e tiveram seus joelhos novamente radiografados. Assim, em um mesmo animal, foi possível avaliar, no lado direito, o enxerto implantado por seis semanas e, no lado esquerdo, o enxerto implantado por três semanas.

b) Grupo II (Enxerto Autógeno)

- Subgrupo A

Da mesma forma que o outro grupo, foi feita uma incisão na pele de aproximadamente cinco centímetros de extensão, porção distal do fêmur esquerdo, sobre o epicôndilo medial, de maneira a expor a cápsula articular que foi incisada e afastada juntamente com a patela. Com a trefina mais larga, acoplado a um perfurador elétrico, foi retirado um bloco ósseo em forma de cilindro, que foi reduzido à medida de um centímetro de diâmetro por um cm de altura, que foi mantido em solução fisiológica. A sutura da ferida cirúrgica no local da retirada do enxerto foi feita com catgut 3-0 para a aproximação e com náilon 3-0 para a sutura da pele.

Em seguida, na porção distal da outra coxa, sobre a região do epicôndilo medial, a pele foi incisada em 5 cm, depois a cápsula articular, que foi afastada juntamente com a patela.

Com a trefina de menor diâmetro acoplada ao perfurador elétrico, foi preparado o leito receptor. O enxerto retirado do fêmur contralateral foi colocado sob pressão no leito, procedendo-se, então, ao fechamento da incisão por planos.

Seis dias após a cirurgia o membro enxertado foi radiografado e também, logo após o sacrifício, como já descrito.

- Subgrupo B

Neste subgrupo os procedimentos cirúrgicos e de avaliação do enxerto autógeno foram os mesmo que os do *Subgrupo A*. A única diferença foi que o sacrifício ocorreu após seis semanas

2.4.3 Avaliação radiográfica

Para a avaliação radiográfica, foi utilizado um aparelho de raios-X modelo UNIMAX 2B da SIEMENS®.

Para o procedimento das radiografias os animais foram colocados em decúbito lateral com o membro a ser radiografado apoiado sobre a mesa. Alguns deles devido a agitação, foram sedados. Para isto foi utilizada a clorpromazina (Amplictil®), na dose de 1mg/kg de peso vivo.

A incidência dos raios-X foi no sentido medial para lateral. Não procedemos à incidência antero-posterior, porque em ensaios preliminares não obtivemos boa visualização das áreas dos enxertos.

Nas radiografias foram avaliados:

- 1- Posição do enxerto em relação ao osso receptor.
- 2- Interface enxerto-osso receptor.
- 3- Densidade e aspecto do trabeculado do enxerto.

2.4.4 Resumo da execução da parte experimental

Grupo I – Enxerto Homólogo

Grupo II-A – Enxerto Autólogo 21 dias

Grupo II-B – Enxerto Autólogo 42 dias

3 RESULTADOS

3.1 Corpos de prova

As radiografias dos cilindros ósseos que foram usados como corpos de prova apresentaram aspecto homogêneo na maioria deles, embora com variação quanto à densidade.

Em três blocos ósseos o trabeculado apresentava condensação e os pares destes enxertos foram descartados (FIGURA 8).

FIGURA 8 - Radiografias de alguns pares de cilindros ósseos que foram usados como corpos de prova. Aumento de radiopacidade devido a presença de osso cortical (A); baixa densidade (B).

3.2 Resultados dos ensaios Mecânicos

Os resultados analisados foram referentes aos valores obtidos nos ensaios de compressão de 20 pares de corpos de prova.

3.2.1 Tensão no limite elástico (σ_e)

O valor médio obtido para o osso fresco foi ($2,468 \pm 0,960$) MPa, sendo que para osso processado e esterilizado em óxido de etileno foi ($1,538 \pm 0,563$) MPa. Houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo dos enxertos frescos e os processados e esterilizado em óxido de etileno ($p \leq 0,001$) (FIGURA 9).

FIGURA 9 – Comparação entre as médias dos valores da tensão do limite elástico dos corpos de prova de ossos frescos e preservados.

3.2.2 Deformação relativa no limite elástico (ϵ)

A deformação relativa para o osso fresco foi $(0,037 \pm 0,016)$ MPa e para o osso processado e esterilizado em óxido de etileno foi $(0,029 \pm 0,008)$ MPa. Houve diferença estatisticamente significante entre ambos os grupos ($p=0,042$) (FIGURA 10).

FIGURA 10 – Comparação entre as médias dos valores da deformação relativa do limite elástico dos corpos de prova de ossos frescos e preservados.

3.2.3 Módulo de elasticidade (E)

O módulo de elasticidade foi $(85,627 \pm 36,681)$ MPa, para o grupo das amostras frescas e para as esterilizadas em óxido de etileno foi de $(63,089 \pm 20,323)$ MPa. Houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($p=0,023$) (FIGURA 11).

FIGURA 11 – Comparação entre as médias dos valores do módulo de elasticidade dos corpos de prova de ossos frescos e preservados.

3.3 Achados radiográficos

A radiografia na fase precoce do implante, em perfil, mostrou claramente o enxerto, representado por um círculo de contorno mais radiodenso que o osso vizinho, tanto para o osso autógeno, quanto para o osso homólogo. Este contorno radiodenso, provavelmente, foi originado pela compactação do trabeculado ósseo, ao se colocar o enxerto sobre pressão.

Com relação ao posicionamento do enxerto, ele estava localizado predominantemente na região epifisária (FIGURA 12). Em apenas três casos o enxerto tinha localização mais excêntrica. Em um caso do grupo autógeno, estava muito anterior e, em dois casos do grupo homólogo o enxerto estava localizado mais proximalmente, na região metafisária.

FIGURA 12 – Radiografia mostrando o local de implante e o enxerto delimitado por um contorno circular radiodenso.

3.3.1 Enxertos autógenos

A radiografia precoce mostrou que a área do enxerto tinha densidade e aspecto semelhante ao osso receptor vizinho.

Com 21 dias de implantação houve tendência para a diminuição da linha radiodensa na interface enxerto-leito receptor (FIGURAS 13A e 13B), sendo que, aos 42 dias, não havia mais separação nítida entre o osso implantado e o adjacente. No interior do enxerto, o aspecto foi se assemelhando ao osso receptor, indicando integração em todos os casos (FIGURAS 14A e 14B).

FIGURA 13 – Radiografias do enxerto autólogo. Seis dias pós-implante pode se notar um discreto anel na interface enxerto-leito receptor provocado pela impactação do enxerto contra a parede do leito receptor (A); 21 dias pós-implante, pode notar um espessamento do anel (aumento da radiopacidade) e diminuição da área circular do enxerto em relação à área circular da radiografia anterior (B).

FIGURA 14 – Radiografias do enxerto autólogo. Seis dias pós-implante (A); 42 dias pós-implante, houve uma diminuição do anel em torno do enxerto e o osso do leito receptor apresenta quase o mesmo padrão radiográfico em relação ao enxerto (B).

3.3.2 Enxerto homogêneo

Chamou a atenção, nesses enxertos, a persistência do círculo radiodenso na interface enxerto-leito receptor, presente aos 21 dias em todos os animais (FIGURA 15A e 15B) e, aos 42 dias, ainda presente em 6 casos (FIGURA 16A e 16B).

FIGURA 15 – Radiografias do enxerto homogêneo. 6 dias pós-implante. Notar que existe diferença entre o padrão radiográfico do osso do leito e do enxerto(A). Notar a persistência do anel entre o leito receptor e o enxerto, que se apresenta mais radiodenso, 21 dias após a cirurgia. Entretanto, ocorreu uma diminuição bastante discreta da área circular do enxerto em relação à radiografia anterior (B).

FIGURA 16 – Radiografias do enxerto homogêneo. 6 dias pós-implante, mostrando um anel radiodenso entre o enxerto e o leito receptor, ocasionado provavelmente pela impactação do enxerto contra o leito receptor (A); 42 dias pós-implante; nota-se o quase desaparecimento do enxerto (B), porém em relação ao enxerto autólogo ele ainda é mais evidente.

Em 1 caso, aos 21 dias, houve reabsorção óssea na periferia do enxerto e, em dois casos, aos 42 dias, houve reabsorção de todo o enxerto.

Nos demais animais, houve integração do enxerto, embora a área central fosse mais regular, quando comparado com os enxertos autógenos.

4 DISCUSSÃO

A enxertia óssea tem um importante papel no tratamento das pseudo-artroses, no atraso da cicatrização óssea, no preenchimento de cavidades ósseas e nos casos onde ocorre destruição óssea devido a traumas ou tumores, sendo que cada situação clínica requer um tipo de procedimento com o uso de um determinado tipo de enxerto. Um grande problema cirúrgico na enxertia óssea é a disponibilidade de um osso apropriado para o transplante (BROWN et al., 1982).

4.1 O enxerto homogêneo

O enxerto autólogo, devido a sua capacidade osteogênica, facilidade de incorporação e ausência de problemas imunológicos, é o preferido pelos cirurgiões ortopédicos (BUCHARDT, 1983), sendo indiscutível a superioridade da atividade biológica deste tipo de enxerto em relação ao enxerto homogêneo já que, segundo PURANEN (1966), o valor biológico de um transplante é baseado na sua capacidade osteogênica e na sua qualidade e rapidez de organização.

Entretanto, a obtenção do osso autólogo, implica em risco para o paciente, aumenta a morbidade pós-operatória e pode provocar um enfraquecimento do sitio doador (BROWN et al., 1982). Tendo isto em vista, é sempre útil que se tenha disponível, um enxerto para o pronto uso em pacientes, vez que o tempo cirúrgico gasto para a obtenção dos enxertos, aumenta a morbidade cirúrgica. Também, a quantidade de osso pretendida para um dado procedimento pode não ser suficiente, principalmente em se tratando de pacientes pediátricos.

Nosso trabalho não visou à buscar um substituto ideal para o enxerto autólogo, porém, fornecer uma opção a mais para os cirurgiões, que muitas vezes se deparam com situações, onde a obtenção do osso autólogo está dificultada.

Em Medicina Veterinária, são freqüentes, traumatismos que provocam grande destruição óssea, as fraturas que não cicatrizam e também cistos ósseos, que requerem o uso do enxerto ósseo córtico-esponjoso para preenchimento de falhas ósseas. A dificuldade de obtenção de osso autólogo do animal devido ao difícil acesso ao osso doador, tamanho, e também a morbidade provocada ao paciente no ato da colheita, sugere a utilização dos bancos de ossos.

Um outro fator que nos incentivou a pesquisar este tipo de enxerto foi a grande disponibilidade de ossos que existe dentro do ramo da veterinária, visto que muitos animais são vítimas de atropelamento, e por ocasião do óbito, são desprezados.

A preservação desse osso, com uma técnica fácil, relativamente barata, passível de ser realizada na rotina de esterilização de um hospital de pequeno, médio e grande porte, proporciona um material clinicamente eficiente, livre de fatores causadores de doenças, fácil de ser transportado e armazenado, dispensando, inclusive, a criopreservação, e que está pronto para ser usado em situações onde a falta do osso autólogo se fizer presente.

Baseado nisso é que propusemos o estudo do enxerto homogêneo córtico-esponjoso, obtido da metáfise distal de fêmures de cães, processado e esterilizado em óxido de etileno segundo a técnica proposta por VOLPON & DA COSTA (2000).

Esta técnica avalia basicamente a atividade osteocondutora do osso córtico-esponjoso, visto que, após a sua preparação todos os elementos osteogênicos, são eliminados por ocasião do processamento, restando somente a matriz mineral e o colágeno.

O papel da medula óssea como elemento fornecedor de células osteogênicas é bastante conhecido e referida em trabalhos de diversos autores, entre eles BURCHARDT (1983). Isto nos motivou a usar, concomitantemente com o osso implantado, medula óssea autógena.

O enxerto embebido na medula óssea tem a ele aderidas, células osteogênicas que são transferidas para o leito receptor no ato do implante. A medula autógena é um material livre de componentes imunogênicos, que estão presentes em grande quantidade na medula alogênica (BURCHARDT, 1983). Com este procedimento, o enxerto de osso córtico-esponjoso homogêneo processado e esterilizado em óxido de etileno, embora sendo osteocondutor teria, em tese, alguma atividade osteoindutora.

Neste trabalho, não procedemos ao implante do enxerto de osso córtico-esponjoso homogêneo sem o embebedimento prévio em medula, e, portanto, não pudemos avaliar o efeito da medula óssea na integração do enxerto. Tal procedimento não foi realizado pois supomos que o próprio leito receptor pudesse servir de fonte de medula óssea para o enxerto e com isso não nos forneceria um resultado real, no caso do implante do osso sem a medula óssea.

Em nosso estudo não nos preocupamos em verificar a eficiência da esterilização pelo óxido de etileno, vez que utilizamos um único parâmetro de esterilização e não procedemos ao controle bacteriológico pré e pós-esterilização. Entretanto, VOLPON & DA COSTA (2000), utilizaram este tipo de esterilização para enxertos humanos e não referiram qualquer caso de infecção.

Da mesma maneira, não foi possível avaliar a influência do óxido de etileno na incorporação e nas propriedades mecânicas do enxerto, porque não procedemos ao implante e ao ensaio mecânico do enxerto não esterilizado. ASPENBERG et al. (1990) relataram que existe uma relação dose dependente na redução das propriedades osteoindutivas induzida pelo óxido de etileno. MUNTING et al. (1988), relataram que o óxido de etileno destrói totalmente a propriedade osteoindutiva.

Da mesma forma que nos experimentos realizados por VOLPON & DA COSTA (2000), obtivemos uma boa incorporação dos enxertos homogêneos córtico-esponjoso, embora não tivéssemos usado grandes fragmentos em lesões extensas. Estes autores utilizaram ossos de doadores humanos selecionados segundo as normas da Associação Americana de Tecidos, com idade conhecida e em perfeito estado de saúde. Nós utilizamos

animais de diferente estado nutricional, gênero, idade, tamanho e constituição física. Isto pode ter influenciado a resistência mecânica do enxerto processado, e também do osso *in natura*. Aqueles autores encontraram, contrariamente ao nosso resultado, uma maior resistência para os enxertos preservados que para os osso *in natura*. Na literatura não encontramos trabalhos que nos relatassem a influência do óxido de etileno nas propriedades mecânicas do osso trabecular.

DOHERTY et al. (1993), trabalhando com osso desmineralizado, encontraram que, dependendo do tempo de exposição do osso ao óxido de etileno, pode ocorrer mudanças estruturais na superfície óssea.

TSHAMALA et al. (1999) relataram que o processamento e esterilização do enxerto podem mudar suas propriedades.

Não foi nossa intenção o estudo em separado do processo de preparação e esterilização dos enxertos e sim do conjunto preparação e esterilização, frente à integração e as propriedades mecânicas do enxerto ósseo córtico-esponjoso.

4.2 A experimentação

4.2.1 O modelo animal

O cão foi utilizado como animal de experimentação porque o tamanho do fêmur na porção distal permitiu que tivéssemos uma boa superfície para obtenção de enxerto e corpos de prova de osso esponjoso. Uma outra vantagem é a quantidade de animais de que dispusemos e o seu baixo custo de manutenção, visto que foram capturados pela Vigilância Sanitária da Prefeitura Municipal de municípios vizinhos a Ribeirão Preto e entregues ao Biotério Central da Prefeitura do Campus da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Algumas dificuldades surgiram, entretanto, entre elas, a não uniformidade dos animais, que se apresentavam com variação de tamanho, gênero, idade, peso, e até mesmo as condições orgânicas. Em muitos dos casos houve necessidade de um tratamento prévio do animal, visando à melhoria da sua saúde, antes que pudéssemos submetê-lo a experimentação. GARRAHAN et al. (1986) relataram a influência da idade e do gênero em alterações estruturais do osso trabecular, bem como as modificações no conteúdo de minerais.

A anatomia do fêmur do cão, mais propriamente da extremidade distal medial propiciou uma boa superfície para o local de implante do enxerto pois apresenta uma delgada camada muscular, ausência de nervos e vasos importantes, que tornaram fácil o acesso ao osso.

A incisão da cápsula articular, com seu ulterior afastamento, evidenciou o local onde foi confeccionado o leito receptor do enxerto. Após a exposição do local de implante, achamos de bom alvitre que o periósteo, fosse removido a fim de não interferir na reparação óssea de origem periosteal (VOLPON, 1985). Nossos resultados mostraram que, dessa forma foi possível selecionar o local do enxerto de maneira padronizada, na maioria dos animais.

A utilização da trefina facilitou a confecção do leito receptor, cujo formato cilíndrico permitiu o encaixe do enxerto de modo perfeito, dispensando o uso de placas, pinos ou outros dispositivos para sua fixação.

Uma dificuldade encontrada foi aquela relativa ao grupo dos animais que receberam o implante de enxertos autólogos. Para a colheita destes enxertos dos membros contralaterais, tornou-se relativamente difícil a retirada dos cilindros de osso dos sítios doadores, não sendo raras as fraturas dos enxertos no ato da sua retirada. Evitou-se também neste grupo, o uso de cães de pequeno porte, porque o uso da trefina de maior diâmetro nestes animais para retirada do enxerto provocava maior enfraquecimento do osso do membro doador, além de ser muito traumático para o animal. A impotência funcional do membro doador fez com que os animais apoiassem sobre o membro receptor.

4.2.2 Avaliação radiográfica

O exame radiográfico serviu para nos fornecer o posicionamento do implante, verificar a sua permanência neste local durante o período de experimentação e também verificar o trabeculado ao redor do enxerto. Em primeira instância, tentamos a incidência antero-posterior, além da látero-lateral, porém esta primeira posição não nos forneceu nenhum subsídio para análise. Não pudemos fazer uma avaliação muito precisa da incorporação do enxerto, porque o período de observação foi relativamente pequeno, e também porque não conseguimos um padrão radiográfico, que pudesse ser usado para todos os animais, em função da desigualdade de tamanho e espessura da musculatura do fêmur dos animais.

Entretanto foi possível verificar a integração avançada na maioria dos enxertos, embora o índice de insucesso tenha sido maior nos enxertos homólogos.

4.2.3 Dos ensaios mecânicos

Os métodos de preparação dos enxertos para serem armazenados em bancos de tecidos podem, além de comprometer o desempenho biológico, afetar também a resistência mecânica. A análise das propriedades mecânicas dos enxertos córtico-esponjosos é de muito importância, primeiro porque estes, uma vez implantados, são submetidos a esforços, principalmente de compressão, e depois porque, em se tratando de um implante, as propriedades mecânicas destes enxertos devem ser compatíveis com as do osso córtico-esponjoso de maneira a garantir a estabilidade do sistema.

Em nosso experimento utilizamos animais de ambos os gêneros, idades, condições nutricionais e tamanhos, variados. Estes fatores aliados às condições de anisotropia do osso acarretaram altos valores de desvio padrão obtidos para as propriedades mecânicas.

THORÉN et al. (1995) não encontraram diferença estatisticamente significativa nas propriedades mecânicas entre amostras de ossos congelados e desengordurados. Do mesmo modo que em nosso experimento, eles realizaram ensaio de compressão em corpos de provas com geometria cilíndrica, com a diferença de que foram obtidos de fêmures humanos. Nós optamos pela geometria cilíndrica em decorrência da facilidade de obtenção e padronização dos corpos de prova.

A extremidade distal do fêmur do cão, por apresentar pouca espessura, dificultou a retirada de cilindros de osso com tamanho superior a 1cm. Em decorrência disso, nossos corpos de prova foram padronizados na dimensão de 1cm de diâmetro por 1cm de altura.

A utilização de radiografias proporcionou uma seleção mais rápida dos corpos de prova, possibilitando descartar aqueles que apresentavam baixa densidade radiográfica. Este método foi utilizado uma vez que, em ensaios preliminares, pôde-se observar que os corpos de prova com baixa densidade radiográfica, quando ensaiados tinham suas propriedades mecânicas com valores muito afastados das médias daqueles com maior densidade radiográfica.

Para proceder ao desengorduramento dos enxertos e dos corpos de prova utilizamos como agente desengordurante o éter etílico, mediante trocas sucessivas e não sabemos do seu efeito sobre as propriedades mecânicas do enxerto.

TOWNSEND et al. (1995) afirmaram que a remoção da medula pelo desengorduramento químico tem efeito desidratante sobre o tecido trabecular, o que pode mudar as propriedades mecânicas do osso.

Os corpos de provas processados, antes de serem ensaiados, foram previamente embebidos em solução fisiológica por um período de duas horas. Não podemos afirmar ao

certo se este período poderia provocar um embebimento do colágeno e interferir nas propriedades mecânica dos enxertos.

LIND (1993) afirma que o osso trabecular sem medula deve ser hidratado antes do ensaio mecânico, porém não existe na literatura informações onde se relaciona o tempo de hidratação em função do tamanho da amostra.

5 CONCLUSÃO

Em nosso estudo observamos que o enxerto homogêneo processado e esterilizado em óxido de etileno apresentou boa atividade biológica, mediante a sua integração sendo, portanto, uma boa alternativa para o enxerto autógeno. Entretanto, o processamento do enxerto provocou diminuição nos parâmetros de algumas propriedades mecânicas, o que implica no uso cauteloso deste enxerto, principalmente em locais onde o implante recebe grandes esforços.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, J.W. (1987). Bone grafting. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, v. 17, p.811-819.
- ARIZONO, T., IWAMOTO, Y., OKUYAMA, K., SUGIOKA, Y. (1994). Ethilene oxide sterilization of bone grafts. Residual gas concentration and fibroblast toxicity. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, v.65(6), p.640-642.
- ASHMAN, R.B. (1989). *Experimental techinics*. In: Cowin, S.C., Bone Mechanics. Florida. CRC Press.
- ASPENBERG, P., JOHNSON, E., THORNGREN, K.-G. (1990). Dose-dependent reduction of bone inductive properties by ethylene oxide. *The Journal of Bone and Joint Surgery.(BR)*, v.72, p.1036-1037.
- BARBIERI, C.H., MAZER, N. (1984). Enxerto ósseo livre revascularizado: alternativa de tratamento da pseudoartrose congênita da tíbia. Relato de caso. *Revista. Brasileira de Ortopedia*, v.19, p.16.
- BLOOMBERG, M.S., CRING, R.L., BORN, F. (1984). Bone and cartilage transplantaion in ortopedic sugery. *Journal of the America Animal Hospital Association*, v.20, p.393-402.
- BOUVIER, M. (1989). *The biology and composition of bone*. In Cowin, S.C., Bone mechanics. Florida. CRC Press.
- BROWN, K.L.N.B., CRUESS, R.L. (1982). Bone and cartilage transplantaion in ortopedic surgery. *The Journal of Bone and Joint Surgery. (AM.)*, v.60, p.270-279.
- BUCHARDT, H. (1983). The biology of bone graft repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v.174, p.28-42.
- CHALMERS, J., GRAY, D.H., RUSH, J. (1975). Observation on the induction of bone in soft tissues. *The Journal of Bone and Joint Surgery. (BR)*, v.57, p. 36.
- DEFINO, H.L.A., DE CONTI, O., VELLUDO, MA.S.L. (1998). Estudo experimental da integração da hidroxiapatita. *Revista Brasileira de Ortopedia*, v.33, p.713-718.
- DOHERTY, M.J., MOLLAN, R.A.B., WILSON, D.J. (1993). Effect of ethylene oxide sterilization on human demineralized bone. *Biomaterials*, v.14 p.994-999.
- FRIEDLAENDER, G.E.(1983). Imune response to osteochondral allograft. *Clinical Orthopaedics and Related Reserch*, v.174, p.58-68.
- FRIEDLAENDER, G.E. (1987). Current concepts review: bone graft. *The Journal of Bone and Joint Surgery (AM)*, v.69, p.786-789.
- GARRAHAN, N.J., MELLISHR.W.E., COMPSTON, J.E. (1986). A new method for the two-dimensional analysis of bone structure in human iliac crest biopsies. *Journal of Microscopy*, v.142, p.341-349.
- GETTY, R. (1981). *Anatomia dos animais domésticos*.Rio de Janeiro, ed. Interamericana.

GOLDBERG, V.M., STEVESON, S. (1987). Natural history of autografts and allograft. *Clinical Orthopaedics and Related Reserch*, v.225, p.7-17.

LIND, F., SØRENSEN, H.C.F. (1983). The effect of different storage methods on the mechanical properties of trabecular bone. *Journal of Biomechanics*, v.26, p.1249-1252.

MANKIN, H.J., DOPPELTS, S., TOMFORD, W. (1983). Clinical experience with allograft implantation. The first ten yer. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v.174, p.69-86.

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

MUNTING, E., WILMART, F.F, WIJNE, A., HENNEBERT, P., DELLOYE, C. (1988). Effect of sterilization on osteoinduction. Comparison of five methods in demineralised rat bone. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, v.59, p.34-38.

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

PARRISH, F.F. (1966). Treatment of bone tumor by total excision and replacement with massive autologous and homologous grafts. *The Journal of Bone and Joint Surgery (AM)*, v.48, p.968.

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

PURANEM, J. (1966). Reorganization of fresh and preserved bone transplants. An experimental study in rabbits using tetracycline labelling. *Acta Orthopaedica Scandinavica(Suppl.)*, v.92.

SOUZA, S.A. (1974). Ensaio mecânicos de materiais metálicos. São Paulo, Ed. Edgar Blücher LTDA.

TAYLOR, G.I. (1977). Microvascular free bone transfer: A clinical technique. *Orthopaedic Clinics of North America*, v.8, p.425-447.

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

TOWNSEND, P.R., ROSE, R.M. (1995). Buckling studies of single human trabeculae. *Journal of Biomechanics*, v.8, p.199-201.

TSHAMALA, M., COX, E., DE COCK, H., GODDEERIS, B.M., MATTHEEUWS, D. (1999). Antigenicity of cortical bone allografts in dogs and effect of ethylene oxide-sterilization. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.69, p.47-59.

URIST, M.R. (1965). Bone: formation by autoinduction. *Science*, v.150, p.893-899.

URIST, M.R., DOWELL, T.A. (1968). Inductive substratum for osteogenesis in pellets of particulate bone matrix. *Clinical Orthopaedics and Related Reserch.*, v.61, p.61.

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

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

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

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