

O EFEITO DA QUANTIDADE DO ENXERTO DE OSSO ESPONJOSO AUTÓLOGO Utilizado na Regeneração Óssea num Modelo Experimental de Osteotomia da Tíbia

MARIA ISABEL DIAS, PAULO LOURENÇO, ADRIANO RODRIGUES, JORGE AZEVEDO, CARLOS VIEGAS, ANTÓNIO FERREIRA, ANTÓNIO SILVÉRIO CABRITA

Departamento de Ciências Veterinárias e Departamento de Zootecnia. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real. Serviço de Ortopedia. Hospitais da Universidade de Coimbra. Laboratório de Medicina Nuclear e Unidade de Estudo do Metabolismo Ósseo. Instituto de Patologia Experimental. Faculdade de Medicina de Coimbra. Coimbra. Departamento de Morfologia e Clínica, Faculdade de Medicina Veterinária. Lisboa.

RESUMO

Este trabalho tem como objectivo o estudo da influência da variação quantitativa do enxerto de osso esponjoso autólogo nas suas potenciais propriedades osteogénicas. Para tal, recorreu-se a um modelo de osteotomia na ovelha, com a remoção de um segmento de 4 mm ao nível da diáfise média da tíbia esquerda em vinte e um animais, estabilizado com placa de osteossíntese e em que se aplicaram diferentes quantidades de auto-enxerto de osso esponjoso de forma (1) a não preencher na totalidade (1,5 g), (2) a preencher sem compressão (3 g) e (3) a preencher com uma quantidade excessiva (5 g) o referido defeito ósseo (n = 5/cada grupo). Realizou-se igualmente (4) uma osteotomia controlo (n = 6) em que o defeito ósseo permaneceu vazio. A comparação da evolução da regeneração óssea ao longo do período pós-operatório de 12 semanas foi realizada através de exames radiográficos convencionais e análise de densitometria óptica e, após a eutanásia das ovelhas, por densitometria óssea radiológica (DEXA), análises histológicas e histomorfometria óssea. A densidade óptica foi significativamente afectada ($p < 0,0001$) pelos tratamento e tempo e ocorreram diferenças significativas entre os vários grupos em estudo para um mesmo tempo do período pós-operatório: no pós-operatório imediato e às 2ª ($p < 0,01$), 4ª ($p < 0,001$), 6ª e 8ª semanas ($p < 0,05$), mas não às 10ª e 12ª semanas ($p > 0,05$) pós-operatórias. A densidade mineral óssea (BMD), obtida por DEXA, foi de $0,4347 \pm 0,3821$ g/cm² no grupo controlo e de $0,7482 \pm 0,2327$ g/cm², $0,9517 \pm 0,2292$ g/cm² e $1,0409 \pm 0,0681$ g/cm² nos grupos que haviam recebido 1,5 g, 3 g e 5 g de enxerto ósseo, respectivamente. O volume ósseo (BV), determinado por histomorfometria óssea, foi de $39,2 \pm 24,4\%$ no grupo controlo e de $62,0 \pm 14,4\%$, $76,0 \pm 15,2\%$ e $84,0 \pm 4,2\%$ nos grupos que receberam 1,5 g, 3 g e 5 g de enxerto ósseo, respectivamente. A BMD e o BV foram significativamente afectados ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) pelo tratamento não tendo, no entanto, existido diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos que haviam recebido as quantidades mais elevadas de auto-enxerto de osso esponjoso à 12ª semana pós-operatória. Concluiu-se não existir vantagem num excessivo preenchimento do local da osteotomia por auto-enxerto de osso esponjoso, sendo necessário apenas a obtenção da quantidade necessária de enxerto ósseo ao preenchimento do defeito ósseo da osteotomia em causa.

SUMMARY

THE EFFECT OF THE QUANTITATIVE VARIATION OF AUTOLOGOUS SPONGY BONE GRAFT APPLIED FOR BONE REGENERATION IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF TIBIA OSTEOTOMY

This study aimed at studying the influence of the quantitative variation of the autologous spongy bone graft on its osteogenic properties by virtue of the fact that its attainment has inconveniences of significant morbidity at local donor level and the limited quantity of grafting able to be obtained. Recourse was made to an osteotomy model for this purpose with the removal of a small 4 mm segment at the mid-diaphysis of the left tibia of twenty one sheep, stabilised by an osteosynthesis plate on which different quantities of autografting spongy bone were applied so that the referred bone defect (1) would not to be completely filled (1.5 g), (2) would be filled without any compression (3 g) and (3) would be filled with an excessive quantity (5 g) (n=5/each group). (4) A control osteotomy (n=6) was also carried out where the bone defect remained empty. Comparison of the evolution of bone regeneration during the post-operative period of 12 weeks was carried out by means of conventional radiographic exams and optical densitometry analysis and by radiological bone densitometry (DEXA - Dual-Energy X-ray Absorptiometry), bone histomorphometry and histological analysis after the animals' euthanasia. Optical density was significantly affected ($p < 0.0001$) by the treatment and by time and with significant differences between the various groups under study over the same time of post-operative period: during immediate post-operative and on the 2nd ($p < 0.01$), 4th ($p < 0.001$), 6th and 8th weeks ($p < 0.05$), but not on the 10th and 12th ($p > 0.05$) post-operative weeks. Bone mineral density (BMD), obtained by DEXA, was 0.4347 ± 0.3821 g/cm² in the control group and 0.7482 ± 0.2327 g/cm², 0.9517 ± 0.2292 g/cm² e 1.0409 ± 0.0681 g/cm² in the groups that had received 1.5 g, 3 g and 5 g of bone graft, respectively. The BV was $39.2 \pm 24.4\%$ with the control group and $62.0 \pm 14.4\%$, $76.0 \pm 15.2\%$ and $84.0 \pm 4.2\%$ in the groups that had received 1.5 g, 3 g and 5 g of bone graft, respectively. The BMD and BV were significantly affected ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively) by the treatment, nevertheless, there were no significant differences ($p > 0.05$) between the groups that had received the largest volumes of autografting spongy bone on the 12th week of the post-operative period. The conclusion was reached that there was no advantage in excessively filling an osteotomy gap with autografting spongy bone and attainment of only the volume strictly required to fill the osteotomy gap at issue was needed.

Key-words: *Autologous spongy bone graft, bone regeneration, osteotomy, sheep*

INTRODUÇÃO

A utilização do enxerto de osso esponjoso autólogo iniciou-se pela necessidade da resolução de defeitos ósseos da face e crânio¹. Após esta fase, o auto-enxerto de osso esponjoso tem sido utilizado na assistência à cicatrização do tecido ósseo em situações em que as condições ideais não são possíveis de obter, como sejam: em presença de discontinuidades ou defeitos ósseos após a redução e estabilização de fracturas^{2,3} ou em fracturas em doentes geriátricos, processos de atrasos da união ou de não união⁴, osteotomias correctivas e artrodeses⁵, no preenchimento de defeitos quísticos ou correcção de sequestros e tratamento de osteomielites⁶, na revisão de próteses da anca⁷ e na fusão de vértebras⁸.

O enxerto de osso esponjoso autólogo, se correctamente manipulado, possui elevado potencial osteogénico pelo transplante de células viáveis da linha osteoblástica, propriedades osteoindutivas pela promoção de quimiotaxia, mitose e diferenciação de células mesenquimatosas pluripotenciais (MSC) em células das linhas condrogénica e osteogénica, após o contacto com vários factores de crescimento e citocinas presentes na matriz óssea (MEC)^{9,10}, e propriedades osteocondutoras ao conferir estrutura tridimensional que possibilita o crescimento passivo de tecido ósseo por extensão de capilares sanguíneos, tecido perivascular e MSC do local receptor para a matriz transplantada^{9,11}. Este tipo de enxerto ósseo possui também as vantagens de histocompatibilidade e ausência de risco de transmissão de doenças

infecto-contagiosas.

A ausência de propriedades mecânicas é compensada pela grande capacidade osteogénica responsável por rápida neoformação de tecido ósseo no local de fractura, contribuindo para a sua rápida estabilização. As propriedades osteogénicas deste tipo de enxerto ósseo advém da sua extensa área de superfície coberta por células de revestimento do tecido ósseo quiescentes e por osteoblastos activos, transplantados em associação com células da medula óssea, e pela arquitectura característica do tecido ósseo trabecular permitir uma rápida revascularização¹².

Stevenson (1999)¹³ e Bauer e Muschler (2000)¹⁴ dividiram a incorporação do auto-enxerto de osso esponjoso no local receptor em cinco estágios sucessivos com a formação do hematoma, com libertação local de citocinas e factores de crescimento, logo após a cirurgia. Nesta fase inicial muitas das células transplantadas morrem devido a isquémia ou por via da apoptose, especialmente os osteócitos situados nas lacunas no interior das trabéculas ósseas¹⁴. No entanto, se o enxerto fôr convenientemente manipulado, poderão sobreviver à transferência para o local receptor as células com maior resistência à isquémia – as MSC presentes na medula óssea e as células progenitoras das células endoteliais¹⁴ – para além de alguns dos osteoblastos situados à superfície das trabéculas ósseas, contribuindo também para a osteogénese osteoblastos com origem no local receptor¹⁵. Numa segunda fase, cerca de cinco dias após a transplantação, ocorre a inflamação, migração e proliferação de MSC e a reorganização gradual do hematoma em tecido conjuntivo fibroso e, numa terceira fase, a progressiva revascularização do enxerto, nos 10 dias seguintes, pela infiltração de vasos sanguíneos no tecido ósseo enxertado^{2,16}, completando-se esta nos primeiros 20 dias após a cirurgia¹⁶. A actividade osteogénica inicia-se por volta do quinto dia após implantação e apresenta actividade máxima à oitava semana após a transplantação^{16,17}. Numa quarta fase ocorre a substituição do enxerto em extensão variável, por reabsorção osteoclástica das trabéculas ósseas enxertadas, em simultâneo com a deposição de osteóide sintetizado pelos osteoblastos da zona receptora, e a formação de tecido ósseo não lamelar sobre as trabéculas ósseas em necrose¹⁵. Na quinta fase ocorre o processo de remodelação óssea, segundo as forças mecânicas que se exercem sobre o local, e em que o tecido ósseo não lamelar recém formado e as trabéculas ósseas em necrose por ele envolvidas são gradualmente reabsorvidos por osteoclastos e substituídos por tecido ósseo lamelar, constituído por sistemas de Havers^{16,17}. As duas últimas fases descritas poderão ter uma duração de

vários meses, sendo que o estágio final inicia-se geralmente seis meses após a realização do enxerto e completa-se cerca de um ano após a cirurgia, e o restabelecimento da cavidade medular pelo contínuo desenvolvimento do tecido ósseo trabecular associado às células da linha hematopoiética acumuladas na região interna do enxerto ósseo¹⁶.

O recurso ao enxerto de osso esponjoso autólogo possui alguns inconvenientes, nomeadamente, a significativa morbilidade que a sua obtenção pode provocar no local dador e a limitada quantidade de enxerto possível de obter¹⁸. A obtenção de auto-enxertos de osso esponjoso na crista ilíaca pode originar complicações em cerca de 10% dos casos, sendo as mais frequentes a infecção, consequentes feridas com drenagem prolongada, hematomas extensos, necessidade de segunda intervenção cirúrgica, dor crónica por um período superior a seis meses, parestesia e cicatrizes inestéticas¹⁹. Por estes factos, e pela literatura científica ser escassa no que respeita às quantidades de auto-enxerto de osso esponjoso mais adequadas ao preenchimento de defeitos ósseos¹⁷, pensou-se que a realização de um estudo com o objectivo de determinar a quantidade ideal de auto-enxerto de osso esponjoso a transplantar para um defeito ósseo completo no tecido ósseo cortical diafisário poderia constituir informação com importância na tentativa da redução ao mínimo da morbilidade promovida ao nível do local dador.

O objectivo deste trabalho foi assim o de estudar a incorporação de diferentes quantidades de auto-enxerto de osso esponjoso num modelo experimental de osteotomia da tíbia, por técnicas de imagiologia – densitometria óptica e densitometria óssea radiológica – histologia e histomorfometria óssea, de forma a verificar qual a sua influência no processo de regeneração óssea assistida com este tipo de enxerto ósseo.

MATERIAL E MÉTODOS

Protocolos Anestésico e Cirúrgico

Os protocolos anestésico e cirúrgico e a manutenção dos animais utilizados neste estudo foram avaliados e aprovados pela Comissão Consultiva do Bem Estar Animal e de Protecção dos Animais Utilizados para Fins Experimentais e/ou Outros Científicos, da Direcção Geral de Veterinária, respeitaram a Portaria nº1005/92 de 23 de Outubro, e os regulamentos da Legislação da Comunidade Europeia para o Bem Estar Animal.

Utilizaram-se 21 ovelhas da raça Churra da Terra Quente, com idades compreendidas entre os dois e seis anos e um peso médio de 45 kg, e nas quais se realizou uma

osteotomia, com a remoção de um segmento de 4 mm ao nível da diáfise média da tíbia esquerda, estabilizada com placa de osteossíntese. Os animais foram subdivididos em quatro grupos experimentais: grupo controlo (grupo 1) (n = 6), em que o local da osteotomia permaneceu vazio, e os outros três grupos que receberam diferentes quantidades de auto-enxerto de osso esponjoso (n = 5/cada grupo) de forma a obter-se um defeito ósseo sub-preenchido com 1,5 g (grupo 2), correctamente preenchido com 3 g (grupo 3) e sobre-preenchido com 5 g (grupo 4).

Nas 24 horas que precederam a intervenção cirúrgica realizou-se o jejum e a tricotomia do membro a intervernicionar. Procedeu-se a medicação pré-anestésica com acepromazina (Calmivet[®], Vetóquinol), 5 mg EV, a indução da anestesia geral com pentotal sódico (Pentothal[®] Sódico, Abbott) a 2,5%, 20-25 mg/kg EV, e manutenção por inalação com halotano (Fluothane, Zeneca Produtos Biociência, Lda.) 1-1,5% em associação de O₂/N₂O.

Os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo de forma a ter acesso cirúrgico à face medial da tíbia esquerda sobre a qual se aplicou provisoriamente uma placa de osteossíntese DCP 4,5 larga de oito orifícios (Synthes[®]), por meio de dois parafusos 4,5 unicorticais. Os restantes orifícios foram perfurados em ambas as corticais, medial e lateral, para a posterior colocação dos parafusos. Realizou-se osteotomia transversa ao nível da diáfise média com serra oscilante, removendo-se um segmento ósseo de 4 mm, com ablação do periósteo 2 mm acima e abaixo e em toda a circunferência do local da fractura. O comprimento original da tíbia foi restabelecido por meio de tracção longitudinal e a osteotomia estabilizada pela aplicação da placa com inserção de parafusos em todos os orifícios. O local da osteotomia foi preenchido com 1,5 g, 3 g ou 5 g de enxerto de osso esponjoso autólogo, previamente pesado em balança electrónica (modelo GA200, OHAUS Corporation), e obtido na epífise proximal do úmero contralateral, ou deixado vazio no grupo controlo. As fâscias musculares e tecido subcutâneo foram suturadas com fio de sutura reabsorvível e a pele com seda.

Procedeu-se a analgesia pela flunixinina meglumina (Finadyne[®] P.A., Schering-Plough II), 1 mg/kg IM/24 horas, nas primeiras 48 horas, e a antibioterapia com amoxicilina (Clamoxyl[®] LA, Pfizer), 15 mg/kg IM/48 horas durante a primeira semana pós-operatória, assim como pensos compressivos e de protecção da sutura cutânea removida ao décimo dia. Realizou-se a eutanásia à 12^a semana pós-operatória pela administração de pentobarbital sódico (Eutasil[®], Sanofi) EV, e as tíbias intervernicionadas preservadas em formaldeído após a remoção dos tecidos moles envolventes.

Exames Radiográficos e Análise da Densitometria Óptica

Obteve-se uma imagem radiográfica num plano antero-posterior e outra num plano latero-medial de todas as tíbias intervernicionadas, imediatamente após a intervenção cirúrgica e a cada intervalo de 15 dias durante todo o período pós-operatório. As radiografias foram realizadas com um aparelho de raios X (bucky DIAGNOST, Philips Medical Systems) aplicando sempre a mesma técnica radiográfica - parâmetros idênticos (60 kV, 35 mA, 0,10 segundos) e posicionamento dos membros de forma a manter a tíbia paralela à película radiográfica e a uma distância de 75 cm. Apesar do controlo dos parâmetros na realização das radiografias, uma pequena peça em alumínio foi incluída para controlo de possíveis variações inerentes à realização de cada radiografia e sua revelação.

As radiografias foram utilizadas na determinação da densidade óptica do local da osteotomia com um densitómetro de transmissão do espectro preto e branco (modelo 331, X-Rite), com uma abertura de 1 mm. Para cada osteotomia procedeu-se a três leituras – córtex lateral e medial e zona medular – com a realização da média final.

Densitometria Óssea Radiológica (DEXA)

Após a remoção dos tecidos moles envolventes e dos implantes, as tíbias intervernicionadas e as contralaterais foram sujeitas a DEXA, imersas em 10 cm de água, com um aparelho de absorcitometria bienergética por raios X (QDR-4500A Elite, Hologic Inc.), uma selecção padronizada de valores dos parâmetros (140/100 kVp, 2,5 mA média, 230 segundos, 50 Hz) e abertura de raios X de ½ mm. Utilizou-se software de elevada resolução para o processamento de imagem e avaliação dos dados.

Em cada peça óssea seleccionaram-se e analisaram-se três regiões de interesse (ROI), correspondentes a áreas (0,046 cm², 7x7 pixel) no interior do canal medular (R1) e entre as extremidades do córtex medial (R2) e lateral (R3), para determinação da densidade mineral óssea (BMD). Nas tíbias contralaterais intactas seleccionaram-se regiões idênticas às anteriormente referidas, ao nível da sua diáfise média. Em cada peça óssea realizaram-se duas determinações por ROI e a média da BMD do conjunto das várias ROI foi calculada para posterior análise.

Histologia e Histomorfometria Óssea

As peças ósseas, contendo a área da osteotomia, foram fixadas numa solução de formaldeído, incluídas em

metilmetacrilato e seccionadas ao longo do eixo longitudinal da tibia e num plano medio-lateral, de forma a obter-se secções ósseas correspondentes aos 2 mm centrais da diáfise da tibia. De seguida, as peças ósseas incluídas em metacrilato foram seccionadas e polidas (EXAKT *Cutting and Grinding System*[®], EXAKT Technologies) até à obtenção de secções com uma espessura média de 25 mm. Realizaram-se duas secções por cada uma das peças ósseas que se submeteram a coloração pelo Azul de Toluidina e pelo Tricrómico de Goldner.

A análise histomorfométrica foi realizada pela quantificação do volume ósseo (BV) à 12^a semana pós-operatória vários nos grupos, com objectiva de x4, e por técnica de leitura manual [BV = área trabecular (B.Ar)/área total medida (Tt.Ar); área = X*D² (X=número de impactos da quadrícula sobre as trabéculas ósseas, D=medida do lado da quadrícula em micrómetros)]²⁰.

Análise Estatística

Todos os dados são apresentados na forma de média ± desvio padrão. A influência do tratamento e do tempo

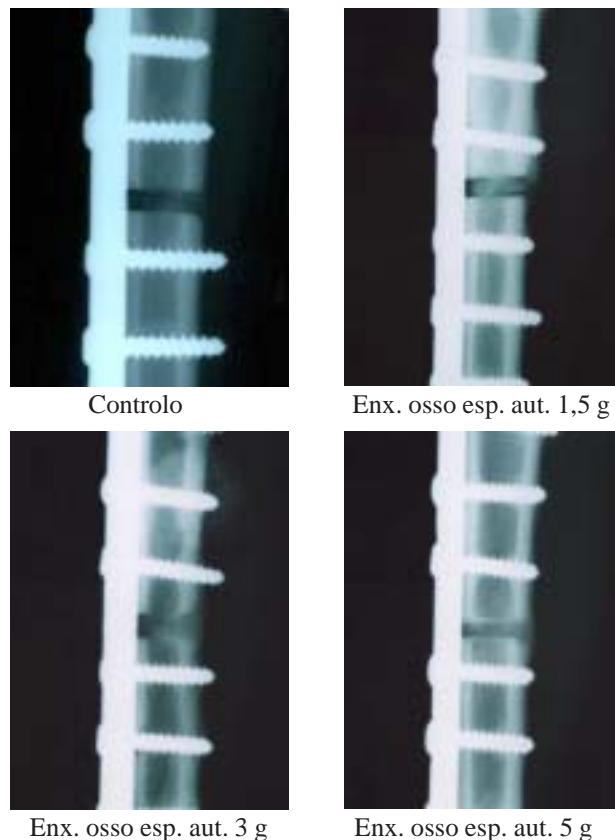


Fig. 1 - Exemplificação da avaliação radiográfica do local da osteotomia nos vários grupos em estudo à 12^a semana pós-operatória.

na variação da densidade óptica nas radiografias foram avaliadas por análise de variância e comparação múltipla de pares de médias ao longo do período pós-operatório foi realizada através de um teste de Tukey. Realizou-se também análise de variância para verificar se existiram diferenças na BMD e BV à 12^a semana pós-operatória entre os diferentes tratamentos. A análise estatística foi realizada pelo programa de software de estatística JMP-4 (SAS Institute, Inc.). As diferenças foram consideradas significativas para uma probabilidade superior a 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Exames Radiográficos e Análise da Densitometria Óptica

Na Figura 1 exemplifica-se o aspecto dos exames radiográficos à 12^a semana pós-operatória para os vários grupos em estudo. Nos exames radiográficos, na área da osteotomia do grupo controlo não se observou uma continuidade completa do tecido ósseo ao longo de todo o período pós-operatório. A radiopacidade aumentou ao longo do tempo nas osteotomias que receberam o enxerto ósseo, especialmente nos grupos 3 e 4 que haviam recebido os maiores volumes de enxerto, com a demonstração de uma radiopacidade homogénea entre as extremidades dos topos ósseos, especialmente nas áreas correspon-

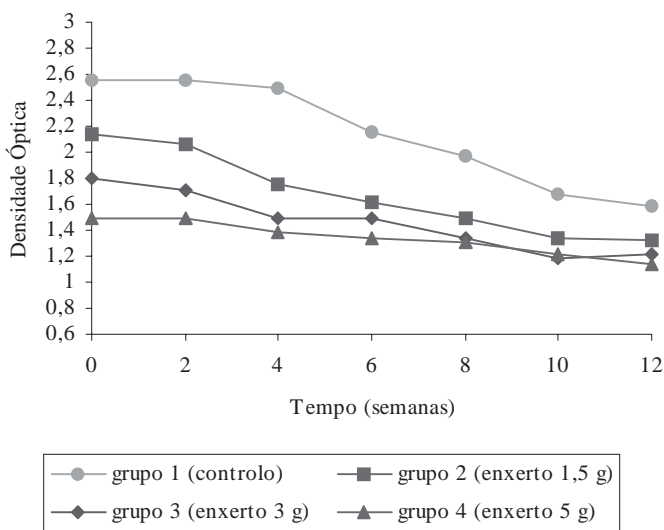


Fig. 2 - Leituras médias das densidades ópticas obtidas nos vários grupos em estudo e ao longo do período pós-operatório. A média da densidade óptica em região correspondente da diáfise média da tibia intacta é de $0,92 \pm 0,30$.

Quadro I – Média ± SD das leituras da densidade óptica obtidas ao nível das películas radiográficas.

Densidade Óptica [†]				
Tempo (semanas)	grupo 1 (controlo)	grupo 2 (enxerto 1,5 g)	grupo 3 (enxerto 3 g)	grupo 4 (enxerto 5 g)
0	2,55±0,60a	2,14±0,41abc	1,80±0,52abcd	1,50±0,33bcd
2	2,55±0,60a	2,06±0,39abcd	1,71±0,60abcd	1,50±0,37bcd
4	2,50±0,33a	1,75±0,39abcd	1,50±0,67bcd	1,39±0,32bcd
6	2,15±0,35ab	1,62±0,47abcd	1,49±0,55bcd	1,34±0,30bcd
8	1,97±0,23abcd	1,50±0,40bcd	1,34±0,36bcd	1,31±0,38bcd
10	1,68±0,35abcd	1,34±0,36bcd	1,18±0,30cd	1,22±0,23bcd
12	1,58±0,17bcd	1,33±0,36bcd	1,21±0,26cd	1,14±0,20d

[†]Médias, para os vários grupos em estudo e tempos pós-operatórios, sinalizadas com diferentes letras supra-inscritas são significativamente diferentes umas das outras ($p < 0,05$).

dentes ao canal medular e ao córtex lateral. Esta observação tornou-se progressivamente mais evidente até à 12ª semana do período pós-operatório, apesar de a radiodensidade geral ao nível do local da osteotomia permanecer inferior à do tecido ósseo cortical normal.

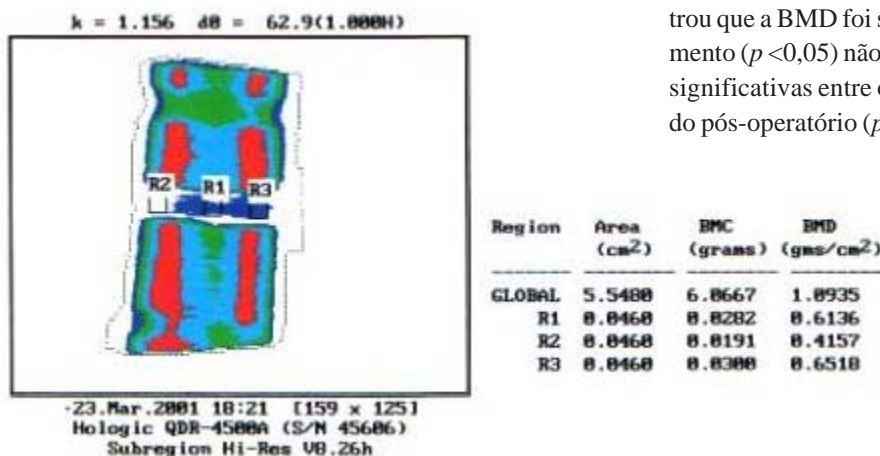
No que se refere à densidade óptica (Quadro I e Figura 2), a análise de variância demonstrou que esta foi significativamente afectada pelo tratamento ($p < 0,0001$) e tempo ($p < 0,0001$) e que existiram diferenças significativas entre os grupos em estudo e para um mesmo tempo no pós-operatório imediato e às 2ª ($p < 0,01$), 4ª ($p < 0,001$) e 6ª e 8ª

semanas ($p < 0,05$), mas não às 10ª e 12ª semanas pós-operatórias ($p > 0,05$).

Densitometria Óssea Radiológica (DEXA)

Na Figura 3 exemplifica-se um exame DEXA. A BMD foi de $0,4347 \pm 0,3821 \text{ g/cm}^2$ no grupo controlo (grupo 1) e de $0,7482 \pm 0,2327 \text{ g/cm}^2$, $0,9517 \pm 0,2292 \text{ g/cm}^2$ e $1,0409 \pm 0,0681 \text{ g/cm}^2$ nos grupos que receberam 1,5 g (grupo 2), 3 g (grupo 3) e 5 g (grupo 4) de enxerto de osso esponjoso autólogo, respectivamente. A análise de variância demonstrou que a BMD foi significativamente afectada pelo tratamento ($p < 0,05$) não tendo, no entanto, existido diferenças significativas entre os grupos 3 e 4 à 12ª semana do período pós-operatório ($p > 0,05$).

Optou-se pela apresentação apenas dos valores globais da média do BMD do conjunto das várias ROI para cada grupo experimental em estudo, e não os valores individuais da BMD para cada uma das ROI (R1, R2 e R3), pelo facto de variações mínimas no local seleccionado como área correspondente a cada ROI poderem implicar em consequência variações relativamente elevadas da



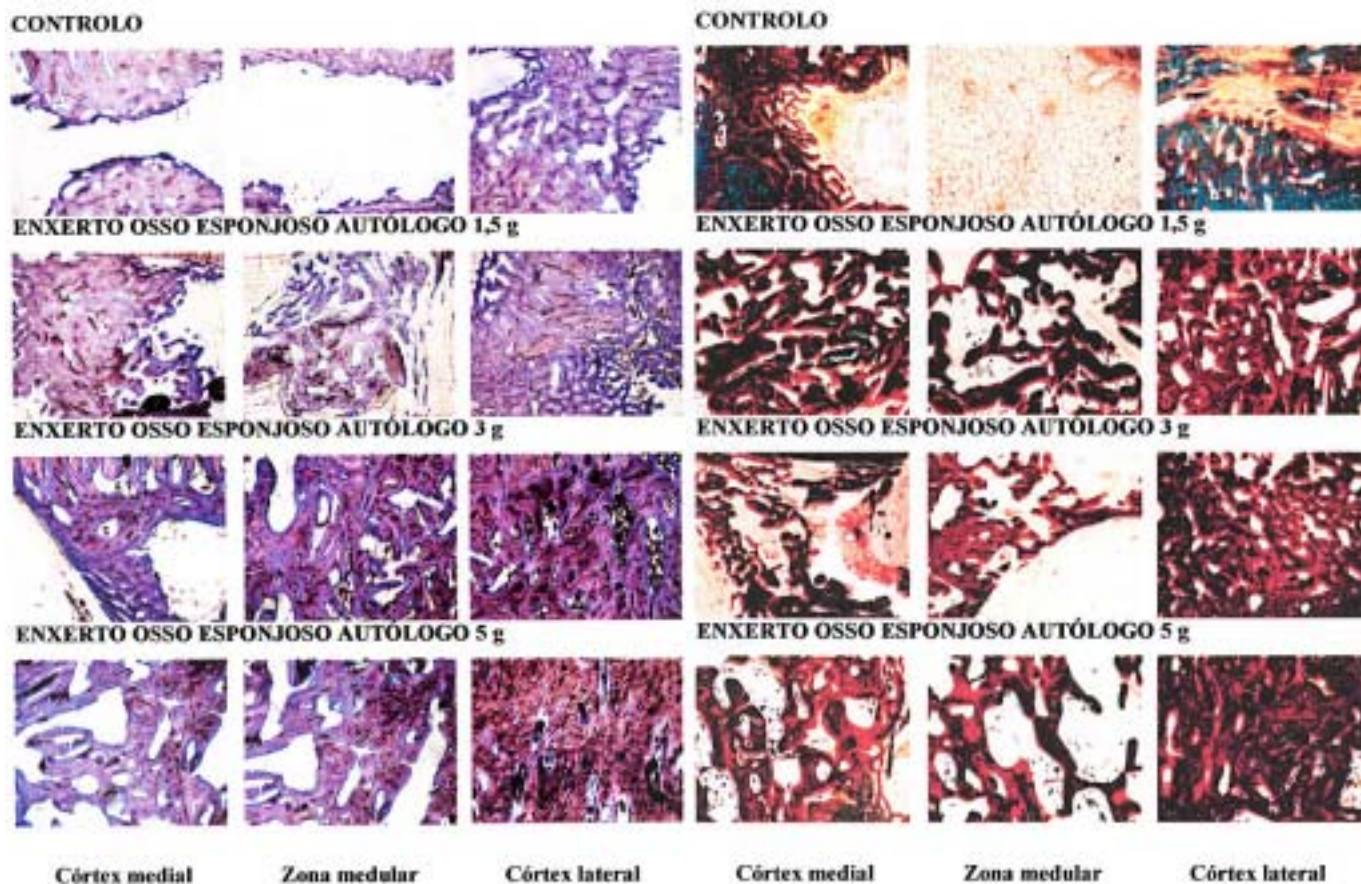


Figura 4A - Avaliação histológica dos vários grupos em estudo à 12ª semana pós-operatória (Azul de Toluidina, x15).

Figura 4B - Avaliação histológica dos vários grupos em estudo à 12ª semana pós-operatória (Tricrômico de Goldner, x15).

BMD, sendo que a média do conjunto das três ROI se demonstrou um valor mais fidedigno. No entanto, verificou-se que a zona correspondente ao córtex medial (R2) apresentou no geral uma BMD média inferior à do córtex lateral (R3) nos vários grupos experimentais em estudo, apesar desta diferença não se ter revelado estatisticamente significativa possivelmente devido às grandes variações individuais observadas para cada uma das várias regiões de interesse em estudo.

Histologia e Histomorfometria Óssea

As Figuras 4A e 4B demonstram a avaliação histológica dos vários grupos à 12ª semana do período pós-operatório. A maior formação de tecido ósseo observou-se nos grupos 3 e 4 que haviam recebido as maiores quantidades de enxerto ósseo. A histologia reflectiu os resultados obtidos pela avaliação radiográfica convencional, densitometria óptica e DEXA, observando-se organização do tecido ósseo e restabelecimento do córtex oposto à placa óssea. A ausência de formação de tecido ósseo cortical directamente sob a placa

pôde ser observada na maioria das peças ósseas.

O BV correspondeu a $39,2 \pm 24,4\%$ no grupo controlo (grupo 1) e a $62,0 \pm 14,4\%$, $76,0 \pm 15,2\%$ e $84,0 \pm 4,2\%$ nos grupos que receberam 1,5 g (grupo 2), 3 g (grupo 3) e 5 g (grupo 4) de enxerto ósseo, respectivamente. A análise de variância permitiu verificar que o BV foi significativamente afectado pelo tratamento ($p < 0,01$) não tendo, igualmente, ocorrido diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos 3 e 4 à 12ª semana do período pós-operatório.

DISCUSSÃO

Apesar da literatura referir vários estudos sobre a incorporação do enxerto de osso esponjoso autólogo em diferentes modelos experimentais de defeitos ósseos não críticos^{17,21}, ou ainda em modelos animais de defeitos ósseos segmentares de dimensões críticas em ossos longos^{2,22,23}, não existe referência sobre a quantidade de osso esponjoso mais adequada a utilizar em defeitos ósseos corticais, já que existe morbilidade associada à sua obtenção. Com este intuito procedeu-se ao sub-, correcto ou

sobre-preenchimento de um defeito não crítico no tecido ósseo cortical com vista a determinar a quantidade mais adequada deste tipo de enxerto ósseo a utilizar de forma isolada ou associado a outros potenciais substitutos ou indutores do tecido ósseo²⁴⁻²⁷.

A selecção de um modelo experimental de osteotomia de 4 mm na diáfise média da tibia neste estudo deveu-se ao facto dos tecidos moles envolventes da tibia nesta localização serem mínimos relativamente a outras opções, uma vez que a diáfise da tibia a este nível é praticamente subcutânea na sua face interna, permitindo assim uma correlação razoável entre a BMD e os valores de densidade óptica obtidos através de películas radiográficas. A avaliação da densitometria óptica através de exames radiográficos necessita apenas de uma variação da densidade do tecido ósseo em cerca de 5 a 10%, sendo o coeficiente de variação (CV) menor em localizações em que a área do tecido ósseo em estudo possuir uma cobertura por tecidos moles mínima relativamente a zonas em que esta cobertura é constituída por grandes massas musculares, sendo que nestas situações o CV poderá atingir os 10 a 30%²⁸.

No que se refere à avaliação visual das películas radiográficas, esta permitiu constatar um aumento da radiodensidade no local da osteotomia, positivamente correlacionada com a aplicação das maiores quantidades de auto-enxerto de osso esponjoso a este nível, e ao longo do tempo de regeneração óssea nos vários grupos em estudo. O aspecto característico do auto-enxerto de osso esponjoso imediatamente após a sua aplicação vai-se alterando à medida que este é incorporado no local receptor, até à observação de uma radiopacidade homogénea e do aparecimento de continuidade entre as margens do tecido ósseo no local da osteotomia e a matriz do enxerto ósseo. Burchardt (1983)¹⁵ descreve estas observações, referindo que a formação de tecido ósseo sobre as trabéculas ósseas transplantadas pode sofrer um ligeiro aumento da radiodensidade na área em que se aplicou o enxerto numa primeira fase sendo que, à medida que o enxerto é incorporado e reabsorvido pelo processo de remodelação óssea a radiodensidade geral tende a retornar ao seu padrão normal.

Apesar do método da quantificação da densidade radiográfica por densitometria óptica constituir uma técnica com elevado CV e limitações inerentes, os resultados finais obtidos à 12ª semana pós-operatória foram confirmados por métodos com elevada sensibilidade, como sejam, a DEXA²⁹ e análises de histomorfometria óssea¹². Para além do referido, a densitometria óptica possui as vantagens de constituir uma técnica com objectividade na ava-

liação da densidade óssea comparativamente aos métodos que se baseiam apenas na avaliação visual das películas radiográficas, com a sua classificação segundo um certo número de variáveis às quais são conferidas pontuações², e tornar possível a realização de estudos ao longo do tempo sem a necessidade da eutanásia dos animais. Pelas leituras da densidade óptica verificou-se que estas cumpriram um padrão de decréscimo dos seus valores ao longo do tempo, paralelamente com o aumento da densidade do tecido ósseo, sendo que nos grupos que receberam as diferentes quantidades de auto-enxerto de osso esponjoso, esta redução foi mais acentuada numa fase inicial relativamente ao grupo controlo em que o decréscimo da densidade óptica se notou numa fase mais tardia do processo de cicatrização do tecido ósseo, possivelmente devido às propriedades osteogénicas, osteoindutoras e osteocondutoras do enxerto ósseo promotoras do processo de regeneração óssea².

As leituras das densidades ópticas permitiram concluir que estas convergiram para valores muito próximos entre si a partir da 8ª semana pós-operatória, especialmente nos grupos que haviam recebido as diferentes quantidades de enxerto ósseo (Figura 2). Os valores da densidade óptica à oitava semana pós-operatória aproximaram-se dos valores máximos obtidos neste estudo, o que poderá ser justificado pela actividade osteogénica máxima do auto-enxerto de osso esponjoso estar reportada em diversos estudos justamente à oitava semana após a sua aplicação¹⁶. Pela densitometria óptica verificou-se que, a partir da oitava semana e até à 12ª semana pós-operatória não existiram diferenças significativas entre os grupos que receberam as diferentes quantidades do enxerto ósseo. Assim, pela análise exclusiva dos resultados obtidos pela densitometria óptica, por análise de variância e pela comparação múltipla de pares de médias ao longo do tempo no período pós-operatório (Quadro I), poder-se-ia concluir que a aplicação padrão da quantidade deste tipo de enxerto ósseo, necessária apenas ao preenchimento mínimo do defeito ósseo em causa, e no nosso estudo correspondente ao defeito ósseo preenchido com as 1,5 g de auto-enxerto de osso esponjoso, foi suficiente para que se atingisse uma correcta regeneração óssea do local da osteotomia à oitava semana pós-operatória.

Os resultados da densitometria óptica à 12ª semana pós-operatória foram corroborados pela DEXA e pela análise de histomorfometria óssea, verificando-se a não existência de diferenças significativas na BMD e BV entre os dois grupos que haviam recebido as quantidades mais elevadas de enxerto ósseo, sendo igualmente de referir que estes resultados estão de acordo com os obtidos no

estudo de DeVries et al (1996)¹⁷ em defeitos ósseos unicorticais, ao nível da epífise proximal do cúbito no cão, preenchidos com diferentes volumes de auto-enxerto de osso esponjoso. A ausência de formação de tecido ósseo directamente sob a placa óssea poderá ter sido devido ao stress de protecção ou inibição do fluxo sanguíneo directamente sob aquela³⁰, ou ainda pela rigidez da placa. Esta terá permitido a distribuição de alguma da carga exercida sobre o membro no córtex contralateral, razão pela qual a formação de tecido ósseo a este nível foi evidente.

CONCLUSÃO

Conclui-se, assim, que se pode obter um efeito osteogénico clínico pela utilização da quantidade de auto-enxerto de osso esponjoso necessária apenas ao preenchimento mínimo do defeito ósseo em causa, sem compressão do enxerto ósseo ou excessivo preenchimento do defeito ósseo, e simultaneamente promotor da morbidade mínima necessária no local dador.

AGRADECIMENTOS

Estudo financiado pela Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro e pelo Laboratório de Medicina Nuclear, Unidade de Estudo do Metabolismo Ósseo e Instituto de Patologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

BIBLIOGRAFIA

- MOWLEM R: Cancellous chip bone-grafts: Report on 75 cases. *Lancet* 1944;2:746-748
- HEIPLE KG, GOLDBERG VM, POWELL AE, BOS GD, ZIKA JM: Biology of cancellous bone grafts. *Clin Orthop North Am* 1987;18:179-185
- BOSSE MJ, ROBB G: Techniques for the reconstruction of large traumatic bony defects with massive autogenous cancellous bone graft. *Tech Orthop* 1992;7:17-25
- RECKLING FW, WATERS III CH: Treatment of nonunions of fractures of the tibial diaphysis by posterolateral cortical cancellous bone grafting. *J Bone Joint Surg* 1980;62A:936-941
- JEBSON PJ, ADAMS BD: Wrist arthrodesis: review of current technique. *J Am Acad Orthop Surg* 2001;9:53-60
- LINDSEY RW, PROBE R, MICLAU T, ALEXANDER JW, PERREN SM: The effects of antibiotic-impregnated autogenic cancellous bone graft on bone healing. *Clin Orthop Relat Res* 1993;(291):303-312
- GAMRADT SC, LIEBERMAN JR: Bone graft for revision hip arthroplasty: biology and future applications. *Clin Orthop Relat Res* 2003;(417):183-194
- MUSCHLER GF, LANE JM: Spinal fusion. Principles of bone fusion. In: Rothman, Simeone Eds. *The Spine*. 4^a ed. Filadélfia. WB Saunders 1999
- BURCHARDT H: Biology of bone transplantation. *Clin Orthop Relat Res* 1987;(18):187-196
- KALE AA, DICESARE PE: Osteoinductive agents: Basic science and clinical applications. *Am J Orthop* 1995;24:752-761
- KHAN SN, CAMMISA FP JR, SANDHU HS, DIWAN AD, GIRARDI FP, LANE JM: The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg* 2005;13:77-86
- FRIEDLAENDER GE: Current concepts review: Bone grafts. *J Bone Joint Surg Am* 1987;69:786-790
- STEVENSON S: Biology of bone grafts. *Orthop Clin North Am* 1999;30:543-552
- BAUER TW, MUSCHLER GF: Bone graft materials: An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res* 2000;(371):10-27
- BURCHARDT H: The biology of bone graft repair. *Clin Orthop Relat Res* 1983;(174):28-42
- ALBREKTSSON T: Repair of bone grafts: A vital microscopic and histological investigation in the rabbit. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1980;14:1-12
- DEVRIES WJ, RUNYON CL, MARTINEZ AS, IRELAND WF: Effect of volume variations on osteogenic capabilities of autogenous cancellous bone graft in dogs. *Am J Vet Res* 1996;57:1501-1505
- BETZ RR: Limitations of autograft and allograft: new synthetic solutions. *Orthopedics* 2002;25(Suppl 5):S561-570
- YOUNGER EM, CHAPMAN MW: Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma* 1989;3:192-195
- PARFITT AM: Stereologic basis of bone histomorphometry: Theory of quantitative microscopy and reconstruction of the third dimension. In: Recker RR Ed. *Bone Histomorphometry: Techniques and Interpretation*. Boca Raton. CRC Press, Inc 1983;53-87
- MICLAU T, LINDSEY RW, PROBE R, RAHN BA, PERREN SM: Autogenous cancellous bone graft incorporation in a gap defect in the canine femur. *J Orthop Trauma* 1996;10:108-113
- SCHWARZ N, SCHLAG G, THURNHER M, ERCHBERGER J, DINGES HP, REDL H: Fresh autogeneic, frozen allogeneic, and decalcified allogeneic bone grafts in dogs. *J Bone Joint Surg Br* 1991;73:787-790
- GERHART TN, KIRKER-HEAD CA, KRIZ MJ et al: Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein. *Clin Orthop Relat Res* 1993;(293):317-326
- ERBE EM, MARX JG, CLINEFF TD, BELLINCAMPI LD: Potential of an ultraporous beta-tricalcium phosphate synthetic cancellous bone void filler and bone marrow aspirate composite graft. *Eur Spine J* 2001;10(Suppl 2):S141-146
- SZPALSKI M, GUNZBURG R: Applications of calcium phosphate-based cancellous bone void fillers in trauma surgery. *Orthopedics* 2002;25(Suppl 5):S601-609
- WILTFANG J, KLOSS FR, KESSLER P et al: Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. An animal experiment. *Clin Oral Implants Res* 2004;15:187-193
- DIAS MI, LOURENÇO PJ, RODRIGUES AC, AZEVEDO JM, FERREIRA JA, CABRITA AM: The influence of the quantity of autologous spongy bone graft applied or its association to platelet rich plasma on the induction of the bone regeneration process in two experimental models in the sheep. *Vet Comp Orthop*

29. Blake GM, Fogelman I: Methods and clinical issues in bone densitometry and quantitative ultrasonometry. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA Eds. Principles of Bone Biology. 2^a ed. San Diego. Academic Press 2002;1573-1585

30. PERREN SM, KLAUE K, POHLER O, PREDIERI M, STEINEMANN S, GAUTIER E: The limited contact dynamic compression plate (LC-DCP). Arch Orthop Trauma Surg 1990;109:304-310