

JOÃO BATISTA DE MIRANDA

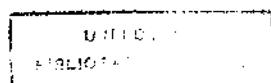
***REGENERAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO ESPONJOSO,
EM FÊMURES DE CÃES, COM AUTO-ENXERTO
FRAGMENTADO E ALOENXERTO FRAGMENTADO
E CONGELADO.***

*Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas, para a obtenção do título de
Doutor em Medicina.*

Orientador: Professor Doutor Ricardo Fonseca Ribeiro

CAMPINAS

1996



ERRATA

Onde constou:

1: ".....chegar....."(página 11)

Leia-se:

".....chegarem....."

2: ".....anteriores e posteriores....."(página 16)

Leia-se:

".....anterior e posterior....."

3: ".....osteoidução....." (página 37)

Leia-se:

".....osteoidução....."

4: "página 38: suprima-se a primeira linha.

5: ".....tanto implantadas, quanto neoformadas....."(página 42)

Leia-se:

".....tanto implantadas quanto neoformadas....."

6: ".....submete-los....."(página 68)

Leia-se:

".....submetê-los....."

7: ".....realizada....."(página 74)

Leia-se:

".....realizada....."

8: ".....É citada na literatura....."(página 77)

Leia-se:

".....É citado na literatura....."

9: ".....espontânea....."

Leia-se:

".....espontânea....."

10: ".....nas regeneração propiciadas por....."

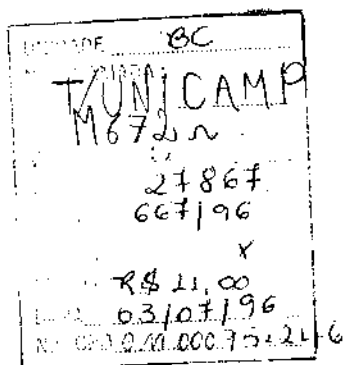
Leia-se:

"..... na regeneração propiciada por....."

(referente à tese de Doutorado do aluno João Batista de Miranda - Regeneração do tecido ósseo esponjoso, em fêmures de cão, com auto-enxerto fragmentado e aloenxerto fragmentado e congelado)

JOÃO BATISTA DE MIRANDA

30-4-96



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS - UNICAMP

Miranda, João Batista de

M673r Regeneração do tecido ósseo esponjoso em fêmures de cães com auto-enxerto fragmentado e aloxerto fragmentado e congelado / João Batista de Miranda. Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador: Ricardo Fonseca Ribeiro

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Osteogênese. 2. Regeneração óssea. 3. Transplante homólogo. I. Ricardo Fonseca Ribeiro. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da Tese de Doutorado

Orientador: Professor Doutor Ricardo Fonseca Ribeiro

Membros:

1. Prof. Dr. Claudio Henrique Bastiani - *Assente*
2. Prof. Dr. Hamilton da Rosa Lima - *Paulo*
3. Prof. Dr. William Dias Delange - *Will*
4. Prof.ª Dr.ª Elaine Maria Ingrid Amstutz - *Amstutz*
5. Prof. Dr. Ricardo Fonseca Ribeiro - *Ricardo*

Curso de Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 30 / 4 / 96

*Ao Professor Doutor Ricardo Fonseca Ribeiro,
agradeço a presença amigável em todos os momentos deste
trabalho, o interesse e o zelo postos na sua realização.*

Dedico esta tese:

À Ana Lúcia, Maria Isabel e Maria Beatriz pelo amor e carinho de todos os momentos.

A meus Pais, por tudo o que fizeram e têm feito por mim.

À minha irmã e meus irmãos, pela alegria e felicidade de tê-los a meu lado.

Ao Professor Doutor Ricardo Fonseca Ribeiro, pelo exemplo de vida, apoio e amizade demonstrados nestes anos de convívio e pela contribuição inestimável na elaboração desta tese.

Ao Professor Doutor Gottfried Köberle, Titular do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, pela acolhida no Departamento e constante estímulo à minha formação.

Ao Professor Doutor Adil Muhib Samara, Titular da Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, amigo e mestre.

Agradecimentos

- *Ao Professor Doutor William Dias Belangero, do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, pelo apoio sempre presente nos momentos necessários.*
- *Aos demais membros do Departamento de Ortopedia e Traumatologia, pelo companheirismo, apoio e estímulo.*
- *Ao Doutor Sebastião de Souza, patologista, pela leitura, discussão e comentários sobre os dados histológicos.*
- *Ao Professor Doutor Norair Salviano dos Reis, do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, pelos ensinamentos, orientação e discussão dos dados histológicos.*
- *À Professora Doutora Iara Maria Silva De Luca, do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, pela supervisão da avaliação histológica.*
- *Ao Professor Doutor José Eduardo Corrente, do Departamento de Matemática e Estatística da Escola Superior de Agronomia Luís de Queiroz da Universidade de São Paulo, pela execução da análise estatística e orientação na sua redação e apresentação.*
- *À Isabel Cristina Izatto, bióloga do Departamento de Ortopedia e Traumatologia, sem a qual a execução deste trabalho teria sido impossível.*
- *Aos funcionários de Nucleo de Medicina Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas Ana Cristina de Moraes, William Adalberto da Silva e Miguel Luís Cândido, pelo auxílio durante o experimento.*

- *Aos funcionários do setor de Patologia Experimental, Ismael Vêncio, Luzia Aparecida Magalhães Ribeiro Reis, Gisele Clotilde Ferreira Turini, pela confecção das lâminas.*
- *À Margarida Alves de Souza, funcionária do setor de Mamografia do Centro de Atendimento Integral à Saúde da Mulher, pela paciência, carinho e dedicação na realização do estudo radiológico das peças anatômicas.*
- *À Seção de Apoio Didático, em especial à Renata Maia, Jefferson Spindola e Marcos Bueno, na edição desta tese.*

ÍNDICE

	pag.
RESUMO.....	i
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Objetivos.....	07
2. TERMINOLOGIA.....	08
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1. Material do experimento e técnica cirúrgica.....	11
3.2. Preparo histológico.....	15
3.3. Obtenção do auto-enxerto.....	18
3.4. Obtenção e estocagem do aloenxerto.....	18
3.5. Estudo radiológico.....	19
3.6. Estudo histológico.....	19
3.6.1. Descritivo.....	19
3.6.2. Quantitativo.....	20
3.7. Métodos estatísticos.....	23
4. RESULTADOS.....	24
4.1. Complicações cirúrgicas.....	25
4.2. Resultados radiológicos.....	25
4.3. Resultados histológicos.....	29
4.3.1. Descritivos.....	29
4.3.1.1. Tíbias.....	29

4.3.1.2. Fêmur com auto-enxerto.....	37
4.3.1.3. Fêmur com aloenxerto.....	48
4.3.2. Quantitativos.....	63
4.4. Resultados da análise estatística.....	68
5. DISCUSSÃO.....	70
5.1. Discussão do modelo experimental.....	71
5.2. Discussão do animal de experimentação.....	72
5.3. Discussão dos métodos de avaliação.....	73
5.4. Discussão dos resultados radiológicos.....	73
5.5. Discussão dos resultados histológicos.....	74
5.6. Discussão dos resultados estatísticos.....	78
6. CONCLUSÕES.....	79
7. SUMMARY.....	81
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

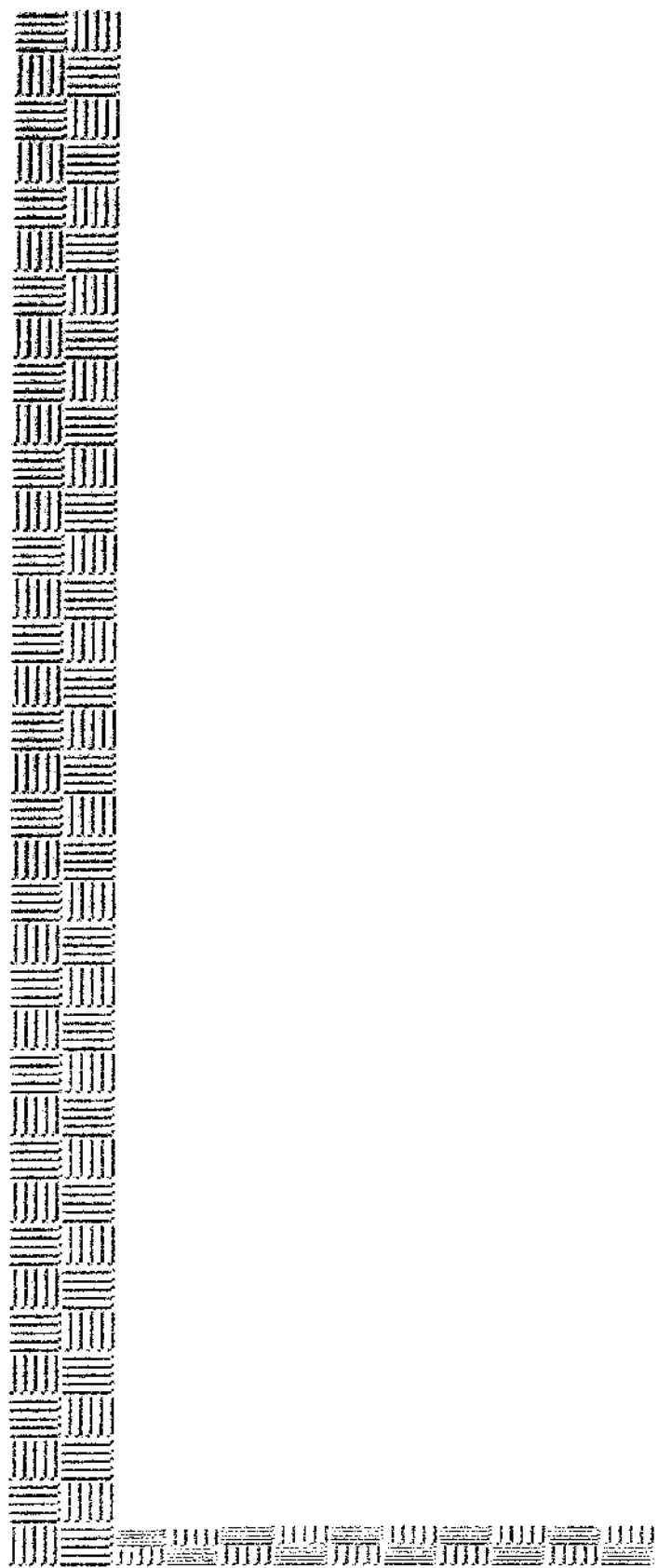
Lista de Quadros, Figuras e Tabelas

	Pág.
Quadro I - IDENTIFICAÇÃO DOS CÃES NOS 5 GRUPOS.....	11
Figura 1: Cão na mesa cirúrgica e esquema das incisões utilizadas.....	13
Figura 2: - Cortes transversais, perpendiculares ao longo eixo do osso.....	16
Figura 3: - Cortes paralelos ao longo eixo da perfuração, que retiraram as corticais anteriores e posteriores.....	16
Figura 4: - Corte perpendicular à perfuração, que retirou a cortical lateral.....	16
Figura 5: - Bloco com cortical medial intacta.....	16
Figura 6: - Cortes perpendiculares à perfuração, que dividiram o bloco em 3 fragmentos.....	16
Figura 7: Grade de Gahn.....	20
Figura 8: Sequência dos Campos examinados.....	21
TABELA 1:- Resultado da análise morfométrica do cão 77 (grupo 5).....	63
TABELA 2:- Resultados da análise morfométrica do cão 120 (grupo 5).....	64
TABELA 3:- Resultados da análise morfométrica do cão 100 (grupo 5).....	65
TABELA 4:- Resultados da análise morfométrica do cão 33 (grupo 5).....	66
TABELA 5:- Resultados da análise morfométrica do cão 5 (grupo 5).....	67
TABELA 6 - Valores das frações de volume ocupado pelas trabéculas ósseas na décima segunda semana (grupo 5).....	68
Quadro II - ANÁLISE DA VARIAÇÃO DA VARIÁVEL TRANSFORMADA.....	69
Quadro III - TESTE DE TUKEY.....	69



Resumo

Estudou-se, do ponto de vista histológico, em 25 cães machos, adultos, a regeneração óssea que ocorreu na metáfise distal dos fêmures quando se produz um orifício nesta região e o mesmo é preenchido com auto-enxerto fragmentado ou aloenxerto fragmentado e congelado. Como controle, usou-se perfuração semelhante na metáfise proximal das tíbias, sem uso de enxerto. Realizou-se este estudo na segunda, quarta, sexta, oitava e décima segunda semanas de pós-operatório. Verificou-se que a regeneração com os dois tipos de enxertos foi muito semelhante, porém ocorreu em ritmos diferentes e mais rápida com auto-enxerto. O padrão de regeneração óssea com uso de enxertos foi de melhor qualidade do que a ocorrida espontaneamente.



1. Introdução

A evolução histórica do transplante ósseo data de pouco mais de um século. Entretanto, já em 1668 houve o relato isolado de um enxerto bem sucedido realizado por *JOB van MEEKEREN, que reparou o defeito da calota craniana de um soldado russo com osso de crânio de cão. Nos dois séculos seguintes, não se encontrou uma só referência sobre tal forma de tratamento.

Somente na segunda metade do século XIX é que os estudos sobre enxertias ósseas foram retomados com bases científicas mais sólidas. **OLLIER (1867), em seu livro “Tratado da Regeneração dos Ossos” formulou os primeiros princípios científicos experimentais da enxertia óssea. Usando auto-enxertos concluiu que, ao ser transplantado, o osso sofre necrose; entretanto, o perióstio permanece viável e mantém a atividade osteogênica.

Em 1881, ***MACEWEN conseguiu reconstruir o úmero de uma criança, substituindo-o por outro de cadáver. ****BARTH (1883,1884) e *****MARCHAND (1899,1901) também observaram que o osso do auto-enxerto, ao ser transplantado, necrosa e é invadido por células da área receptora que têm potencial osteogênico. São estas que passam a produzir novo osso sobre o enxerto necrótico. Desta forma, estes autores demonstraram que osso de uma parte do corpo pode substituir o de outra com sucesso. A partir dos relatos de *****AXHAUSEN (1907), *****PHEMISTER (1914) e LEXER (1907, 1925), a técnica de enxertia óssea foi reconhecida como racional e viável.

*JOB van MEEKEREN apud MULLIKEN, KABAN, GLOWACKI, (1984); MARX & KLINE, (1983); LANE & SHANDU (1987).

**OLLIER (1867) apud SCHWEIBERER, STÜTZLE, MANDELKOW

***MACEWEN, apud MARX & KLINE, (1983)

****BARTH (1883,1884) apud CHASE & HERDON (1955); SCHWEIBERER et al. (1989)

*****MARCHAND (1899,1901) apud CHASE & HERDON (1955); SCHWEIBERER et al. (1989)

*****AXHAUSEN (1907) apud CHASE & HERDON, (1955), MARX & KLINE, (1983)

*****PHEMISTER (1914) apud MULLIKEN et al. (1984); MARX & KLINE, 1983.

AXHAUSEN e PHEMISTER descreveram como ocorre a incorporação do enxerto pelo receptor e LEXER (1907, 1925) publicou seus primeiros casos de implantes ósseos e relatou que, após 20 anos de seguimento, metade dos pacientes que receberam aloenxerto não tiveram sinais de rejeição e os enxertos haviam se integrado totalmente.

No Brasil, em 1912, JORGE GOUVEA, na cidade do Rio de Janeiro, realizou o que deve ter sido o primeiro implante ósseo no país; substituiu a extremidade distal do rádio, comprometida por um tumor, pela extremidade proximal do perônio.

Posteriormente, ao final dos anos quarenta, BUSH & GARBER (1948) e WILSON (1947) descreveram as técnicas de estocagem de osso em congelador. A demonstração do comportamento e da eficácia clínica dos aloenxertos assim preservados (WILSON, 1947; HENRY, 1948; CHASE & HERDON, 1955; TURNER, BASSET, SAWAYER, 1955; HEIPLE, CHASE , HERDON, 1963) reacendeu o interesse por esta conduta, que passou a ser usada rotineiramente em alguns países (VOLKOV, 1970; OTTOLENGHI, 1972; PARRISH, 1973)

Atualmente, dentre os tecidos humanos transplantados, somente as transfusões sanguíneas superam as enxertias ósseas. Estima-se que, nos Estados Unidos da América do Norte, sejam realizadas de 100.000 a 200.000 cirurgias de enxertos ósseos por ano (LANE & SANDHU, 1987), com diferentes finalidades: preencher as falhas ósseas causadas por trauma ou ressecções de tumores, estimular a consolidação de fraturas, tratar pseudo-artroses, estimular a consolidação nas artrodeses e reconstruir a anatomia e a massa óssea nas revisões de endopróteses (PALMER, 1948; MANKIN et al. 1982; BORJA & MNAYMNEH, 1985; DICK, MALININ, MNAYMNEH, 1985; GROSS et al. 1985; MAKLEY, 1985; MALININ, MARTINEZ, BROWN, 1985; MNAYMNEH et al. 1985; URBANIACK & BLACK, 1985; LANGLAIS & VIELPEAU, 1989; LING et al. 1993).

Dentre os enxertos utilizados, o auto-enxerto é o mais tolerado. Há, entretanto, limitações ao seu uso, pois sua disponibilidade é limitada, tanto em relação à quantidade quanto à forma (BURCHARDT, 1987; GOLDBERG & STEVENSON, 1987; LANE &

SHANDU, 1987). Além do mais, para sua obtenção, há custos e riscos adicionais. Dentre estes, destacam-se: aumento da morbidade, necessidade de outra incisão cirúrgica e, obviamente, maior tempo de anestesia e maior risco de infecção. A área doadora sofre enfraquecimento e, dependendo de sua localização, poderá fraturar-se. Por estes motivos, por produzirem resultados comparáveis aos auto-enxertos e terem disponibilidade ilimitada, os aloenxertos tendem a ser mais usados (DOPPELT et al. 1981; MANKIN, 1983; MANKIN et al. 1982; MANKIN & FRIEDLANDER, 1983; BURCHARDT, 1987; MAKLEY, 1985; MALININ et al. 1985). Nas reparações ósseas extensas podem substituir grandes segmentos ósseos e até hemiarticulações (PARRISH, 1973; MURRAY, 1983; MAKLEY, 1985; MNAYMNEH et al. 1985; URBANIAK, 1985; LANGLAIS & VIELPEAU, 1993).

A análise dos resultados clínicos de enxertias ósseas mostra 25% de complicações, tais como: infecção, a não união do enxerto com o osso receptor, fratura do enxerto por fadiga e, ocasionalmente, reabsorção do osso transplantado (GOLDBERG & STEVENSON, 1987; MANKIN, 1983; MURRAY, 1983; BURCHARDT, 1987).

Estas complicações estão relacionadas a vários fatores: técnicas de preservação óssea (TURNER et al. 1955; TOMFORD, 1983; TOMFORD, DOPPELT, MANKIN, 1983), imunogenicidade do osso transplantado (CURTISS & WILSON, 1953; BONFIGLIO, JETER, SMITH, 1955; CURTISS & HERDON, 1955; BROOKS, et al. 1963; BOS et al. 1983; MANKIN, 1983; MANKIN, FRIEDLANDER, LANGER, 1983; CZITRON, AXELROD, FERNANDEZ, 1985;), revascularização inadequada do enxerto e diminuição da deposição mineral no osso transplantado (MANKIN, 1983; KANDEL et al. 1985). Por ser inaceitável este índice de complicações, várias pesquisas têm sido realizadas, na tentativa de se obter uma melhor compreensão da resposta biológica do organismo aos auto-enxertos e aloenxertos (CHASE & HERDON, 1955; HEIPLE et al. 1963; ENNEKING et al. 1975; BOS et al. 1983; MANKIN et al. 1983; POWELL et al. 1983; CZITRON et al. 1985; SHAFFER et al. 1985; HEIPLE et al. 1987; LANE & SHANDU, 1987; GRECO et al. 1989). O conhecimento mais preciso deste processo é fundamental para que se possam realizar enxertias ósseas com maior margem de sucesso.

As teorias de incorporação dos enxertos ósseos também remontam ao século passado. Como já foi referido, Ollier (1867) investigou as propriedades do auto-enxerto e discutiu seu papel na produção de osso novo sem, entretanto, diferenciar osso esponjoso e cortical. Concluiu que o perióstio transplantado permanece viável e contribui para a neoformação óssea. BARTH (1883,1884) e MARCHAND (1899,1901) sugeriram que o tecido transplantado morre e que as células do receptor adjacentes ao enxerto é que produzem o osso novo. O transplante forneceria somente a estrutura sobre a qual é reconstruído o tecido ósseo.

No início deste século, estes conceitos foram revistos por AXHAUSEN (1907). Segundo suas observações, o osso transplantado morre, mas o perióstio permanece viável.

A sequência dos eventos biológicos nos implantes de auto-enxerto e aloenxerto apesar de ter sido muito estudada, continua obscura (HEIPLE et al. 1963; ENNEKING et al. 1975; BURCHARDT & ENNEKING, 1978; SCHACHAR et al. 1983; MARX et al. 1984; PROLO & RODRIGO, 1985; KANDEL et al. 1985; BURCHARDT, 1987; GOLDBERG & STEVENSON, 1987; HEIPLE et al. 1987; SPRINGFIELD, 1987; SCHWEIBERER et al. 1989).

Ainda hoje, atribui-se a AXHAUSEN o entendimento básico do processo de regeneração óssea após enxertia. Segundo ele, esta ocorre em duas fases: a primeira dura dias ou semanas e deve-se à atividade dos osteoclastos e osteoblastos presentes no osso transplantado. No caso do auto-enxerto a regeneração ocorre de forma mais rápida e mais intensa. Com aloenxerto, como há diminuição do número de osteoclastos e osteoblastos presentes no enxerto, devido à degradação celular secundária à reação imunológica, esta regeneração é menos intensa. Na segunda fase, há, predominantemente, degradação da matriz óssea transplantada, realizada por células de corpo estranho e macrófagos do receptor. No aloenxerto, apesar da destruição das células transplantadas, ainda ocorre osteogênese. Células mesenquimais pluripotenciais do receptor migram para o enxerto e se diferenciam em osteoblastos, enquanto células hematopoiéticas se diferenciam em osteoclastos e, ambas, passam a produzir o osso novo. A diferenciação das células

mesenquimais e hematopoiéticas deve-se à ação catalisadora do enxerto. Essa fase é chamada indutiva e dura semanas ou meses, dependendo dos fatores físicos e bioquímicos que atuem na região.

URIST e colaboradores (1965, 1974, 1975, 1983) observaram que certas proteínas ou derivados protéicos também estimulam estas transformações celulares e, conseqüentemente, os processos de indução óssea.

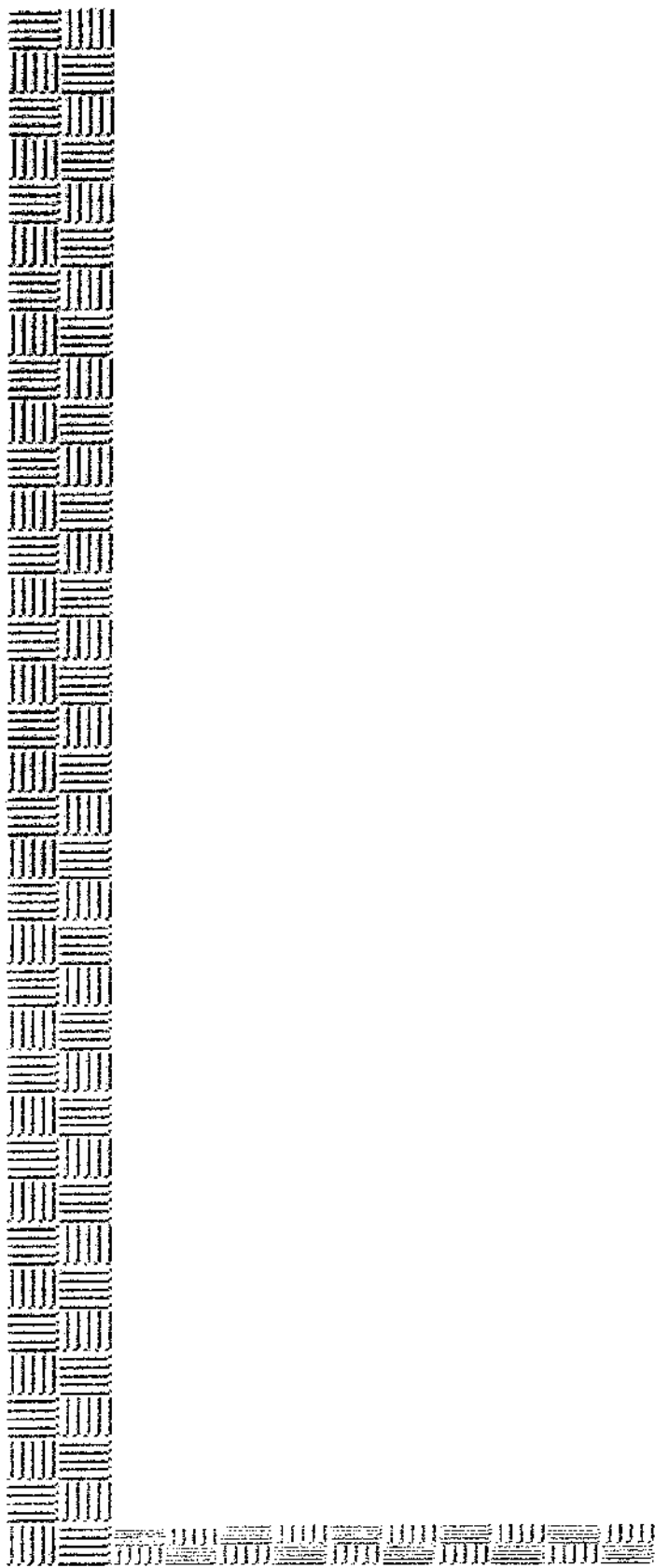
As pesquisas sobre biologia de incorporação dos enxertos ósseos, sejam eles auto-enxertos, aloenxertos ou xenoenxertos, foram realizadas, na maior parte das vezes, com enxertos segmentares (HEIPLE et al. 1963; ENNEKING et al. 1975; SCHACHAR et al. 1983; GOLDBERG & STEVENSON, 1987; LANE & SHANDU, 1987; SPRINGFIELD, 1987). Nos estudos de osteoindução os modelos experimentais utilizaram matriz óssea desmineralizada em pó (THIELEMANN, SCHMIDT, KOSLOWSKI, 1982; VOLPON, XAVIER, GONÇALVES, 1982; REDDI, 1983; REDDI & ANDERSON, 1976; REDDI, WIENTROUB, MUTHUKAMARAN, 1987), derivados protéicos da matriz óssea (URIST, 1965; TURK et al. 1993), coágulo de fibrina (ZILCH & WOLF, 1987; GRECO, DE PALMA, LISAI, 1988), derivados da medula óssea (CUMMINE, ARMSTRONG, NADE, 1983) e osso desproteínizado (RAY & HOLLAWAY, 1957). Encontraram-se poucos trabalhos experimentais utilizando aloenxerto fragmentado e congelado (RAY & HOLLAWAY, 1957; MARX et al. 1984; GRECO et al. 1989) e nenhum deles comparativo com auto-enxerto fragmentado e nas metáfises dos fêmures e das tíbias.

No Brasil, poucos serviços ortopédicos dispõem de Banco de Ossos e, entre nós, não foi encontrado nenhum estudo experimental sobre regeneração óssea, comparando auto-enxerto e aloenxerto. Em 1982, VOLPON e colaboradores estudaram a reparação de defeito diafisário em ulna de coelhos, utilizando osso cortical em pó, descalcificado e calcificado. Na Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (FCM-UNICAMP) criou-se um banco de ossos que, até o momento, funciona em caráter experimental.

1.1. OBJETIVOS

Este experimento visou observar como ocorre a regeneração óssea com enxertos fragmentados; adquirir conhecimento e experiência com a mesma e, concomitantemente, testar a eficácia das condições de armazenamento de aloenxertos no banco de ossos do Hospital de Clínicas da FCM/UNICAMP.

Para tal, comparou-se, do ponto de vista histológico e radiológico, a regeneração óssea nas metáfises distais de fêmures de cães, propiciada pela enxertia de aloenxerto fragmentado e congelado e auto-enxerto fragmentado.



2. Terminologia

AUTO-ENXERTO:- Tecido removido de uma parte do corpo e transferido para outra do mesmo indivíduo. Representa o padrão para avaliações de transplantes ósseos.

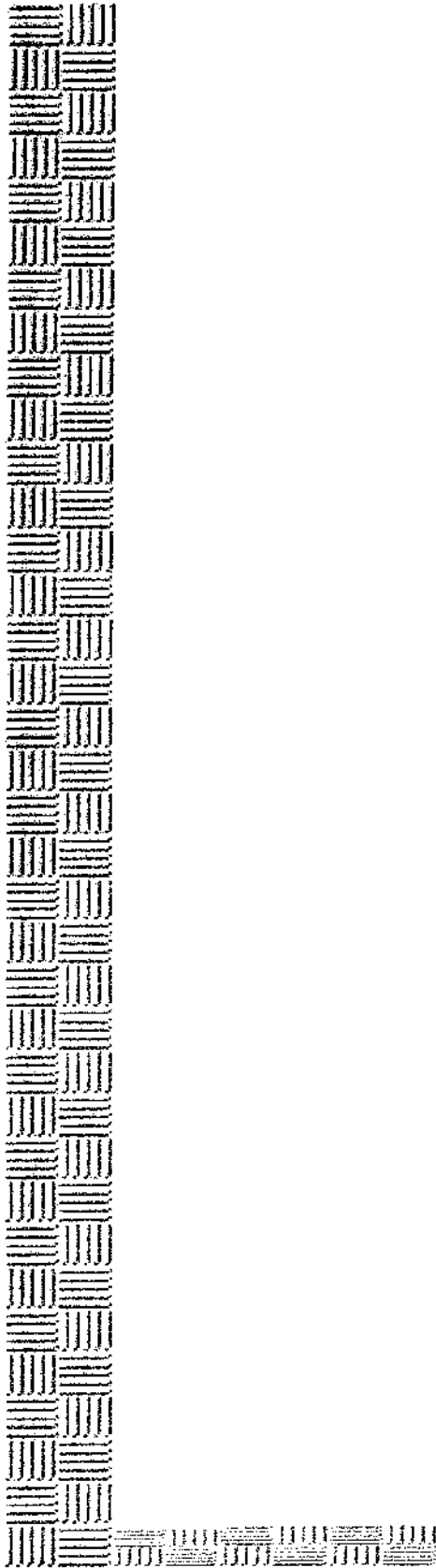
ALOENXERTO:- Tecido transplantado de um animal para outro da mesma espécie. É o termo preferido atualmente e já foi referido como enxerto homólogo.

XENOENXERTO:- Tecido transplantado entre espécies diferentes. Anteriormente era referido como enxerto heterólogo.

INCORPORAÇÃO:- Termo usado para descrever a integração e a reparação do tecido ósseo transplantado (BURCHARDT, 1987; PROLO & RODRIGO, 1985).

OSTEOCONDUÇÃO:- É o crescimento de capilares e células osteoprogenitoras (mesenquimais) do receptor no material transplantado. Estes materiais podem ser não biológicos (vidros, cerâmicas, plásticos, etc), biológicos não viáveis (osso congelado, osso desidratado e congelado, osso autoclavado e osso desproteinizado) e biológicos viáveis (auto-enxerto vascularizado e não vascularizado) . Em essência, a osteocondução depende do crescimento de osso novo do leito receptor sobre o material transplantado (BURCHARDT, 1987; PROLO & RODRIGO, 1985). Em 1907, BARTH e AXHAUSEN usaram o termo “schleichender ersatz” para descrever a substituição de osso necrótico por osso neoformado, após enxertia óssea. Na língua inglesa, este termo foi traduzido por “creeping substitution” (BURCHARDT, 1987; GOLDBERG & STEVENSON, 1987; PROLO & RODRIGO, 1985). No Brasil a expressão que mais se aproxima destas denominações é “crescimento em trepadeira”.

OSTEOINDUÇÃO:- É o processo de diferenciação de células mesenquimais pluripotenciais, do leito receptor, em células osteoprogenitoras quando em contato com o implante. Este processo hipoteticamente é regulado por polipéptidos morfogênicos insolúveis, enzimas específicas e enzimas inibidoras (URIST, EARNEST, KIMBALL, 1974; URIST & HERNANDEZ, 1974; URIST, MIKULSKI, BOYD, 1975; MULLIKEN et al. 1984). Em 1965, URIST demonstrou pela primeira vez a capacidade de a matriz óssea descalcificada e desvitalizada induzir a formação óssea em locais heterotópicos.



3. Material e Métodos

3.1. MATERIAL DO EXPERIMENTO E TÉCNICA CIRÚRGICA

Foram utilizados 36 cães adultos, machos, sem raça, do biotério da FCM-UNICAMP, fornecidos pelos Centros de Controles de Zoonoses e Captura de Animais das Prefeituras Municipais de Campinas e região.

Ao chegar ao biotério, eram examinados por veterinário, submetidos a tratamento de verminoses e de outras eventuais patologias. Permaneciam em observação por 20 dias, em canis isolados, e alimentados com ração apropriada *ad libitum*. Os considerados em boas condições de saúde foram usados no experimento.

O planejamento previu a formação de cinco grupos, com cinco animais cada e o critério que serviu para diferenciar estes grupos foi a semana em que os animais seriam sacrificados. Foram assim constituídos:

Grupo I: cinco cães sacrificados duas semanas após a cirurgia.

Grupo II: cinco cães sacrificados quatro semanas após a cirurgia.

Grupo III: cinco cães sacrificados seis semanas após a cirurgia.

Grupo IV: cinco cães sacrificados oito semanas após a cirurgia.

Grupo V : cinco cães sacrificados doze semanas após a cirurgia.

Nos grupos os cães tiveram as identificações citadas no quadro I.

Quadro I

IDENTIFICAÇÃO DOS CÃES NOS 5 GRUPOS

Grupos	Cães				
I	72	71	36a	92a	6
II	91a	4a	123	4	124
III	36	45	41	82	73
IV	90	91	16	93	95
V	120	77	33	5	100

Ao todo, foram operados 36 cães. Oito morreram por diferentes causas e três foram desprezados porque os enxertos utilizados não preencheram um dos critérios de estocagem previamente determinados: manutenção a menos 70 graus Celsius. O peso dos 25 cães utilizados no experimento variou de 10 a 27 kilogramas, com média de 15.5 kilogramas e desvio padrão de 7 kilogramas.

Para serem submetidos à cirurgia, foram anestesiados com Tiopental Sódico (15 miligramas por quilo de peso) e uma associação de Fentanil (0.1 miligrama) e Droperidol (5.0 miligramas), injetados por via endovenosa, independentemente do peso do animal; entubados com sonda endotraqueal e mantidos com respiração assistida por aparelho de ventilação mecânica controlada*.

Fez-se, a seguir, a assepsia pré-operatória dos membros pélvicos. Para tal, foram tricotomizados com aparelho elétrico do terço médio das coxas ao médio das pernas, lavados com água corrente e sabão e pintados com solução de álcool iodado a 5%. Com o animal colocado em decúbito dorsal horizontal sobre calha especial, os membros pélvicos caíam naturalmente em abdução, o que permitiu fácil acesso ao lado medial dos joelhos.

Cobriram-se os animais com campos cirúrgicos esterilizados e somente a área a ser operada ficou exposta. As metáfises proximais das tíbias e distais dos fêmures, nas faces mediais, foram expostas por meio de duas incisões cirúrgicas, oblíquas, periarticulares, com aproximadamente três centímetros de extensão cada.

A do fêmur dirigia-se de cima para baixo, de posterior para anterior e terminava anteromedialmente próximo à interlinha articular do joelho. A da tibia iniciava próximo à linha articular, dirigia-se de cima para baixo e de anterior para posterior (Figura 1).

* Aparelho de Takaoka, modelo 600.

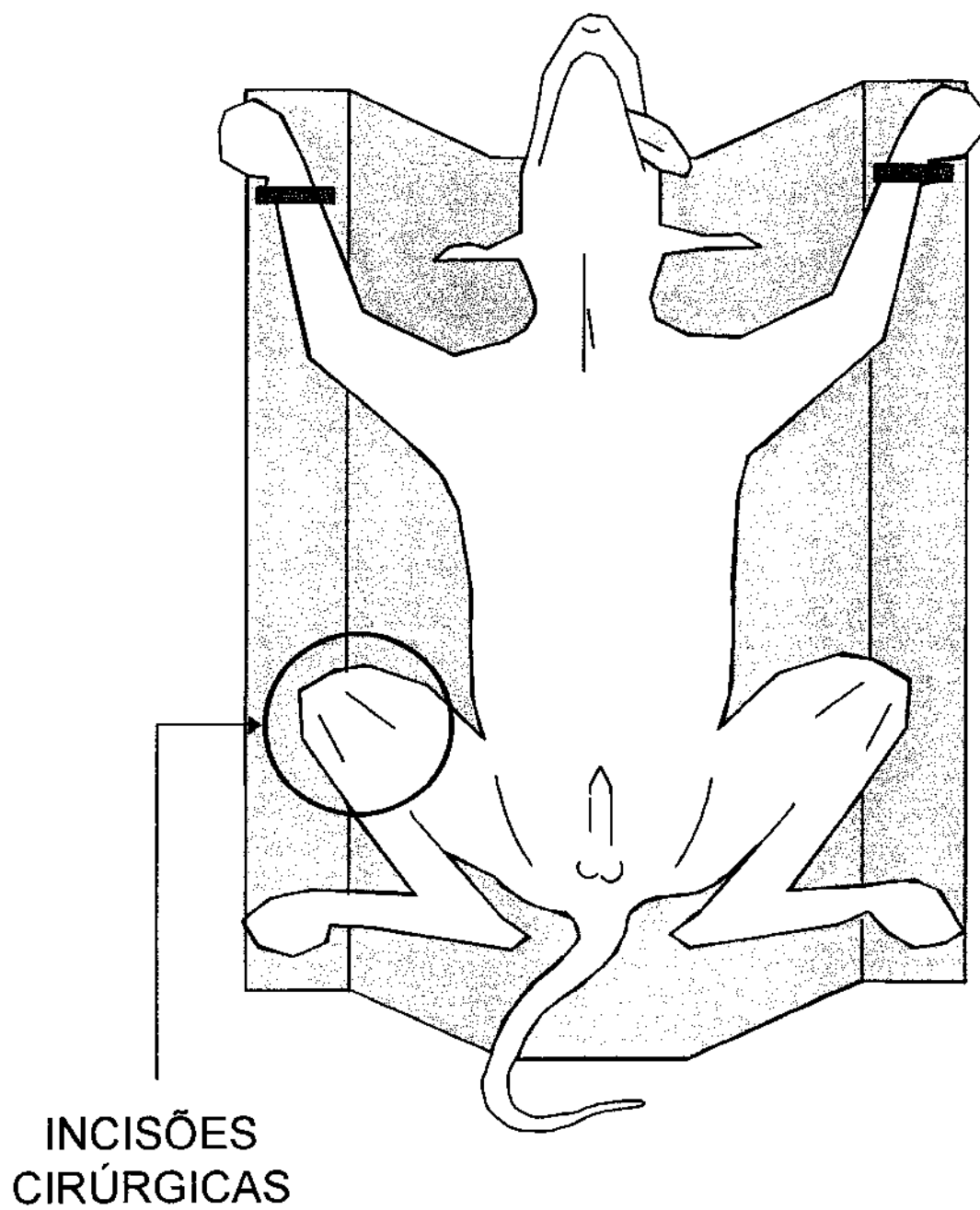


Figura 1: Cão na mesa cirúrgica e esquema das incisões utilizadas.

Abriu-se a pele e o tecido celular subcutâneo e efetuou-se a hemostasia dos vasos sangrantes por pinçamento e posterior cauterização com bisturi elétrico. Dissecou-se e afastou-se do fêmur o vasto medial do quadriceps e abriu-se o periósteo. Na tíbia, fez-se o mesmo com o periósteo; assim, expuseram-se as metáfises desses ossos.

A seguir, os dois ossos foram perfurados com perfurador elétrico* e broca de 5.55 milímetros de diâmetro. As perfurações foram feitas nas metáfises distais dos fêmures e proximais das tíbias, perpendiculares aos planos sagitais. Atingiram a cortical medial, o osso esponjoso e respeitavam a cortical lateral.

Os orifícios dos fêmures foram preenchidos com auto-enxerto ou aloenxerto. Foi definido, por sorteio, antes de cada cirurgia, qual lado receberia uma ou outra forma de enxerto. Os orifícios das tíbias foram deixados sem enxertos, como controle. A distribuição dos enxertos foi a seguinte: o fêmur direito recebeu em 12 cães, auto-enxerto e em 13, aloenxerto. O esquerdo, em 13 cães recebeu auto-enxerto e em 12, aloenxerto. A forma como esses enxertos foram obtidos vai descrita adiante.

Os orifícios das tíbias foram tamponados até que o sangramento fosse interrompido. Após revisão da hemostasia, a ferida cirúrgica foi fechada com catgut simples 00 (subcutâneo) e mononylon 000 (pele).

No pós-operatório imediato, cada animal recebeu antibióticoterapia**, em dose única, por via intramuscular, num dos membros pélvicos. Foram confinados em gaiolas que permitiam a deambulação.

*Perfuradora Marca Singer. Modelo número 900, de 110 a 120voltz, 60 hertz e 2,0 amperes e 2000 rotações por minuto.

** Pentabiótico Veterinário. Grande Porte. Associação de 1200000 U Penicilina G Benzatina, 600000 U de Penicilina G Procaina, 600000 U Penicilina G Potássica Cristalina, 500 miligramas de Dihidroestreptomicina Base (Sulfato) e 500 Miligramas de Estreptomicina Base (Sulfato).

Segundo o protocolo, cada grupo de cinco cães foi sacrificado na segunda, quarta, sexta, oitava e décima segunda semanas de pós-operatório. Para tal, foram anestesiados com 150 miligramas de Tiopental Sódico, e a seguir, recebiam 10 mililitros de Cloreto de Potássio a 19%, por via endovenosa. Após parada cardíaca e morte, os joelhos com os terços distais dos fêmures e proximais das tíbias foram extraídos, os ossos separados e as partes moles cuidadosamente retiradas. A seguir, foram fixados por imersão em solução de formalina a 10% por um período mínimo de sete dias.

3.2. PREPARO HISTOLÓGICO

Depois de fixadas, as peças foram descalcificadas por imersão em solução de Ácido Nítrico a 5%, por 15 dias. A seguir, cortadas da seguinte maneira: as peças do fêmur, inicialmente, por dois cortes transversais ao eixo longo do osso, junto à perfuração, sendo um proximal e outro distal a esta (Figura 2). Em seguida, fizeram-se mais três cortes. Dois, paralelos ao longo eixo da perfuração, que retiravam as corticais anterior e posterior (Figura 3). O terceiro, perpendicular à perfuração, retirava a cortical lateral (Figura 4). A cortical medial foi deixada intacta com seu orifício (Figura 4). Deste modo, obteve-se um bloco em forma de paralelepípedo que continha a perfuração no seu interior, ao longo do comprimento (Figura 5).

Por cortes perpendiculares à perfuração, direcionados da cortical medial para a lateral, este paralelepípedo foi subdividido em três fragmentos, um contendo a cortical e dois contendo osso esponjoso. Cada fragmento media aproximadamente um milímetro e meio de espessura. Isto nos permitiu obter dois fragmentos de osso esponjoso, em diferentes profundidades da perfuração (Figura 6).

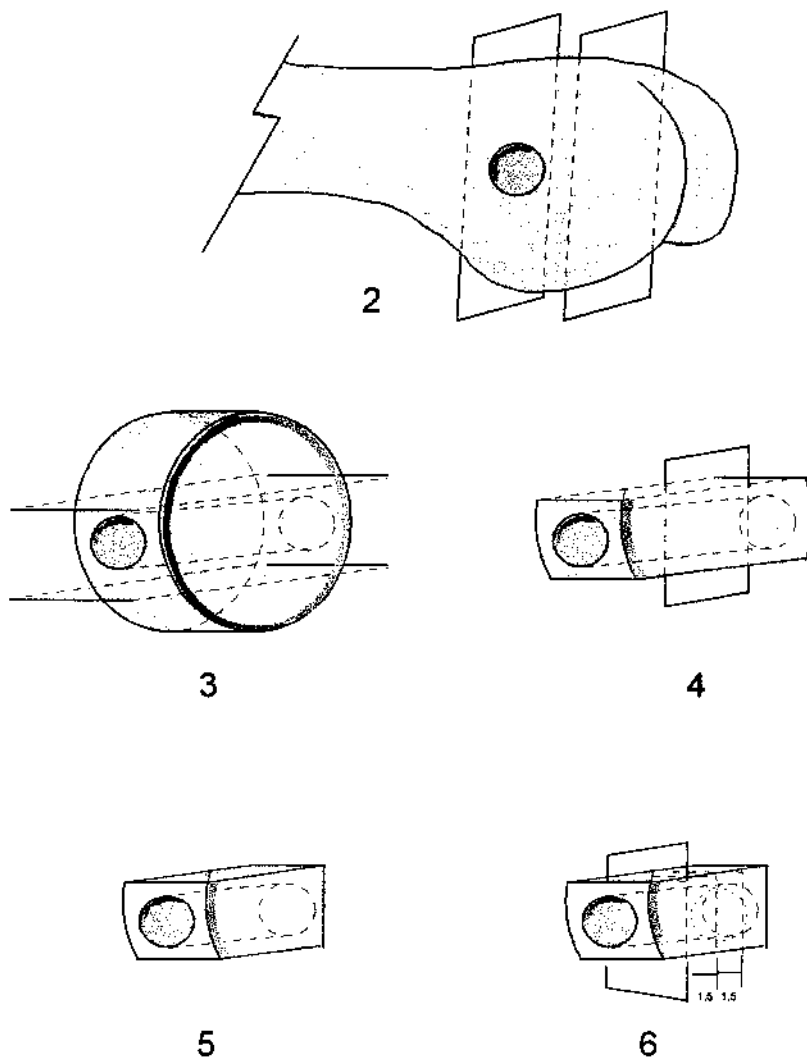


Figura 2: - Cortes transversais, perpendiculares ao longo eixo do osso.

Figura 3: - Cortes paralelos ao longo eixo da perfuração, que retiraram as corticais anteriores e posteriores.

Figura 4: - Corte perpendicular à perfuração, que retirou a cortical lateral.

Figura 5: - Bloco com cortical medial intacta.

Figura 6: - Cortes perpendiculares à perfuração, que dividiram o bloco em 3 fragmentos.

As peças das tíbias foram cortadas do mesmo modo que as dos fêmures. Entretanto, devido à forma da sua metáfise proximal, a perfuração ficou ao longo da largura do paralelepípedo obtido, o que permitiu a obtenção de dois fragmentos perpendiculares à perfuração. Um com a cortical medial e outro com tecido esponjoso. Deste foram retiradas duas amostras histológicas da região superficial e duas da região mais profunda.

Para o processamento histológico, os fragmentos de cada bloco foram colocados em cápsulas unicassetes e lavados com água corrente por 24 horas. A seguir, foram processados em histotécnico, fazendo-se a desidratação, diafanização e a infiltração por parafina líquida. A desidratação, por imersão em álcool etílico, em diferentes concentrações: a 80% na primeira hora, a 95% na segunda hora e a 100% na terceira hora. A diafanização, imergindo as cápsulas com os fragmentos ósseos em Xylol a 100% por duas horas. Por fim, a infiltração, imergindo as cápsulas em parafina a 100%, derretida, por duas horas e meia.

Para a inclusão, os fragmentos foram retirados das cápsulas e imersos em parafina, também derretida, contida em reservatórios próprios. Este processo durou poucos minutos.

Nesses blocos, os fragmentos foram dispostos de forma que, ao serem cortados com micrótomo, as secções histológicas obtidas eram transversais à perfuração óssea.

Para confecção das lâminas, de cada fragmento de osso esponjoso do fêmur foram obtidas duas secções histológicas, que foram coradas com Hematoxolina-Eosina e Tricrômico de Masson, num total de quatro secções para cada fêmur. As mesmas colorações foram feitas com as quatro secções de osso esponjoso do fragmento da tíbia.

3.3. OBTENÇÃO DO AUTO-ENXERTO.

Ao se perfurarem as metáfises proximais das tíbias e a metáfise distal do fêmur que recebeu o aloenxerto, a broca produziu pequenos fragmentos ósseos que foram coletados, depositados sobre gaze seca e estéril e utilizados como auto-enxerto. Padronizou-se no início do experimento, que os fragmentos do fêmur que recebeu auto-enxerto não seriam utilizados. A quantidade de enxerto obtida foi sempre mais que suficiente para preencher completamente o orifício que o recebeu.

3.4. OBTENÇÃO E ESTOCAGEM DO ALOENXERTO

Três cães forneceram os aloenxertos. A técnica asséptica para a retirada dos fragmentos ósseos foi a mesma empregada para a realização das cirurgias.

Os cães doadores foram sacrificados, suas tíbias e fêmures extraídos e as partes moles retiradas. A seguir, perfuraram-se as metáfises e epífises proximais e distais destes, tantas vezes quanto possível, em diferentes direções com a mesma perfuradora e broca do experimento. Os fragmentos ósseos assim obtidos foram coletados e armazenados em pequenos frascos estéreis de vidro, envolvidos por duas bolsas plásticas, também estéreis e estocados em congelador a 70 graus Celsius negativos, por um período de, no mínimo, 15 dias. Cada frasco continha quantidade mais que suficiente de fragmentos ósseos para preencher o orifício do fêmur. Foi preparado número de frascos maior que o necessário.

Antes de cada cirurgia os fragmentos, necessários para cada experimento, eram retirados do congelador e deixados embebidos em solução fisiológica a 0,9% por 30 minutos em temperatura ambiente.

3.5. ESTUDO RADIOLÓGICO

Depois de fixados, os segmentos dos fêmures e tíbias foram submetidos a radiografias com aparelho de alta definição* e filme específico para mamografia**. A técnica utilizada foi a convencional para mamografia na qual a amperagem e voltagem utilizadas dependiam da espessura da peça. Sempre usou-se foco fino e distância máxima. Como não se tinha nenhum parâmetro quanto a voltagem e amperagem necessárias, as radiografias foram feitas por tentativas e as melhores, selecionadas.

3.6. ESTUDO HISTOLÓGICO

Todo estudo histológico foi realizado pelo autor, supervisionado por dois histologistas. Para a análise dos resultados, as lâminas foram identificadas: cão, profundidade do corte, tipo de enxerto utilizado e semana do sacrifício.

A metodologia proposta previu estudar a regeneração óssea em todas as lâminas e quantificar em cada lâmina, dos cães sacrificados com doze semanas, a fração de volume ocupada pelas trabéculas ósseas na área do defeito produzido nas metáfises. Para tal, utilizou-se a metodologia de volumetria de pontos (AHERNE, 1970; WEIBEL, 1979; SALA, MATHEUS, VALERI, 1981).

3.6.1. ESTUDO HISTOLÓGICO DESCRITIVO

Avaliou-se o processo de regeneração óssea com a observação de três elementos principais: trabéculas ósseas, espaço intertrabecular e áreas de tecido conjuntivo fibroso denso. Quanto às trabéculas ósseas, estudou-se sua quantidade, aspecto, disposição,

*Mamógrafo CGR, Kilovoltagem: 22-49, Amperagem: 4-800

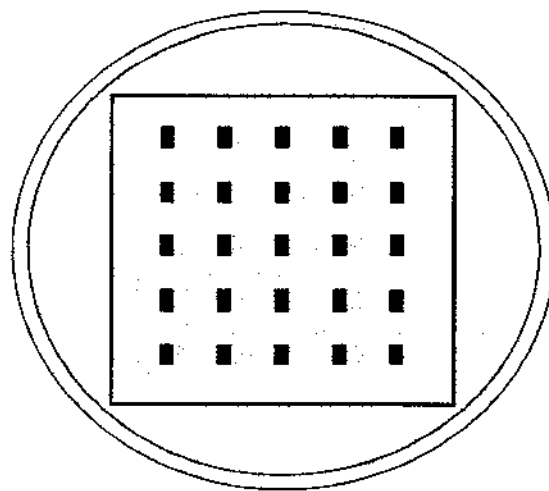
** Foto Med 18x24

atividade osteoclástica e osteoblástica. No espaço intertrabecular, levou-se em conta a quantidade de vasos neoformados, células hematopoiéticas, tecido conjuntivo frouxo e células adiposas. Em relação ao tecido conjuntivo fibroso denso, avaliou-se sua área, aspecto e celularidade.

3.6.2. ESTUDO HISTOLÓGICO QUANTITATIVO

3.6.2.1. Avaliação histológica quantitativa da fração de volume (Volume Relativo) ocupada pelas trabéculas ósseas na reparação de defeito ósseo na décima segunda semana de pós operatório (Análise Morfométrica).

A fração de volume ocupada pelas trabéculas ósseas produzidas em cada defeito ósseo foi avaliada pelo método da volumetria de pontos (AHERNE, 1970; WEIBEL, 1979; SALA, MATHEUS, VALERI, 1981), utilizando-se um sistema-teste, com uma ocular com retículo de integração de 25 pontos (Grade de Gahn, Figura 7).



Grade de Gahn

Figura 7: Grade de Gahn

Examinou-se, com esta ocular, numa sequência estabelecida, cinco campos distintos do defeito ósseo, denominados 1, 2, 3, 4 e 5 e contaram-se os números de pontos do retículo de integração que caíram sobre as trabéculas ósseas destes campos (Figura 8).

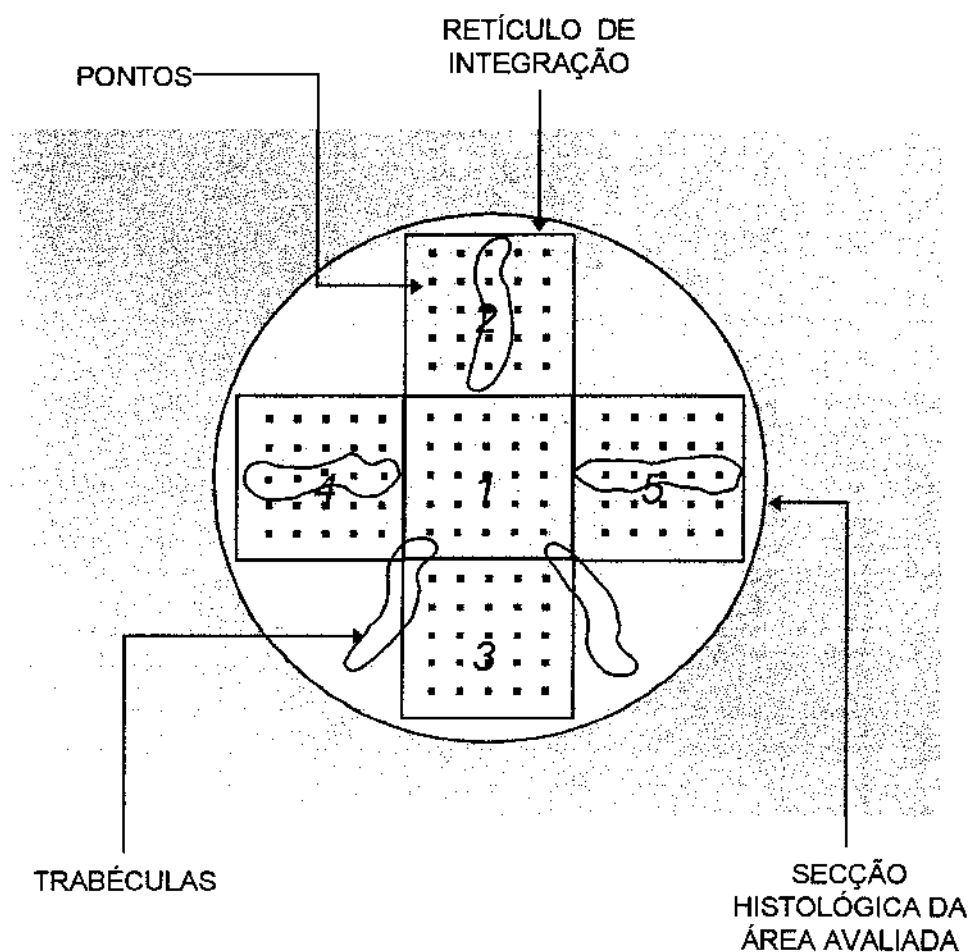


Figura 8: Sequência dos Campos examinados.

Com estes valores, utilizando-se fórmula baseada em conceito de morfometria histológica, calcularam-se as frações de volume (volume relativo) ocupada pelas trabéculas em cada defeito. Nesta fórmula, o somatório de pontos que caem sobre as trabéculas, nos campos sequenciais examinados e situadas na área de regeneração é dividido pelo número de pontos possíveis destes cinco campos.

Esta análise volumétrica tem como fundamento básico o teorema do geologista *Delesse cujo enunciado é:

“Numa rocha composta de vários minerais, a área ocupada por qualquer mineral, na superfície de um corte da rocha, é proporcional ao volume do mineral na rocha.”

Portanto, tem-se que a fração de volume ocupada por um objeto num continente é diretamente proporcional à fração de área que o mesmo ocupa num plano seccional médio do continente; assim, a fração de volume ocupada por um objeto é igual à sua fração de área em uma transeção

Temos então :

p=soma do número de pontos (hits) que caem sobre as trabéculas ósseas;

P=número total de pontos que caem sobre a área do defeito ósseo:

Ppi=fração de volume= p/P

Se tomarmos como exemplo a figura 8 em que 5 campos são medidos numa secção histológica, temos:

P=125 pontos= número total de possíveis

p=15 pontos= número total de pontos que caíram sobre as trabéculas ósseas nos 5 campos.

* DELESSE apud WEIBEL, 1979.

Então:

$$P_{pi}=15/125= 0,12$$

Portanto, a fração de volume ocupada pelas trabéculas ósseas na área do defeito ósseo foi de 12,0%

Em nossas avaliações usamos uma ocular Kpl 8x, com retículo de integração de 25 pontos e objetiva de 10x.

3.7. MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Para a análise estatística, realizou-se a análise da variação (das variáveis transformadas) dos valores das frações de volume ocupada pelas trabéculas ósseas no defeito ósseo e o Teste de Tukey (COCHRAN & COX, 1957) para análise comparativa entre as médias das Frações de Volume, obtidas nos fêmures e nas tíbias.



4. Resultados

4.1. COMPLICAÇÕES CIRÚRGICAS

Dos 36 cães operados, oito faleceram sem que se pudesse estabelecer a causa. Outros três, apresentaram complicações: dois, deiscência de sutura e um, infecção no subcutâneo. Nos cães com deiscência, repetiu-se a antibioticoterapia preventiva, lavou-se e ressuturou-se a incisão. Evoluíram sem outras complicações. Nos animais com infecção, fez-se drenagem, ressutura e nova antibioticoterapia. A evolução também foi favorável e todos os três foram mantidos no experimento.

4.2. RESULTADOS RADIOLÓGICOS

Não foi possível avaliar-se, quantitativamente, do ponto de vista radiológico, a evolução da reparação dos defeitos ósseos tratados. Existiu variação de cão para cão dentro de uma mesma fase do experimento.

Notamos que, ao redor da sexta semana, os defeitos femorais estavam reparados, embora ainda fosse possível identificar o local da perfuração em todos os cães. Nas tíbias, entretanto, os defeitos estavam bem evidentes e só parcialmente ocupados por trabéculas ósseas (Fotos 1, 2 e 3).

Na décima segunda semana, o processo de reparação dos fêmures é de tal ordem que, em dois cães, tivemos dificuldades em localizar os defeitos. Nas tíbias, por outro lado, ainda não estavam completamente preenchidos por trabéculas e tinham sinais de osteoporose.

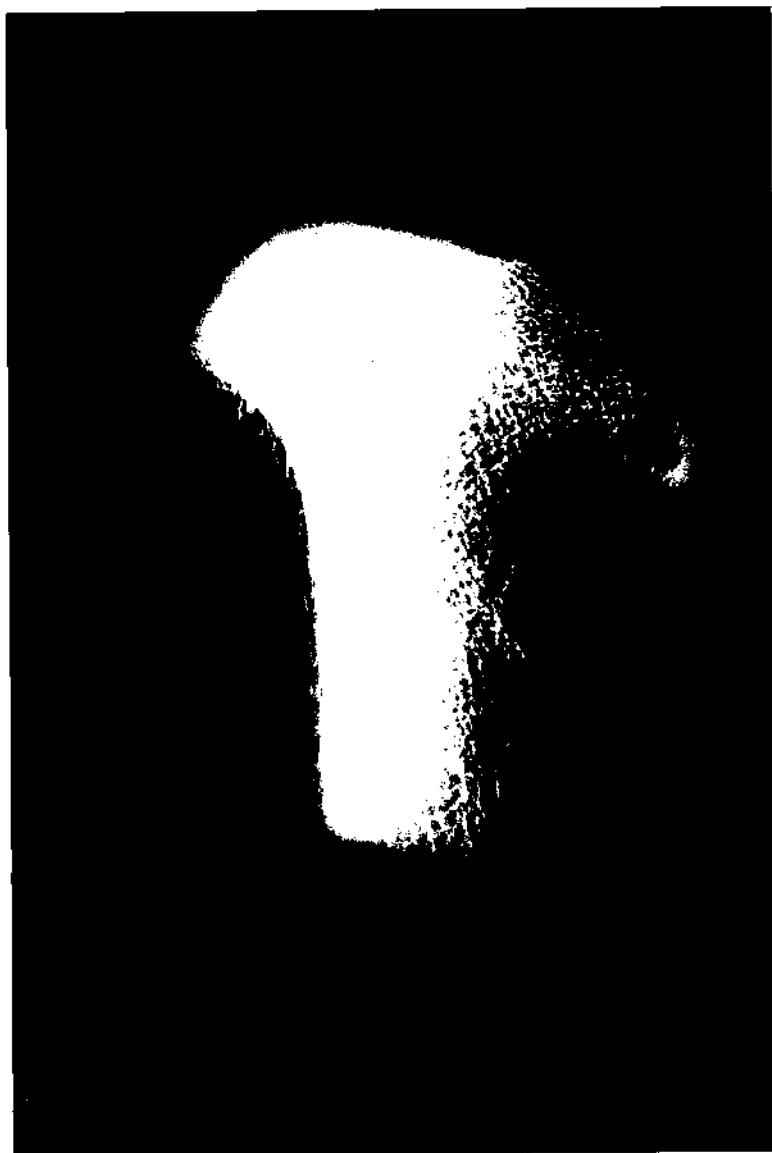


Foto 1: Radiografia da tíbia do cão 82, na sexta semana. O defeito ósseo criado ainda é perfeitamente visível.



Foto 2: Radiografia do cão 82, com auto-enxerto, na sexta semana. Ainda se consegue identificar o local do defeito ósseo, mas a regeneração está em fase avançada.

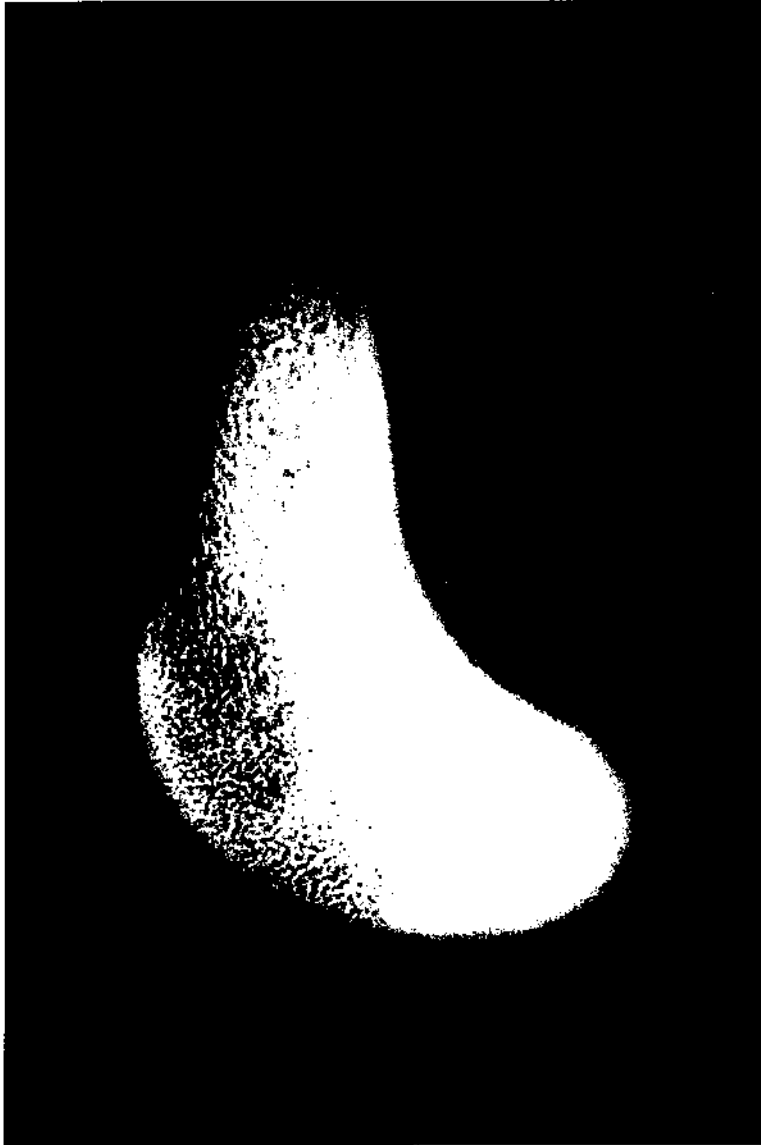


Foto 3: Radiografia do fêmur do cão 82, com aloenxerto, na sexta semana. Ainda se identifica o local do defeito ósseo criado, mas a regeneração também está avançada.

4.3. RESULTADOS HISTOLÓGICOS

4.3.1. RESULTADOS HISTOLÓGICOS DESCRITIVOS

4.3.1.1. Aspectos histológicos da regeneração óssea das tíbias

Numa mesma etapa, o processo de regeneração óssea variou entre os cães e entre os cortes de diferentes profundidades num mesmo osso.

Segunda semana: a periferia do defeito foi ocupada por trabéculas neoformadas, enquanto que a área central foi ocupada por núcleo de tecido de granulação rico em fibras colágenas e vasos neoformados.

As trabéculas estavam dispostas de duas formas dentro do defeito ósseo: uma circular, na borda da lesão e outra radial, com crescimento centrípeto (Foto 4). Eram jovens e tinham atividade osteoblástica intensa, mais evidente junto à área de granulação (Foto 5). O espaço intertrabecular apresentou-se constituído de vasos neoformados, tecido conjuntivo frouxo e células hematopoiéticas em grande quantidade.

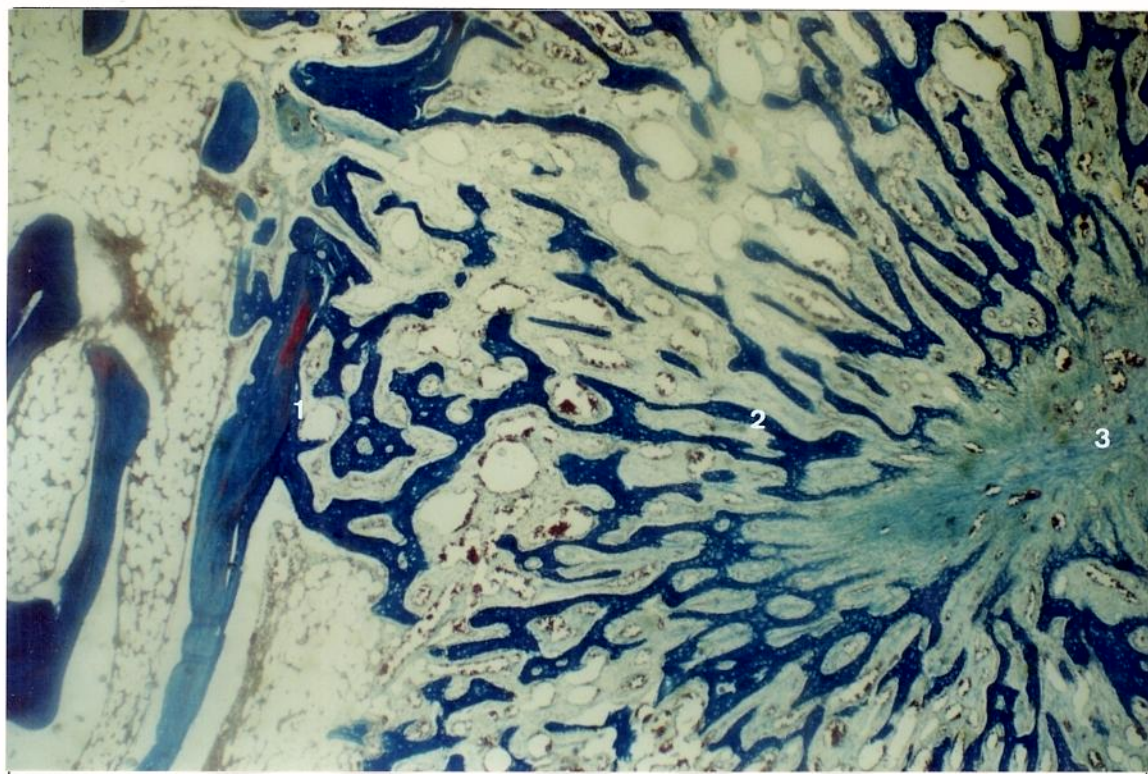


Foto 4: Segunda semana. Cão 72, lâmina 172 b2, tíbia esquerda. Coloração de Tricrômico de Masson, aumento 32x.

Legendas : 1:-Espículas neoformadas circulares, 2:-Espículas neoformadas radiais, 3:- Área de tecido de granulação.

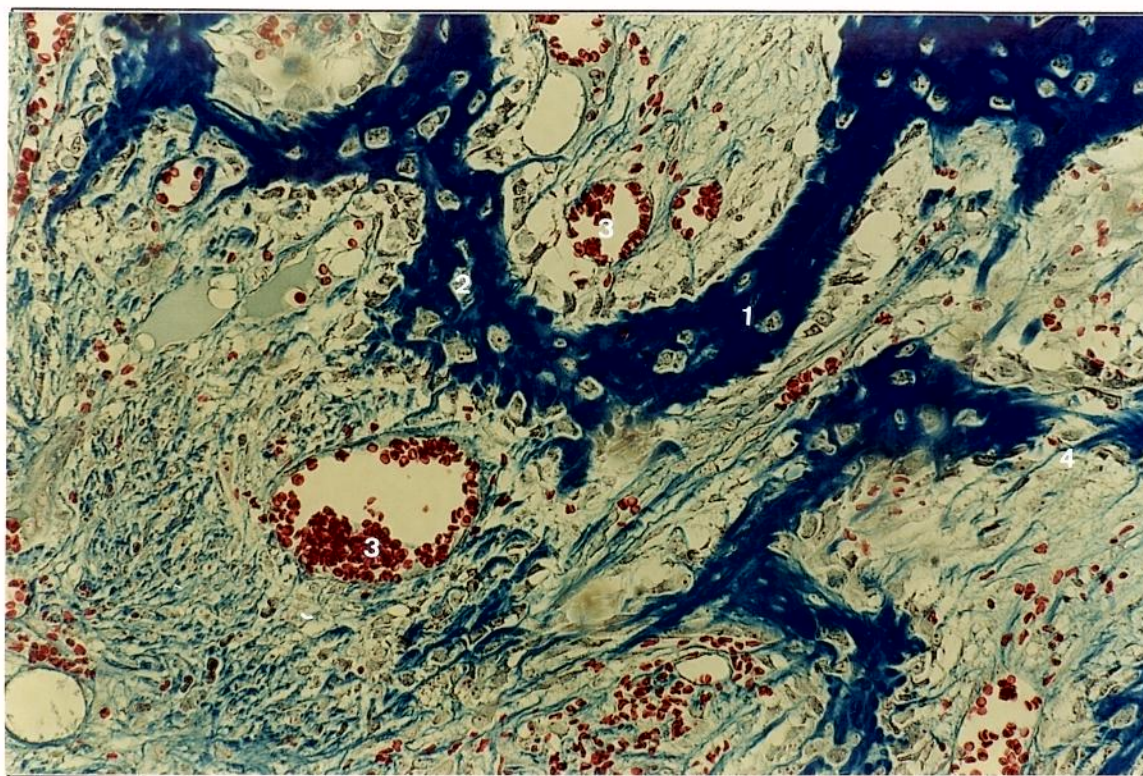


Foto 5: Segunda semana. Cão 72, lâmina 172 b2, tibia esquerda. Coloração de Tricômio de Masson, aumento 256x.

Legendas:- 1:- Espículas neoformadas junto à área central, 2:- Osteoblastos, 3:- Vasos neoformados, 4:- Tecido conjuntivo frouxo.

Quarta semana: as trabéculas da área periférica tornaram-se rarefeitas, diminuíram muito em número e tamanho. O que predominou, nesta área, foi tecido conjuntivo frouxo e células hematopoiéticas e começaram a surgir células gordurosas. As trabéculas com disposição radial também apresentaram-se em menor número, concentrando-se ao redor da área central, junto ao núcleo de tecido conjuntivo e mantendo as características anteriores. O espaço intertrabecular, desta área, continuou mostrando o aspecto observado na segunda semana. (fotos 6 e 7)

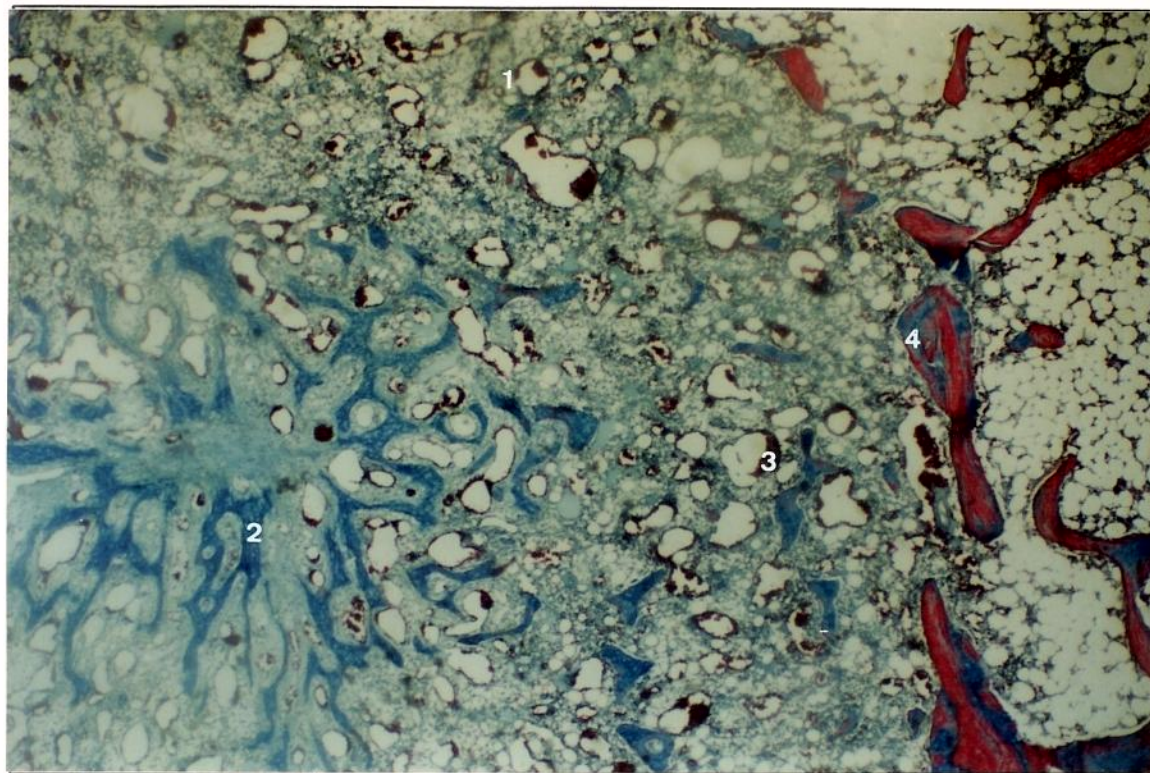


Foto 6: Quarta semana. Cão 4a, lâmina 139 b1, tibia esquerda. Coloração de Tricrômico de Masson, aumento 32x.

Legendas:- 1:-Área periférica com rarefação de espículas, 2:- Espículas radiais ao redor da área central, 3:-Vasos neoformados, 4:-Trabéculas circulares (vermelho-antigas, azul-neoformadas).

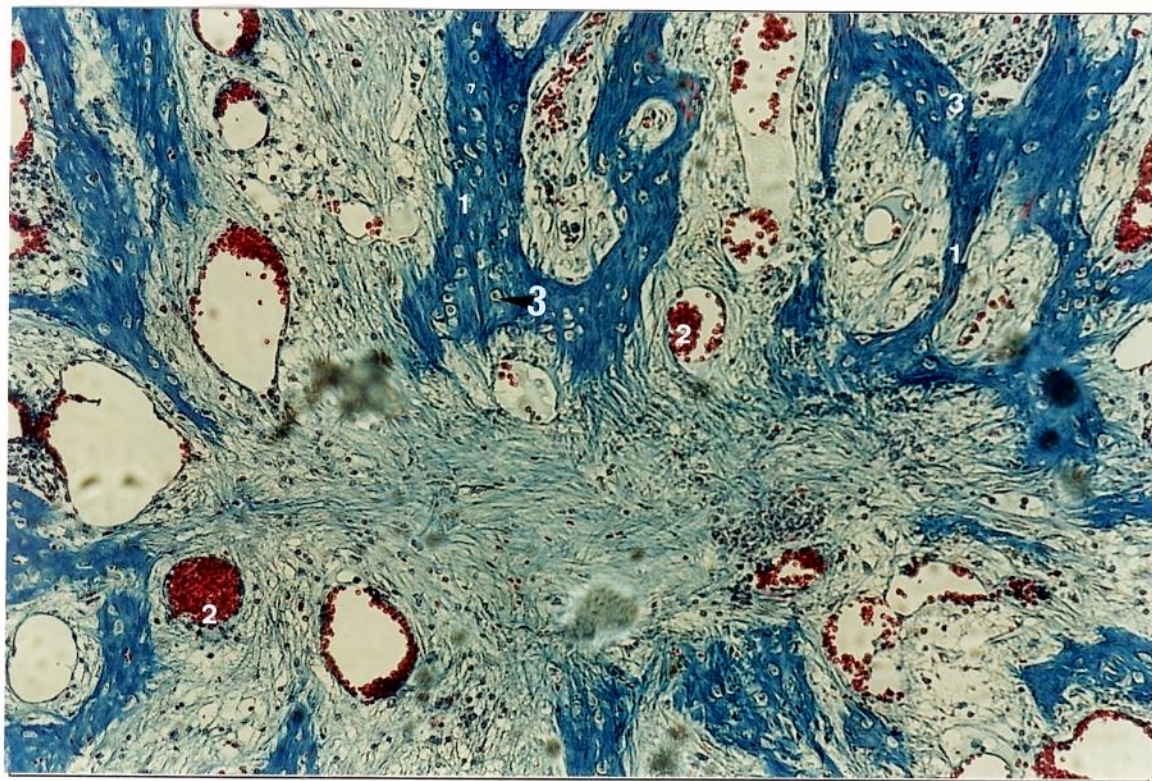


Foto 7: Quarta semana. Cão 4a, lâmina 139 b2, tíbia esquerda. Coloração de Tricrômico de Masson, aumento 128x.

Legendas:- 1:- Espículas neoformadas ao redor da área central, 2:- Vasos neoformados, 3:- Osteoblastos.

Sexta semana: O aspecto histológico do processo de regeneração variou muito. Entretanto, dos cinco cães estudados, quatro apresentaram marcada rarefação das trabéculas. Esta rarefação, que na quarta semana era visível na área periférica, nesta fase aconteceu, também, junto à área central. O núcleo de tecido conjuntivo fibroso, antes frouxo, apresentou-se denso (foto 8), com muito pouca celularidade e quase ausência de vasos neoformados.

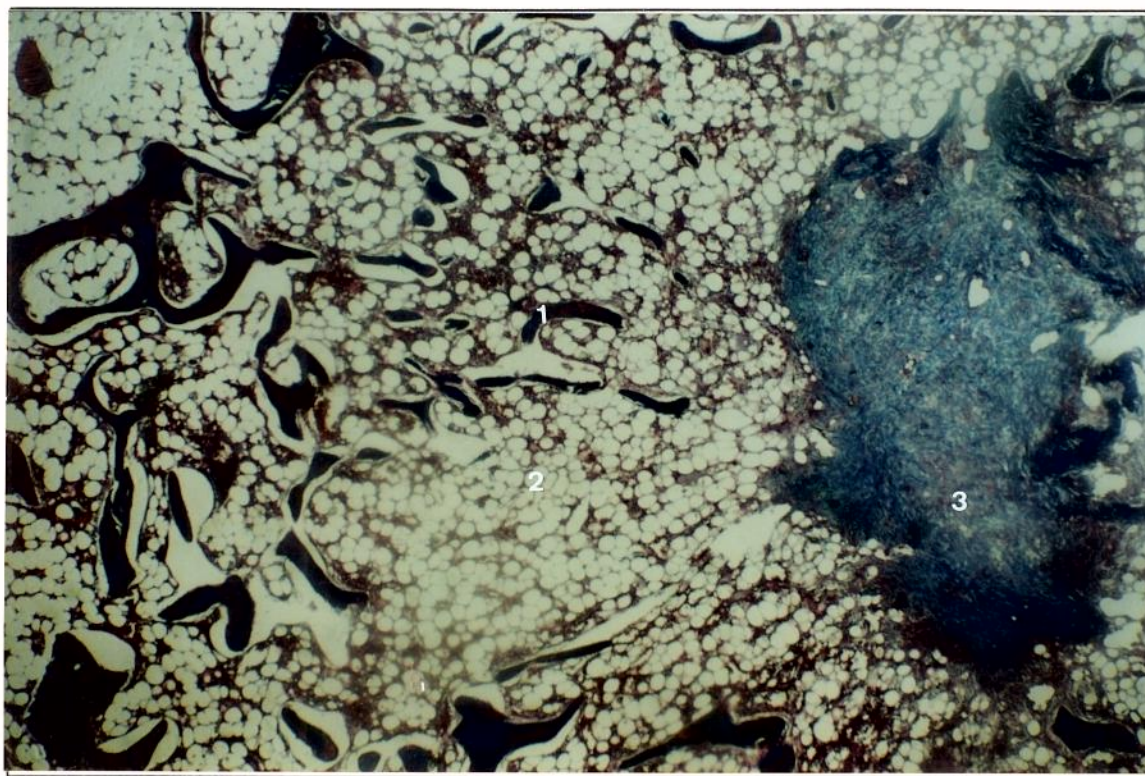


Foto 8 : Sexta Semana. Cão 41, lâmina 333 b2, tibia direita. Coloração de Tricrômico de Masson, aumento 32x.

Legendas: 1:-Trabéculas pequenas e rarefeitas, 2:-Células adiposas, 3:- Núcleo fibroso central.

As trabéculas apresentavam atividade osteoclástica e osteoblástica discreta, indicio de pequena neoformação óssea. Foi significativo, nessa etapa, o aumento de células adiposas no espaço intertrabecular, ao passo que, diminuiu a quantidade de vasos e de células hematopoiéticas. Tinha-se a impressão de que o processo caminhava para a formação de medula amarela (Foto 9).

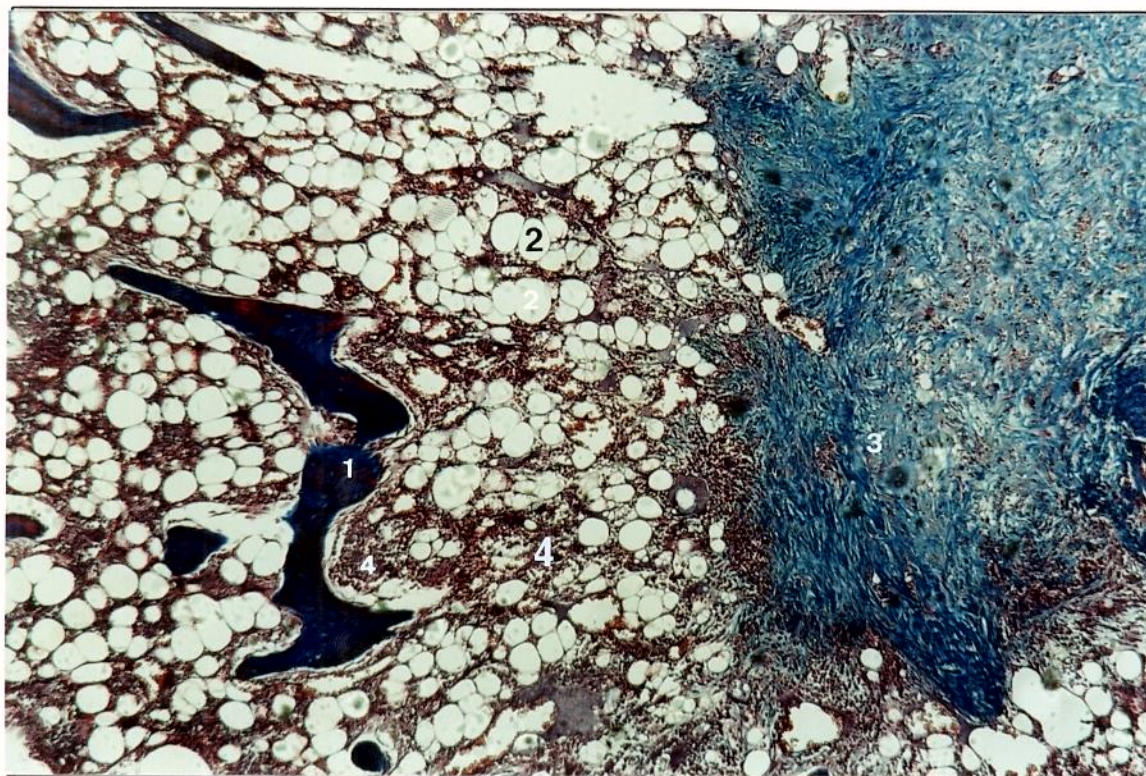


Foto 9: Sexta semana. Cão 41, lâmina 333b2, tíbia direita. Coloração de Tricrômico de Masson, aumento 64x.

Legendas: 1:- Trabécula neoformada, 2:-Células adiposas, 3:- Área central com aspecto fibroso, 4:- Células hematopoiéticas

Oitava semana: Não houve diferenças marcantes em relação às semanas anteriores. Manteve-se o aspecto de rarefação trabecular e discreta atividade osteoclástica e osteoblástica em todo o defeito. No espaço intertrabecular, o número de células adiposas aumentou e o núcleo de tecido conjuntivo fibroso persistiu em apenas dois cães (Foto 10).

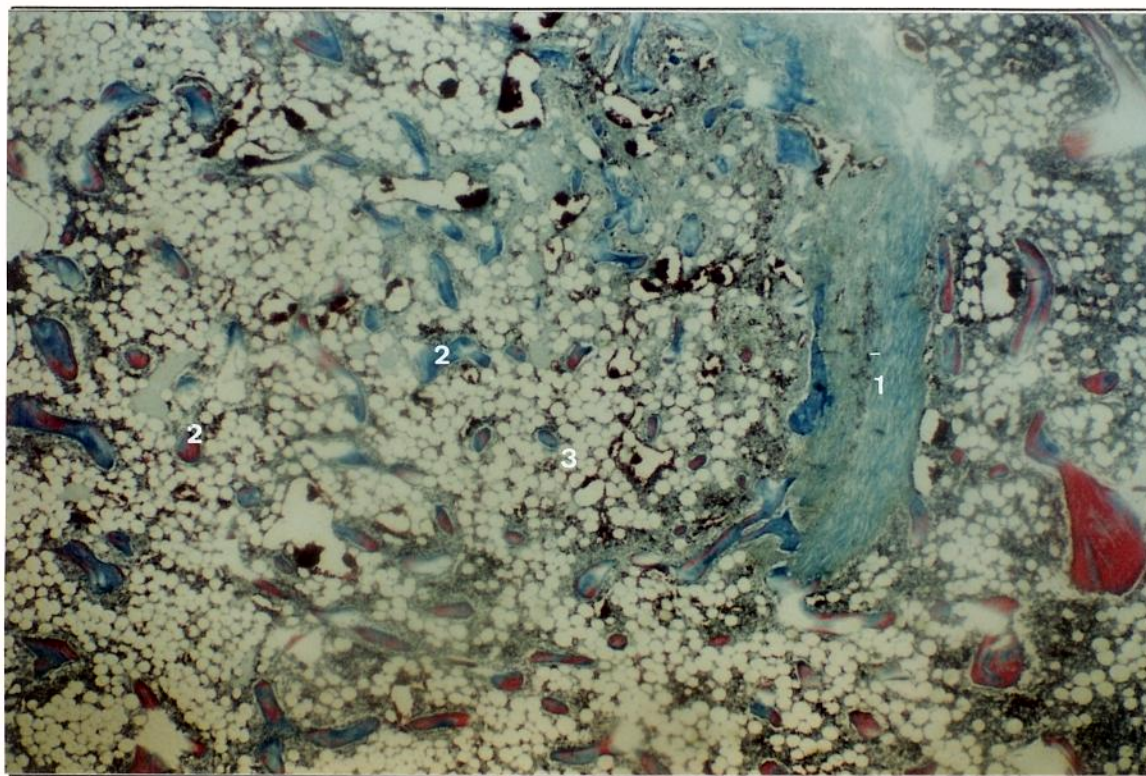


Foto 10: Oitava semana. Cão 92, lâmina 136 b2, tíbia esquerda. Coloração de Tricrômico de Masson, aumento 32x.

Legendas:- 1:-Núcleo fibroso, 2:-Trabéculas neoformadas pequenas (azul-jovens, vermelho-antigas) 3:-Células adiposas

Décima segunda semana: o aspecto da área de regeneração era de porose. As trabéculas eram pequenas, estavam em pequeno número e nelas, praticamente, não se observou nem atividade osteoclástica, nem osteoblástica. O espaço intertrabecular foi ocupado quase que exclusivamente por células adiposas (Foto 11). Quando a rarefação era menor, aumentava a quantidade de vasos e de células hematopoiéticas e diminuía a de células adiposas.

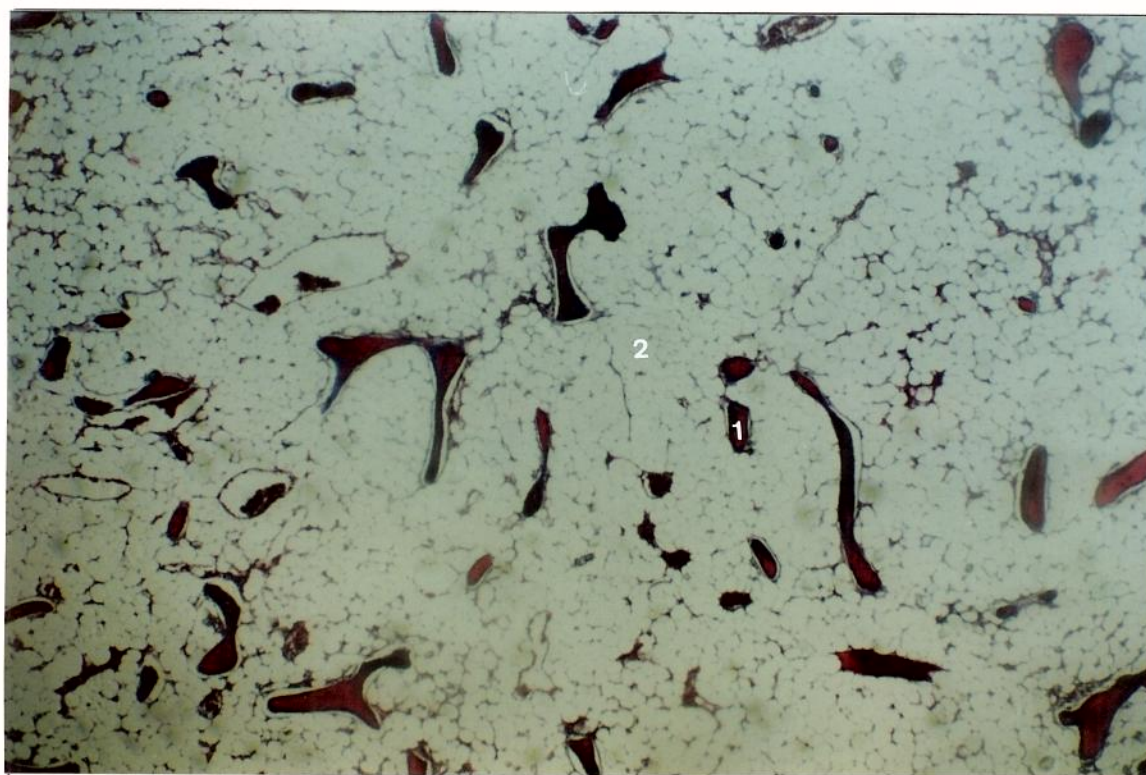


Foto 11: Décima segunda semana. Cão 100, lâmina 183 b2, tíbia direita. Coloração de Tricrômico de Masson, aumento 32x.

Legendas: 1: Trabéculas pequenas e rarefeitas, 2:- Células adiposas

4.3.1.2. Aspectos histológicos da regeneração óssea do fêmur com auto-enxerto.

Também se observaram diferenças histológicas no processo de regeneração, não só entre os diferentes cães, como entre os cortes de diferentes profundidades de um mesmo osso.

Segunda semana: o defeito ósseo foi ocupado, em sua maior parte, por trabéculas implantadas e neoformadas. As neoformadas, o foram por osteoindução e osteocondução. Estavam em maior quantidade e integravam as implantadas entre si e ao osso receptor (Fotos 12 e 13). Em relação às implantadas, muitas foram absorvidas e outras

osso receptor (Fotos 12 e 13). Em relação às implantadas, muitas foram absorvidas e outras estavam em degeneração. As presentes passavam por processo de osteocondução e também induziam neoformação óssea. Em toda a região era intensa a atividade osteoclástica e osteoblástica. Nas áreas em que as trabéculas implantadas estavam degeneradas havia intensa celularidade, com maior quantidade de osteoclastos (foto 14).

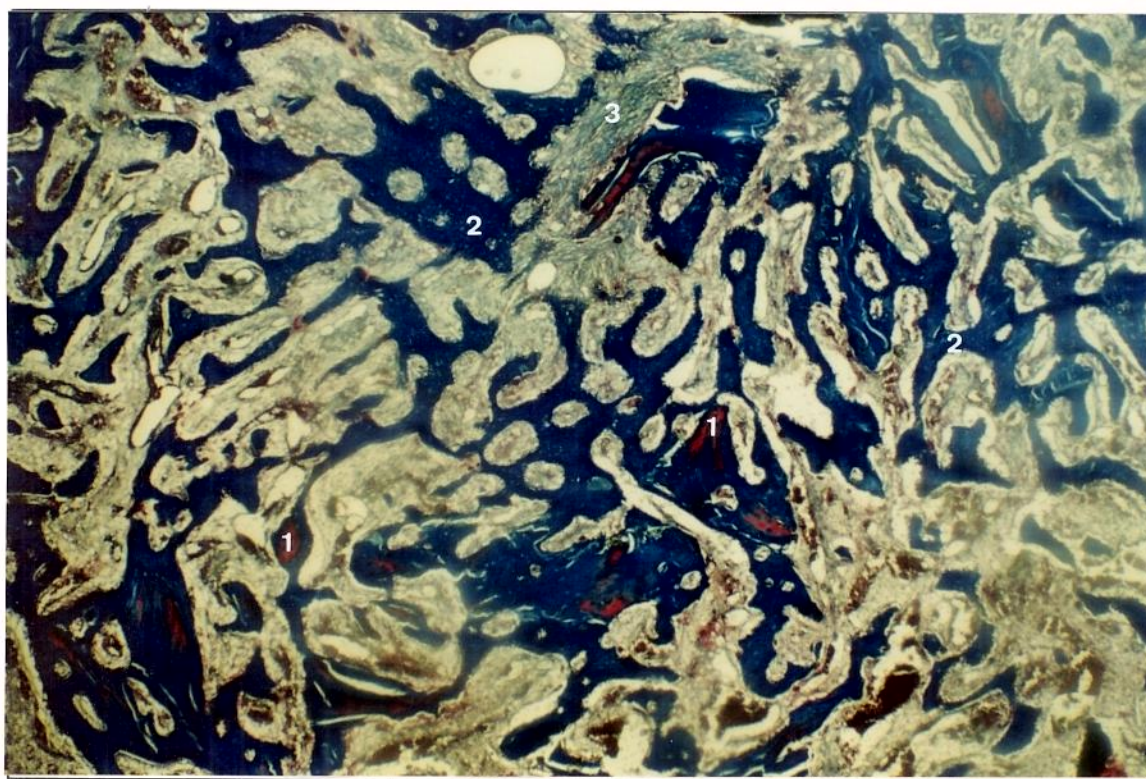


Foto 12: Segunda semana. Fêmur com auto-enxerto. Cão 72, lâmina 132 b2. Coloração Tricrômico de Masson, aumento 32x.

Legendas: 1:- Trabéculas implantadas, 2:- Trabéculas neoformadas, 3:- Área fibrosa

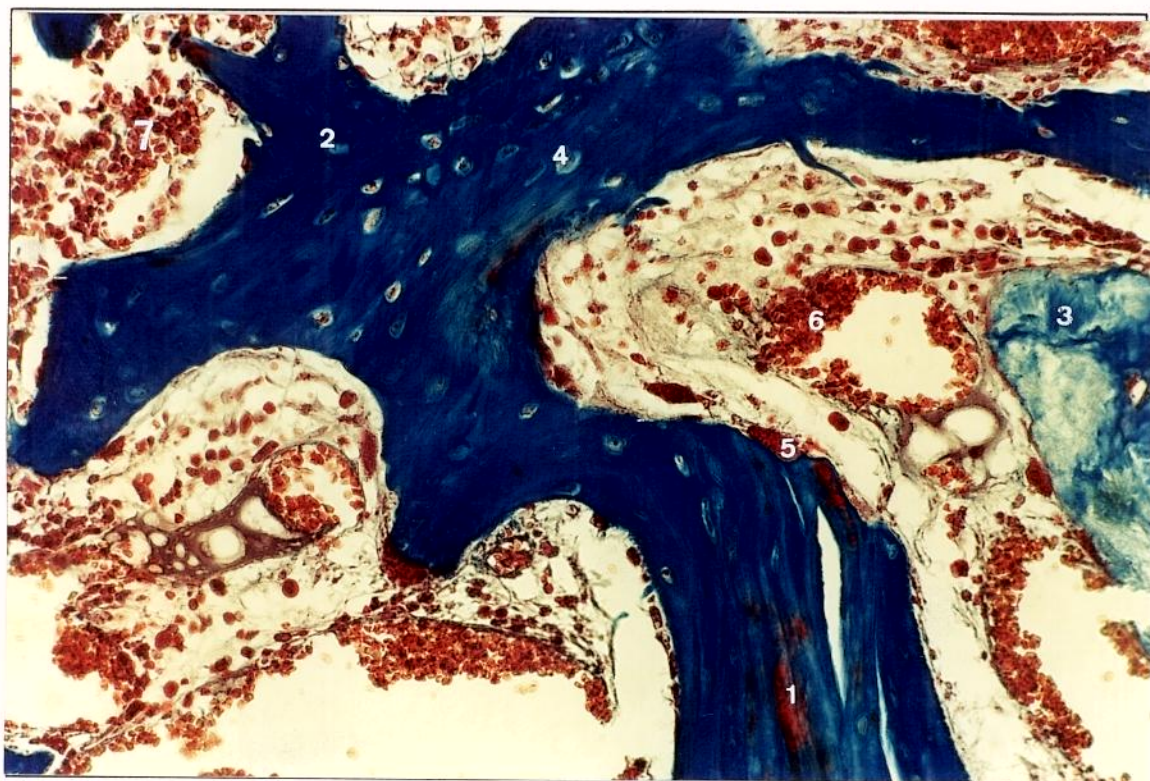


Foto 13: Segunda semana. Fêmur com auto-enxerto. Cão 78, lâmina 158 b2. Coloração Tricrômico de Masson, aumento 256x.

Legendas: 1:- Trabécula implantada com aspecto lamelar, 2:- Trabécula neoformada com aspecto primário, 3:- Trabécula degenerada, 4:-Osteoblastos 5:- Osteoclasto, 6:- Vasos, 7:- Células hematopoiéticas

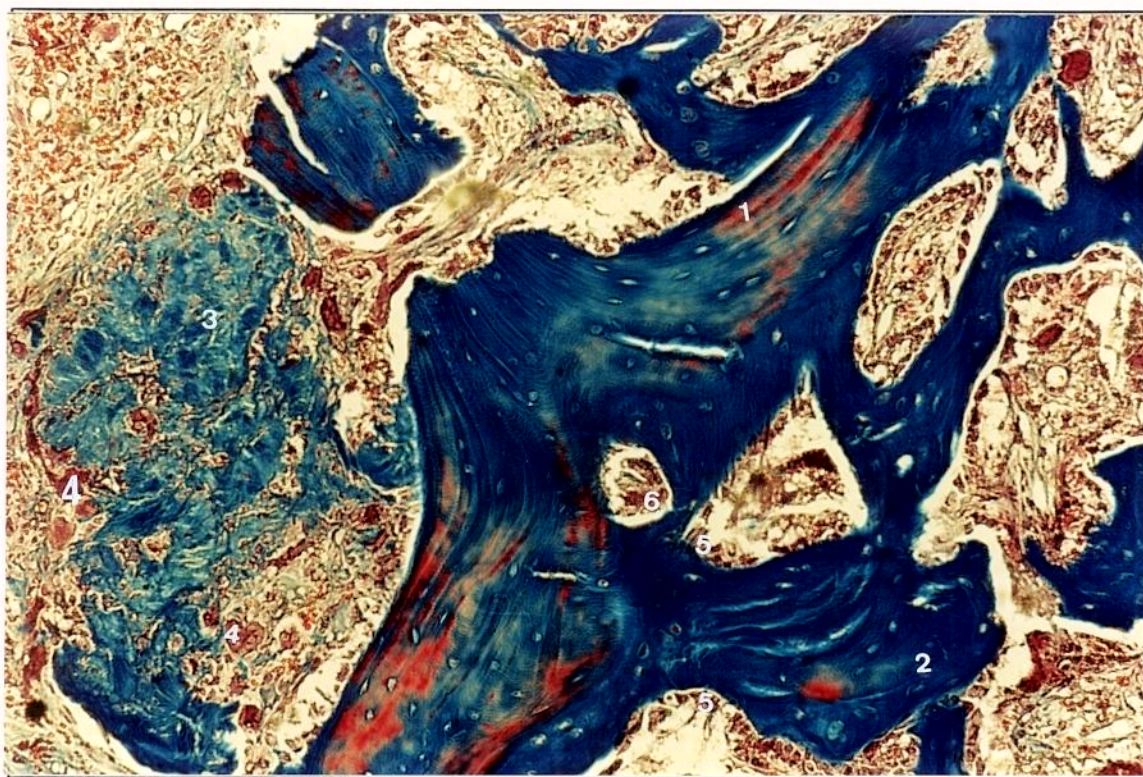


Foto 14: Segunda semana. Fêmur com auto-enxerto. Cão 72, lâmina 132 b1. Coloração Tricrômico de Masson, aumento 128x.

Legendas: 1:- Trabéculas implantadas com disposição lamelar, 2:-Trabéculas neoformadas com aspecto primário, 3:-Trabéculas implantadas degeneradas, 4:-Osteoclóstos, 5:- Osteoblóstos. 6:- Vasos Neoformados

O espaço intertrabecular era rico em vasos neoformados e células hematopoiéticas. Nos locais em que as trabéculas foram absorvidas observavam-se pequenas áreas de tecido conjuntivo fibroso.

Nos cortes mais profundos, as trabéculas neoformadas e implantadas estavam em menor número. A área intertrabecular, conseqüentemente, era maior e continha células hematopoiéticas, vasos e células adiposas em maior quantidade.

Quarta semana: observou-se diminuição acentuada do número de trabéculas. Houve rarefação importante, provavelmente, por degeneração das implantadas. Sobre elas as atividades osteoclástica e osteoblástica continuaram intensas e persistiram os processos de osteoindução e de osteocondução (fotos 15 e 16).

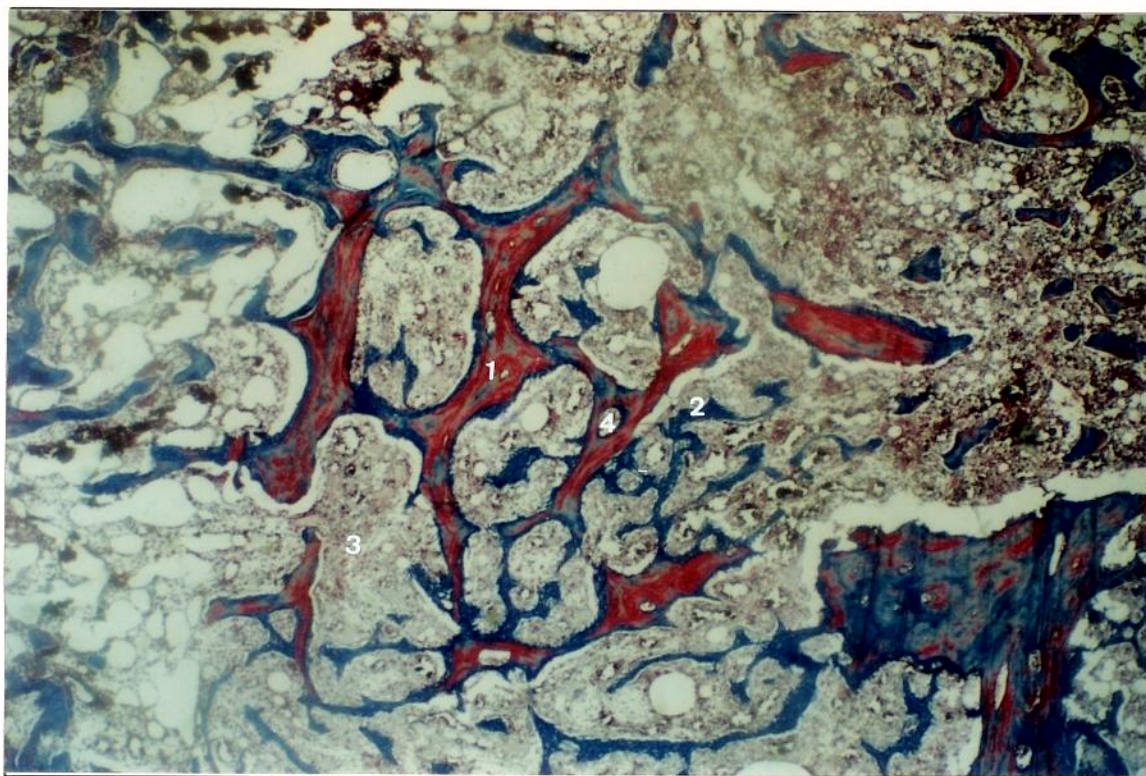


Foto 15: Quarta semana. Fêmur com auto-enxerto. Cão 4a, lâmina 124 b2. Coloração Tricrômico de Masson, aumento 32x.

Legendas: 1:- Trabéculas implantadas (vermelho), 2:- Trabéculas neoformadas (azul), 3:- Tecido conjuntivo frouxo, 4:- Vasos neoformados

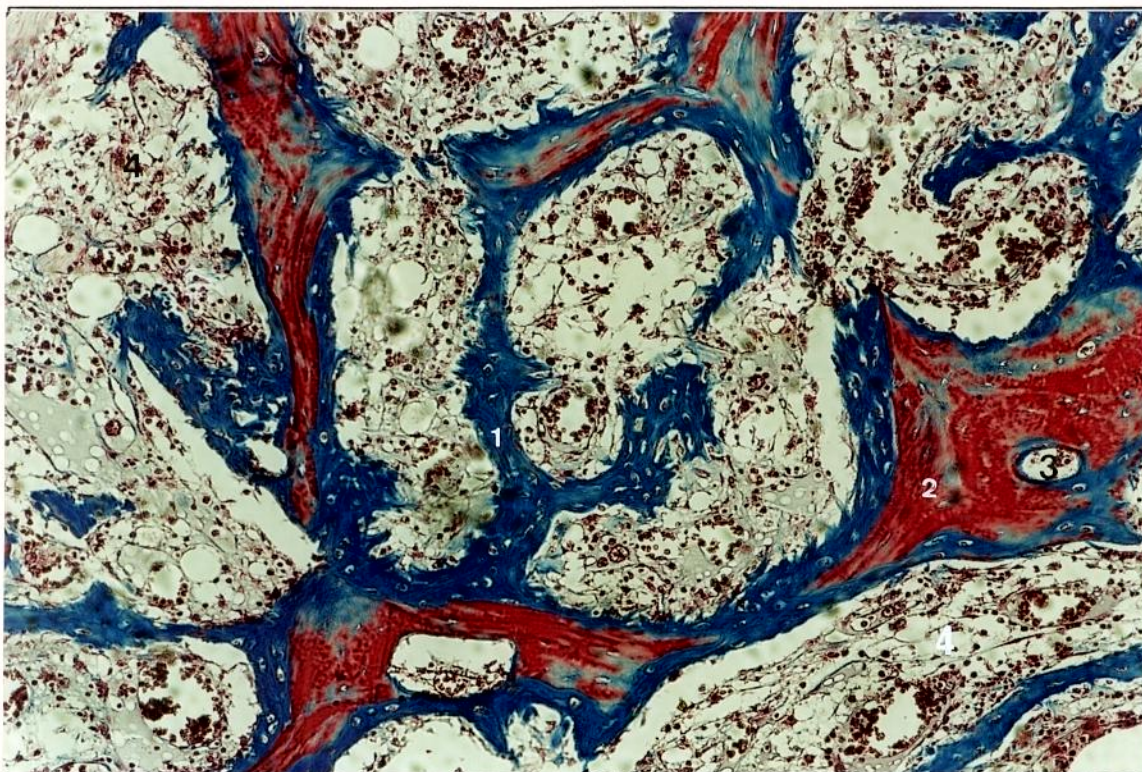


Foto 16: Quarta semana. Fêmur com auto-enxerto. Cão 4a, lâmina 124 b2. Coloração Tricrômico de Masson, aumento 128x.

Legendas: 1:- Trabéculas neoformadas, 2:- Trabéculas implantadas, 3:- Vaso neoformado revascularizando trabécula implantada 4:- Tecido conjuntivo frouxo

No espaço intertrabecular, aumentou a quantidade de tecido conjuntivo frouxo, de vasos e de células hematopoiéticas. Ainda persistiam os núcleos de tecido conjuntivo fibroso.

Sexta semana: apresentaram-se aspectos marcantes da regeneração óssea. Cessou o processo de osteoindução e era intensa a remodelação das trabéculas, tanto implantadas, quanto neoformadas, embora, houvessem diminuído as atividades osteoclástica e osteoblástica (Fotos 17 e 18). No espaço intertrabecular, aumentou a quantidade de células adiposas e o núcleo de tecido conjuntivo fibroso persistiu em apenas um corte de um dos cães. Ainda era grande a quantidade de células hematopoiéticas e vasos.

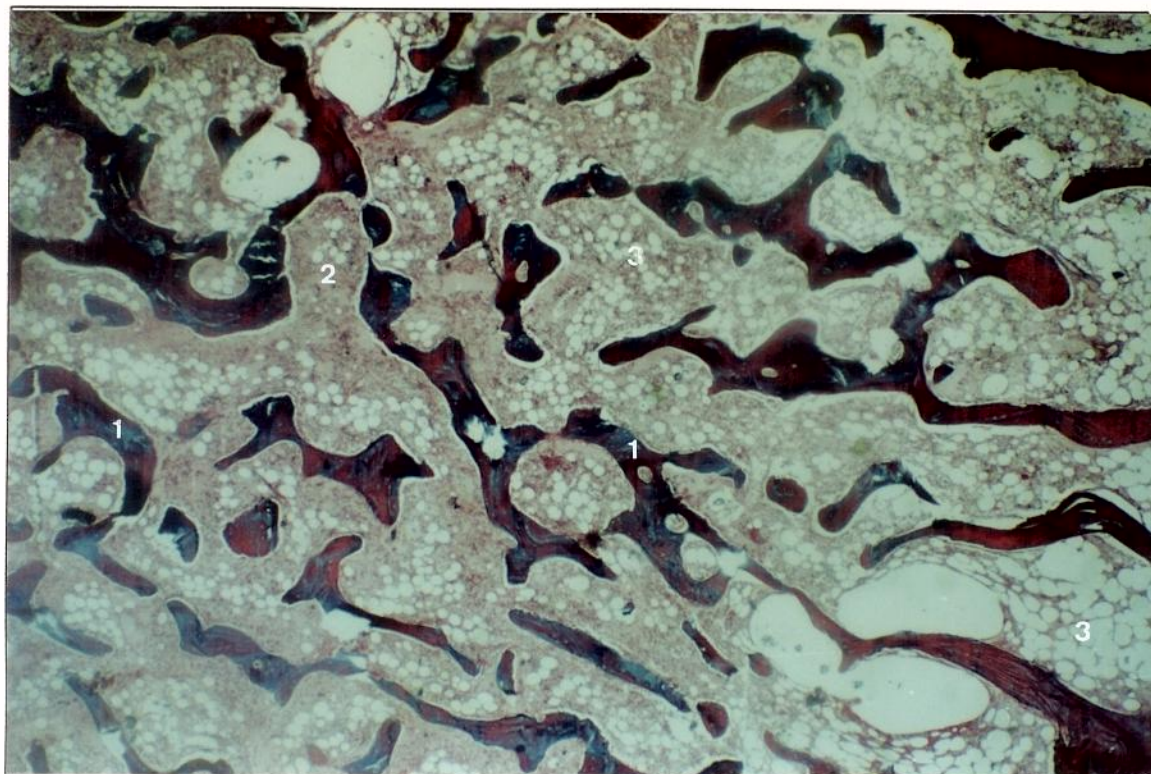


Foto 17: Sexta semana. Fêmur com auto-enxerto. Cão 41, lâmina 86 b2. Coloração Tricrômico de Masson, aumento 32x.
Legendas: 1:-Trabéculas em remodelação, 2:- Células hematopoiéticas, 3:- Células adiposas.

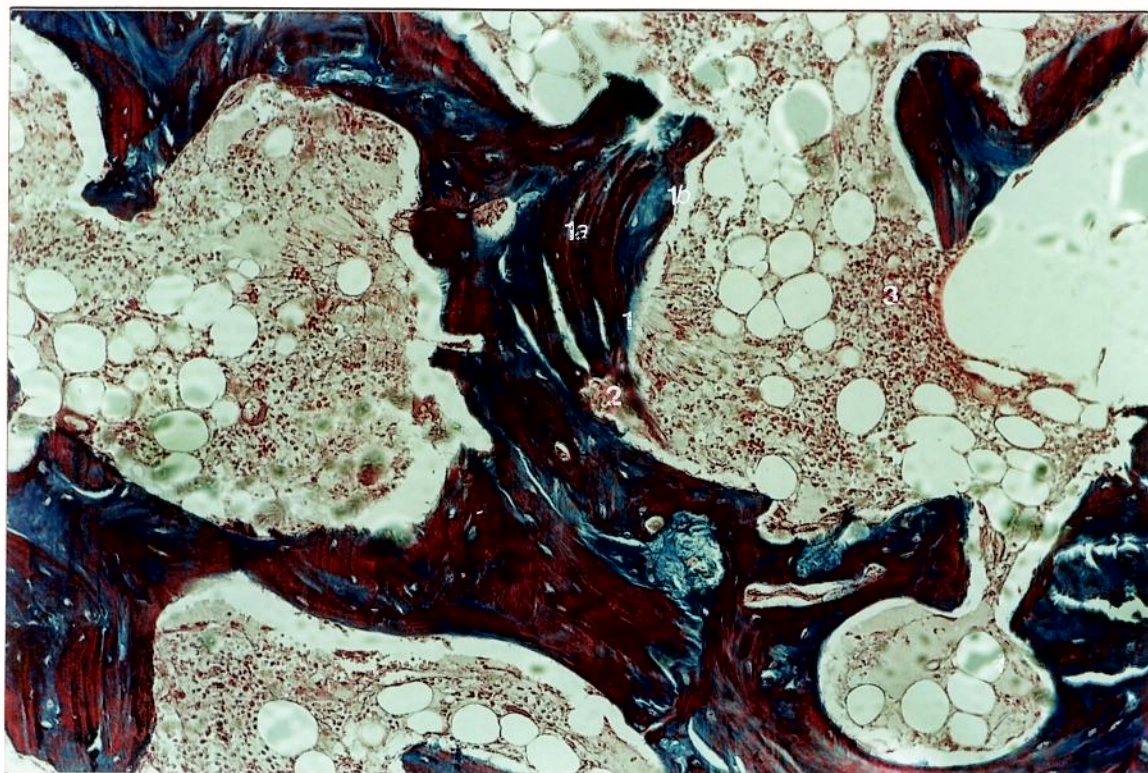


Foto 18: Sexta semana. Fêmur com auto-enxerto. Cão 41, lâmina 86 b2. Coloração Tricrômico de Masson, aumento 12.5.

Legendas: 1:- Trabéculas em remodelação (1a-aspecto lamelar, 1b-área em remodelação)
2:- Osteoclastos 3:- Células hematopoiéticas, 4:- Células adiposas

Oitava semana: manteve-se a remodelação das trabéculas (foto 19). As atividades osteoclástica e osteoblástica apresentavam-se com o aspecto da sexta semana (foto 20). No espaço intertrabecular, aumentou a quantidade de células adiposas e diminuiu a de vasos, células hematopoiéticas e de tecido conjuntivo frouxo, o que sugere que a área caminhava para a formação de medula amarela.

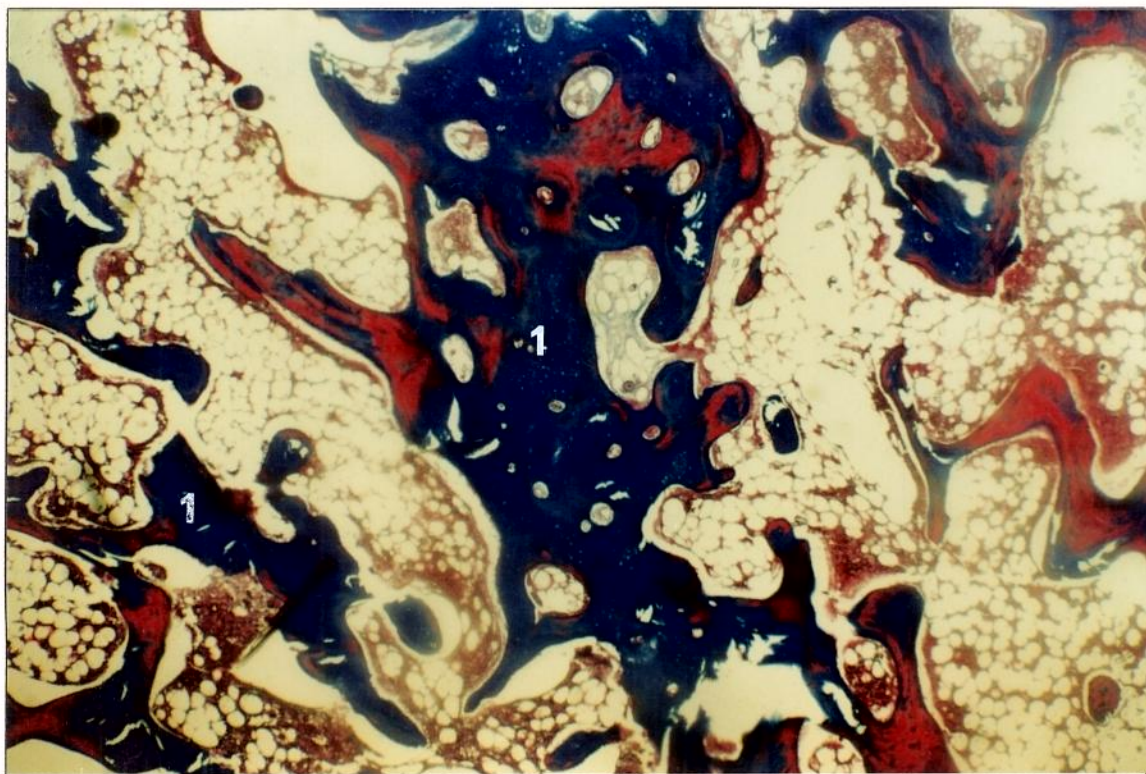


Foto 19: Oitava semana. Fêmur com auto-enxerto. Cão 90, lâmina 175 b2. Coloração Tricrômico de Masson, aumento 32x.
Legenda: 1:- Trabéculas em remodelação.

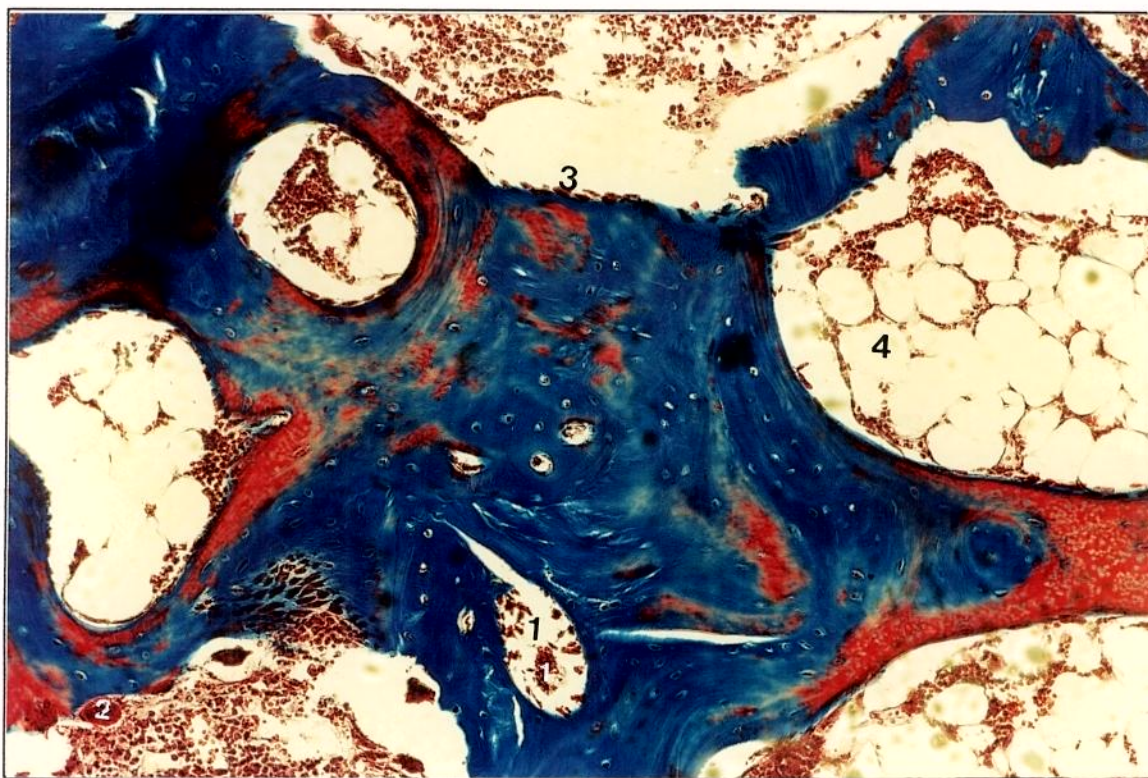


Foto 20: Oitava semana. Fêmur com auto-enxerto. Cão 90, lâmina 175 b2. Coloração Tricrômico de Masson, aumento 128x.

Legendas: 1:- Vasos neoformados, 2:- Osteoclastos 3:-Osteoblastos 4:- Células adiposas.

Décima segunda semana: a área regenerada assemelhava-se à do osso normal. Entretanto, ainda havia desarranjo e remodelação das trabéculas (fotos 21 e 22). Eram mínimas as atividades osteoclástica e osteoblástica. O espaço intertrabecular, caminhava para transformar-se em medula amarela, apesar de ainda ser grande a quantidade de células hematopoiéticas em alguns cortes.

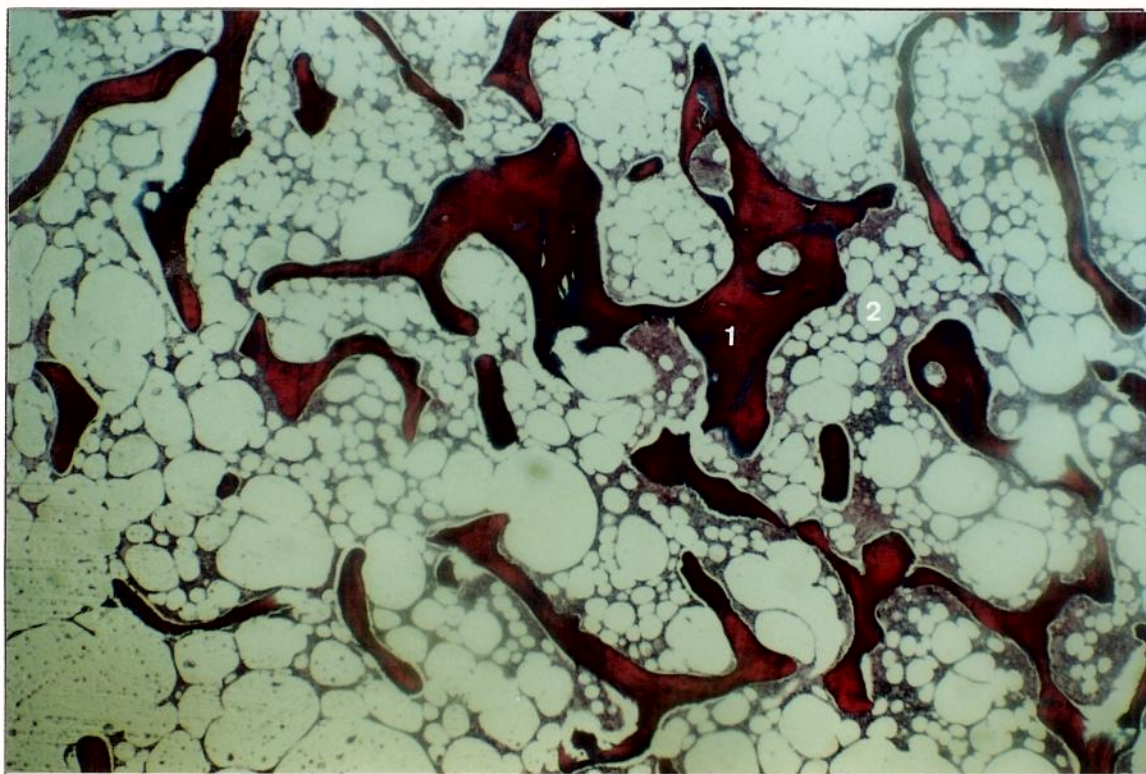


Foto 21: Décima Segunda semana. Fêmur com auto-enxerto. Cão 100, lâmina 189
b1. Coloração Tricrômico de Masson, aumento 32x.
Legenda: 1:- Trabéculas desarranjadas. 2:- Células adiposas.

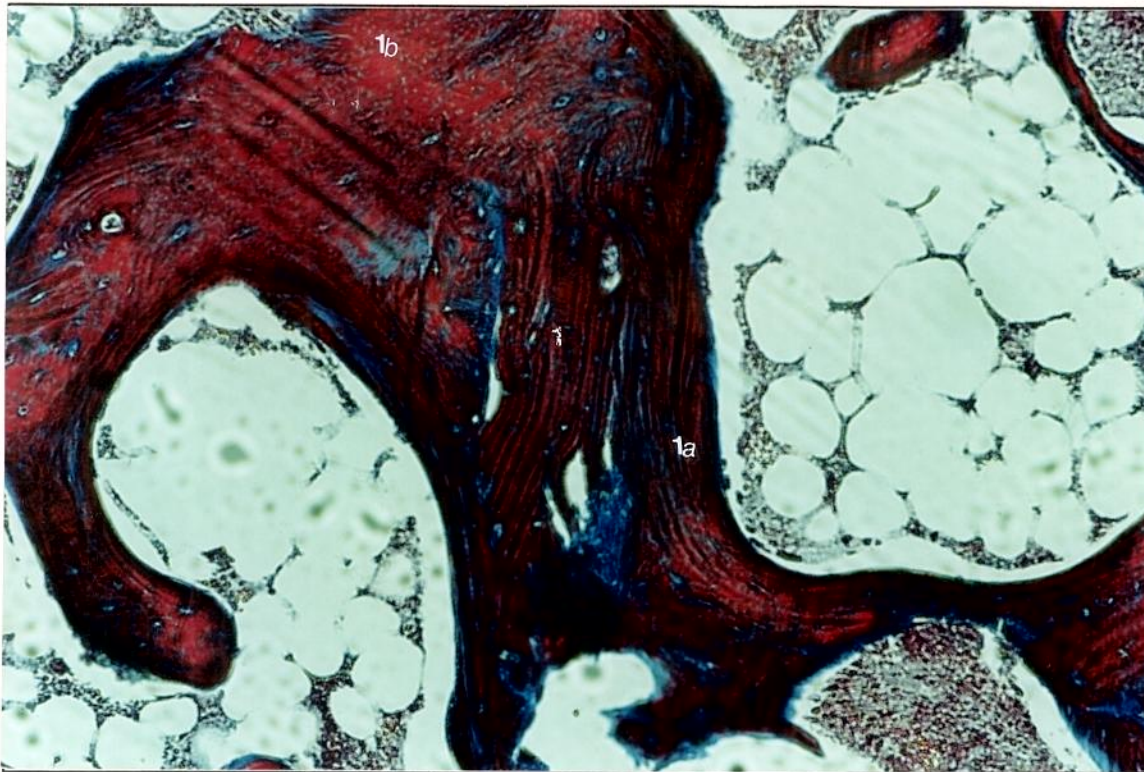


Foto 22: Décima Segunda semana. Fêmur com auto-enxerto. Cão 100, lâmina 189 b1. Coloração Tricrômico de Masson, aumento 128x.

Legenda: 1:- Trabéculas em remodelação (1a-aspecto lamelar, osso secundário. 1b-aspecto neoformado, osso primário).

4.3.1.3. Aspectos histológicos da regeneração óssea do fêmur com aloenxerto.

O processo de regeneração também foi bastante variável e muito semelhante ao do auto-enxerto. As maiores diferenças foram observadas na segunda e sexta semana.

Segunda semana: as diferenças observadas foram: tanto as trabéculas neoformadas como as implantadas apresentavam-se em menor número, as áreas de tecido conjuntivo fibroso, maiores e mais frequentes e a atividade osteoclástica menos intensa (foto 23).

Como no auto-enxerto, foram intensos os processos de osteoindução e osteocondução (foto 24) e as trabéculas neoformadas integravam as trabéculas implantadas entre si e estas às do osso receptor (foto 25).

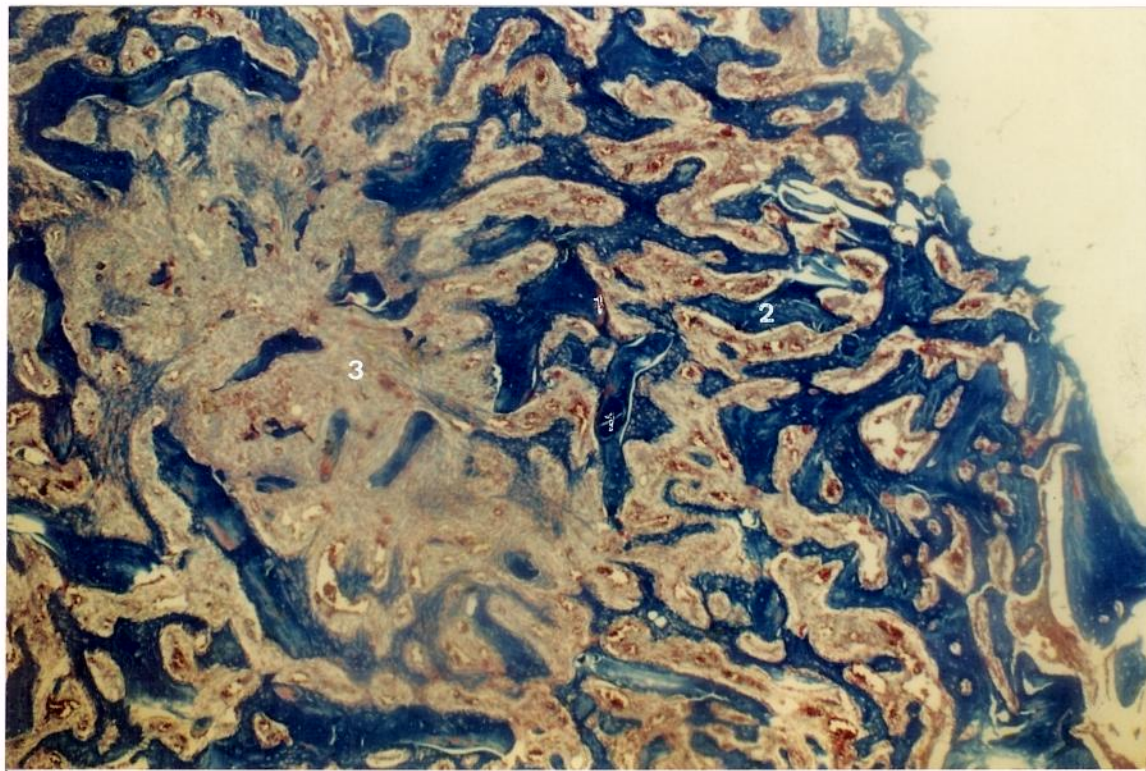


Foto 23: Segunda semana. Fêmur com aloenxerto. Cão 72, lâmina 135 b2. Coloração Tricrômico de Masson, aumento 32x.

Legendas: 1: Trabéculas implantadas, 2:- Trabéculas neoformadas, 3:- Tecido conjuntivo frouxo.

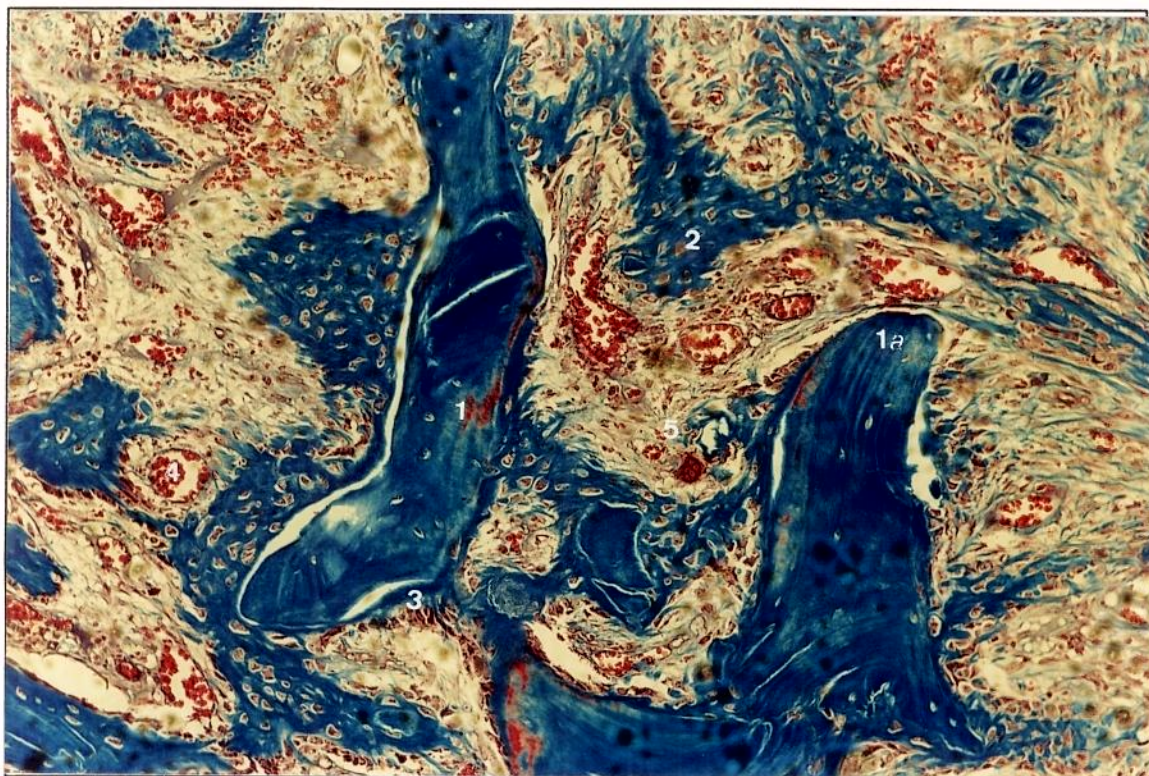


Foto 24: Segunda semana. Fêmur com aloenxerto. Cão 72, lâmina 135 b2. Coloração Tricrômico de Masson, aumento 128x.

Legendas: 1:- Trabéculas implantadas (1a-aspecto lamelar), 2:- Trabéculas neoformadas, 3:- Osteoblastos, 4:- Vasos neoformados, 5:- Tecido conjuntivo frouxo

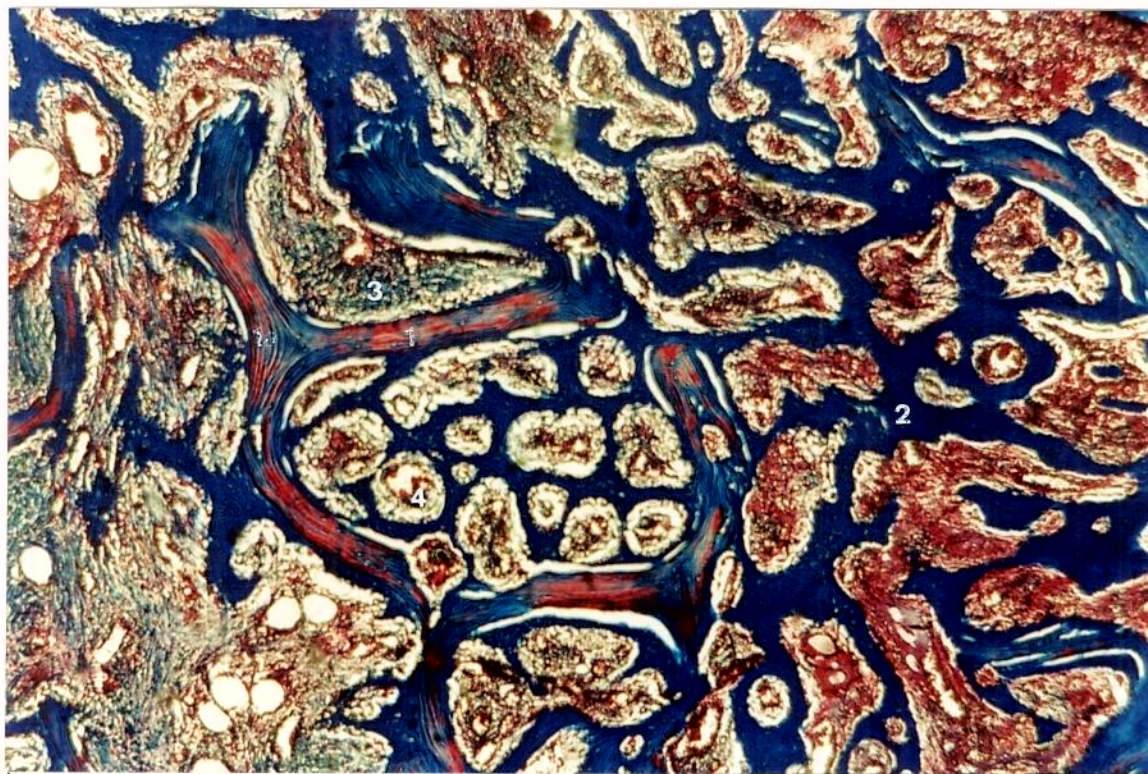


Foto 25: Segunda semana. Fêmur com aloenxerto. Cão 71, lâmina 162 b2. Coloração Tricrômico de Masson, aumento 32x.

Legendas: 1:- Trabéculas implantadas (1a-aspecto lamelar), 2:- Trabéculas neoformadas, 3:- Trabéculas degeneradas, 4:- Vasos neoformados

No espaço intertrabecular, a celularidade também foi intensa, mas com maior número de vasos e maior quantidade de tecido conjuntivo frouxo e de tecido conjuntivo fibroso denso (foto 26).

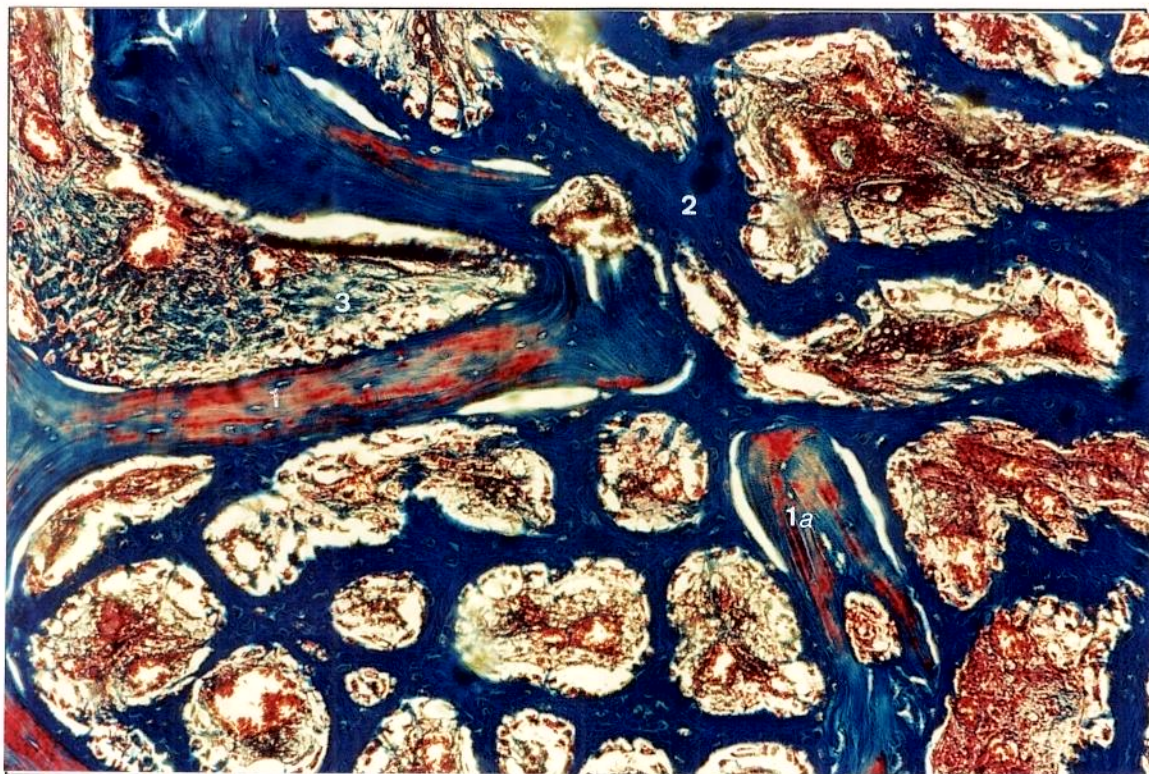


Foto 26: Segunda semana. Fêmur com aloenxerto. Cão 71, lâmina 162 b2. Coloração Tricrômico de Masson, aumento 64x.

Legendas: 1:- Trabéculas implantadas (1a-aspecto lamelar), 2:- Trabéculas neoformadas.
3:- Trabéculas degeneradas.

Quarta semana: assim como no auto-enxerto, diminuiu o número de trabéculas (foto 27), mantendo-se os processos de osteoindução e osteocondução e, como consequência deste último, as trabéculas implantadas estavam revascularizadas e em remodelação (foto 28). Continuou significativa a menor intensidade da atividade osteoclástica.

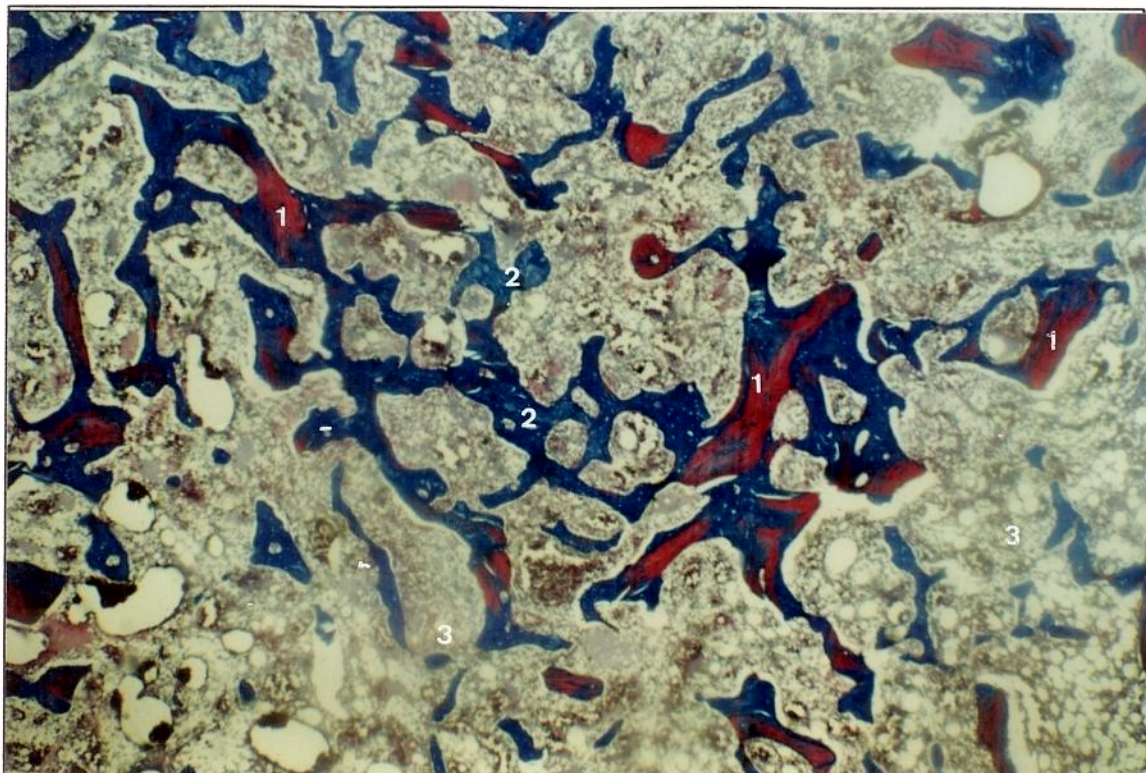


Foto 27: Quarta semana. Fêmur com aloenxerto. Cão 4a, lâmina 141 b2. Coloração Tricrômico de Masson, aumento 32x.

Legendas: 1:- Trabéculas implantadas, 2:- Trabéculas neoformadas, 3:- Tecido conjuntivo frouxo.

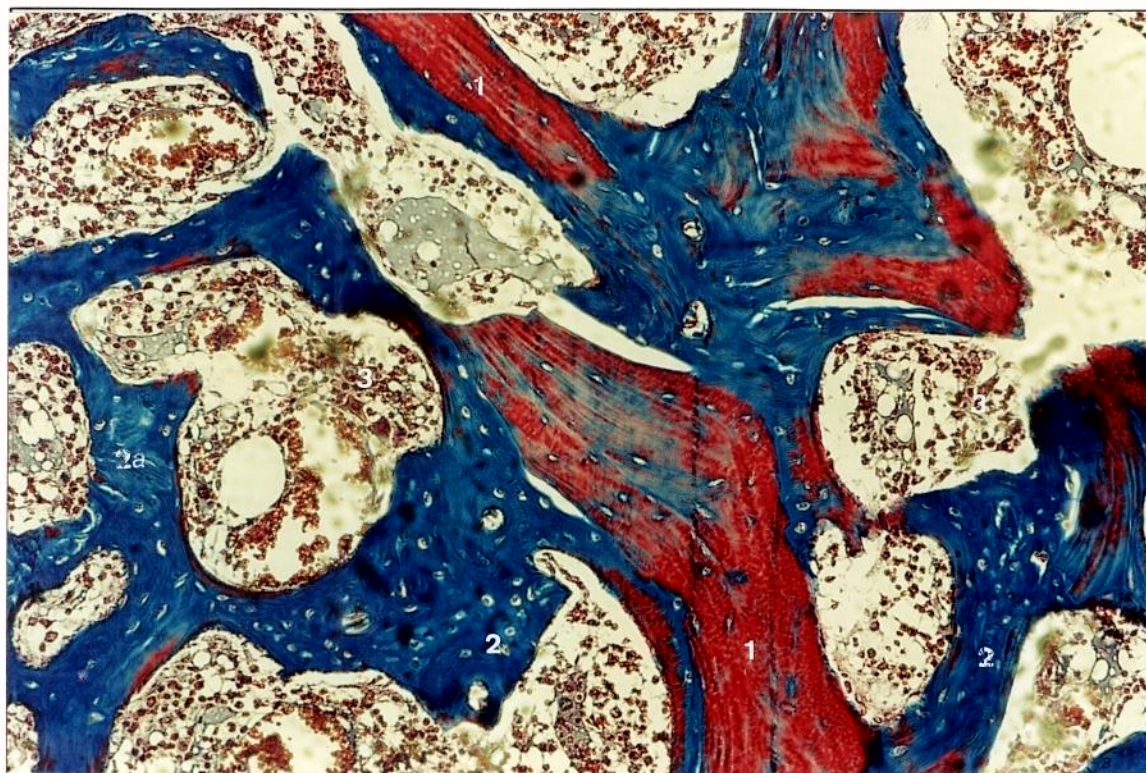


Foto 28: Quarta semana. Fêmur com aloenxerto. Cão 4a, lâmina 141 b2. Coloração Tricrômico de Masson, aumento 128x.

Legendas: 1:-Trabéculas implantadas, 2:-Trabéculas neoformadas (2a-área em remodelação), 3:- Células hematopoiéticas.

Nas áreas em que a remodelação foi mais intensa, a atividade osteoclástica foi mais acentuada, mas menor do que com o auto-enxerto.

Entre as trabéculas, observaram-se células adiposas, que até então estavam ausentes e grande quantidade de vasos. O núcleo de tecido fibroso esteve presente em três cães e maior do que com o auto-enxerto.

Sexta semana: as diferenças com o autoenxerto foram: remodelação das trabéculas em menor intensidade e persistência da osteoindução (Fotos 26 e 27). As trabéculas de aloenxerto estavam preservadas em maior número, o que dava a falsa impressão que este osso era de melhor qualidade

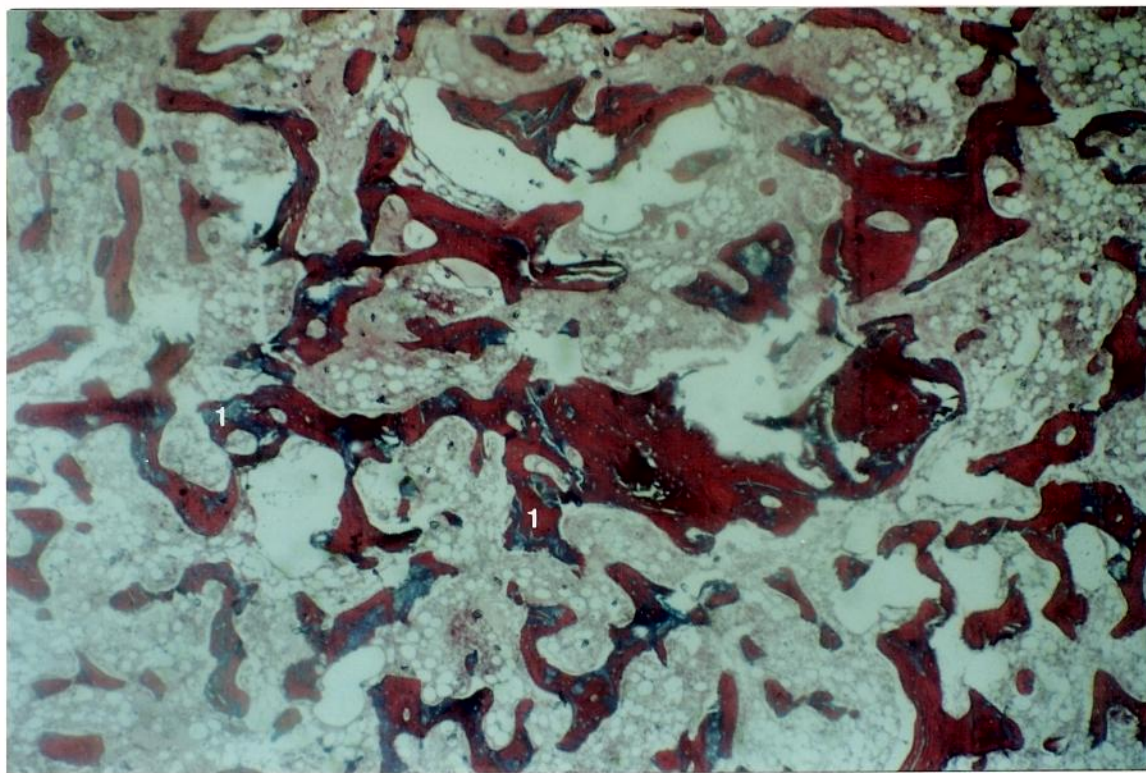


Foto 29: Sexta semana. Fêmur com aloenxerto. Cão 41, lâmina 89 b2. Coloração Tricrômico de Masson, aumento 32x.

Legendas: 1:- Trabéculas em remodelação.

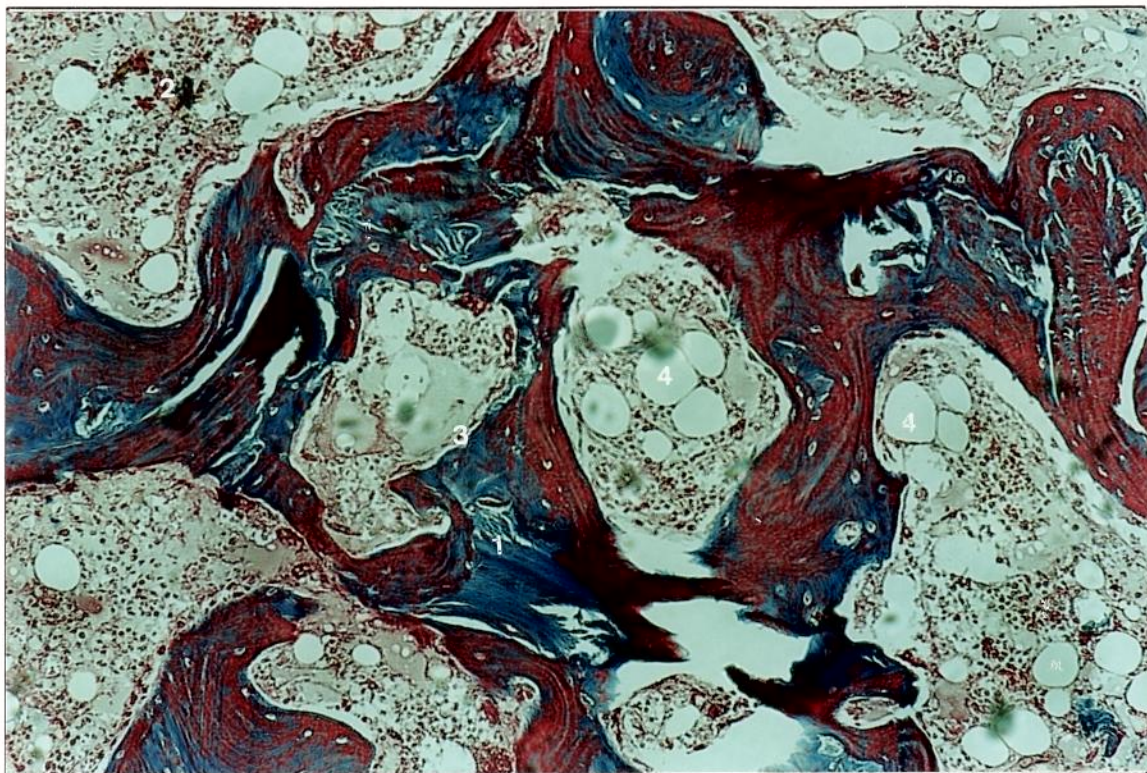


Foto 30: Sexta semana. Fêmur com aloenxerto. Cão 41, lâmina 89 b2. Coloração Tricrômico de masson, aumento 128x.

Legendas: 1:- Trabéculas em remodelação, 2:- Células hematopoiéticas, 3:-Osteoblastos, 4:- Células adiposas.

A atividade osteoclástica se intensificou e tornou-se semelhante à do auto-enxerto. Entre as trabéculas continuava maior a quantidade de vasos e de células hematopoiéticas. Aumentou também a quantidade de células adiposas.

Oitava semana: observou-se que a remodelação das trabéculas não se intensificou como no auto-enxerto e a presença de tecido conjuntivo entre as mesmas foi mais freqüente (fotos 31 e 32). A atividade osteoclástica, que foi menos intensa até a sexta semana, nesta fase tinha a mesma intensidade que a verificada no auto-enxerto. Entre as trabéculas, a celularidade foi maior, com mais vasos, células hematopoiéticas e células adiposas.

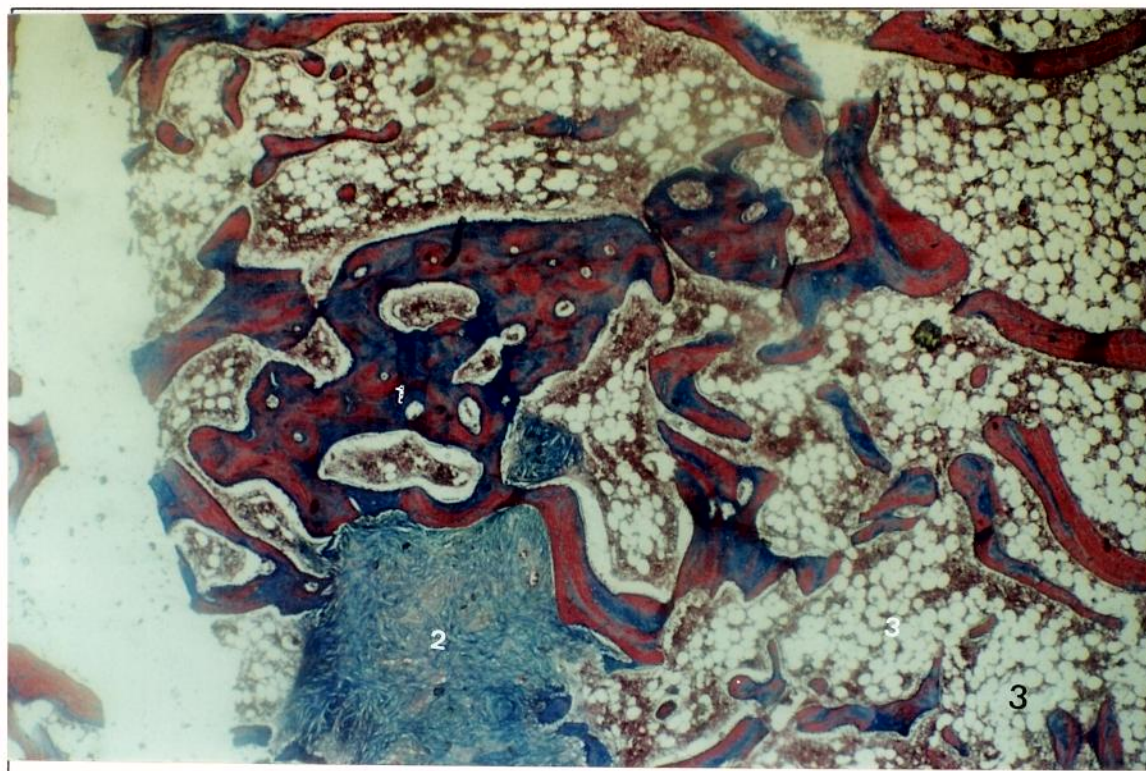


Foto 31: Oitava semana. Fêmur com aloenxerto. Cão 90, lâmina 146 b2. Coloração Tricrômico de Masson, aumento 32x.

Legendas: 1:- Trabéculas em remodelação, 2:-Núcleo tecido conjuntivo fibroso 3:- Células adiposas.

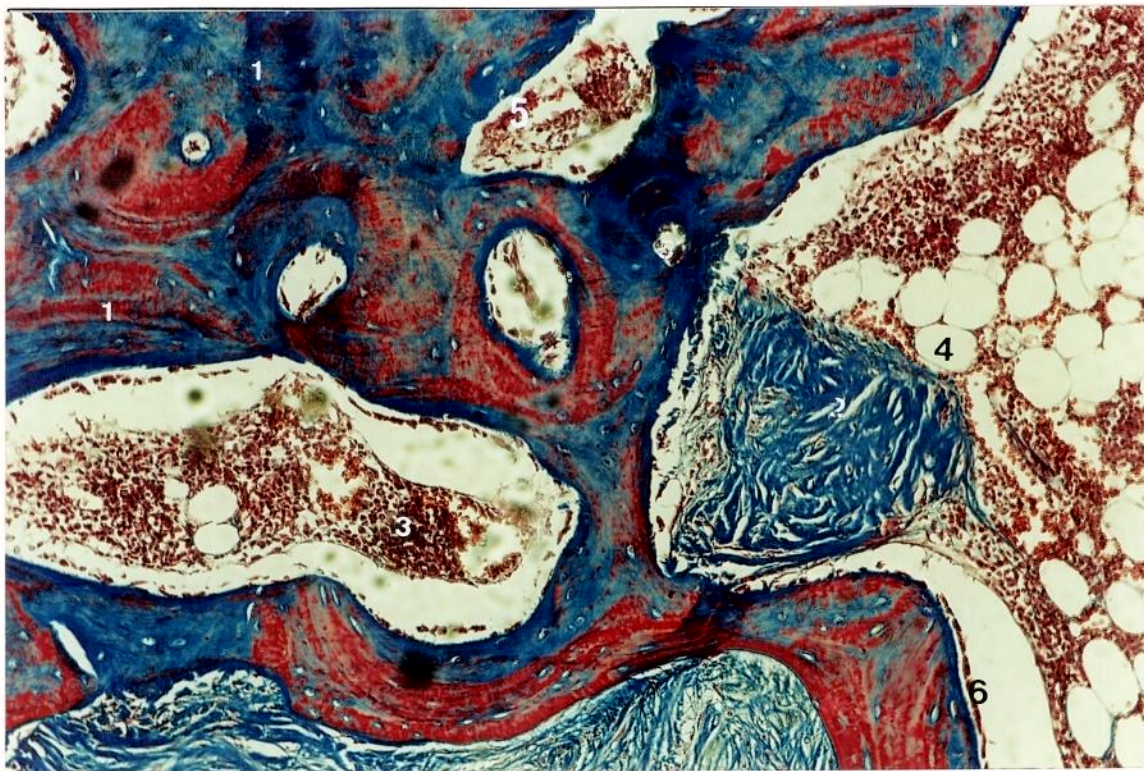


Foto 32: Oitava semana. Fêmur com aloenxerto. Cão 90, lâmina 146 b2. Coloração Tricrômico de Masson, aumento 128x.

Legendas: 1:- Trabéculas em remodelação, 2:- Núcleo de tecido conjuntivo fibroso 3:- Células hematopoiéticas, 4:- Células adiposas, 5:- Vasos neoformados, 6:- Osteoblastos.

Décima segunda semana: os aspectos com os dois enxertos foram muito semelhantes. As trabéculas dessa área, também, estavam desorganizadas e em grande número (fotos 33 e 34). Sua remodelação estava presente, de forma mais evidente (foto 35) e ainda havia sinais de neoformação óssea sobre elas (foto 36).

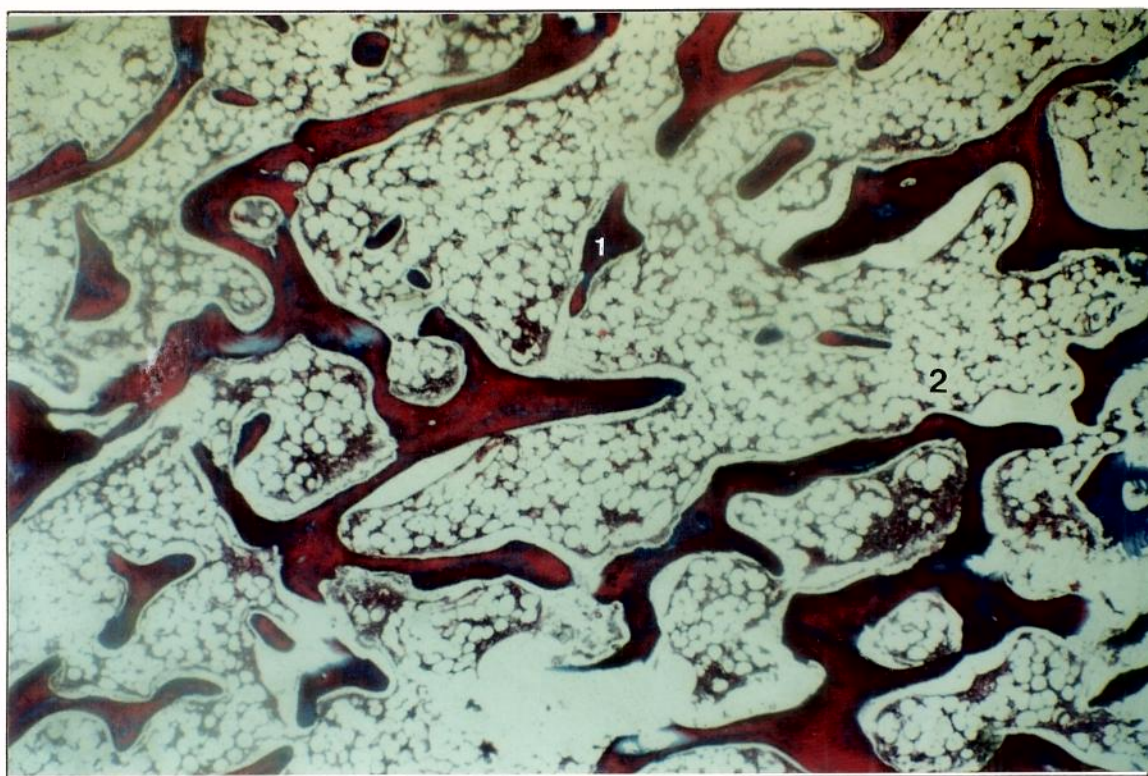


Foto 33: Décima segunda semana. Fêmur com aloenxerto. Cão 100, lâmina 28 b2.
Coloração Tricrômico de Masson, aumento 32x.
Legendas: 1:- Trabéculas desarranjadas, 2:- Células adiposas

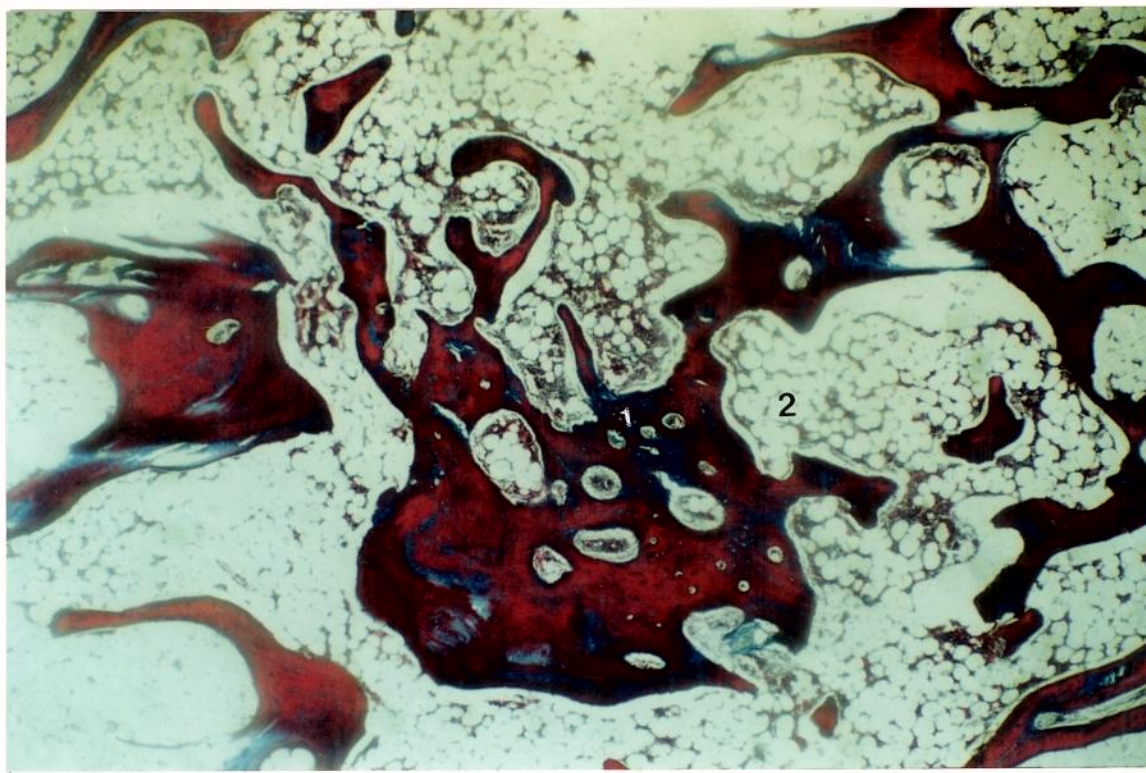


Foto 34: Décima segunda semana. Fêmur com aloenxerto. Cão 100, lâmina 28 b2.
Coloração Tricrômico de Masson, aumento 32x.
Legendas: 1:- Trabéculas em remodelação, 2: Células adiposas

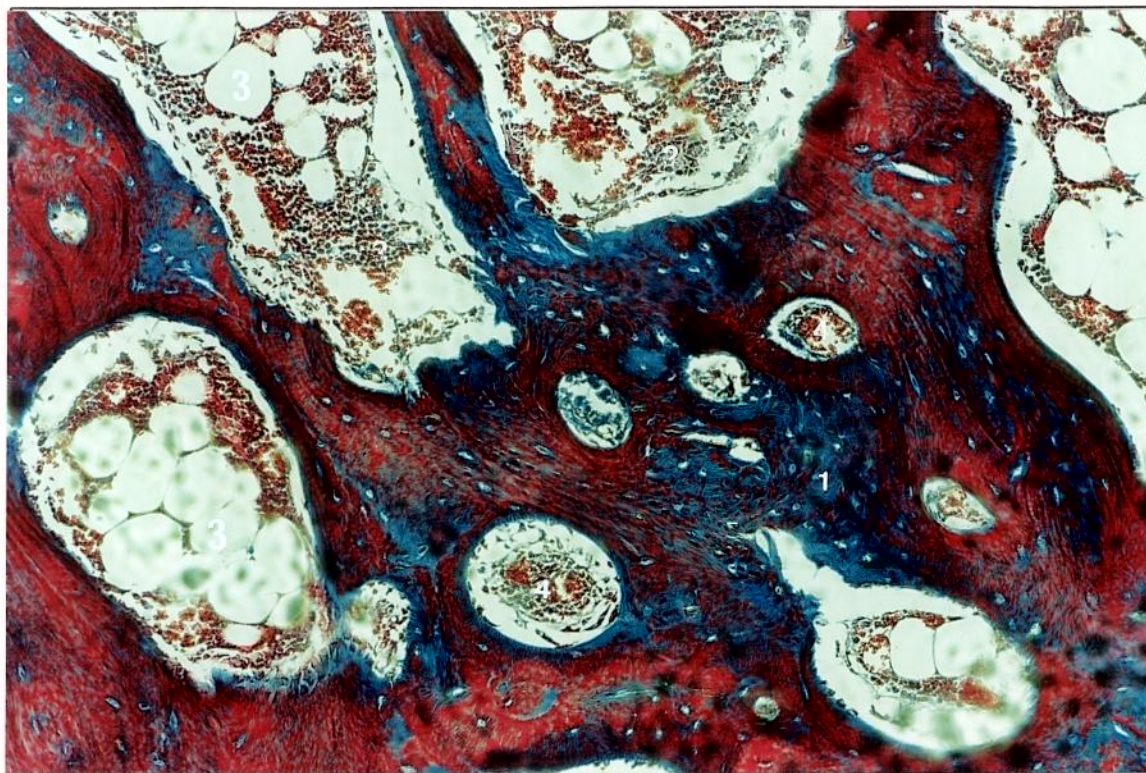


Foto 35: Décima segunda semana. Fêmur com aloenxerto. Cão 100, lâmina 28 b2.
 Coloração Tricrômico de Masson, aumento 128x.

Legendas: 1:- Trabécula em remodelação 2:- Células hematopoiéticas, 3:- Células adiposas,
 4:- Vasos neoformados.

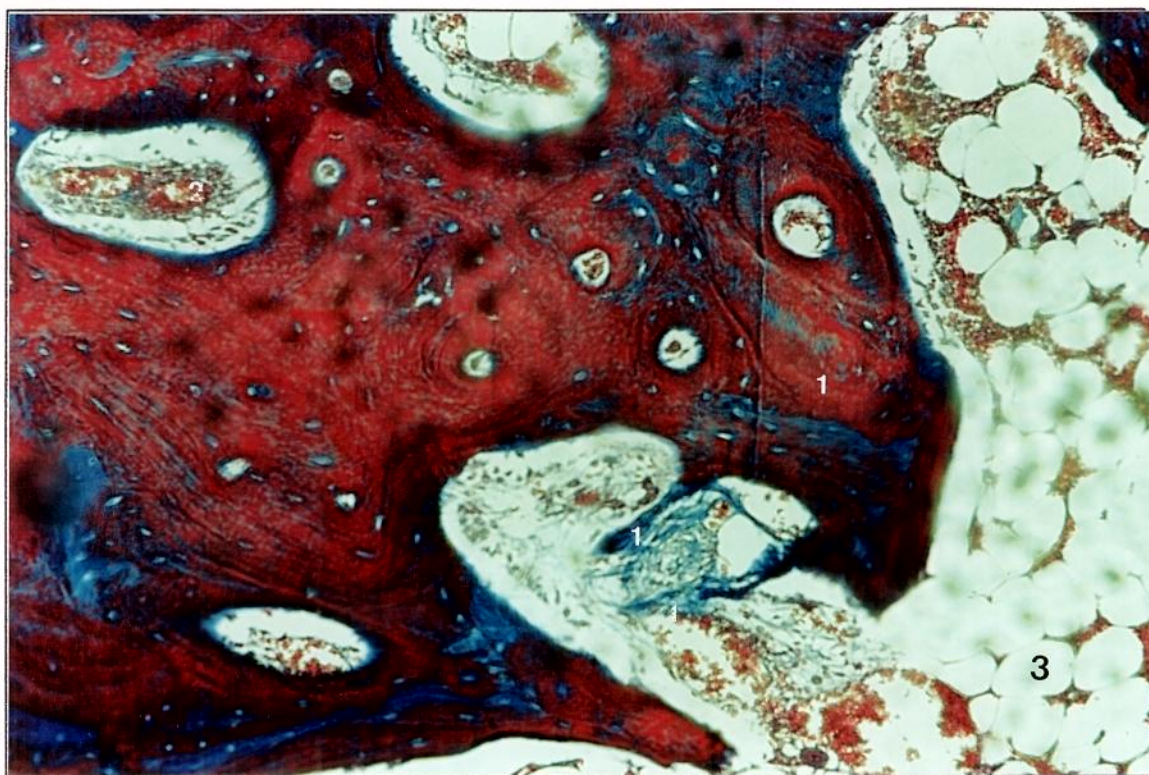


Foto 36: Décima segunda semana. Fêmur com aloenxerto. Cão 100, lâmina 28 b2.
Coloração Tricrômico de Masson, aumento 64x.

Legendas: 1:- Espícula em remodelação com neoformação óssea, 2:- Vasos, 3:- Células adiposas-

4.3.2. RESULTADOS DA ANÁLISE QUANTITATIVA

Os resultados da análise morfométrica (quantitativa), realizada no grupo de cães sacrificados na décima segunda semana de pós-operatório (grupo 5), estão nas tabelas de 1 a 6.

Nestas tabelas têm-se, também, as frações de volume ocupada pelas trabéculas ósseas, no defeito ósseo produzido, neste grupo de cães.

TABELA 1:- Resultado da análise morfométrica do cão 77 (grupo 5).

CAO 77			
TÍBIA DIREITA	CORTE I	CORTE II	Ppi =4,00%
	CAMPOS =VALORES	CAMPOS =VALORES	
	1 = 0	1 = 1	
	2 = 0	2 = 1	
	3 = 0	3 = 2	
	4 = 1	4 = 2	
	5 = 2	5 = 1	
	TOTAL = 3	TOTAL = 7	
TÍBIA ESQUERDA	CORTE I	CORTE II	Ppi = 8,80%
	CAMPOS =VALORES	CAMPOS =VALORES	
	1 = 1	1 = 2	
	2 = 6	2 = 3	
	3 = 2	3 = 2	
	4 = 2	4 = 1	
	5 = 2	5 = 1	
	TOTAL = 13	TOTAL = 9	
FÊMUR COM AUTO-ENXERTO	CORTE I	CORTE II	Ppi =26,40%
	CAMPOS =VALORES	CAMPOS =VALORES	
	1 = 4	1 = 11	
	2 = 9	2 = 7	
	3 = 4	3 = 5	
	4 = 4	4 = 6	
	5 = 5	5 = 11	
	TOTAL = 26	TOTAL = 40	
FÊMUR COM ALOENXERTO	CORTE I	CORTE II	Ppi =24,80%
	CAMPOS =VALORES	CAMPOS =VALORES	
	1 = 6	1 = 7	
	2 = 8	2 = 6	
	3 = 6	3 = 4	
	4 = 8	4 = 7	
	5 = 5	5 = 5	
	TOTAL = 33	TOTAL = 29	

LEGENDAS: 1,2,3,4,5=Campos Histológicos Analisados.

CORTE I: CORTE SUPERFICIAL

CORTE II: CORTE PROFUNDO

TABELA 2:- Resultados da análise morfométrica do cão 120 (grupo 5).

CÃO 120			
TÍBIA DIREITA	CORTE I	CORTE II	Ppi = 14,00%
	CAMPOS =VALORES	CAMPOS =VALORES	
	1 = 3	1 = 4	
	2 = 6	2 = 1	
	3 = 4	3 = 2	
	4 = 1	4 = 6	
TÍBIA ESQUERDA	5 = 3	5 = 5	Ppi=14,00%
	TOTAL = 17	TOTAL = 18	
	CORTE I	CORTE II	
	CAMPOS =VALORES	CAMPOS =VALORES	
	1 = 5	1 = 5	
	2 = 4	2 = 4	
FÊMUR COM AUTO-ENXERTO	3 = 2	3 = 2	Ppi=14,00%
	4 = 3	4 = 5	
	5 = 3	5 = 2	
	TOTAL = 17	TOTAL = 18	
	CORTE I	CORTE II	
	CAMPOS =VALORES	CAMPOS =VALORES	
FÊMUR COM ALOENXERTO	1 = 6	1 = 1	Ppi=22,00%
	2 = 6	2 = 3	
	3 = 2	3 = 4	
	4 = 6	4 = 3	
	5 = 1	5 = 3	
	TOTAL = 21	TOTAL = 14	
FÊMUR COM ALOENXERTO	CORTE I	CORTE II	Ppi=22,00%
	CAMPOS =VALORES	CAMPOS =VALORES	
	1 = 4	1 = 3	
	2 = 6	2 = 7	
	3 = 5	3 = 3	
	4 = 6	4 = 6	
FÊMUR COM ALOENXERTO	5 = 12	5 = 3	Ppi=22,00%
	TOTAL = 33	TOTAL = 22	

LEGENDAS: 1,2,3,4,5=Campos Histológicos Analisados.

CORTE I: CORTE SUPERFICIAL

CORTE II: CORTE PROFUNDO

TABELA 3:- Resultados da análise morfométrica do cão 100 (grupo 5).

CÃO 100			
TÍBIA DIREITA	CORTE I	CORTE II	Ppi=5,60%
	CAMPOS =VALORES	CAMPOS =VALORES	
	1 = 0	1 = 2	
	2 = 2	2 = 1	
	3 = 1	3 = 3	
	4 = 1	4 = 2	
	5 = 0	5 = 2	
	TOTAL = 4	TOTAL = 10	
TÍBIA ESQUERDA	CORTE I	CORTE II	Ppi=5,60%
	CAMPOS =VALORES	CAMPOS =VALORES	
	1 = 0	1 = 2	
	2 = 2	2 = 1	
	3 = 1	3 = 3	
	4 = 1	4 = 2	
	5 = 0	5 = 2	
	TOTAL = 4	TOTAL = 10	
FÊMUR COM AUTO-ENXERTO	CORTE I	CORTE II	Ppi=29,20%
	CAMPOS =VALORES	CAMPOS =VALORES	
	1 = 7	1 = 9	
	2 = 3	2 = 7	
	3 = 8	3 = 6	
	4 = 9	4 = 8	
	5 = 8	5 = 8	
	TOTAL = 35	TOTAL = 38	
FÊMUR COM ALOENXERTO	CORTE I	CORTE II	Ppi=27,20 %
	CAMPOS =VALORES	CAMPOS =VALORES	
	1 = 9	1 = 5	
	2 = 6	2 = 7	
	3 = 10	3 = 5	
	4 = 6	4 = 7	
	5 = 9	5 = 4	
	TOTAL = 40	TOTAL = 28	

LEGENDAS: 1,2,3,4,5=Campos Histológicos Analisados.

CORTE I: CORTE SUPERFICIAL

CORTE II: CORTE PROFUNDO

TABELA 4:- Resultados da análise morfométrica do cão 33 (grupo 5).

CÃO 33			
TÍBIA DIREITA	CORTE I	CORTE II	Ppi=6,00%
	CAMPOS =VALORES	CAMPOS =VALORES	
	1 = 4	1 = 1	
	2 = 4	2 = 0	
	3 = 3	3 = 0	
	4 = 2	4 = 0	
	5 = 1	5 = 0	
	TOTAL =14	TOTAL = 1	
TÍBIA ESQUERDA	CORTE I	CORTE II	Ppi=6,00%
	CAMPOS =VALORES	CAMPOS =VALORES	
	1 = 1	1 = 0	
	2 = 1	2 = 1	
	3 = 1	3 = 0	
	4 = 4	4 = 1	
	5 = 5	5 = 1	
	TOTAL = 12	TOTAL = 3	
FÊMUR COM AUTO-ENXERTO	CORTE I	CORTE II	Ppi =18,40%
	CAMPOS =VALORES	CAMPOS =VALORES	
	1 = 6	1 = 4	
	2 = 5	2 = 4	
	3 = 5	3 = 4	
	4 = 6	4 = 4	
	5 = 5	5 = 3	
	TOTAL = 27	TOTAL = 19	
FÊMUR COM ALOENXERTO	CORTE I	CORTE II	Ppi=24,80%
	CAMPOS =VALORES	CAMPOS =VALORES	
	1 = 6	1 = 5	
	2 = 5	2 = 7	
	3 = 7	3 = 6	
	4 = 6	4 = 7	
	5 = 8	5 = 5	
	TOTAL =32	TOTAL =30	

LEGENDAS: 1,2,3,4,5=Campos Histológicos Analisados.

CORTE I: CORTE SUPERFICIAL

CORTE II: CORTE PROFUNDO

TABELA 5:- Resultados da análise morfométrica do cão 5 (grupo 5).

CAO 5			
TÍBIA DIREITA	CORTE I	CORTE II	Ppi=19,20%
	CAMPOS =VALORES	CAMPOS =VALORES	
	1 = 3	1 = 7	
	2 = 7	2 = 2	
	3 = 4	3 = 1	
	4 = 7	4 = 5	
	5 = 5	5 = 7	
	TOTAL = 26	TOTAL = 22	
TÍBIA ESQUERDA	CORTE I	CORTE II	Ppi=10,00%
	CAMPOS =VALORES	CAMPOS =VALORES	
	1 = 1	1 = 2	
	2 = 4	2 = 3	
	3 = 2	3 = 3	
	4 = 2	4 = 2	
	5 = 2	5 = 4	
	TOTAL = 11	TOTAL = 14	
FÊMUR COM AUTO-ENXERTO	CORTE I	CORTE II	Ppi = 24,4%
	CAMPOS =VALORES	CAMPOS =VALORES	
	1 = 4	1 = 3	
	2 = 8	2 = 5	
	3 = 7	3 = 6	
	4 = 7	4 = 5	
	5 = 9	5 = 7	
	TOTAL = 35	TOTAL = 26	
FÊMUR COM ALOENXERTO	CORTE I	CORTE II	Ppi=21.20%
	CAMPOS =VALORES	CAMPOS =VALORES	
	1 = 6	1 = 4	
	2 = 8	2 = 3	
	3 = 8	3 = 7	
	4 = 0	4 = 7	
	5 = 6	5 = 4	
	TOTAL = 28	TOTAL = 25	

LEGENDAS: 1,2,3,4,5=Campos Histológicos Analisados.

CORTE I: CORTE SUPERFICIAL

CORTE II: CORTE PROFUNDO

TABELA 6 - Valores das frações de volume ocupado pelas trabéculas ósseas na décima segunda semana (grupo 5).

	TÍBIAS D/E	FÊMUR COM AUTO- ENXERTO	FÊMUR COM ALOENXERTO
CÃO 77	6,40%	26,40%	24,80%
CÃO 120	14,00%	14,00%	22,00%
CÃO 100	5,60%	29,20%	27,20%
CÃO 33	6,00%	18,40%	24,80%
CÃO 5	14,60%	24,40%	21,20%
MÉDIAS	9,32%	22,48%	24,02%

4.4. RESULTADOS DA ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS VALORES DAS FRAÇÕES DE VOLUME OCUPADA PELAS TRABÉCULAS ÓSSEAS NA DÉCIMA SEGUNDA SEMANA DE REGENERAÇÃO (GRUPO 5).

Para verificar a diferença entre valores das frações de volume ocupada pelas trabéculas ósseas, cujos dados constam da tabela 6, utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado com 3 tratamentos (tíbias direita e esquerda, fêmur com autoenxerto e fêmur com aloenxerto) e 5 repetições (cães).

Como os dados obtidos são em forma de proporções, uma transformação foi necessária, a fim de estabilizar a variabilidade dos mesmos e submete-los à Análise de Variância (Quadro II). Feita a Análise da Variância evidenciou-se diferença significativa entre as Frações de Volume ocupadas pelas trabéculas presentes na regeneração mediada por autoenxerto e aloenxerto e a Fração de Volume ocupada pelas trabéculas da regeneração espontânea.

Quadro II

ANÁLISE DA VARIAÇÃO DA VARIÁVEL TRANSFORMADA

FONTE	GRAU DE LIBERDADE	SOMA DOS QUADRADOS	MÉDIA DOS QUADRADOS	F
OSSOS	2	0,13164931	0,06582465	15,70** (p< 0.01)
ERRO	12	0,05031828	0,00419319	
TOTAL	14			

**Significativo a 1%.

CV=Porcentagem de variação do modelo=14,87

R2=Coeficiente de ajustamento=0,723477

Utilizando-se o Teste de Tukey tem-se que as Frações de Volume ocupada pelas trabéculas ósseas presentes na regeneração com auto-enxerto e aloenxerto não diferem significativamente entre si, como pode ser visto no Quadro III.

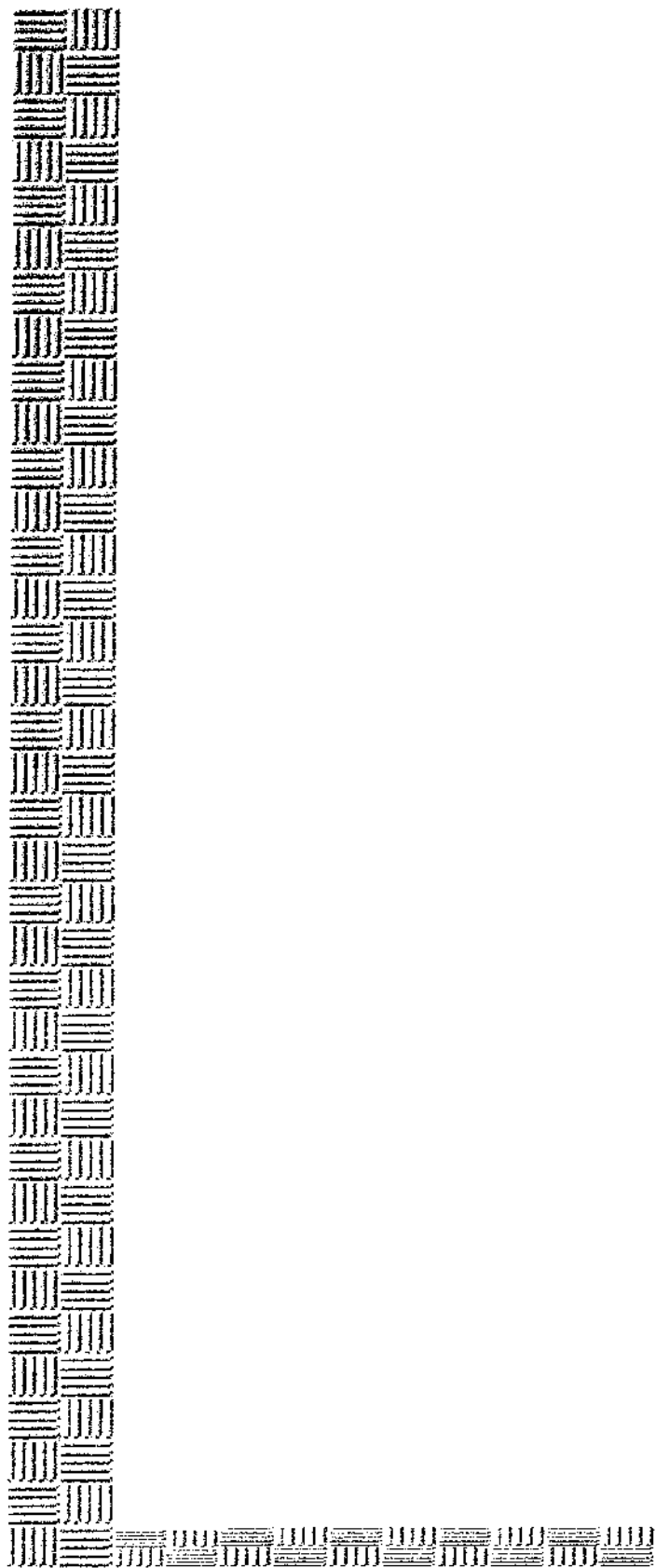
Quadro III

TESTE DE TUKEY

TRATAMENTO	MÉDIA	TESTE
ALOENXERTO	24,02	A
AUTO-ENXERTO	22,48	A
TÍBIAS	9,32	B

MÉDIAS SEGUIDAS DA MESMA LETRA NÃO DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE.

A aplicação do Teste de Tukey nas variáveis transformadas segue o mesmo critério para as variáveis originais.



5. Discussão

5.1. MODELO EXPERIMENTAL

Para se avaliar como ocorre a neoformação e a reparação óssea, a escolha do modelo experimental a ser utilizado é de fundamental importância. Nos estudos de osteoindução vários modelos tem sido utilizados e os materiais testados implantados em diferentes locais: subcutâneo (REDDI & ANDERSON, 1976; RAY & SABET, 1963), intramuscular (URIST, 1965), bainha de tecido conjuntivo (CHALMERS, et al. 1975), câmara anterior do olho (AMLER, 1984) e ossos das extremidades (LANE & SHANDU, 1987; ZILCH & WOLF, 1987).

Nos estudos de reparação de defeitos ósseos, também têm sido empregados diferentes modelos, em diferentes ossos: tábua craniana (RAY & HOLLOWAY, 1957; OKLUND, et al. 1986; SCHMITZ & HOLLINGER, 1986), mandíbula (MARX et al. 1984) e extremidades (HEIPLE et al. 1963; ENNEKING et al. 1975; SCHMITZ & HOLLINGER, 1986). Atributo fundamental destes modelos é sua reprodutividade, sem a qual o experimento carece de verdade científica.

Quando o osso cortical é o objetivo da pesquisa, alguns autores julgam que o modelo experimental deve alterar a estrutura óssea. Para se alterar a estrutura do osso cortical é necessário que se crie defeito que tenha a extensão de uma vez e meia o diâmetro da diáfise do osso em questão (ENNEKING et al. 1975; HEIPLE et al. 1963; HEIPLE et al. 1987). Segundo tais autores, caso o defeito não tenha esta extensão, qualquer enxerto seria incorporado em maior ou menor tempo. Não se criaria na região potencial de não união, que é fundamental para se testar a eficácia do material que se está avaliando. Outros autores realizam pesquisas em situações estáveis em que a estrutura não é comprometida (GRECO et al. 1989; MARX et al. 1984; MULLIKEN et al. 1984; OKLUND et al. 1986).

É nossa opinião, que aquele conceito é coerente, quando o objetivo é o da correção de um defeito segmentar. Quando o objetivo é estudar biologicamente o estímulo à reparação de uma falha óssea e se usa, por exemplo, enxerto ósseo esponjoso,

fragmentado, cuja maior propriedade é a osteogenicidade, a criação de tal modelo é desnecessária.

Pensamos que, neste modelo, devem-se eliminar dois tipos de fatores: os que tragam instabilidade à região e os que predisponham à infecção. São os que, mais frequentemente, influem nos resultados dos experimentos, na medida em que inibem a regeneração óssea.

Nesse experimento, o modelo utilizado mostrou-se facilmente reproduzível e com poucas possibilidades de complicações. Nele, não há instabilidade na área de regeneração e, com os cuidados adotados, não tivemos nenhum caso de infecção óssea. Os dois casos de deiscência de sutura e o de infecção no subcutâneo, que foi prontamente debelada com o tratamento instituído, não influenciaram no resultado histológico.

Os fêmures foram utilizados para colocação dos enxertos e as tíbias, como controles, porque experimento piloto, realizado previamente, mostrou que a regeneração óssea espontânea é semelhante nestes dois ossos.

Este modelo foi útil para avaliar os objetivos aqui propostos: testar-se a efetividade das condições de estocagem do banco de ossos e, também, se determinar como ocorre, histologicamente, a regeneração óssea com o uso de enxertos.

5.2. ANIMAL DE EXPERIMENTAÇÃO

Quanto aos animais de experimentação, os cães (HEIPLE et al. 1963; ENNEKING et al. 1975; LANE & SHANDU, 1987) e os roedores (URIST et al. 1983; MULLIKEN et al. 1984) têm sido os mais empregados. Para HEIPLE et al. (1987) os cães são os mais indicados porque apresentam regeneração óssea semelhante à do homem. Os roedores têm capacidade de regeneração óssea maior que os homens, portanto apesar das facilidades com o manejo destes animais, não são os ideais.

Escolhemos o cão, pelas razões acima e pelas facilidades oferecidas pelo Núcleo de Medicina Experimental da FCM-UNICAMP para se trabalhar com este animal.

Há um ponto importante a ser discutido. Não se dispunham de animais padronizados quanto à raça, peso e idade. Entretanto, são animais com essas características que o Biotério da UNICAMP pôde fornecer. Dentro do que se pôde observar, estas variáveis não tiveram influência nos resultados obtidos.

5.3. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO

Quanto às formas de avaliação dos resultados, as técnicas mais utilizadas são: histológica (TURNER, BASSET, SAWYER, 1955; HEIPLE et al. 1963; ENNEKING et al. 1975; BOS et al. 1983; CUMMINE et al. 1983; MULLIKEN et al. 1984; MARX et al. 1984; BURCHARDT, 1987; GOLDBERG & STEVENSON, 1987; LANE & SHANDU, 1987; ZILCH & WOLF, 1987; TURK et al. 1993) e radiológicas (TURNER et al. 1955; ENNEKING et al. 1975; BOS et al. 1983; LANE & SHANDU, 1987;). São utilizados ainda testes de torsão (ENNEKING et al. 1975; LANE & SHANDU, 1987) e testes de atividade biológica, para se medir o reparo do osso transplantado (ENNEKING et al. 1975, LANE & SHANDU, 1987).

Utilizaram-se a histologia e a radiologia porque, usualmente, estas duas técnicas fornecem dados adequados à interpretação do objetivo do estudo e são as mais utilizadas nestes experimentos.

5.4. RESULTADOS RADIOLÓGICOS

Não foi possível se quantificar os resultados radiológicos. Entretanto, ficaram claras as diferenças entre as tíbias e fêmures. Na oitava semana, os fêmures apresentavam-se com a regeneração praticamente concluída, ao passo, que nas tíbias a

regeneração era somente parcial. Como dado para avaliação da regeneração, o valor foi muito limitado, entretanto, o estudo foi útil para nos auxiliar na preparação das peças histológicas. A partir da oitava semana foi difícil a localização macroscópica do defeito. Colocando-se a peça anatômica dos fêmures junto às chapas radiográficas, foi possível, estabelecerem-se os locais dos defeitos e fazer os cortes com maior segurança.

Mesmo nos dois cães em que foi difícil a localização dos defeitos pelas radiografias, a análise conjunta da peça e da chapa, possibilitou o corte no local correto, confirmado posteriormente pela microscopia.

5.5. RESULTADOS HISTOLÓGICOS

Poucos experimentos de enxertia óssea, que avaliaram a capacidade de regeneração e de osteoindução dos aloenxertos, foram feitos com enxertos fragmentados e de pequenas proporções (RAY & HOLLAWAY, 1957; MARX et al. 1984; GRECO et al. 1989). A maior parte dessas pesquisas foi realizada com enxertos segmentares (HEIPLE et al. 1963; ENNEKING et al. 1975; BOS et al. 1983; BURCHARDT, 1987; LANE & SHANDU, 1987).

Nos últimos anos as pesquisas que avaliaram a osteoindução, na grande maioria das vezes, empregaram materiais como: matriz óssea desmineralizada (THIELEMAN et al. 1982; GREEN, HINTON, TRIFFITT, 1986; ISAKSSON & ALBERIUS, 1992), matriz óssea desmineralizada em pó (REDDI, 1983; ALPER et al. 1989), derivados protéicos da matriz óssea (URIST, De LANGE, FINERMAN, 1983; DOLL et al. 1990), derivados da medula óssea (AMLER, 1984), coágulo de fibrina (GRECO et al. 1988), hidróxiapatita e derivados (ALPER et al. 1989; DOLL et al. 1990; TURK et al. 1993; AMLER, 1987). Das que utilizaram enxertos fragmentados (RAY & HOLLAWAY, 1957; MARX et al. 1984; GRECO et al. 1989; OKLUND, 1986), nenhuma comparou auto-enxerto e aloenxerto e em nenhuma dessas o local do implante foi a metáfise do fêmur. RAY & HOLLAWAY (1957) utilizaram aloenxerto de pequenas proporções e congelado, entretanto, este modelo

experimental criou defeito na calota craniana de rato. MARX et al. (1984), embora o tenham usado congelado, utilizaram na sua pesquisa fragmentos de maiores proporções e implantados na mandíbula de cães. GRECO et al. (1989), além de empregarem enxertos de grandes proporções, implantaram-no na diáfise proximal da tíbia de cães. Todos esses fatos são determinantes de resultados, o que torna tais pesquisas diferentes da nossa. O objetivo desses experimentos foi o mesmo, entretanto, os procedimentos diferiram entre si. Devido ao fato de não se encontrar, na literatura, modelo experimental semelhante, torna-se difícil a comparação dos resultados desse trabalho com os citados. No entanto, em razão da importância de certas semelhanças e diferenças observadas, alguns comentários sobre elas se farão necessários.

Com os resultados que foram obtidos, pode-se dizer que, em toda regeneração, há uma sequência de eventos que se sucedem, estabelecendo um padrão. No entanto, há variações de animal para animal e mesmo entre cortes de um mesmo osso. Esses padrões são observados, quer quando a regeneração ocorre espontaneamente, quer com o uso de enxertos. Tais fatos também já foram observados na literatura, tanto com os enxertos segmentares (HEIPLE et al. 1963; ENNEKING et al. 1975; BURCHARDT, 1987; LANE & SHANDU, 1987), como com os fragmentados (RAY & HOLLAWAY, 1957; MARX et al. 1984; GRECO et al. 1989).

Quando se utilizam enxertos, a sequência de eventos está relacionada à sua rápida revascularização, à substituição de áreas necrosadas, aos processos de osteoindução, de osteocondução e à remodelação das trabéculas neoformadas e implantadas. Embora, esses processos tenham sido muito semelhantes aos relatados na literatura, neste experimento foram observados fatos extremamente interessantes.

Quando se examinou o material histológico chamou a atenção o fato da regeneração óssea, produzida por aloenxerto, parecer melhor do que aquela produzida por auto-enxerto. Este aspecto ficou evidente da segunda à oitava semanas. Na segunda e quarta semanas a atividade osteoclástica era muito mais intensa com o auto-enxerto; o mesmo ocorreu com a remodelação trabecular entre a sexta e oitava semanas, o que deu

aparência de maior destruição das trabéculas de auto-enxerto. Tinha-se a impressão de que as trabéculas de aloenxerto estavam mais preservadas, pois tinham melhor aspecto. Obviamente, isso se contrapõe a tudo o que existe descrito na literatura (HEIPLE et al. 1963; PROLO & RODRIGO, 1985; BURCHARDT, 1987; SCHWEIBERER et al. 1989). O padrão máximo de regeneração óssea aceito é o produzido pelo auto-enxerto e é o que, empiricamente, se espera.

À medida que se reestudou e se reanalisou o material, as diferenças entre os vários animais e cortes de um mesmo osso foram melhor compreendidas. Os processos de regeneração óssea com os dois enxertos foram muito semelhantes. Entretanto, alguns fenômenos ocorreram em ritmos diferentes, sendo mais rápidos com o auto-enxerto, o que torna sua integração mais precoce. Esta regeneração mais rápida e mais eficaz foi o que diferenciou uma regeneração da outra. Ficou evidente que o auto-enxerto é reintegrado ao leito mais rapidamente, pois não existe reação imunológica a vencer; assim, o osso retorna ao estado inicial mais precocemente. A integração do aloenxerto começa mais tarde e demora mais a chegar ao mesmo estado pré-operatório; razão pela qual ainda existe trabéculas implantadas se remodelando às 12 semanas.

Esta diferença, é o que explica a osteoindução observada até a quarta semana com auto-enxerto e até a sexta com aloenxerto e também a remodelação das trabéculas de autoenxerto, bem evidente entre a sexta e oitava semanas. Com aloenxerto, como o processo de remodelação foi mais lento e menos intenso, suas trabéculas apresentavam aspecto mais preservados até a sexta e oitava semanas, o que se fez pensar de forma incorreta no início, que a regeneração com o mesmo fosse melhor. Foi este ritmo, mais lento, que manteve a neoformação óssea até a décima segunda semana.

As diferenças que se observaram em relação aos trabalhos encontrados na literatura ativeram-se à necrose e absorção das trabéculas e à massa óssea regenerada com o aloenxerto. Enquanto os trabalhos publicados mostram intensa necrose e absorção das trabéculas de aloenxerto implantadas (RAY & HOLLAWAY, 1957; MARX et al. 1984; GRECO et al.; 1989), esta pesquisa revelou que foram semelhantes à que ocorreu com

auto-enxerto, talvez, um pouco mais intensas. Provavelmente, um dos fatores importantes para isto, tenha sido o tamanho diminuto das trabéculas. Esse fato, fez que os eventos ocorridos, tanto com um como com outro enxerto fossem muito parecidos. Marx et al. (1984) utilizaram fragmentos com 2x5x5 milímetros de tamanho e Greco et al. (1989) fragmentos circulares de 4.4 milímetros de diâmetro. Ray e Hollaway (1957) não definiram o tamanho dos fragmentos utilizados e os implantaram na calota craniana de ratos. Embora não se tenha medido as fragmentos utilizados nesse experimento, estes grosseiramente mediam 3.0x1.0x1.0 milímetros, e portanto, eram menores do que os referidos na literatura. Talvez, isto tenha facilitado sua revascularização e, conseqüentemente, sua viabilidade. Prova disso, é o fato de a massa óssea regenerada no final de doze semanas ser igual à do auto-enxerto, o que não ocorreu nos trabalhos citados, em que essa massa foi muito pequena.

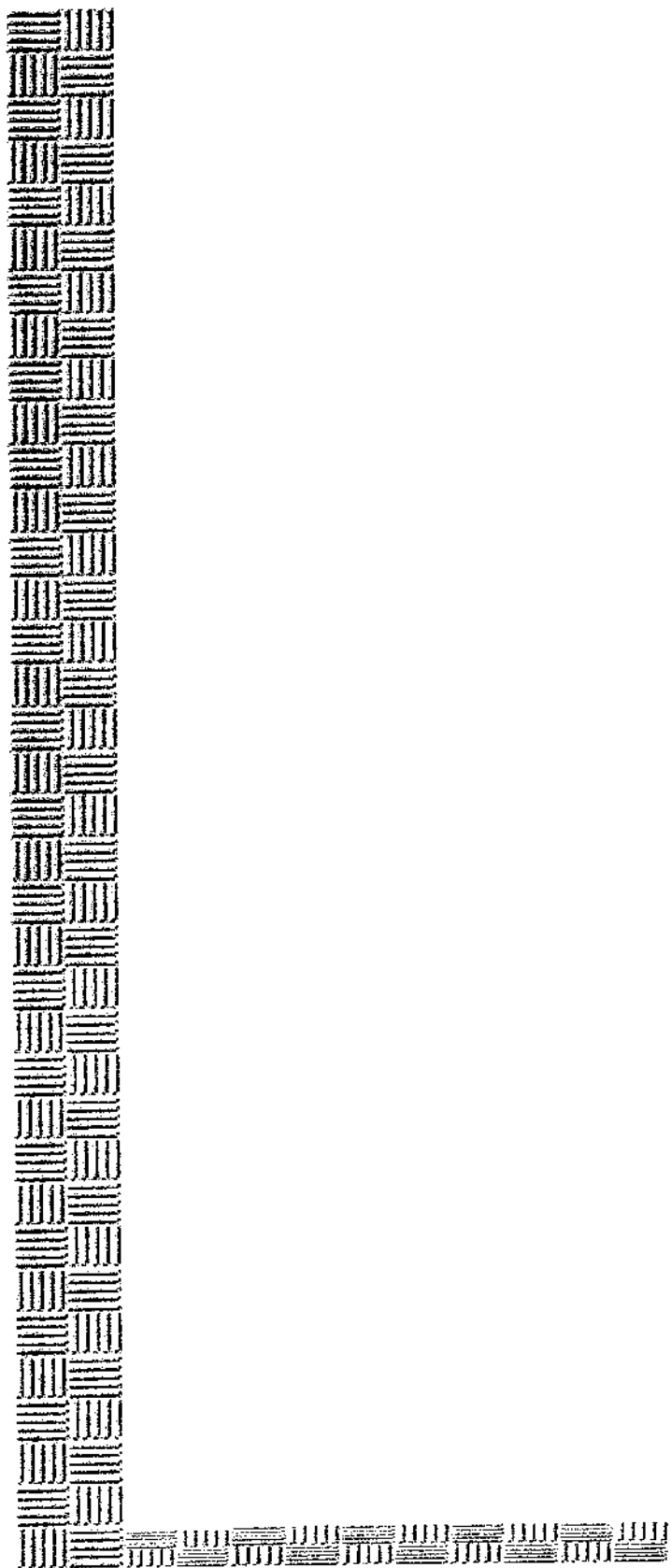
Quanto a constatação de que a remodelação e neoformação óssea persistiram por tempo mais prolongado com aloenxerto, talvez, também se deva à integração retardada de suas trabéculas. É citada na literatura (GOLDBERG & STEVENSON, 1987), que a trombose, por reações imunológicas, de vasos revascularizados dos aloenxertos retarda sua integração, sem necessariamente levá-los à necrose. Isso manteria a osteoindução, a osteocondução e a neoformação óssea por mais tempo, uma vez que, tecidos ósseos viáveis são indutores de neoformação óssea.

Quanto a regeneração espontânea, o aspecto histológico é de cicatrização óssea centrípeta, diferente da produzida com os enxertos. Todo o processo cicatricial começa na periferia e se dirige para o centro do defeito. Provavelmente, a neoformação óssea é induzida por substâncias osteoindutoras presentes nas trabéculas da periferia do defeito e que são liberadas pelo trauma com fraturas destas trabéculas. A ausência de trabéculas na área central e a formação dos núcleos de tecido conjuntivo devem ser decorrentes, dentre outros fatores, da falta de tais substâncias nesses locais, onde no início só tem coágulo sanguíneo. Estes fatos explicariam a menor massa óssea observada em todas as fases da regeneração óssea espontânea.

5.6. RESULTADOS ESTATÍSTICOS

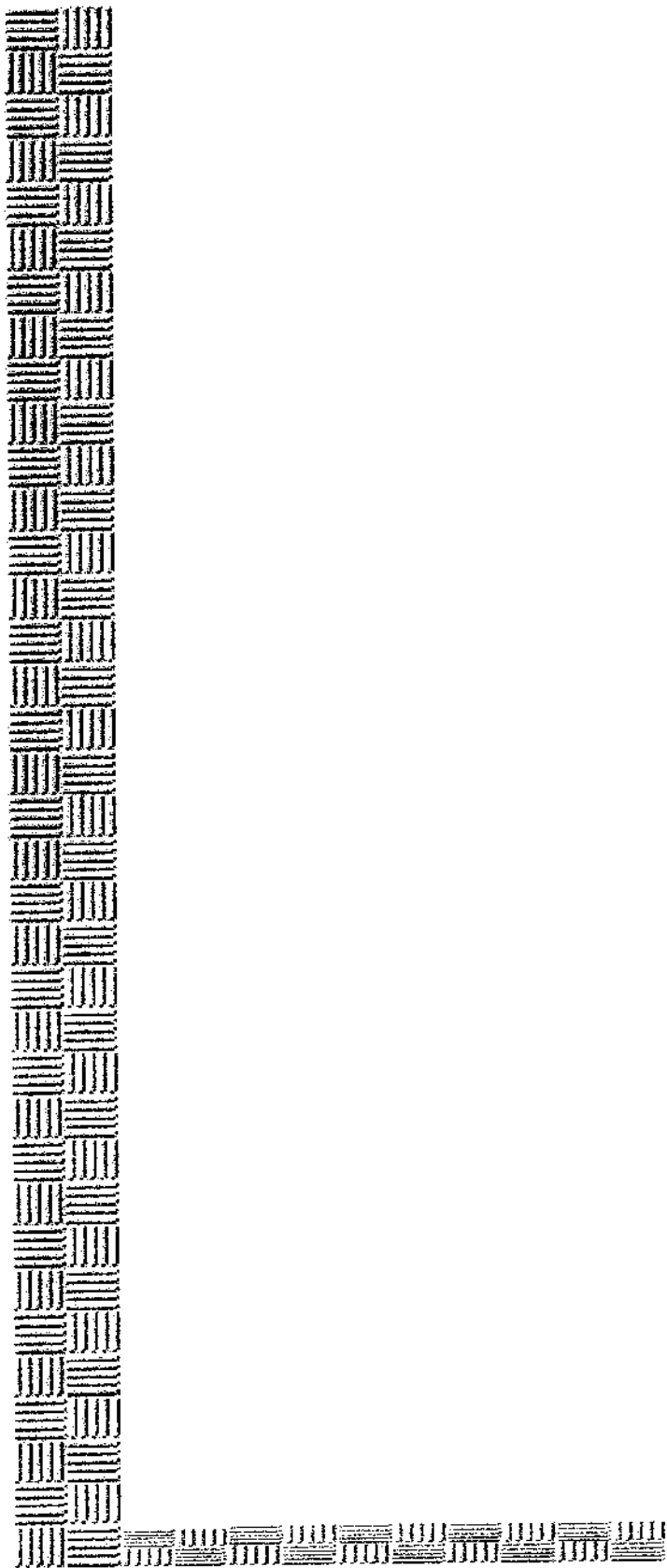
No que concerne à análise estatística dos resultados, a diferença significativa entre as frações de volume ocupadas pelas trabéculas no processo de regeneração ocorrido com enxertos e a fração de volume ocupada pelas trabéculas, no processo de regeneração espontânea, revela que a presença das trabéculas implantadas foi importante para a neoformação óssea.

O fato de não ocorrer diferença estatística significativa entre as frações de volume ocupadas pelas trabéculas no processo de regeneração com auto-enxerto e aloenxerto indica que este, congelado e fragmentado em pequenas dimensões é elemento eficaz no estímulo à regeneração óssea.



6. Conclusões

- I - Auto-enxerto fragmentado e aloenxerto fragmentado e congelado produzem regeneração óssea significativamente melhor que a regeneração espontânea, na décima segunda semana de pós-operatório.
- II - Na análise estatística, não houve diferença significativa entre as frações de volume ocupadas pelas trabéculas ósseas, nas regeneração propiciadas por auto-enxerto fragmentado e aloenxerto fragmentado e congelado, na décima segunda semana de pós-operatório.
- III - Não houve nenhum caso de infecção óssea verificada clínica ou histologicamente. Pode-se dizer que as condições de funcionamento do Banco de Ossos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, mostraram-se adequadas à finalidade proposta.



7. Summary

Bone regeneration was studied, from a hystological point of view, in 25 male, adult, mongrel dogs. A standard hole, of 5.55 milemeters was made in the distal metaphysis of both fêmura and fild up with fresh crushed autografts or frozen crushed allografts. A similar hole was made in the proximal metaphysis of the tibiae and left empty, as a control. Groups of five animals were sacrificed at the 2nd, 4th, 6th, 8th and 12th week postoperatively. After hystological analysis of the implanted area it was concluded that bone regeneration with both grafts was very similar, but the rythm of the return to the normal bone structure was faster with crushed autografts.

Analising the fraction of volume occupied by the newly formed trabeculae, it was found to be the same at the 12th week with both grafts and there was more than in the controls.



8. Referências bibliográficas

- AHERNE, W. - Quantitative methods in Histology. **J. Med. Lab. Techn.**, **27**: 160-170, 1970.
- ALPER, G.; BERNICK, S.; YAZDI, M.; NIMNI, M.E. - Osteogenesis in Bone Defects in Rats: The Effects of Hydroxiapatite and Demineralized Bone Matrix. **Am. J. Med. Sciences.**, **298** (6):371-376, 1989.
- AMLER, M.H. - The Effectiveness of Regenereting Versus Mature Marrow in Physiologic Autogenous Transplants. **J. Periodontol.**, **55**(5):268-272, 1984.
- AMLER, M.H. - Osteogenic Potential of Nonvital Tissues and Synthetic Implant Materials. **Osteogenic Potential.**, **58**(11): 758-761, 1987.
- BONFIGLIO. M.; JETER. W. S.; SMITH. C. L. - Immune Reactions in Tissue Homotransplants. **Ann. N. York Acad. Sci.**, **59**: 417-432, 1955.
- BORJA, F. & MNAYMNEH, W. - Bone Allografts in Salvage of Difficult Hip Arthroplasty. **Clin. Orthop. and Related Res.**, **197**:123-130, 1985.
- BOS, G.D.; GOLDBERG, V. M.; POWELL, A. E.; HEIPLE, K. G.; ZIKA, J. M. - The Effect of Histocompatibility Matching on Canine Frozen Bone Allografts. **J. Bone Joint Surg.**, **65-A**(1): 89-96, 1983.
- BROOKS, D. B.; HEIPLE, K. G.; HERNDON, C. H.; POWELL, A. E. -Immunological Factors in Homogenous Bone Transplantation. **J. Bone Joint Surg.**, **45-A**(8): 1617-1626, 1963.
- BURCHARDT, H. - Biology of Bone Transplantation. **Orthop. Clin. N. Am.**, **18**(2): 187-196, 1987.
- BURCHARDT, H. & ENNEKING, W.F. - Transplantation of Bone. **Surg.Clin. N. Am.**, **58**(2):403-424, 1978.
- BUSH, L. F. & GARBER, C. Z. - The Bone Bank. **J. A. M. A.**, **137**(7):588- 594, 1948.

- CHALMERS, J.; GRAY, D.H.; RUSH, J. - Observations on the induction of bone in soft tissues. **J. Bone Joint Surg.**, **57b**: 36, 1975.
- CHASE, S.W. & HERNDON, C.H. - The Fate of Autogenous Bone Grafts. A Historical Review. **J Bone Joint Surg.**, **37-A**(4): 809-841, 1955.
- COCHRAN, W. G. & COX, M.G. - Experimental Designs. 2a edição. John Wiley & Sons. N. York. 1957.
- CUMMINE, J.; ARMSTRONG, L.; NADE, S. - Osteogenesis After Bone and Bone Marrow Transplantation. **Acta Orthop.**, **54**:235-241, 1983.
- CURTISS, P. H. & HERDON, C. H. - Immunologic Factors in Homogenous Bone Transplantation. **Ann. N. York Acad Sci.**, **59**:434- 442, 1955
- CURTISS, P. H. & WILSON, P. D. - A Comparison of the Healing of Homogenous Bank and Autogenous Fresh Bone Grafts with and Without the Administration of Cortisone. **Surg. Gynec. Obstet.**, 155-161, 1953.
- CZITRON, A.A.; AXELROD, T.; FERNANDEZ, B. - Antigen Presenting Cells and Bone Allograft Transplantation. **Clin. Orthop. and Related Res.**, **197**:27-31, 1985.
- DICK, H.M.; MALININ, T.I.; MNAYMNEH, W.A. - Massive Allograft Implantation Following Radical Resection of High-Grade Tumors Requiring Adjuvant Chemotherapy Treatment. **Clin. Orthop. and Related Res.**, **197**:88-95, 1985.
- DOLL, B.A.; TOWLEM, H.J.; HOLLINGER, F.O.; REDDI, A.H.; MELLONIG, J.T. - The Osteogenic Potential of Two Composite Graft Systems Using Osteogenin. **J. Periodontol.**, **61**(12):745-750, 1990.
- DOPPELT, S.M.; TOMFORD, W.W.; LUCAS, A.B.; MANKIN, H.J. - Operational and financial aspects of a hospital bone bank. **J. Bone Joint Surg.**, **63A**:1472, 1981.

- ENNEKING, W.F.; BURCHARDT, H.; PUHL, J.J.; PIOTROWSKI, M.S. - Physical and Biological Aspects of Repair in Dog Cortical Bone Transplants. **J. Bone Joint Surg.**, **57-A**: 237-252, 1975.
- GOLDBERG, V.M. & STEVENSON, S. - Natural History of Autografts and Allografts. **Clin Orthop and Related Res.**, **225**: 7-16, 1987.
- GOUVÊA, J. - Transplantation Libre et Tumeurs des Os. **Presse Medicale.**, **58**:606-608, 1912.
- GRECO, F.; DE PALMA, L.; LISAI, P. - Experimental Investigation in to Reparative Osteogenesis with Fibrin Adhesive. **Arch Orthop Trauma Surg.**, **107**: 99-104, 1988.
- GRECO, F.; DE PALMA, L.; SPECCHIA, N.; SANTUCCI, A. - Biological Aspects of Repair Osteogenesis in Corticospongy Homologous Grafts. **Italian J. Orth Traum.**, **15**(4):491-499, 1989
- GREEN, E.; HINTON, C.; TRIFFITT, J.T. - The effect of Decalcified Bone Matrix on the Osteogenic Potential of Bone Marrow. **Clin. Orthop. and Related Res.** **205**:292-298, 1986.
- GROSS, A.E.; LAVOIE, M.V.; McDERMOTT, P.; MARKS, P. - The use of Allograft Bone in Revision of Total Hip Arthroplasty. **Clin. Orthop. and Related Res.**, **197**:115-124, 1985.
- 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.**, **45-A**(8):1593-1616, 1963.
- HEIPLE, K.G.; GOLDBERG, V.M.; POWELL, A.E.; BOS, G.D.; ZIKA, J.M. - Biology of Cancellous Bone Grafts. **Orth. Clin. N.Am.**, **18**(2):179-185, 1987.

- HENRY, M. O. - Homografts in Orthopaedic Surgery. **J. Bone Joint Surg.**, **30-A** (1): 70-76, 1948.
- ISAKSSON, S. & ALBERIUS, P. - Comparison of Regenerative Capacity Elicited by Demineralized Bone Matrix of Different Embryonic Origins. **J. Cranio-Max-Fac. Surg.**, **20**:73-80, 1992.
- KANDEL, R.A.; GROSS, A.E.; GANEL, A.; McDERMOTT, A.G.P.; LANGER, F.; PRITZKER, K.P.H. - Histopathology of Failed Osteoarticular Shell Allografts. **Clin. Orthop. and Related Res.**, **197**:103-110, 1985.
- LANE, J.M. & SANDHU, H.S. - Current Approaches to Experimental Bone Grafting. **Orthop. Clin. N. Am.**, **18**(2): 213-225, 1987.
- LANGLAIS, F. & VIELPAU, C.; - Allografts of the Hemipelvis after Tumour Resection. **J Bone Joint Surg.**, **71-B**:58-62, 1989.
- LEXER, E. - Joint Transplantation. 1907. Translated in: **Clin. Orthop. and Related Res.**, **197**:4-10, 1985.
- LEXER, E. - Joint Transplantations and Arthroplasty. **Surg. Gynec Obstet.** 782-809. 1925.
- LING, R.S.M.; TIMPERLEY, A.J.; LINDER, L. - Histology of Cancellous Impaction Grafting in the Fémur. **J. Bone Joint Surg.**, **75b**(5):693- 696, 1993.
- MAKLEY, J.T. - The Use of Allografts to Reconstruct Intercalary Defects of Long Bones. **Clin. Orthop. and Related Res.**, **197**:58-75, 1985.
- MALININ, T.I.; MARTINEZ, O.V.; BROWN, M.D. - Banking of Massive Osteoarticular and Intercalary Bone Allografts- 12 Years of Experience. **Clin. Orthop. and Related Res.**, **197**:44-57, 1985.

- MANKIN, H.J. - Complications of Allograft Surgery. **Osteochondral Allografts.** Biology, Banking and Clinical Applications. Edited by Friedlander, G.E., Mankin, H.J., Sell, K.W. Little, Brown and Company. Boston, Massachusetts. 1983. 259-274.
- MANKIN, H.J.; DOPPELT, S.H.; SULLIVAN, T.R.; TOMFORD, W.W. - Osteoarticular and intercalary allograft transplantation in the management of malignant tumors of bone. **Cancer**, **50**:613, 1982.
- MANKIN, H.J. & FRIEDLANDER, G.E. - Perspectives in Bone Allograft Surgery in **Osteochondral Allografts.** Biology, Banking and Clinical Applications. Edited by Friedlander, G.E., Mankin, H.J., Sell, K.W. Little, Brown and Company. Boston, Massachusetts. 1983. 3-8.
- MANKIN, H.J.; FRIEDLANDER, G.E.; LANGER, F. - Immunology of Osteochondral Allografts: Background and General Considerations. in **Osteochondral Allografts.** Biology, Banking and Clinical Applications. Edited by Friedlander, G.E., Mankin, H.J., Sell, K.W. Little, Brown and Company. Boston, Massachusetts. 1983. 133-140
- MARX, R.E. & KLINE, S.N. - Principles and Methods of Osseous Reconstruction. **Int. Advances in Surg Onc.**, **6**: 167-228, 1983.
- MARX, R.E.; MILLER, R.I.; EHLE, W.J.; HUBBARD, G.; MALININ, T.I. - A Comparison of Particulate Allogeneic and Particulate Autogenous Bone Grafts into Maxillary Alveolar Clefts in Dogs. **J. Oral Maxillofac Surg.**, **42**:3-9, 1984.
- MNAYMNEH, W.; MALININ, T.I.; MAKLEY, J.T.; DICK, H.M. - Massive Osteoarticular allografts in the Reconstruction of Extremities Following Resection of Tumors Not Requiring Chemotherapy and Radiation. **Clin. Orthop. and Related Res.**, **197**:76-87, 1985.

- MULLIKEN, J. B.; KABAN, L. B.; GLOWACKI, J. - Induced Osteogenesis - The Biological Principle and Clinical Applications. **J. Surg. Res.**, **37**:487-496, 1984.
- MURRAY, J.A. - Techniques of Allograft Reconstruction Following Resection of Skeletal Neoplasms in **Osteochondral Allografts**. Biology, Banking and Clinical Applications. Edited by Friedlander, G.E., Mankin, H.J., Sell, K.W. Little, Brown and Company. Boston, Massachusetts. 1983.275-279.
- OTTOLENGHI, C. - Massive Osteo and Osteo-articular bone grafts: Technics and results in 62 cases. **Clin. Orthop.**, **87**:156-164, 1972.
- OKLUND, S.A.; PROLO, D.J.; GUTIERREZ, R.V.; KING, S.E. - Quantitative Comparisons of healing in Cranial Fresh Autografts, Frozen Autografts and Processed Autografts, and Allografts in Canine Skull Defects. **Clin. Orthop. and Related Res.**, **206**:269-291, 1986.
- PALMER, I. - Open Reduction with the use of Cancellous Grafts. **J. Bone Joint Surg.**, **30-A**(1):2-8, 1948
- PARRISH, F. F. - Allograft Replacement of All or Part of the End of a Long Bone Following Excision of a Tumor. **J. Bone Joint Surg.**, **55A**(1):1-22, 1973.
- POWELL, A.E.; BOS, G.D.; GOLDBERG, V.M.; ZIKA, J.M.; HEIPLE, K.G.- Immune Responses to Bone Allografts. in **Osteochondral Allografts**. Biology, Banking and Clinical Applications. Edited by Friedlander, G.E., Mankin, H.J., Sell, K.W. Little, Brown and Company. Boston, Massachusetts. 1983.141- 150.
- PROLO, D.J. & RODRIGO, J.J. - Contemporary Bone Graft Physiology and Surgery. **Clin Orthop Related Res.**, **200**: 322-342, 1985.
- RAY, R.D. & HOLLOWAY, J.A. - Bone Implants. **J Bone Joint Surg.**, **39-A**(5):1119-1128. 1957.

- RAY, R. D. & SABET, T. Y. - Bone Grafts: Cellular Survival Versus Induction. **J. Bone Joint Surg.**, **45-A(2)**: 337-344, 1963.
- REDDI, A.H. - Extracellular Bone Matrix Dependent Local Induction of Cartilage and Bone. **J. Rheumat. Suppl.**, **11**: 67-69, 1983.
- REDDI, A.H. & ANDERSON, W.A. - Collagenous bone matrix-induced endochondral ossification and hemopoiesis. **J. Cell. Biol.**, **69**: 557-572, 1976
- REDDI, A. H.; WIENTROUB, W.; MUTHUKUMARAN, N. - Biologic Principles of Bone Induction. **Orth Clin N Am.**, **18(2)**: 207-212, 1987.
- SALA, M.A.; MATHEUS, M.; VALERI, V. - Princípios Básicos e aplicações da estereologia em morfologia. **Ci. e Cult.**, **34(3)**: 305- 313, 1981.
- SCHACHAR, N.S.; HENRY, Jr. W.B.; WADSWORTH, P.; CASTRONOVO, Jr. F.P.; MANKIN, H.J. - Fate of Massive Osteochondral Allografts in a Feline Model. **Osteochondral Allografts**. Biology, Banking and Clinical Applications. Edited by Friedlander, G.E., Mankin, H.J., Sell, K.W. Little, Brown and Company. Boston, Massachusetts. 1983.
- SHAFFER, J. W.; FIELD, G. A.; GOLDBERG, V. M.; DAVY, D. T. - Fate of Vascularized and Nonvascularized Autografts. **Clin Orthop Related Res.**, **197**: 32-43, 1985.
- SCHWEIBERER, L.; STÜTZLE, H.; MANDELKOW, H. K. - Bone Transplantation. **Arch Orth. Trauma Surg.**, **109**: 1-8, 1989.
- SCHMITZ, J.P. & HOLLINGER, J.O. - The Critical Size Defect as an Experimental Model for Craniomandibulofacial nonunions. **Clin Orthop. Related Res.**, **205**: 299-308, 1986.
- SPRINGFIELD, D. S. - Massive Autogenous Bone Grafts. **Orth. Clin. N. Am.**, **18(2)**: 249-256, 1987.

- THIELEMANN, K. S.; SCHMIDT, K.; KOSLOWSKI, L. - Osteoinduction, Purification of the Osteoinductive Activities of Bone Matrix. **Arch Orthop Traumat Surg.**, 100: 73-78, 1982.
- TOMFORD, W.W.- Sterility Control in Bone Banking. **Osteochondral Allografts.** Biology, Banking and Clinical Applications. Edited by Friedlander, G.E., Mankin, H.J., Sell, K.W. Little, Brown and Company. Boston, Massachusetts. 1983. 219-221.
- TOMFORD, W.W.; DOPPELT, M.D.; MANKIN, H.J.; FRIEDLAENDER, G.E. - Bone Bank Procedures. **Clin. Orth. Related Res.**, 174:15-21. 1983.
- TURK, A. E.; ISHIDA, K.; JENSEN, J. A.; WOLLMAN, J. S.; MILLER, T. A. - Enhanced Healing of Large Cranial Defects by an Osteoinductive Protein in Rabbits. **Plast. Reconstr. Surg.**, 92(4):593-600. 1993.
- TURNER, L. T. C.; BASSETT, C. A. L.; SAWYER, L. P. N. - An Experimental Comparison of Freeze-Dried and Frozen Cortical Bone-Graft Healing. **J. Bone Joint Surg.**, 37-A,6: 1955.
- URBANIAK, J.R., & BLACK, Jr. K.E. - Cadaveric Elbow Allografts. A six year experience. **Clin. Orthop. and Related Res.**, 197:131-140, 1985.
- URIST, M.R. - Bone formation by autoinduction. **Science**, 150:893, 1965.
- URIST, M.R.; DeLANGE, R.J.; FINERMAN, G.A.M. - Bone Cell Differentiation and Growth Factors. **Science** 220., 4598:680-686, 1983
- URIST, M.R.; EARNEST, F.; KIMBALL, K.M. - Bone morphogenesis in implants of residues of radioisotope labelled bone matrix. **Calcif. Tissue Res.**, 15:236, 1974.
- URIST, M. & HERNANDEZ, A. - Excitation transfer in bone: Deleterious effects of cobalt 60 radiation-sterilization of bank bone. **Arch. Surg.**, 109:486, 1974.

- URIST, M.; MIKULSKI, A.J.; BOYD, S.D. - A chemosterelized antigen extracted bone morphogenetic alloimplant. **Arch. Surg.**, **110**:416, 1975.
- VOLKOW, M.- Allotransplantation of joints. **J. Bone Joint Surg.**, **52B**:49, 1970.
- VOLPON, J.B.; XAVIER, C.A.M.; GONÇALVES, R.P. - The use of Decalcified Granuleted Homologous Cortical Bone Matrix in the Correction of diaphyseal Bone Defect. **Arch. Orthop. Traumat. Surg.** **99**:199-207,1982.
- WEIBEL, E.R. - Stereological Methods, Vol. I. **Pratical methods for Biological Morphometry.**, Academic Press, New York, 1979.
- WILSON, P.D. - Experiences with a bone bank. **Ann. Surg.**,**126**(6):932-946, 1947
- ZILCH, H. & WOLF, R. - Fibrinkleber und Knochenneubildung. **Z. Orthop.**, **125**: 214-218, 1987.