

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

FÁBIAN MACCARINI PERUCHI

VIABILIDADE DO ENXERTO ÓSSEO DA CRISTA ILÍACA

VASCULARIZADO PELO RAMO ILÍACO DA ARTÉRIA

ILIOLOMBAR – ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS

Porto Alegre

2009

FÁBIAN MACCARINI PERUCHI

**VIABILIDADE DO ENXERTO ÓSSEO DA CRISTA ILÍACA
VASCULARIZADO PELO RAMO ILÍACO DA ARTÉRIA ILIOLOMBAR –
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

**Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do grau de Mestre pelo Programa de
Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da
Pontifícia Universidade Católica do Rio
Grande do Sul.**

ORIENTADOR:

Dr. Jefferson Luís Braga da Silva

CO-ORIENTADOR:

Dr. Vinicius Duval da Silva

**Porto Alegre
2009**

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

P471v Peruchi, Fábio Maccarini

Viabilidade do enxerto ósseo da crista ilíaca vascularizado pelo ramo ilíaco da artéria iliolumbar - estudo experimental em ratos / Fábio Maccarini Peruchi. Porto Alegre: PUCRS, 2009.

75 f.: il. tab.

Orientação: Prof. Dr. Jefferson Luís Braga da Silva.

Co-orientação: Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de Concentração: Cirurgia.

1. TRANSPLANTE ÓSSEO. 2. MATRIZ ÓSSEA/ irrigação sanguínea. 3. ARTÉRIA ILÍACA. 4. REGENERAÇÃO ÓSSEA. 5. HISTOLOGIA. 6. IMUNOISTOQUÍMICA. 7. MODELOS ANIMAIS. 8. EPIDEMIOLOGIA EXPERIMENTAL. 9. RATOS. I. Silva, Jefferson Luís Braga da. II. Silva, Vinicius Duval da. III. Título.

C.D.D. 617.52

C.D.U. 617-89.843:61118.4(043.3)

N.L.M. WE 190

Aos meus pais, Amélio Peruchi e Dulce Maccarini Peruchi pelo amor, zelo e assistência incondicional.

À minha irmã Mirella e aos meus irmãos Rafael, Mateus e Samuel com os quais compartilho os melhores momentos da vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Jefferson Luís Braga da Silva por sempre incentivar e participar diretamente na construção da minha formação pessoal e acadêmica, tornando-se o exemplo a ser seguido.

Ao meu co-orientador Dr. Vinicius Duval da Silva pelo auxílio na elaboração do trabalho.

Ao Dr. Marcos Ricardo de Oliveira Jaeger pela ajuda e conselhos durante a realização dos experimentos.

Ao Dr. Paulo Favalli pelas horas de ensinamento voluntário no Laboratório de Microcirurgia.

Ao Gilmar, pelo serviço prestado no Laboratório de Microcirurgia.

Ao meu amigo e colega de residência Dr. Gustavo Munaro Moschen, pelos ensinamentos, exemplo e momentos de descontração durante os dois anos de especialização em Cirurgia da Mão.

Ao Dr. Javier Andrés Arturo Roman Veas pelas inúmeras contribuições no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Tiago, funcionário do Laboratório de Patologia, pelo auxílio na preparação do material histológico.

Ao acadêmico Marcelo Costa Rabello por seu empenho e disponibilidade.

A todos os colegas do Serviço de Cirurgia da Mão do Hospital São Lucas da PUCRS pelo apoio e ajuda nos momentos necessários.

RESUMO

Introdução: Os enxertos ósseos continuam sendo utilizados com frequência na resolução de situações clínicas com perda de substância óssea. A viabilidade das células ósseas transferidas com o enxerto é um dos fatores determinantes para as propriedades mecânicas e fisiológicas do enxerto. Uma dúvida inerente ao procedimento cirúrgico quando se utiliza enxertos ósseos vascularizados é: será que o enxerto ósseo manterá sua viabilidade através do pedículo vascular com o decorrer do tempo? Através de um modelo experimental, almejamos criar inferências sobre a viabilidade do enxerto ósseo vascularizado da crista íliaca em ratos e verificar suas características histológicas.

Métodos: Foram utilizados 23 ratos machos isogênicos da linhagem Kyoto, os quais foram divididos em dois grupos, o primeiro composto por animais submetidos à técnica do enxerto ósseo vascularizado da crista íliaca baseado no ramo íliaco da artéria iliolumbar, e o segundo (grupo controle) submetidos ao mesmo procedimento que o primeiro com a adição da ligadura do pedículo vascular. A viabilidade dos enxertos ósseos foi verificada durante três semanas, através da visualização direta do enxerto, histologia e imuno-histoquímica.

Resultados: Todos os enxertos vascularizados avaliados na primeira semana apresentaram viabilidade segundo a observação direta, histologia e imuno-histoquímica. Entretanto na segunda e terceira semana os enxertos mostraram-se inviáveis em 75% dos casos quando submetidos à avaliação segundo a observação direta e em 50% dos casos quando realizada a análise histológica e imuno-histoquímica.

Conclusão: Alguns enxertos vascularizados em sua concepção tornaram-se inviáveis e passaram a se comportar como enxertos não-vascularizados sob a análise da observação direta e histológica. Apesar da possibilidade de falha, o uso de enxertos ósseos vascularizados deve ser incentivado, pois a histologia descritiva demonstrou maior densidade celular na porção óssea medular, osteócitos com maior funcionalidade na deposição de matriz óssea, com rede vascular intra-óssea preservada.

Palavras-chave: transplante ósseo. matriz óssea. histologia. imuno-histoquímica. modelos animais. rato.

ABSTRACT

Introduction: The bone grafts are still used frequently in the resolution of clinical situations with loss of bone substance. The viability of bone cells transferred with the graft is crucial in the mechanical and physiological properties of the graft. A question inherent to the surgical procedure when using vascularised bone grafts is: will the bone graft maintain its viability through the vascular pedicle over time? Through an experimental model, we desire to create inferences about the viability of vascularised bone graft from the iliac crest in rats and check their histological features.

Methods: We used 23 isogenic male Kyoto rats, which were divided into two groups, the first consisting of animals subjected to the technique of vascularised bone graft from the iliac crest and pedicled on the iliac branch of the iliolumbar artery, and the second (control group) underwent the same procedure the first with the addition of ligation of the vascular pedicle. The viability of bone grafts was observed for three weeks, by direct observation of the graft, histology and immunohistochemistry.

Results: All vascularised grafts evaluated in the first week showed viability by direct observation, histology and immunohistochemistry. Meanwhile in the second and third weeks the grafts were shown to be not viable in 75% of cases when subjected to evaluation by the direct observation and 50% of cases when performed for histological analysis and immunohistochemistry.

Conclusions: Some vascularised grafts in their design have become unviable and began to behave as if non-vascularised grafts under the direct observation and histology. Despite the possibility of failure, the use of vascularized bone grafts should be encouraged, because the descriptive histology showed greater cell density in the portion medullary bone, osteocytes with greater functionality in the deposition of bone matrix, with intra-vascular network bone preserved.

Keywords: bone transplantation. bone matrix. histology. immunohistochemistry. models, animal. rat.

LISTA DE ABREVIATURAS

DAB - Diaminoazobenzidina

FAMED - Faculdade de medicina

HE - Hematoxilina e eosina

IC – Intervalo de confiança

PUCRS - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Anel pélvico do rato, vista anterior.....	21
Figura 2. Anel pélvico do rato, vista em perfil.....	21
Figura 3. Microfotografia de corte histológico de enxerto ósseo de rato submetido à injeção de tintura da Índia, com presença do corante nos vasos periosteais da região cortical e nos vasos endosteais da região medular (HE, 50X)	25
Figura 4. Desenho da incisão cirúrgica.....	26
Figura 5. Acesso cirúrgico e localização da transição entre as musculaturas glútea e abdominal, pontos de referência para a localização do pedículo.....	27
Figura 6. Localização do ramo ilíaco da artéria iliolumbar após sua emergência da cavidade abdominal.....	27
Figura 7. Laparotomia com dissecação do ramo ilíaco da artéria iliolumbar em direção à sua origem na aorta abdominal.....	29
Figura 8. Ligadura do ramo ilíaco distalmente a emergência de vaso para o osso ilíaco.....	29
Figura 9. Exposição da face externa do osso ilíaco após incisão e afastamento da musculatura glútea.....	30
Figura 10. Local de osteotomia do osso ilíaco, separando seu terço superior.....	30
Figura 11. Osteotomia e liberação da musculatura fixa à porção superior do osso ilíaco.....	31
Figura 12. Enxerto ósseo vascularizado do osso ilíaco baseado no ramo ilíaco da artéria iliolumbar.....	31
Figura 13. Envolvimento do enxerto com a lâmina de silicone.....	32
Figura 14. Posicionamento do enxerto envolvido com a lâmina de silicone na cavidade abdominal.....	32
Figura 15. Aproximação do plano muscular com fechamento da cavidade abdominal....	33
Figura 16. Aproximação dos bordos cutâneos, finalizando o procedimento cirúrgico.....	33
Figura 17. Aspecto macroscópico do enxerto ósseo vascularizado.....	36
Figura 18. Aspecto macroscópico do enxerto ósseo não- vascularizado.....	37
Figura 19. Fotomicrografia de corte histológico de enxerto ósseo com características de viabilidade (HE, 50X).....	38
Figura 20. Fotomicrografia de corte histológico de enxerto ósseo com características de viabilidade. Na região medular óssea há abundância de elementos celulares e matriz osteogênica (HE, 100X).....	39

Figura 21. Fotomicrografia de corte histológico de enxerto ósseo com características de enxerto ósseo não-vascularizado (HE, 50X).....	39
Figura 22. Fotomicrografia de corte histológico de enxerto ósseo com características de ausência de viabilidade. Na região medular óssea há sinais de reabsorção óssea e diminuição da densidade celular (HE, 100X).....	40
Figura 23. Fotomicrografia de corte imuno-histoquímico com presença de estruturas com lúmen coradas em marrom, caracterizando vasos sanguíneos na região medular óssea (HE com marcador imuno-histoquímico anti-CD 34, 200X)	40
Figura 24. Fotomicrografia de corte imuno-histoquímico com ausência de estruturas com lúmen em marrom, caracterizando a ausência na detecção de vasos sanguíneos (HE com marcador imuno-histoquímico anti-CD 34, 200X)	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação da concordância entre observação direta, HE e CD 34.....	41
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1 O OSSO.....	15
2.2 HISTÓRICO.....	15
2.3 DEFINIÇÕES.....	16
2.4 FISIOLOGIA DOS ENXERTOS ÓSSEOS.....	16
2.5 IMPORTÂNCIA DA VASCULARIZAÇÃO.....	19
2.6 ESTUDO EXPERIMENTAL EM ANIMAIS.....	20
2.7 ANATOMIA VASCULAR DO RATO.....	22
3 OBJETIVOS.....	23
3.1 OBJETIVO PRINCIPAL.....	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1 DELINEAMENTO.....	24
4.2 ANIMAIS.....	24
4.3 ESTUDO PILOTO.....	24
4.4 GRUPOS DE COMPARAÇÃO.....	25
4.5 PROCEDIMENTOS.....	26
4.6 HISTOLOGIA.....	34
4.7 IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	34
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
4.9 ASPECTOS ÉTICOS.....	35
5 RESULTADOS.....	36
5.1 OBSERVAÇÃO DIRETA.....	36
5.2 HISTOLOGIA.....	37
5.3 CORRELAÇÃO ENTRE A OBSERVAÇÃO DIRETA E A HISTOLOGIA.....	41

6 DISCUSSÃO.....	42
7 CONCLUSÕES.....	44
8 REFERÊNCIAS.....	45
ANEXOS.....	51
ANEXO A – ARTIGO SUBMETIDO PARA A REVISTA MICROSURGERY.....	51

1 INTRODUÇÃO

Os enxertos ósseos continuam sendo utilizados com frequência na resolução de situações clínicas com perda de substância óssea. Sua aplicabilidade é vasta na cirurgia reconstrutiva, principalmente na área ortopédica, sendo empregados para o reparo da perda tecidual óssea, que pode ser decorrente de traumas, pseudo-artroses, correção de deformidades, ressecção tumoral e estímulo a osteogênese.¹⁻⁴

A viabilidade das células ósseas transferidas com o enxerto é um dos fatores determinantes para as propriedades mecânicas, como a resistência a forças externas, porosidade e densidade óssea, e também determina propriedades fisiológicas como a capacidade de osteogênese e osteoindução. Por isso, fatores que contribuem para a sobrevivência celular deveriam ser respeitados para a obtenção de enxertos com qualidades superiores, determinando, desta forma, melhor prognóstico nas intervenções que visam a reconstrução de defeitos do aparelho esquelético.

A obtenção dos enxertos ósseos vascularizados requer maior destreza cirúrgica, curva de aprendizagem da técnica mais longa e muitas vezes a detenção de conhecimento microvascular para dissecação e proteção do pedículo.²

Uma dúvida inerente ao procedimento cirúrgico quando se utiliza enxertos ósseos vascularizados é: será que o enxerto ósseo manterá sua viabilidade através do pedículo vascular com o decorrer do tempo? Alguns eventos poderiam obstruir o pedículo, como compressão externa, edema, imobilização pós-operatória, trombose devido estase venosa e lesão do pedículo devido manipulação. Ao ocorrer uma obstrução do pedículo, o enxerto ósseo vascularizado transforma-se em não-vascularizado.

Através de um modelo experimental, almejamos criar inferências sobre a viabilidade do enxerto ósseo vascularizado da crista ilíaca em ratos sustentada pelo pedículo vascular e verificar suas características histológicas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O OSSO

O osso é um tecido (material) e um órgão (estrutura). O tecido ósseo é composto por células, mineral, matriz e água. Os osteoblastos secretam um material amorfo que gradualmente se torna densamente fibroso – osteóide, então cristais de fosfato de cálcio são depositados no osteóide, assim formando a matriz óssea.⁵ Os osteoblastos ficam circundados pela matriz óssea e tornam-se osteócitos. A integração dos componentes minerais com a matriz orgânica permite que o osso possua propriedades mecânicas relacionadas à porção mineral (quebradiço) ou a porção da matriz (elasticidade).

O colágeno tipo I é o principal componente da matriz óssea, correspondendo aproximadamente a 30% do peso seco da matriz não-desmineralizada.⁶ As proteínas não-colágenas correspondem a 5% do peso seco da matriz e participam da regulação da organização, remodelação e mineralização da matriz.

A parte mineral, composta por cristais de fosfato de cálcio é análoga a hidroxiapatita, com fórmula química descrita como $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

2.2 HISTÓRICO

A idéia do emprego de enxerto ósseo vem de longa data. Em 1668, o duque cirurgião Job van Meekeren descreveu o primeiro procedimento de enxerto ósseo reparando o defeito do crânio de um soldado com um pedaço de crânio canino. Depois de anos, ameaçado de heresia pela Igreja, tal soldado solicitou a retirada do enxerto canino de seu crânio e a realização do procedimento não foi possível devido à osteointegração obtida.^{7,8}

Phelps, em 1891, realizou um enxerto ósseo vascularizado, transferindo um fragmento ósseo canino para o defeito tibial de uma criança.⁹

Somente em 1915, após a publicação de Albee os enxertos ósseos passaram a ser utilizados com maior frequência.¹⁰

Com o desenvolvimento do microscópio cirúrgico nos anos 60 e com o avanço dos instrumentais microcirúrgicos houve uma impulsão no uso dos enxertos ósseos vascularizados. O trabalho de Ostrup, em 1974, estimulou o uso deste tipo de enxerto.¹¹

Taylor, em 1975, realizou o primeiro enxerto de fíbula vascularizado com microanastomose.¹²

2.3 DEFINIÇÕES

Os enxertos ósseos podem ser agrupados em: enxerto ósseo vascularizado, quando existe um pedículo vascular preservado nutrindo-o, e em enxerto ósseo não-vascularizado ou convencional, quando não recebe aporte sanguíneo através de um pedículo.

A rigor, o enxerto ósseo vascularizado deveria ser denominado retalho ósseo, uma vez que o uso do termo retalho é empregado para caracterizar uma porção tecidual transplantada com a preservação de seu suprimento sanguíneo e, o enxerto ósseo não-vascularizado deveria ser denominado simplesmente enxerto ósseo, pois o termo enxerto refere-se a uma porção tecidual transplantada sem a preservação da sua vascularização.

A escolha do uso dos termos enxerto ósseo vascularizado e enxerto ósseo não-vascularizado atribui-se ao seguimento da nomenclatura empregada em todos os artigos revisados para a elaboração deste estudo.

2.4 FISIOLOGIA DOS ENXERTOS ÓSSEOS

Três funções fisiológicas foram atribuídas aos enxertos ósseos. A função de osteoindução refere-se ao processo de induzir a formação local de osso através do recrutamento de células com potencial para formação óssea.^{13, 14, 15} A osteocondução oferece um arcabouço para a deposição óssea.¹⁶ E a osteogênese é definida como a capacidade de fornecer células formadoras de osso.¹⁷

Ollier, em 1867, relatou que enxertos são viáveis e que fragmentos ósseos sem periósteo retirados do osso doador poderiam sobreviver e crescer num leito receptor favorável.¹⁸ Barth, em 1893, foi o primeiro a discordar dessa conclusão, seus estudos revelaram que o enxerto ósseo estava completamente morto vários dias após sua transferência, e que somente através de um gradual processo de invasão por células oriundas do osso receptor havia ocupação por células vivas, descrevendo o processo de osteocondução.¹⁹

Phemister, em 1914, demonstrou conclusivamente que algumas células osteogênicas da superfície do enxerto sobreviviam por difusão de nutrientes advindos do leito receptor, ele concordou com Barth que a grande maioria das células no centro do enxerto estavam mortas, mas notou que as células sobreviventes na superfície desempenhavam importante papel na reabsorção e no repovoamento de células ósseas.^{20, 21, 22}

Gallie & Robertson, em 1918, concordaram que a sobrevivência de células na superfície do osso enxertado era importante. Eles também notaram que a sobrevivência e a osteogênese eram muito melhores com o uso de osso esponjoso que com a utilização de osso cortical.²³

Mowlen, em 1944, popularizou o uso de osso esponjoso e demonstrou sua superioridade ao osso cortical em relação à osteointegração.^{24, 25}

Fazili, em 1978, relatou que, passados três anos da realização do enxerto, e não havendo estímulo ósseo, cerca de 92% do osso enxertado era reabsorvido, ressaltando a importância do ambiente biológico para o qual é transferido o enxerto.²⁶

Urist, em 1983, descreveu que as células ósseas que sobreviveram na superfície do enxerto desempenham um papel importante na proliferação de novas células formadoras de osso.¹⁴ Oklund, em 1986, demonstrou que é da sobrevivência de células na superfície do enxerto que resulta a superioridade dos enxertos autógenos recém obtidos sobre os enxertos autógenos congelados ou sobre os implantes ósseos.²⁷

Fisiologicamente o enxerto ósseo não-vascularizado, após ser obtido do osso doador e transferido para o leito receptor, necessita dos tecidos vizinhos para ser nutrido e sobreviver, pois não possui meio próprio de auto-sustentação. Através da liberação de fatores humorais pelos tecidos vizinhos em direção ao enxerto, ocorre a promoção da angiogênese, e com o tempo, sua revascularização. Como o arcabouço estrutural ósseo do enxerto, que é composto pela porção mineralizada do osso, se mantém íntegro, ele preserva a capacidade osteocondutiva, no entanto, as propriedades osteogênicas e osteoindutivas dependentes dos componentes celulares tendem a diminuir, pois no período entre a perda da vascularização

iniciada com a obtenção do enxerto no osso doador e a revascularização promovida pela invasão de vasos sanguíneos da vizinhança ocorre morte celular no enxerto.²⁸

Os enxertos ósseos vascularizados, por sua vez, são concebidos com a preservação de sua vascularização arterial e venosa, permitindo uma condição de sobrevivência celular.²⁹ Com conseqüente obtenção de um enxerto com propriedades osteocondutivas, osteoindutivas e osteogênicas, que se comporta de modo semelhante ao osso sadio.

Os enxertos ósseos não-vascularizados necessitam em torno de cinco semanas para readquirir uma vascularização condizente ao exercício de sua função reparadora osteogênica, e ainda partem de uma situação menos privilegiada no que se refere ao quesito celular, devido à morte celular maciça que antecedeu a revascularização.³⁰

Trabalhos convincentes sustentam o conceito de que somente poucas células superficiais nos auto-enxertos não-vascularizados sobrevivem, muitas sofrendo necrose.³¹

Sempuku *et al* afirmam que uma semana após a transferência para o leito receptor, todo o enxerto estava necrosado. O osso foi gradualmente reabsorvido e a presença de osso neo-formado ao redor do enxerto foi detectada somente após cinco semanas, sugerindo que a revascularização do enxerto e a formação óssea ocorreram por substituição a partir do leito receptor.³⁰

Nos últimos cinqüenta anos, os enxertos vascularizados têm sido amplamente utilizados.^{2,3} Presumivelmente, este procedimento garante mínima absorção óssea e a sobrevivência de grande parte das células do segmento ósseo transferido, as quais auxiliam no processo de consolidação e remodelação óssea.^{29, 32} Ocorrendo um processo de consolidação similar ao que ocorre numa fratura, ao invés de um processo mais lento de incorporação do enxerto não-vascularizado, que desempenha uma função de suporte estrutural pelo qual ocorre o crescimento de novas células.^{32, 33, 34, 35, 36}

Perante as argumentações acima descritas, o enxerto ósseo vascularizado apresenta superioridade na capacidade de consolidação e integração no leito receptor quando comparado ao enxerto ósseo não-vascularizado. Aquele apresenta maior resistência devido ao equilíbrio orgânico e inorgânico do tecido ósseo, maior potencial osteoindutivo pela maior viabilidade celular com conseqüente síntese protéica e também maior potencial osteogênico.

2.5 IMPORTÂNCIA DA VASCULARIZAÇÃO

A angiogênese, processo de formação de novos vasos, é essencial no desenvolvimento e reparo ósseo. A formação de novos vasos e as funções microvasculares são cruciais no reparo ósseo, não somente para o suprimento adequado de nutrientes, transporte de macromoléculas e invasão celular, mas também para a regulação do microambiente metabólico.³⁷

A vascularização é considerada um dos fatores principais que garantem a qualidade do osso transferido. Procedimentos para manter a irrigação sanguínea devem ser seguidos para a obtenção de um enxerto ósseo vascularizado, trazendo consigo maior potencial osteoindutivo e capacidade osteogênica. O processo de osteogênese é determinado pela interação seqüencial de osteoclastos, osteoblastos e angiogênese.^{38, 39}

O processo de recrutamento, e a ativação de osteoclastos, osteoblastos e das suas células precursoras dependem das propriedades da microcirculação, as quais também estão envolvidas no processo de regulação do microambiente metabólico.⁴⁰ Isto envolve a expressão e ativação de vários genes envolvidos na regulação do reparo ósseo. Então, as propriedades microvasculares podem exercer uma função essencial durante a osteogênese.⁴¹

A perda da integridade óssea leva à interrupção da microcirculação, ocasionando necrose e hipóxia do tecido ósseo.^{42, 39} A reconstrução da circulação é um dos primeiros eventos durante o reparo ósseo.^{39, 45} O estabelecimento de uma rede vascular funcional intacta parece não apenas preceder o evento de formação óssea, como também tem uma influência substancial no resultado.^{43, 44}

A osteogênese depende do processo de angiogênese, que é caracterizada por uma seqüência específica de eventos. Uma das etapas iniciais e essenciais da angiogênese é o aumento da permeabilidade vascular, que leva a uma alta exudação de plasma, e a subsequente formação de matriz osteogênica.^{38, 39, 45} A proliferação e a migração de células endoteliais é seguida pela tubulização e perfusão dos novos vasos formados, e, com a maturação dos vasos, as propriedades microcirculatórias são alteradas por células de músculo liso e por periócitos adjacentes.⁴⁶ Depois da vascularização, com a proliferação de células osteoblásticas e com a produção de matriz osteogênica, a neoformação óssea pode começar.^{38, 47}

2.6 ESTUDO EXPERIMENTAL EM ANIMAIS

Modelos animais experimentais têm provado utilidade na avaliação pré-clínica da eficácia funcional e segurança nas metodologias envolvendo tecido ósseo.⁴⁸

O presente estudo visa criar evidências sobre a viabilidade do enxerto ósseo vascularizado promovida pelo pedículo vascular com ausência da influência dos tecidos vizinhos. Tal estudo somente pode ser realizado em experimentos animais, pois não há justificativas para impedir a contribuição benéfica dos tecidos vizinhos na integração de enxerto em situações clínicas envolvendo humanos nem justificativas para reintervenções cirúrgicas visando a coleta de tecido do enxerto ósseo para estudo.

Dentre as opções de modelo animal, os ratos possuem a vantagem de apresentar condições experimentais padronizadas, são pouco onerosos para manutenção, a arquitetura óssea lamelar é similar a do homem, são de fácil manuseio, têm maior disponibilidade e resistência. Como desvantagem, podemos citar o pequeno porte, podendo trazer dificuldade na técnica cirúrgica, além de baixa remodelação intra-cortical.^{49, 50}

Na literatura encontramos descritos sete modelos de enxerto ósseo vascularizado em ratos: 1) com zona doadora no fêmur, nutrido pela artéria epigástrica inferior, 2) com zona doadora na tíbia, 3) com zona doadora no osso ilíaco, nutrido pela artéria iliolumbar ou pela artéria femoral circunflexa lateral, 4) com zona doadora na fíbula, nutrido pela artéria safena, 5) com zona doadora no acrômio, nutrido pelo tronco cervical, 6) com zona doadora no crânio, nutrido pela artéria carótida e 7) com zona doadora no fêmur, nutrido pela artéria femoral.^{51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58}

Neste estudo optamos como sítio doador o osso ilíaco (Figuras 1 e 2), com pedículo constituído pelo ramo ilíaco da artéria iliolumbar. A escolha se fundamenta nas maiores dimensões do enxerto obtido, na menor perda funcional para o animal, na possibilidade de proteger o enxerto ósseo dentro da cavidade abdominal e na facilidade técnica para sua obtenção.



Figura 1 – Anel pélvico do rato, vista anterior.



Figura 2 - Anel pélvico do rato, vista em perfil.

2.7 ANATOMIA VASCULAR DO RATO

A artéria iliolumbar origina-se na artéria aorta abdominal, distalmente à origem das artérias renais, aproximadamente no mesmo nível em que a veia iliolumbar drena para a veia cava inferior. Tipicamente a artéria iliolumbar passa lateralmente pela superfície ventral do músculo psoas e então se divide nos ramos lombar e ilíaco. O ramo ilíaco supre o osso ilíaco, e, juntamente com o nervo cutâneo femoral, cruza o ligamento inguinal e penetra na parede abdominal próximo à espinha ântero-superior do osso ilíaco.⁵⁹

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Estudar a viabilidade do enxerto ósseo da crista ilíaca vascularizado pelo ramo ilíaco da artéria iliolumbar no rato.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Encontrar diferenças na viabilidade do enxerto ósseo da crista ilíaca vascularizado pelo ramo ilíaco da artéria iliolumbar com o decorrer do tempo.

Descrever histologicamente o enxerto ósseo da crista ilíaca vascularizado pelo ramo ilíaco da artéria iliolumbar e o enxerto ósseo não-vascularizado da crista ilíaca.

Verificar a integridade dos vasos intra-ósseos no enxerto ósseo da crista ilíaca vascularizado pelo ramo ilíaco da artéria iliolumbar e no enxerto ósseo não-vascularizado da crista ilíaca.

Avaliar a correlação da viabilidade dos enxertos segundo a observação direta e a histológica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO

Estudo experimental.

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados 23 ratos machos isogênicos da linhagem Kyoto destinados exclusivamente à pesquisa, provenientes e mantidos no Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica da PUCRS, em condições ambientes adequadas para a espécie, com controle da temperatura, umidade, ventilação, luz, ruído, odores e interação social. Foram mantidos em gaiolas individuais, recebendo água e alimento em qualidade e quantidade adequados para a espécie. Os animais, observados no biotério do Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica da PUCRS, ficaram aos cuidados de profissionais com competência e experiência no seu manuseio. O protocolo de estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da FAMED-PUCRS. As regras para a utilização de animais de experimentação conforme a legislação brasileira foram respeitadas em todas as etapas do procedimento. Os parâmetros anatômicos utilizados neste estudo foram extraídos do livro Anatomia do Rato, de Greene.⁵⁹

4.3 ESTUDO PILOTO

Foram utilizados dois ratos machos da linhagem Kyoto durante o estudo piloto. Na ocasião realizamos a revisão da anatomia e determinamos o trajeto dos vasos iliolombares e de seus ramos. A mensuração do diâmetro médio da artéria foi de 0,7 mm e o da veia de 0,9 mm, dimensões estas confirmadas nos procedimentos subseqüentes deste estudo. O comprimento médio do pedículo do enxerto ósseo vascularizado foi de 25 mm. Após a

obtenção do enxerto ósseo vascularizado canulizamos a artéria aorta da qual provêm a artéria iliolumbar e injetamos tintura da Índia. Imediatamente o enxerto foi corado, e desta forma, comprovamos tratar-se de um enxerto ósseo vascularizado. Estes enxertos foram fixados em formalina tamponada com pH neutro a 10%. Para descalcificação foi utilizada uma solução de ácido fórmico a 10%. Após o procedimento padrão de coloração com hematoxilina e eosina, os enxertos foram examinados com microscópio ótico para detecção da presença de tintura corando os vasos sanguíneos no tecido ósseo (Figura 3).

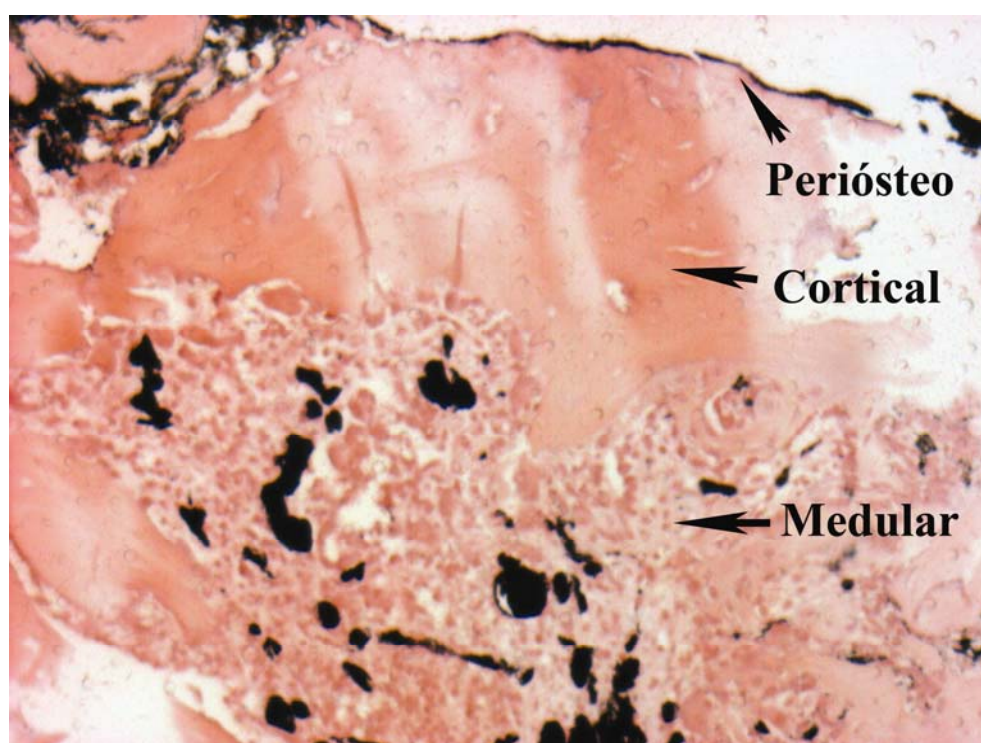


Figura 3 - Microfotografia de corte histológico de enxerto ósseo de rato submetido a injeção de tintura da Índia, com presença do corante nos vasos periosteais da região cortical e nos vasos endosteais da região medular (HE, 50X).

4.4 GRUPOS DE COMPARAÇÃO

- Grupo 1: enxerto ósseo vascularizado da crista ilíaca (N = 12).
- Grupo 2 (controle): enxerto ósseo não-vascularizado da crista ilíaca (N = 09).

4.5 PROCEDIMENTOS

Todos os procedimentos foram realizados pelo autor no Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica da PUCRS.

O animal era pesado, tinha seu sexo determinado e sua idade verificada. Por via intramuscular era administrada a anestesia, consistindo numa solução de 0,2 ml de clorpromazina e 0,8ml de quetamina, na dose de 3ml/kg. Uma vez anestesiado, o rato era submetido a tricotomia na área do acesso cirúrgico. Doses de manutenção anestésica eram administradas no transcorrer do ato cirúrgico, conforme a necessidade.

O animal era posicionado em decúbito lateral esquerdo e com azul de metileno era marcada a incisão cirúrgica. Esta era longitudinal, paralela e afastada 2 cm da linha mediana dorsal, iniciando 1 cm abaixo do último arco costal e terminando na altura do quadril (Figura 4).

Realizada a incisão na pele, o acesso era aprofundado até o plano subcutâneo, e com a utilização de afastadores, os bordos da incisão eram tracionados para ganho de área cirúrgica (Figura 5). No plano subfascial, o ramo ilíaco da artéria e da veia iliolumbar eram identificados e cuidadosamente dissecados em direção proximal até o ponto onde entravam na cavidade abdominal (Figura 6). Para acessar a cavidade abdominal, a inserção dos músculos abdominais era liberada na crista ilíaca.



Figura 4 – Desenho da incisão cirúrgica.

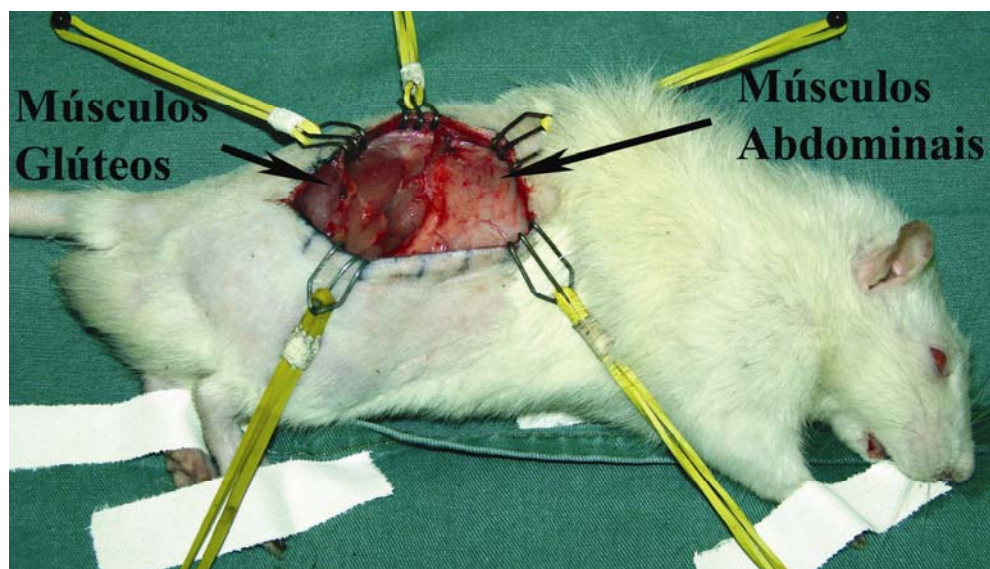


Figura 5 – Acesso cirúrgico e localização da transição entre as musculaturas glútea e abdominal, pontos de referência para a localização do pedículo.

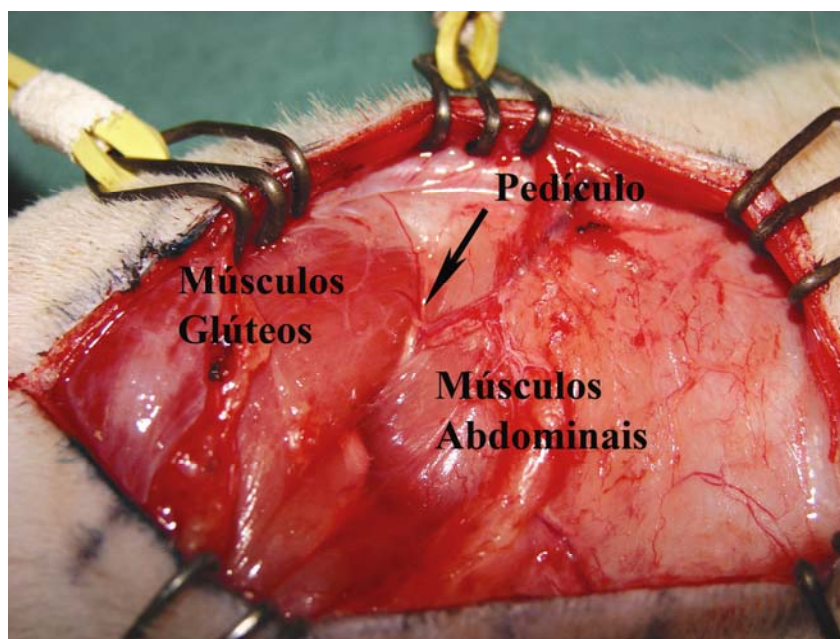


Figura 6 – Localização do ramo ilíaco da artéria iliolumbar após sua emergência da cavidade abdominal.

Após a abertura da cavidade abdominal, a dissecação do pedículo vascular era realizada, até a sua origem na artéria aorta e na veia cava inferior (Figura 7).

O ramo para o osso íliaco era então identificado, e distalmente a ele era realizada a ligadura da artéria (Figura 8).

A fáscia toracolombar era incisada no bordo lateral da coluna vertebral e a porção medial do osso íliaco era exposta. Paralelo a 1 cm da borda superior do osso íliaco, o músculo glúteo máximo era incisado na face externa do íliaco e o músculo íliaco era incisado expondo a face interna do osso íliaco (Figura 9).

Uma osteotomia bicortical separava o terço superior do osso íliaco dos dois terços inferiores articulados ao sacro e ao quadril (Figura 10). As partes moles inseridas na metade superior eram liberadas, permitindo a obtenção do enxerto ósseo vascularizado pelo ramo íliaco da artéria e da veia iliolumbar (Figuras 11 e 12).

O enxerto ósseo era envolvido por uma lâmina de silicone sem compressão do pedículo. Desta forma, era criada uma barreira mecânica que impedia a invasão e diminuía a influência de tecidos vizinhos na viabilidade do enxerto ósseo, tornando-se este dependente do seu pedículo vascular para manter-se viável (Figura 13).

No grupo 2, se realizava o mesmo procedimento descrito para o grupo 1, com o adendo de que o pedículo vascular era ligado e seccionado, tornando o enxerto ósseo não-vascularizado, sendo utilizado como grupo controle.

O enxerto envelopado pela lâmina de silicone era colocado dentro da cavidade abdominal com a finalidade de minimizar as chances de extrusão para o meio externo (Figura 14).

Os músculos glúteo máximo, íliaco e abdominais eram suturados, de forma a fechar a cavidade abdominal (Figura 15). A pele era aproximada com fio mononylon 4.0 (Figura 16).

Durante o período de observação, era utilizada uma solução de paracetamol, na concentração de 1ml/20ml de água, para analgesia nos primeiros três dias de pós-operatório, sendo este procedimento bem tolerado pelos animais.

Foi utilizada uma superdosagem de tiopental intraperitoneal para o sacrifício dos animais sem provocar dor ou outro sofrimento. Após a coleta do fragmento ósseo, era acionado o Serviço Especial de Coleta DMLU (zoonose), responsável pelo destino adequado dos animais.

Dos 21 animais, sete foram sacrificados após uma semana do procedimento cirúrgico; sete após duas semanas, e sete após três semanas. Dentre os sete animais sacrificados semanalmente, quatro pertenciam ao Grupo 1 e os outros três ao Grupo 2.

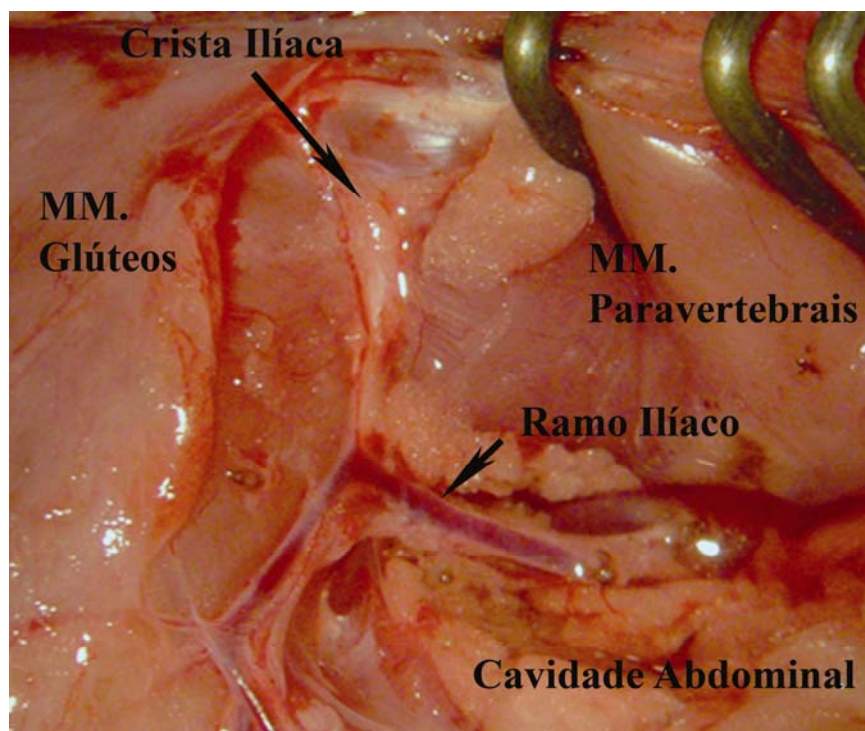


Figura 7 – Laparotomia com dissecção do ramo ilíaco da artéria iliolumbar em direção à sua origem na aorta abdominal.

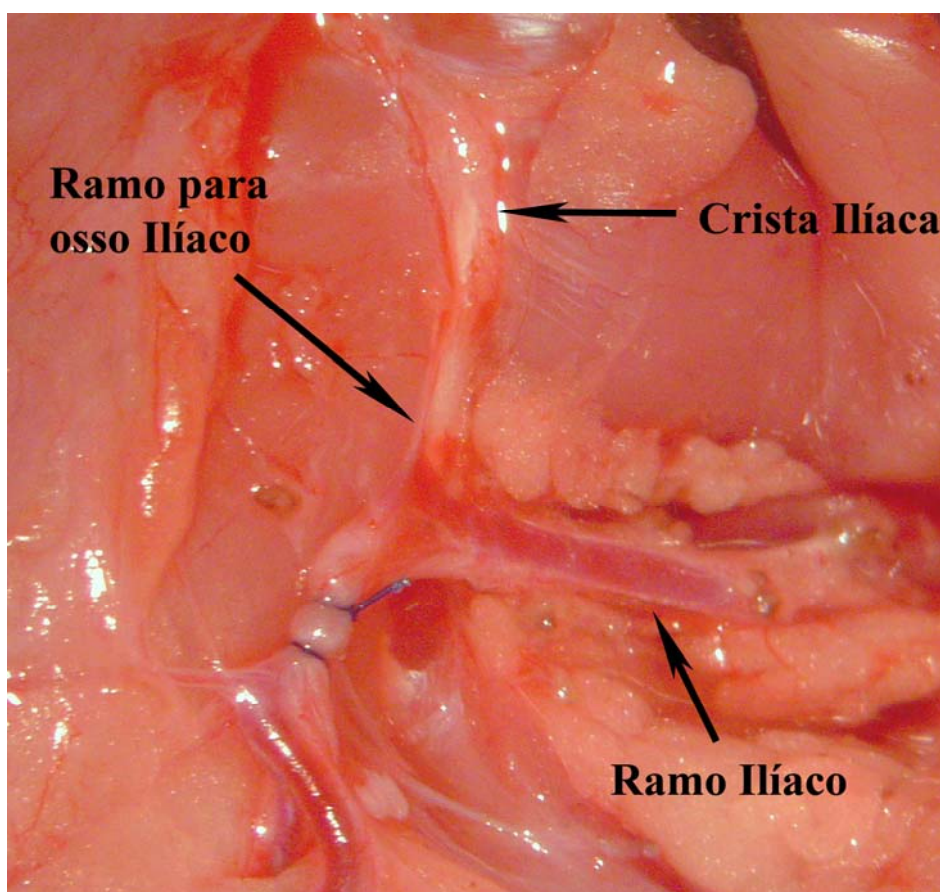


Figura 8 – Ligadura do ramo ilíaco distalmente a emergência de vaso para o osso ilíaco.

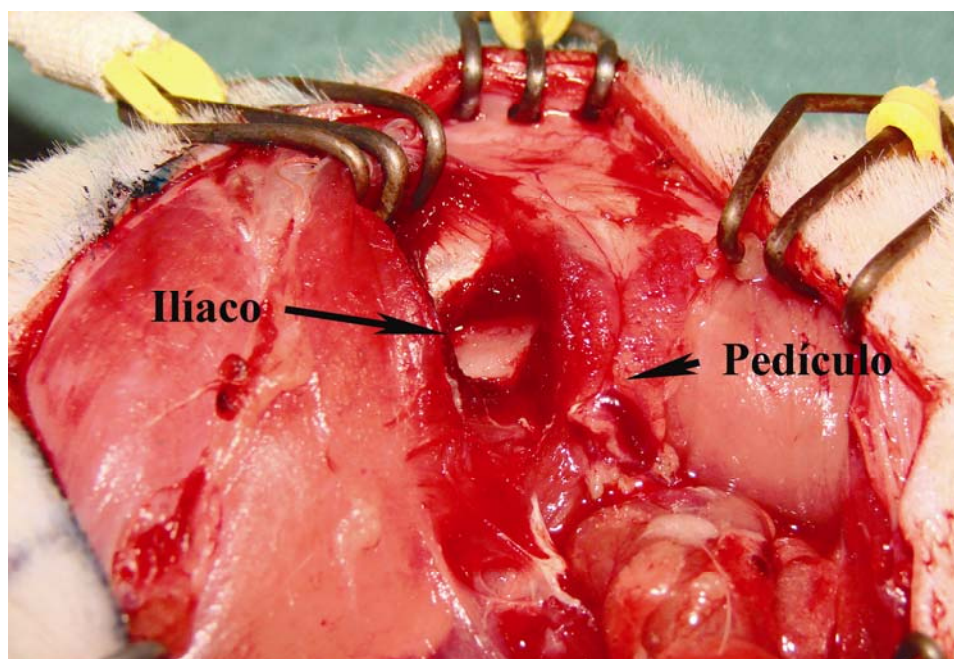


Figura 9 – Exatão da face externa do osso ilíaco após incisão e afastamento da musculatura glútea.



Figura 10 – Local de osteotomia do osso ilíaco, separando seu terço superior.

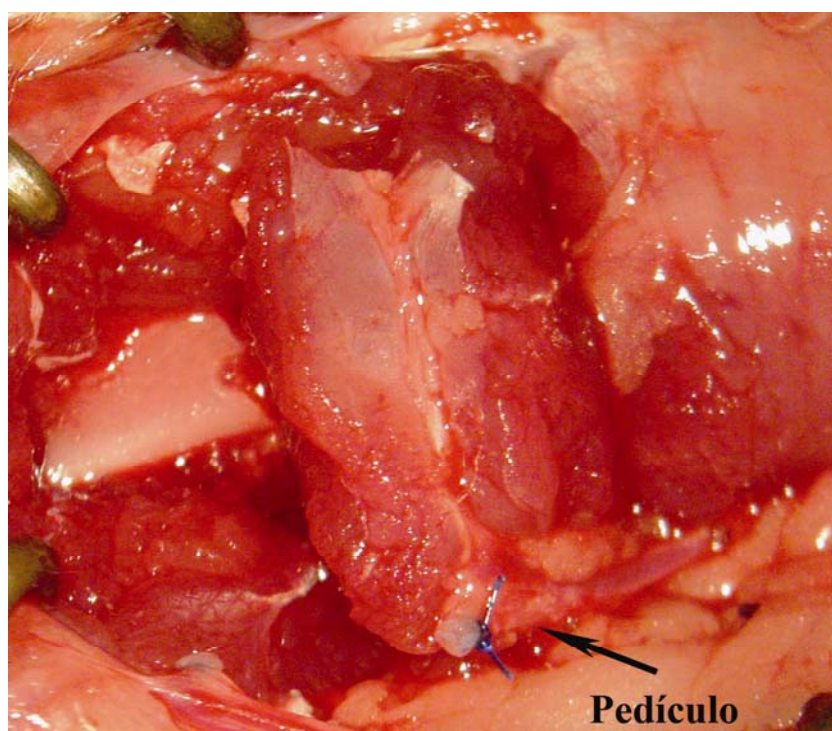


Figura 11 – Osteotomia e liberação da musculatura fixa à porção superior do osso íliaco.

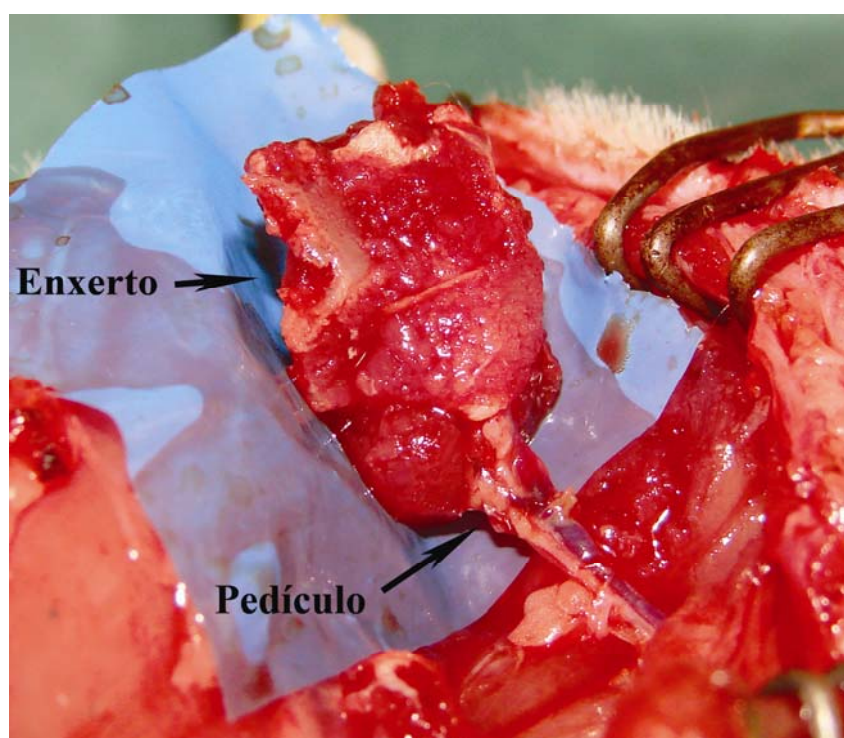


Figura 12 – Enxerto ósseo vascularizado do osso íliaco baseado no ramo íliaco da artéria iliolumbar.

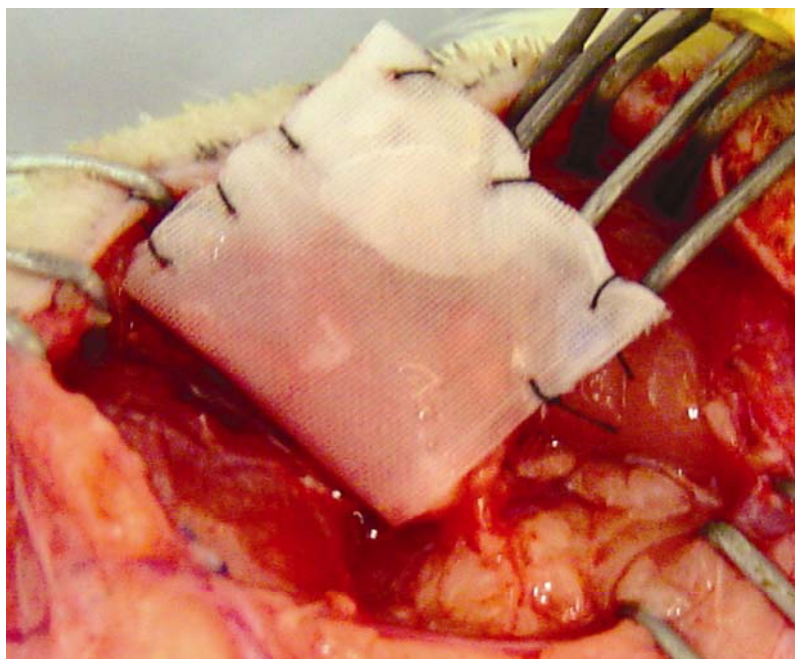


Figura 13 – Envolvimento do enxerto com a lâmina de silicone.

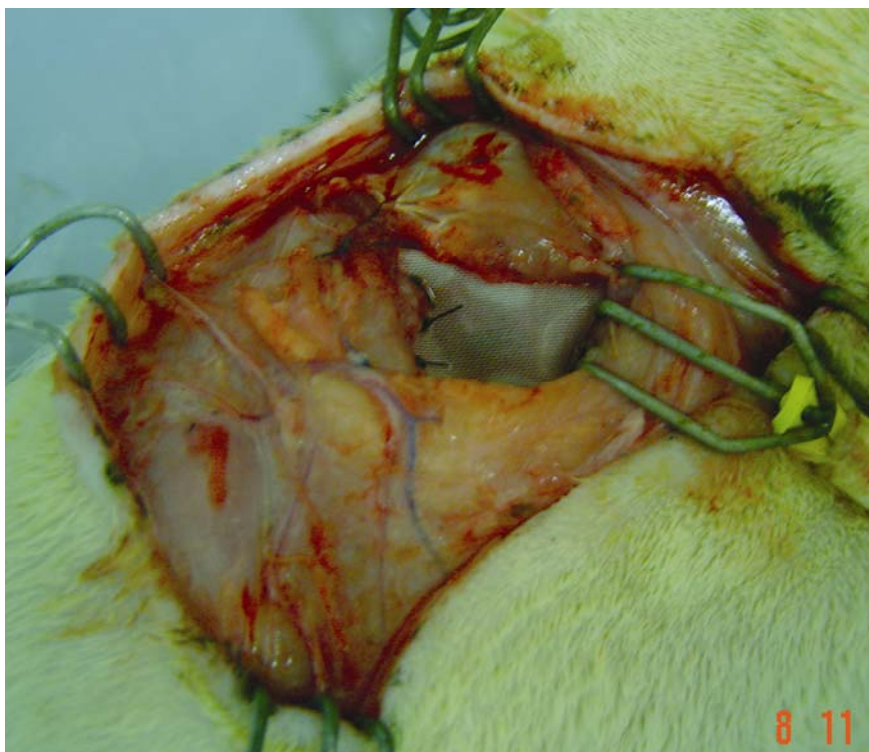


Figura 14 – Posicionamento do enxerto envolvido com a lâmina de silicone na cavidade abdominal.

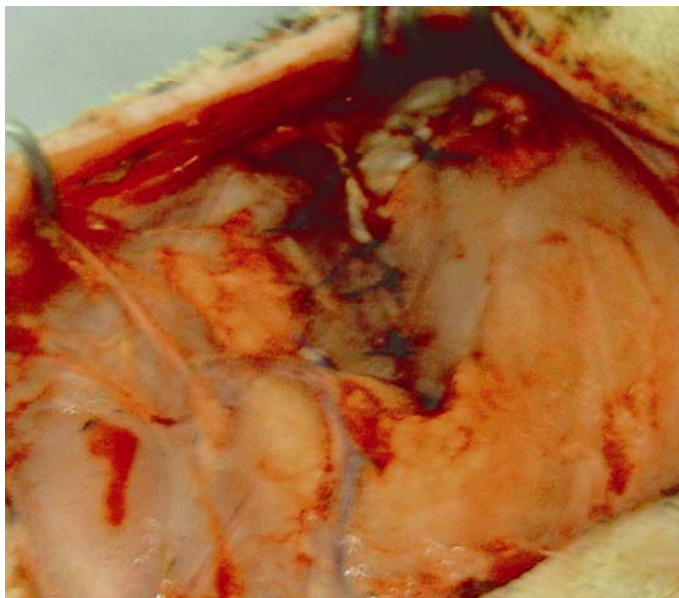


Figura 15 – Aproximação do plano muscular com fechamento da cavidade abdominal

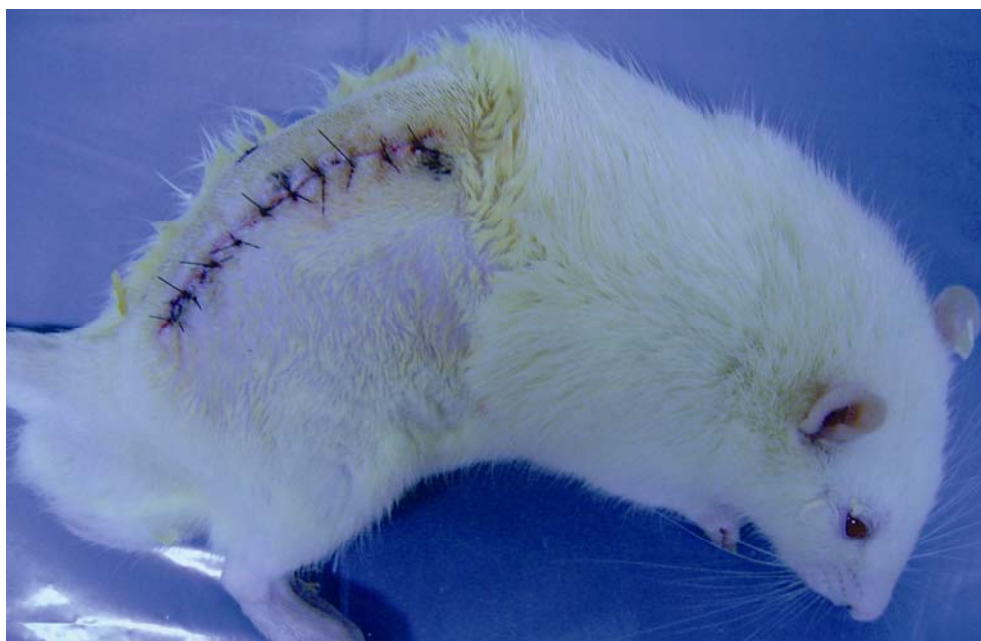


Figura 16 – Aproximação dos bordos cutâneos, finalizando o procedimento cirúrgico.

4.6 HISTOLOGIA

Os enxertos foram fixados em formalina tamponada com pH neutro a 10% por 24h, submetidos à lavagem com água, mantidos em água por 12h e descalcificados por 24h, utilizando-se uma solução de ácido fórmico a 22% e citrato de sódio a 10%. Após este procedimento, foi realizada a inclusão da peça em parafina de acordo com o processamento para tecidos convencionais e realizados cortes histológicos de 3 μ m, com coloração com HE.

4.7 IMUNO-HISTOQUÍMICA

As mesmas peças fixadas e descalcificadas para a histologia foram utilizadas no preparo de lâminas para análise imuno-histoquímica. Foi utilizado um marcador endotelial denominado anti-CD34 para avaliação da vascularização intra-óssea.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis foram descritas através de frequências absolutas e relativas.

Para avaliar a concordância entre os métodos, foi aplicado o coeficiente de concordância de Kappa. Esse coeficiente varia de -1 a 1, sendo que valores negativos representam discordância e valores positivos representam concordância. Quanto mais próximo de 1, mais os métodos concordam. Segundo Altman, valores acima de 0,6 indicam uma boa concordância entre as avaliações e acima de 0,8 indicam excelente concordância.⁶⁰

Para estimar a magnitude do coeficiente Kappa, o intervalo com 95% de confiança foi calculado.

O nível de significância adotado foi de 5% e as análises foram realizadas nos programas SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 13.0 e PEPI (Programs for Epidemiologists) versão 4.0.

4.9 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos em animais de experimentação foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS. Os procedimentos foram realizados de acordo com os aspectos regidos pela Lei nº. 6638/ 1979 (Brasil), que estabelece as normas para a execução de procedimentos em animais de experimentação.

O estudo somente teve início após ter sido aprovado pelo Comitê de Ética.

5 RESULTADOS

5.1 OBSERVAÇÃO DIRETA

As diferenças nas características macroscópicas entre o enxerto vascularizado e o não-vascularizado foram evidentes. Nos primeiros, foram encontrados uma porção óssea com tonalidade avermelhada, com osso medular abundante e sangrante. Ao manuseio, possuía plasticidade semelhante ao osso encontrado no momento da realização do procedimento cirúrgico inicial, embora com perda da resistência (Figura 17). Os enxertos ósseos não-vascularizados apresentavam coloração amarelo-esbranquiçada, com escassa quantidade de osso medular, eram menos plásticos e mais friáveis, sem nenhuma evidência de sangramento, mostrando-se ressecados (Figura 18).

Em todos os ratos cujo procedimento visava a obtenção de um enxerto não-vascularizado, ectoscopicamente foram observadas porções ósseas com as características descritas acima para tal. Entretanto, dentre os enxertos cujo procedimento visava a integridade da vascularização, todos os da primeira semana foram caracterizados ectoscopicamente como vascularizado. Somente um foi classificado como vascularizado dentre os da segunda semana e os da terceira semana. Com isso, foi constatado ausência de vascularização em 75% (três de quatro) dos enxertos inicialmente vascularizados na segunda e terceira semana.



Figura 17 – Aspecto macroscópico do enxerto ósseo vascularizado.



Figura 18 – Aspecto macroscópico do enxerto ósseo não-vascularizado.

5.2 HISTOLOGIA

A distinção histológica descritiva entre os enxertos vascularizados e não-vascularizados foram evidentes. Ao visualizar as lâminas coradas com hematoxilina e eosina, encontramos nos enxertos vascularizados a presença de trabéculas bem estruturadas na região medular óssea, nas quais identificamos grande quantidade de osteócitos com abundante deposição de matriz osteóide ao seu redor, com alta densidade de elementos celulares na região medular óssea (Figuras 19 e 20). De modo oposto, quando era encontrada uma lâmina com osteócitos em menor quantidade, acompanhada de menor quantidade de matriz óssea depositada ao seu redor e escassa quantidade de osso medular, tal lâmina era caracterizada como padrão de osso não-vascularizado (Figuras 21 e 22). Todas as lâminas do Grupo 2 foram classificadas como não-vascularizadas. As lâminas das peças histológicas do Grupo 1 da primeira semana foram classificadas como vascularizadas. Entretanto, somente 50% (dois de quatro) das lâminas obtidas após a segunda semana e na terceira semana, foram classificadas como vascularizadas.

As lâminas coradas com o marcador imuno-histoquímico anti-CD 34 para tecido endotelial também mostraram diferenças na análise descritiva histológica. Ao se avaliar as lâminas classificadas como padrão de osso vascularizado, foram encontradas grande

quantidade de estruturas marcadas com coloração de tonalidade marrom (coloração por DAB), com a presença de lúmen e hemáceas no seu interior, caracterizando vasos sanguíneos (Figura 23). As lâminas com osso não-vascularizado demonstravam ausência das estruturas descritas acima (Figura 24). Em todas as lâminas do Grupo 2 não foram observadas estruturas correspondentes a vasos sanguíneos. Dentre as lâminas com enxerto vascularizado, todas da primeira semana demonstravam sinais de vascularização, enquanto somente 50% das lâminas da segunda e da terceira semana possuíam vasos sanguíneos.

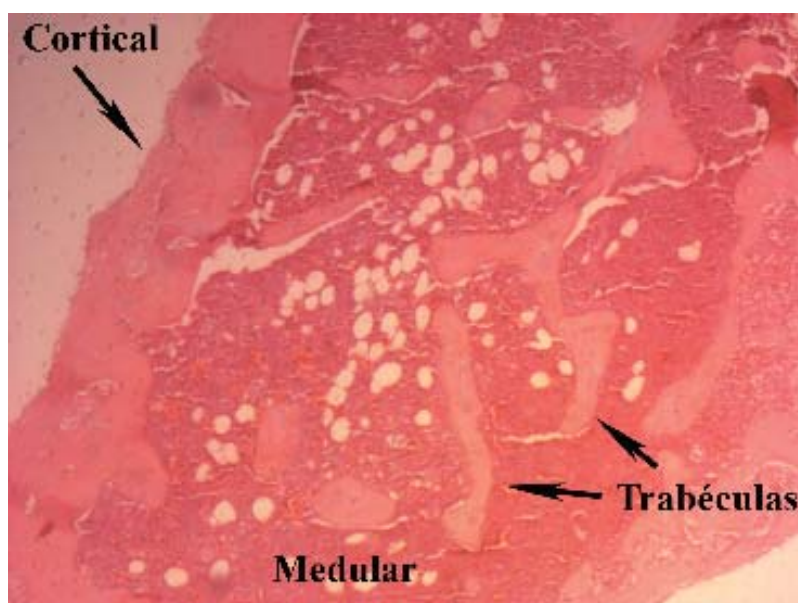


Figura 19 – Fotomicrografia de corte histológico de enxerto ósseo com características de viabilidade (HE, 50X).

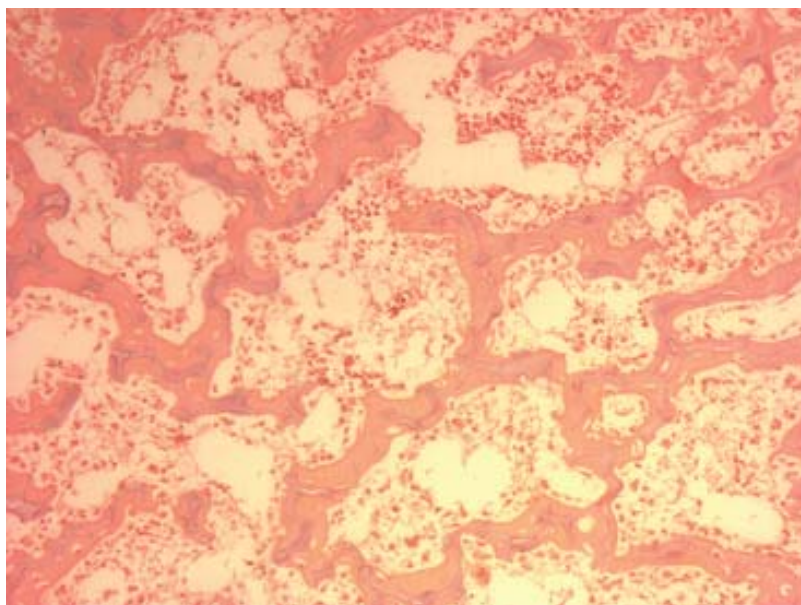


Figura 20 – Fotomicrografia de corte histológico de enxerto ósseo com características de viabilidade. Na região medular óssea há abundância de elementos celulares e matriz osteogênica (HE, 100X).

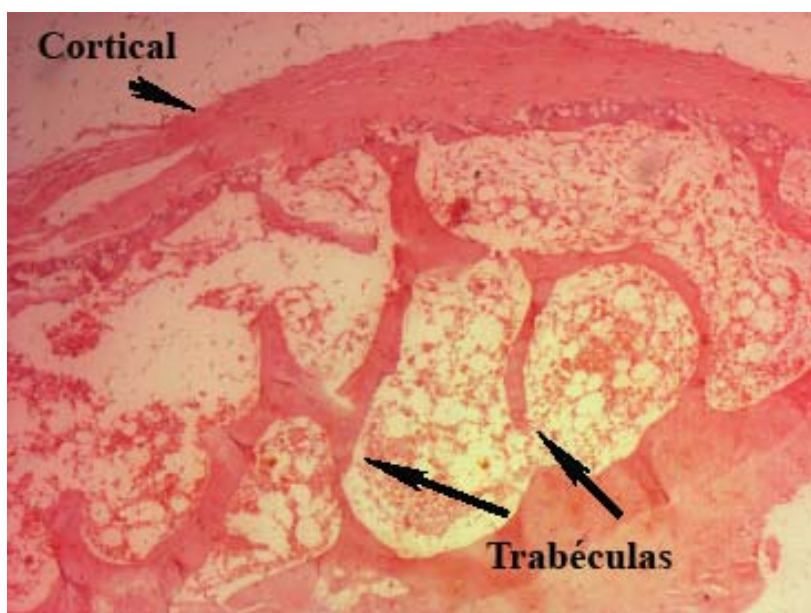


Figura 21 – Fotomicrografia de corte histológico de enxerto ósseo com características de enxerto ósseo não-vascularizado (HE, 50X).

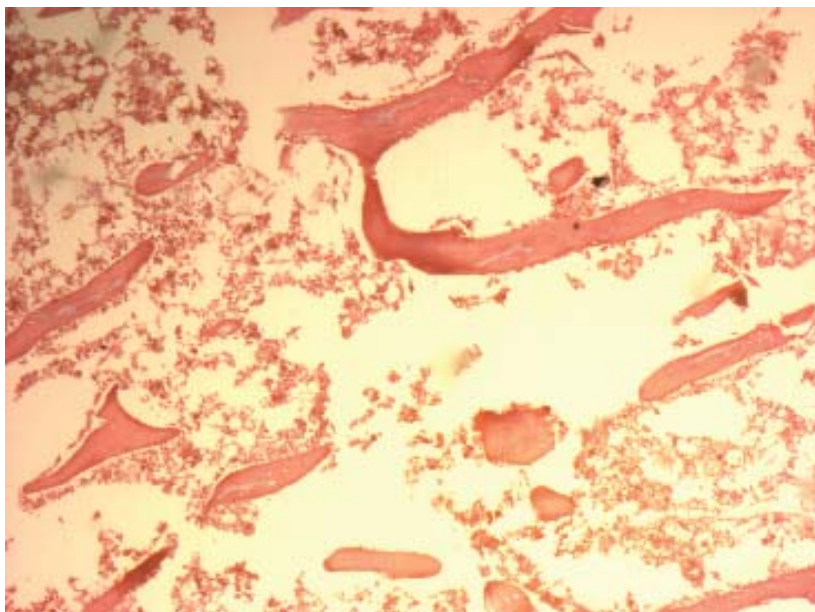


Figura 22 – Fotomicrografia de corte histológico de enxerto ósseo com características de ausência de viabilidade. Na região medular óssea há sinais de reabsorção óssea e diminuição da densidade celular (HE, 100X).

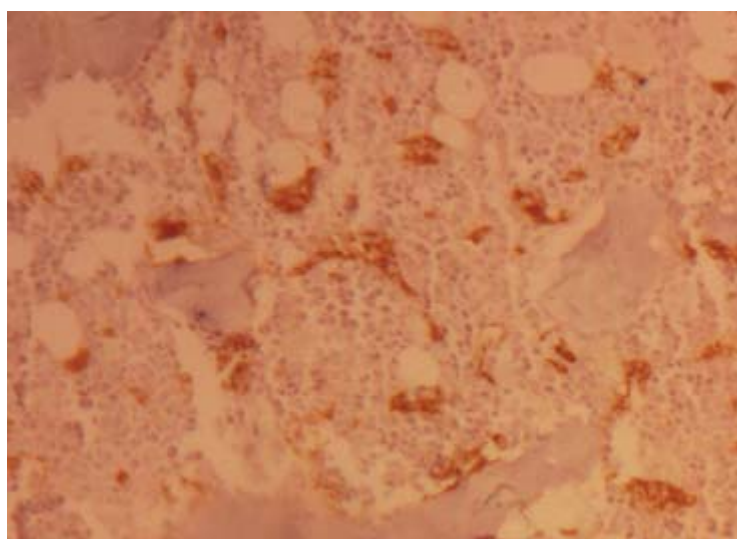


Figura 23 – Fotomicrografia de corte imuno-histoquímico com presença de estruturas com lúmen coradas em marrom, caracterizando vasos sanguíneos na região medular óssea (HE com marcador imuno-histoquímico anti-CD 34, 200X).

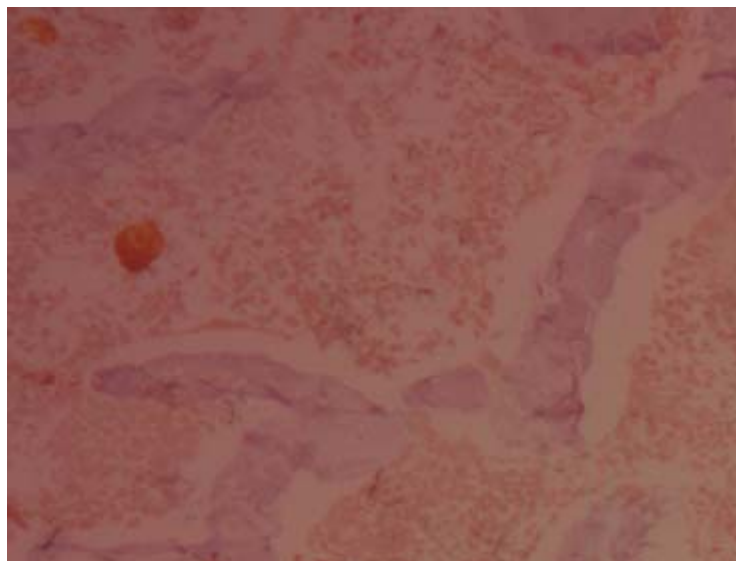


Figura 24 – Fotomicrografia de corte imuno-histoquímico com ausência de estruturas com lúmen em marrom, caracterizando a não detecção de vasos sanguíneos (HE com marcador imuno-histoquímico anti-CD 34, 200X).

5.3 CORRELAÇÃO ENTRE A OBSERVAÇÃO DIRETA E A HISTOLOGIA

Houve concordância estatisticamente significativa entre todos os métodos ($p < 0,001$), conforme apresenta a Tabela 1. Percebe-se que o coeficiente kappa apresenta uma boa concordância entre todos os métodos ($\geq 0,79$), sendo completamente concordante entre a coloração HE e anti-CD 34 ($k=1,00$). Apenas duas das 21 avaliações (9,5%) foram discordantes entre a observação direta e a histologia com coloração HE e anti-CD 34. Nestas, a observação direta demonstrou desvascularização e os demais métodos apresentaram vascularização.

Tabela 1 – Avaliação da concordância entre observação direta, HE e CD 34

Comparação	Concordância n (%)	Kappa (IC 95%)	p
Observação direta x HE	19/21 (90,5)	0,79 (0,51 – 1,00)	<0,001
Observação direta x CD 34	19/21 (90,5)	0,79 (0,51 – 1,00)	<0,001
HE x CD 34	21/21 (100,0)	1,00 (0,68 – 1,00)	<0,001

HE: hematoxilina e eosina; IC: intervalo de confiança; p: significância estatística

6 DISCUSSÃO

Os enxertos ósseos são fundamentais para a reconstrução de defeitos esqueléticos. O sucesso do tratamento pode ser influenciado pelo tipo de enxerto utilizado devido às diferenças nas propriedades entre os enxertos ósseos vascularizados e os não-vascularizados.

As propriedades dos enxertos ósseos vascularizados possibilitam a sobrevivência de grande parte de seus elementos celulares, a consolidação e a integração mais precoce no leito receptor, a maior manutenção da massa óssea, a maior capacidade de hipertrofia e a maior resistência a infecções quando comparados aos enxertos ósseos não-vascularizados.^{35,36,61, 62, 63}

Fisiologicamente, os enxertos ósseos vascularizados apresentam maior capacidade de osteogênese, osteoindução e osteocondução quando comparados aos enxertos ossos não-vascularizados, e sua utilidade clínica se torna imperativa em algumas situações onde o índice de falha com o uso do enxerto ósseo convencional seria demasiadamente alto para justificar seu emprego, como em defeitos ósseos extensos, em leito receptor mal-vascularizado ou até mesmo desvascularizado e em procedimentos prévios com uso de enxerto e que resultaram em falha do procedimento.^{64, 65} Todavia, se o prognóstico melhora com o uso do enxerto vascularizado nos casos com pior prognóstico, ele também poderia ser utilizado com maior frequência ou até como primeira escolha, em situações consideradas menos graves.

Uma pergunta freqüente sobre enxertos ósseos vascularizados aborda a viabilidade do enxerto com o transcorrer do tempo: seria justificável a opção por uma técnica que prolonga o tempo cirúrgico ou o encaminhamento para profissionais mais habilitados a realizar o procedimento? O enxerto inicialmente vascularizado comprovadamente no trans-operatório poderia deixar de sê-lo por diversos motivos, por exemplo: estase venosa, microtrauma vascular, distúrbios de coagulação, alterações sistêmicas do paciente, compressão externa, edema, processo inflamatório ou infeccioso.

Linssell, em 1988, num estudo experimental em ratos, relatou viabilidade em 88% de seus enxertos vascularizados do fêmur após uma semana de seguimento, utilizando microanastomose artério-venosa.⁵¹

Sempuku, em 1993, detectou neo-formação óssea em duas semanas utilizando um modelo de enxerto ósseo vascularizado em cauda de rato, sendo que no grupo de enxertos não-vascularizados ocorreu necrose completa após uma semana e após cinco semanas foi detectada neo-formação óssea envolvendo o osso necrótico sugerindo revascularização e osteogênese por invasão tecidual circunjacente.³⁰

Nasir, em 2003, constatou histologicamente em ratos que após uma semana o enxerto ósseo vascularizado da crista ilíaca, vascularizado pela artéria femoral circunflexa lateral, estava viável.⁵⁴

Ozkan, em 2001, utilizando o modelo experimental do enxerto ósseo vascularizado baseado na artéria iliolumbar em ratos, após uma semana obteve viabilidade histológica em todos os enxertos examinados.⁵³ O modelo experimental de Ozkan, o qual foi escolhido para este trabalho, mostrou-se factível, apresentando poucas variações no trajeto dos vasos, na localização e no número de seus ramos. A anatomia constante trouxe confiabilidade e facilidade na execução do enxerto vascularizado. Pelo fato do rato ser um animal de pequeno porte e conseqüentemente seus vasos serem diminutos, o uso do microscópio microcirúrgico acrescentou segurança na dissecação e na ligadura dos vasos. Citam-se como principais vantagens deste modelo, a pequena perda funcional para o animal sem alterações na marcha, a obtenção de um fragmento ósseo com dimensões amplas (1x1cm), a possibilidade de proteger o fragmento ósseo na cavidade abdominal e a facilidade de execução.

Neste estudo experimental, foi verificado no trans-operatório o sangramento ativo de todos os enxertos vascularizados, com pedículos vasculares funcionais. No momento da reintervenção cirúrgica para coleta do material e análise dos resultados, os animais sacrificados na primeira semana detinham enxertos considerados vascularizados pela observação direta e pela histologia. Entretanto, dentre os animais da segunda semana, foi considerado vascularizado pela observação direta apenas um deles (25%) e, pela histologia, dois deles (50%). Tais resultados se repetiram nos animais sacrificados na terceira semana. Houve correlação entre o resultado da classificação ectoscópica e histológica.

Então, os enxertos vascularizados em sua concepção tornaram-se em algum momento desvascularizados e passaram a se comportar como enxertos não-vascularizados sob a análise ectoscópica e histológica. Outros trabalhos seriam necessários para se fazer inferências sobre as possíveis causas que determinam falhas na vascularização.

Apesar da possibilidade de falha, o emprego de enxertos ósseos vascularizados deve ser incentivado, pois a histologia descritiva demonstrou maior densidade celular na porção óssea medular, osteócitos com maior funcionalidade na deposição de matriz óssea, com rede vascular intra-óssea preservada. Com isso, pode-se utilizar em procedimentos reconstrutivos, uma porção óssea com características inerentes que promovam maiores chances de cura dos pacientes.

7 CONCLUSÕES

Houve viabilidade do enxerto ósseo da crista ilíaca vascularizado pelo ramo ilíaco da artéria iliolumbar, entretanto ocorreram alterações com o decorrer do tempo. Na primeira semana após o procedimento cirúrgico o enxerto vascularizado manteve-se viável, entretanto na segunda e terceira semana houve interrupção da perfusão em alguns casos e o enxerto tornou-se desvascularizado.

Histologicamente os enxertos ósseos vascularizados evidenciaram a presença de trabéculas bem estruturadas na região medular óssea, nas quais foram identificadas grande quantidade de osteócitos com abundante deposição de matriz osteóide ao seu redor, com alta densidade de elementos celulares na região medular óssea e com numerosos vasos intra-ósseos na região medular. De modo oposto, os enxertos não-vascularizados apresentavam osteócitos em menor quantidade, acompanhado de menor quantidade de matriz óssea depositada ao seu redor, escassa quantidade de osso medular e ausência completa de vasos intra-ósseos íntegros.

Existiu concordância estatisticamente significativa entre a observação direta e a histologia para a avaliação da viabilidade do enxerto ósseo ($p < 0,001$).

8 REFERÊNCIAS

1. Yajima H, Tamai S, Mizumoto S, Inada Y. **Vascularized fibular grafts in the treatment of osteomyelitis and infected nonunion.** Clin Orthop Relat Res 1993:256-64.
2. Weiland AJ, Moore JR, Daniel RK. **Vascularized bone autografts. Experience with 41 cases.** Clin Orthop Relat Res 1983:87-95.
3. Wood MB, Cooney WP, 3rd. **Vascularized bone segment transfers for management of chronic osteomyelitis.** Orthop Clin North Am 1984;15:461-72.
4. Wood MB, Bishop AT. **Massive bone defects of the upper limb: reconstruction by vascularized bone transfer.** Hand Clin 2007;23:49-56.
5. Mazhuga PM. **Mechanisms of cartilage precursor replacement by bone in the mammalian skeleton.** Acta Biol Hung 1984;35:219-25.
6. Burgeson RE, Nimni ME. **Collagen types. Molecular structure and tissue distribution.** Clin Orthop Relat Res 1992:250-72.
7. Fleming JEJ, Cornell CN, Muschler GF. **Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering.** Orthop Clin North Am 2000;31:357-74.
8. Meekeren Jv. **Heel en geneeskunstige annmerkingen.** Amsterdam, Commelijjn 1668.
9. Phelps AM. **Transplantation of tissue from lower animals to man, and a report of the case of bone-transplantation at Charity Hospital, Blackwell's Island, N.Y. 1891.** Clin Orthop Relat Res 2000:3-9.
10. Albee FH. **Bone-graft surgery.** Clin Orthop Relat Res 1996:5-12.
11. Ostrup LT, Fredrickson JM. **Distant transfer of a free, living bone graft by microvascular anastomoses. An experimental study.** Plast Reconstr Surg 1974;54:274-85.

12. Taylor GI, Miller GD, Ham FJ. **The free vascularized bone graft. A clinical extension of microvascular techniques.** *Plast Reconstr Surg* 1975;55:533-44.
13. Urist MR. **Bone: formation by autoinduction.** *Science* 1965;150:893-9.
14. Urist MR, DeLange RJ, Finerman GA. **Bone cell differentiation and growth factors.** *Science* 1983;220:680-6.
15. Urist MR, Mc LF. **Osteogenetic potency and new-bone formation by induction in transplants to the anterior chamber of the eye.** *J Bone Joint Surg Am* 1952;34-A:443-76.
16. Enneking WF, Eady JL, Burchardt H. **Autogenous cortical bone grafts in the reconstruction of segmental skeletal defects.** *J Bone Joint Surg Am* 1980;62:1039-58.
17. Ray RD. **Vascularization of bone grafts and implants.** *Clin Orthop Relat Res* 1972;87:43-8.
18. Ollier L. **Traité expérimental et clinique de la régénération des Os et de la production artificielle du tissu osseux.** Paris: P Masson et Fils 1867.
19. Barth A. **Über histologische Befunde nach Knochenimplantation.** *Arch Klin Chir* 1893;46:409.
20. Phemister DA. **The fate of transplanted bone and regenerative power of its various constituents.** *Surg Gynecol Obstet* 1914;19:303.
21. Ham A, Gordon S. **The origin of bone that forms in association with cancellous chips transplanted into muscle.** *Br J Plast Surg* 1952;5:154-60.
22. Hancock DO. **The Fate of Replaced Bone Flaps.** *J Neurosurg* 1963;20:983-4.
23. Gallie WE, Robertson DE. **Transplantation of bone.** *JAMA* 1918;70:1134.
24. Mowlem R. **Cancellous chip bone grafts: report on 75 cases.** *Lancet* 1944;2:746.
25. Mowlem R. **Bone Grafting.** *Br J Plast Surg* 1963;16:293-304.

26. Fazili M, von Overvest-Eerdmans GR, Vernoooy AM, Visser WJ, von Waas MA. **Follow-up investigation of reconstruction of the alveolar process in the atrophic mandible.** *Int J Oral Surg* 1978;7:400-4.
27. Oklund SA, Prolo DJ, Gutierrez RV, King SE. **Quantitative comparisons of healing in cranial fresh autografts, frozen autografts and processed autografts, and allografts in canine skull defects.** *Clin Orthop Relat Res* 1986:269-91.
28. Bauer TW, Muschler GF. **Bone graft materials. An overview of the basic science.** *Clin Orthop Relat Res* 2000:10-27.
29. Doi K, Tominaga S, Shibata T. **Bone grafts with microvascular anastomoses of vascular pedicles: an experimental study in dogs.** *J Bone Joint Surg Am* 1977;59:809-15.
30. Sempuku T, Tamai S, Mizumoto S, Yajima H. **Vascularized tail bone graft in rat.** *Plast Reconstr Surg* 1993;91:502-10.
31. Enneking WF, Burchardt H, Puhl JJ, Piotrowski G. **Physical and biological aspects of repair in dog cortical-bone transplants.** *J Bone Joint Surg Am* 1975;57:237-52.
32. Arata MA, Wood MB, Cooney WP, 3rd. **Revascularized segmental diaphyseal bone transfers in the canine.** An analysis of viability. *J Reconstr Microsurg* 1984;1:11-9.
33. Cutting CB, McCarthy JG. **Comparison of residual osseous mass between vascularized and nonvascularized onlay bone transfers.** *Plast Reconstr Surg* 1983;72:672-5.
34. Teissier J, Bonnel F, Allieu Y. **Vascularization, cellular behavior, and union of vascularized bone grafts: experimental study in the rabbit.** *Ann Plast Surg* 1985;14:494-505.
35. Cutting CB, McCarthy JG. **Comparison of residual osseous mass between vascularized and nonvascularized onlay bone transfer.** *Plast Reconstr Surg* 1983;72:672-75.
36. Antonyshyn O, Volcleugh RG, Anderson C. **Growth potential in onlay bone grafts: a comparison of vascularized and free calvarial bone and suture bone grafts.** *Plast Reconstr Surg* 1987;79:12-20.

37. Hansen-Algenstaedt N, Joscheck C, Wolfram L, et al. **Sequential changes in vessel formation and micro-vascular function during bone repair.** Acta Orthop 2006;77:429-39.
38. Probst A, Spiegel HU. **Cellular mechanisms of bone repair.** J Invest Surg 1997;10:77-86.
39. Glowacki J. **Angiogenesis in fracture repair.** Clin Orthop Relat Res 1998:S82-9.
40. Algenstaedt P, Schaefer C, Biermann T, et al. **Microvascular alterations in diabetic mice correlate with level of hyperglycemia.** Diabetes 2003;52:542-9.
41. Leunig M, Yuan F, Berk DA, Gerweck LE, Jain RK. **Angiogenesis and growth of isografted bone: quantitative in vivo assay in nude mice.** Lab Invest 1994;71:300-7.
42. Wang JS. **Basic fibroblast growth factor for stimulation of bone formation in osteoinductive or conductive implants.** Acta Orthop Scand Suppl 1996;269:1-33.
43. Wallace AL, McLaughlin B, Weiss JB, Hughes SP. **Increased endothelial cell stimulating angiogenesis factor in patients with tibial fractures.** Injury 1991;22:375-6.
44. Wallace AL, Makki R, Weiss JB, Hughes SP. **Measurement of serum angiogenic factor in devascularized experimental tibial fractures.** J Orthop Trauma 1995;9:324-32.
45. Carmeliet P, Jain RK. **Angiogenesis in cancer and other diseases.** Nature 2000;407:249-57.
46. Allt G, Lawrenson JG. **Pericytes: cell biology and pathology.** Cells Tissues Organs 2001;169:1-11.
47. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. **VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation.** Nat Med 1999;5:623-8.
48. Vacanti CA, Bonassar LJ. **An overview of tissue engineered bone.** Clin Orthop Relat Res 1999:S375-81.
49. Rodgers JB, Monier-Faugere MC, Malluche H. **Animal models for the study of bone loss after cessation of ovarian function.** Bone 1993;14:369-77.

50. Mosekilde L. **Assessing bone quality--animal models in preclinical osteoporosis research.** Bone 1995;17:343S-52S.
51. Linsell M, Jablonski P, Howden B, Scott D, Marshall V. **The thigh flap: an osteomyocutaneous free-flap model in the rat.** Plast Reconstr Surg 1988;81:240-5.
52. Lehner B, Bauer J, Rodel F, Grabenbauer G, Neukam FW, Schultze-Mosgau S. **Radiation-induced impairment of osseous healing with vascularized bone transfer: experimental model using a pedicled tibia flap in rat.** Int J Oral Maxillofac Surg 2004;33:486-92.
53. Ozkan O, Akyurek M, Safak T, Kayikcioglu A, Guler G, Erk Y. **A new flap model in rats: iliac osteomusculocutaneous flap.** Ann Plast Surg 2001;47:161-7.
54. Nasir S, Aydin A, Kayikcioglu A, Sokmensuer C, Cobaner A. **New experimental composite flap model in rats: gluteus maximus-tensor fascia lata osteomuscle flap.** Microsurgery 2003;23:582-8.
55. Mutaf M, Tasaki Y, Arakaki M, Fujii T. **A true osteomyocutaneous free-flap model in rats: the saphenous artery osteomyocutaneous flap.** Plast Reconstr Surg 1995;96:1629-35.
56. Chen SG, Zhang F, Komorowska-Timed E. **Free microvascular transfer of the acromiotrapezius osteomuscular flap in rats.** Br J Plast Surg 2000;53:612-15.
57. Yazici I, Unal S, Siemionow M. **Composite hemiface/calvaria transplantation model in rats.** Plast Reconstr Surg 2006;118:1321-7.
58. Lee WP, Pan YC, Kesmarky S, et al. **Experimental orthotopic transplantation of vascularized skeletal allografts: functional assessment and long-term survival.** Plast Reconstr Surg 1995;95:336-49; discussion 50-3.
59. Greene EC. **Anatomy of the rat.** Philadelphia, New York: Hafner Publishing Co (eds); 1995.
60. Altman DG. **Practical Statistical for Medical Research.** London, England Chapman & Hall 1991.

61. Tamai S. **Experimental vascularized bone transplantations.** *Microsurgery* 1995;16:179-85.
62. Haw CS, O'Brien BM, Kurata T. **The microsurgical revascularisation of resected segments of tibia in the dog.** *J Bone Joint Surg Br* 1978;60-B:266-9.
63. Weiland AJ, Phillips TW, Randolph MA. **Bone grafts: a radiologic, histologic, and biomechanical model comparing autografts, allografts, and free vascularized bone grafts.** *Plast Reconstr Surg* 1984;74:368-79.
64. Cooney WP, Linscheid RL, Dobyns JH, Wood MB. **Scaphoid nonunion: role of anterior interpositional bone grafts.** *J Hand Surg [Am]* 1988;13:635-50.
65. Green DP. **The effect of avascular necrosis on Russe bone grafting for scaphoid nonunion.** *J Hand Surg [Am]* 1985;10:597-605.

ANEXOS

ANEXO A – ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA MICROSURGERY



Iliac crest vascularised bone graft - Experimental Study in rats.

Journal:	<i>Microsurgery</i>
Manuscript ID:	MICR-09-0015
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	27-Jan-2009
Complete List of Authors:	Peruchi, Fábio; Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Service of Hand Surgery and Reconstructive Microsurgery Silva, Jefferson; Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Service of Hand Surgery and Reconstructive Microsurgery Roman, Javier; Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Service of Hand Surgery and Reconstructive Microsurgery Jaeger, Marcos; Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Service of Hand Surgery and Reconstructive Microsurgery
Keywords:	bone transplantation, histology, immunohistochemistry, models, animal, rat



Title

Iliac crest vascularised bone graft - Experimental Study in rats.

Running title

Bone graft – experimental study in rats.

Autors

Fabian Maccarini Peruchi, MD^{1*}

Jefferson Braga Silva, MD, PhD¹

Javier Andrés Arturo Roman Veas, MD¹

Marcos Ricardo de Oliveira Jaeger, MD, PhD¹

¹ Service of Hand Surgery and Reconstructive Microsurgery, Hospital São Lucas, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul Porto Alegre (RS) Brazil

* Rua Madre Tereza Michel, 367, Criciúma (SC), CEP 88803-030, Brazil. Tel 55 48 34335509 / 55 48 84058813

e-mail: fabianperuchi@hotmail.com

Abstract word count: 245

Text word count: 2580

Number of figures: 11

Number of tables: 1

Keywords: bone transplantation. histology. immunohistochemistry. models, animal. rat.

ABSTRACT

The viability of bone cells transferred with the graft is crucial in the mechanical and physiological properties of the graft. Through an experimental model, we desire to create inferences about the viability of vascularised bone graft from the iliac crest in rats and check their histological features. We used 21 isogenic rats, which were divided into two groups, the first consisting of animals subjected to the technique of vascularised bone graft from the iliac crest and pedicled on the iliac branch of the iliolumbar artery, and the second (control group) underwent the same procedure the first with the addition of ligation of the vascular pedicle. The viability of bone grafts was observed for three weeks, by direct observation of the graft, histology and immunohistochemistry. All vascularised grafts evaluated in the first week showed viability by direct observation, histology and immunohistochemistry. Meanwhile in the second and third weeks the grafts were shown to be not viable in 75% of cases when subjected to evaluation by the direct observation and 50% of cases when performed for histological analysis and immunohistochemistry. Some vascularised grafts in their design have become unviable and began to behave as if non-vascularised grafts under the direct observation and histology. Despite the possibility of failure, the use of vascularised bone grafts should be encouraged, because the descriptive histology showed greater cell density in the medullar portion of the bone, osteocytes with greater functionality in the deposition of bone matrix, with intra-vascular network bone preserved.

Keywords: bone transplantation. histology. immunohistochemistry. models, animal. rat.

INTRODUCTION

Bone grafts are frequently used in clinical situations where bone tissue loss occurs. Its applicability is wide in reconstructive surgery, mainly in orthopedics, being employed in the repair of bone tissue loss resulted from traumatic injuries, pseudoarthrosis, correction of deformities, tumoral resection, and for osteogenesis stimulation¹⁻⁴.

The viability of transferred bone cells with the graft is one of the determinant factors for either the mechanical properties such as: resistance against external pressure, porosity, and bone density or physiological properties as osteogenesis and osteoinduction. Therefore, factors that contribute to cellular survival should be respected in the production of high quality grafts, leading, in that way, to a better prognosis in the reconstructive interventions.

One frequent interrogation occurs whenever a vascularised bone graft are used: will the bone graft maintain its viability through the vascular pedicle after a long period of time? The pedicle may be obstructed by external compression, edema, post operatory immobilization, thrombosis due to venous stasis, and lesion of the pedicle after manipulation. When the pedicle is obstructed, the vascularised bone graft is transformed in non-vascularised.

Through an experimental model, we studied the viability of iliac crest vascularised bone grafts in rats, sustained by a vascular pedicle and we verified its histological characteristics.

METHODS

Twenty-one Kyoto isogenic male mice, maintained at adequate environmental conditions and controlled for temperature, humidity, ventilation, light, noise and social interaction, were used. All the animals were breed exclusively for research purposes at the Laboratory of Medical Skills and Surgical Research from the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS) and were maintained in individual cages with adequate access to water and food.

The experiments were performed after approval of the protocol by the Ethics Committee of the institution (FAMED-PUCRS) and all efforts were made to minimize animal suffering.

The animals were divided in two comparing groups:

- Group 1: iliac crest vascularised bone graft (n=12)
- Group 2: iliac crest non-vascularised bone graft (n=09)

SURGICAL PROCEDURES

An anaesthetical solution, consisting of 0,2 ml of chlorpromazine and 0,8 ml of ketamine, in a dose of 3 ml/kg were administered through intramuscular injection. Additional doses were further administered during the surgical procedure whenever it was necessary.

Surgical incision were longitudinal, parallel and two centimeters away from the dorsal median line, beginning one centimeter below the last costal arch and finishing at the level of the hip (Figure 1).

At the subfascial level, the iliac branch of both iliolumbar artery and vein were identified and carefully dissected in proximal direction to the point where they entered the abdominal cavity. To access the abdominal cavity, the abdominal muscle insertions were released at the iliac crest. The pedicle dissection was performed, until its origin at the aorta and inferior cava vein (Figure 2)

A bicortical osteotomy were performed, disconnecting the upper third part of the iliac bone from the two inferior parts articulated with the hips and the sacral bone. The connective tissues inserted in the upper half were released, allowing the obtention of a graft, vascularised by the iliac branch of the iliolumbar artery and vein (Figure 3).

The bone graft were covered by a thin silicone layer, therefore, creating a mechanical barrier that prevented the invasion and lowered the influence of the surrounding tissues on the graft viability, making it dependent of its vascular pedicle to be maintained viable.

The second group was used as a control group, where the same procedures were performed as described for the group 1, except that the vascular pedicle was sutured and resected.

The enveloped graft, by the silicon layer, was inserted in the abdominal cavity to minimize the chances of extrusion.

Of the 21 animals used in the experiments, seven were sacrificed one week after the surgical procedure, seven after two weeks, and seven after three weeks. Of the seven animals sacrificed weekly, four belonged to the group 1 and the other three to the group 2.

HISTOLOGY

The grafts were fixed in a 10% formal solution with neutral pH for 24 hours, after all were submitted to water cleansing, maintained in watery solution for 12 hours and decalcified

1
2 for 24 hours using a 22% formic acid solution and 10% sodium citrate. After those procedures,
3 the material was included in paraffin according to the proceedings for conventional tissues and
4 histological cuts of 3 μm and coloration with hematoxylin-eosin (HE) were performed.
5
6
7
8
9

10 IMMUNOHISTOCHEMISTRY

11
12
13
14
15 The same samples, fixed and decalcified for histological analysis were used for
16 immunohistochemical analysis. An endothelial marker denominated anti-CD34 was used for the
17 evaluation of the vascularization inside the bone tissue.
18
19
20
21
22
23

24 STATISTICAL ANALYSIS

25
26
27
28 Statistical analysis was performed using the SPSS (Statistical Package for the Social
29 Sciences) program version 13.0 and the PEPI (Programs for Epidemiologists) version 4.0.
30
31

32 For descriptive analysis, the variables were described by their absolute and/or relative
33 frequencies. For analysis of the agreement between methods, the Kappa concordance coefficient
34 was applied with a confidence interval of 95%.
35
36

37 The level of statistical significance was set up at $p < 0,05$ in all studies.
38
39
40
41
42
43
44

45 RESULTS

51 DIRECT OBSERVATION

52
53
54
55
56
57 The differences in the macroscopic characteristics between the vascularised and the non-
58 vascularised grafts were evident. In the former, a bone portion with a reddish coloration was
59 found with an abundant and rich in blood medullar bone. When it was handled, the vascularised
60 graft had a plasticity similar to the bone found at the moment when the surgical procedure was

1
2 initially performed except for a loss in resistance. (Figure 4) The non-vascularised bone grafts,
3
4 on the other hand, presented a yellow-white coloration, with a poor quantity of medullar bone,
5
6 they presented less plasticity and were more friable, without any evidence of blood, showing a
7
8 dried aspect.
9

10 11 12 13 14 HISTOLOGY 15 16 17 18

19
20 At the evaluation of the vascularised graft plates, colored by HE, it presented well-
21 structured trabeculae at the medullar region, where could be identified a large quantity of
22 osteocytes with abundant deposition of osteoid matrix in its surroundings associated with a high
23 density of cellular elements in the medullar bone region (Figures 6 and 7). On the other hand,
24 when the analyzed plates, presented an inferior quantity of osteocytes, associated with fewer
25 osteoid matrix deposited around, and a low quantity of medullar bone, this plate was
26 characterized as having a non-vascularised bone pattern (Figures 8 and 9). All the plates of the
27 group 2 were classified as non-vascularised. The plates belonging to the histological samples of
28 group 1 obtained at the first week were classified as vascularised. However, only 50% of the
29 plates obtained at the second and the third weeks, were classified as vascularised.
30
31
32
33
34
35
36

37
38 The plates colored by the immunohistochemical marker anti-CD34 for endothelial tissue
39 also showed differences after histological analysis. The evaluation of the plates classified as
40 having a vascularised bone pattern, showed a large quantity of marked structures with a brown
41 color (coloration by diaminoazobenzidine), with the presence of lumen and red cells in its
42 interior, characterizing blood vessels (Figure 10). The plates with non-vascularised bone pattern,
43 showed an absence of the structures above mentioned (Figure 11). In all the plates of the group
44 2 it was not observed structures correspondent to blood vessels. Of the plates with vascularised
45 graft, all of them, bellonging to the first week showed signs of vascularization, while only 50%
46 of the plates of the second and third weeks showed blood vessels.
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

CORRELATION BETWEEN DIRECT OBSERVATION AND HISTOLOGY

There was a significant statistical agreement between all the methods ($p < 0,001$) (Table I). The kappa coefficient showed a good agreement between all the methods (kappa coefficient $\geq 0,79$), being completely concordant when the HE coloration and anti-CD34 were compared (kappa coefficient = 1,00).

Only two out of the 21 evaluations (9,5%) showed disagreement when comparing direct observation and histology analysis using HE and anti-CD34 coloration. On those, the direct observation showed absence of vascularization while the other methods showed vascularization.

DISCUSSION

Bone grafts are fundamental to the reconstruction of bone defects. The type of graft used may influence the treatment success due to the differences in the properties of vascularised and non-vascularised bone grafts.

The properties of the vascularised bone grafts enable the survival of great part of the cellular elements⁵, a more precocious consolidation and integration of the receptor layer^{6,7}, a large maintenance of bone mass⁵, a higher capacity of hypertrophy⁵, and a better resistance to infections when compared to non-vascularised bone grafts^{8,9}.

Physiologically, the vascularised bone grafts present a higher capacity of osteogenesis, osteoinduction, and osteoconduction when compared to non-vascularised bone grafts and its clinical utility became imperative in situations where the incidence of failure of the conventional bone graft is too high to justify its employment, such as: extensive bone defects, unwell vascularised or even unvascularised receptor layer^{10,11}, and in procedures where it has already presented a failure. However, if the prognosis is improved with the vascularized graft in more severe cases, it could also be used with higher frequency or even as a first choice procedures in those cases with a better prognosis.

A frequent interrogation when vascularised bone grafts are used lies on its viability after a long period of time: would be justified a technique that demands a longer surgical time or even the reference to better skilled professional? The graft initially vascularised, proved during the surgical time, could become unvascularised for several reasons such as: venous stasis, vascular

1
2 micro traumas, coagulation defects, systemical alterations, external compression, edema, and
3
4 inflammatory or infectious processes.

5
6 Linssell, in 1998, in a experimental study with rats, showed a viability of 88% in femoral
7 vascularised grafts after one week of follow-up, using an arterio-venous microanastomosis¹².

8
9 Sempuku, in 1993, detected bone neo-formation after two weeks using a model of
10 vascularised bone graft in rat tails, while in non-vascularised grafts a complete necrosis occurred
11 after one week. Further, after a five week period a bone neo-formation was detected involving
12 the necrotic bone suggesting revascularization and osteogenesis through surrounding tissue
13 invasion¹³.

14
15 Nasir, in 2003, in rats, found histologically that a vascularised bone graft of iliac crest,
16 based at the lateral circumflex femoral artery, was still viable after one week¹⁴.

17
18 Ozkan, in 2001, using an experimental model of vascularised bone graft based on the
19 iliolumbar artery, in rats, showed that after one week, all the analyzed grafts were remain
20 viable¹⁵. The experimental model of Ozkan, which was chose for this study, was feasible,
21 presenting few variations in the trajectory of the vessels, in the localization, and in the number
22 of the branches. The constant anatomy brought confidence and facility in the execution of the
23 vascularised graft. Due to the fact that the rat is a small animal, the use of the microsurgery
24 microscope added security in the dissection of the vessels. The main advantages of this method
25 are: the little functional loss for the animal without gait alterations, the obtaintion of a bone
26 fragment with wide dimensions (1 x 1 cm), the possibility to protect the bone fragment inside
27 the abdominal cavity, and the facility in its execution.

28
29 In this experimental project, it was verified, during the surgery, active bleeding of all the
30 vascularised grafts, with functional vascular pedicles. At the moment of surgical re-intervention,
31 for collecting the material and analysis of the results, the sacrificed animals in the first week
32 presented grafts considered vascularised in the direct observation and in the histological
33 analysis. However, in the animals sacrificed in the second week, the grafts were considered
34 vascularised in only one (25%) through direct observation and in two of them (50%) through
35 histological analysis. Those results were similar to those found in the animals sacrificed in the
36 third week. There were a correlation between the ectoscopic classification and histological.

37
38 So, the vascularised grafts, in its conception, became in some moment non-vascularised,
39 and started to behave as non-vascularised grafts under the ectoscopic and histological analysis.
40 Further researches are needed to shed some light about the possible causes that determines the
41 vascularization failures.

42
43 Despite the possibility of failure, the employment of vascularised bone grafts must be, in
44 our opinion, encouraged, because the descriptive histology showed a higher density in the
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2 medullar bone region, osteocytes functionally better in the deposition of bone matrix, with a
3 preserved vascular net inside the bone.
4
5
6
7
8
9

10 REFERENCES

- 14 1. Yajima H, Tamai S, Mizumoto S, Inada Y. Vascularized fibular grafts in the treatment of
15 osteomyelitis and infected nonunion. *Clin Orthop Relat Res* 1993(293):256-264.
16
- 17 2. Weiland AJ, Moore JR, Daniel RK. Vascularized bone autografts. Experience with 41
18 cases. *Clin Orthop Relat Res* 1983(174):87-95.
19
- 20 3. Wood MB, Cooney WP, 3rd. Vascularized bone segment transfers for management of
21 chronic osteomyelitis. *Orthop Clin North Am* 1984;15(3):461-472.
22
- 23 4. Wood MB, Bishop AT. Massive bone defects of the upper limb: reconstruction by
24 vascularized bone transfer. *Hand Clin* 2007;23(1):49-56.
25
- 26 5. Tamai S. Experimental vascularized bone transplantations. *Microsurgery*
27 1995;16(4):179-185.
28
- 29 6. Haw CS, O'Brien BM, Kurata T. The microsurgical revascularisation of resected
30 segments of tibia in the dog. *J Bone Joint Surg Br* 1978;60-B(2):266-269.
31
- 32 7. Weiland AJ, Phillips TW, Randolph MA. Bone grafts: a radiologic, histologic, and
33 biomechanical model comparing autografts, allografts, and free vascularized bone grafts.
34 *Plast Reconstr Surg* 1984;74(3):368-379.
35
- 36 8. Cutting CB, McCarthy JG. Comparison of residual osseous mass between vascularized
37 and nonvascularized onlay bone transfer. *Plast Reconstr Surg* 1983;72:672-675.
38
- 39 9. Antonyshyn O, Volcleugh RG, Anderson C. Growth potential in onlay bone grafts: a
40 comparison of vascularized and free calvarial bone and suture bone grafts. *Plast Reconstr*
41 *Surg* 1987;79:12-20.
42
- 43 10. Cooney WP, Linscheid RL, Dobyns JH, Wood MB. Scaphoid nonunion: role of anterior
44 interpositional bone grafts. *J Hand Surg [Am]* 1988;13(5):635-650.
45
- 46 11. Green DP. The effect of avascular necrosis on Russe bone grafting for scaphoid
47 nonunion. *J Hand Surg [Am]* 1985;10(5):597-605.
48
- 49 12. Linsell M, Jablonski P, Howden B, Scott D, Marshall V. The thigh flap: an
50 osteomyocutaneous free-flap model in the rat. *Plast Reconstr Surg* 1988;81(2):240-245.
51
- 52 13. Sempuku T, Tamai S, Mizumoto S, Yajima H. Vascularized tail bone graft in rat. *Plast*
53 *Reconstr Surg* 1993;91:502-510.
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
14. Nasir S, Aydin A, Kayikcioglu A, Sokmensuer C, Cobaner A. New experimental composite flap model in rats: gluteus maximus-tensor fascia lata osteomuscle flap. *Microsurgery* 2003;23(6):582-588.
 15. Ozkan O, Akyurek M, Safak T, Kayikcioglu A, Guler G, Erk Y. A new flap model in rats: iliac osteomusculocutaneous flap. *Ann Plast Surg* 2001;47(2):161-167.

Figure 1 - Surgical access and localization of the transition between the gluteal and abdominal musculature, reference points for the correct localization of the pedicle.

Figure 2 – Laparotomy with dissection of the iliac branch of the iliolumbar artery through its origin in abdominal aorta.

Figure 3 – Iliac crest vascularised bone graft based on the iliac branch of the iliolumbar artery.

Figure 4 – Macroscopic aspect of the vascularised bone graft

Figure 5 – Macroscopic aspect of the non-vascularised bone graft

Figure 6 – Photomicrography of the histological sample of bone graft showing viability (HE 50x).

Figure 7 – Photomicrography of the histological sample of bone graft showing viability. In the medullar region there are large quantity of cellular elements and osteogenic matrix (HE 100x).

Figure 8 – Photomicrography of histological sample of bone graft with a non-vascularised pattern (HE 50x).

Figure 9 - Photomicrography of histological sample of bone graft characterizing absence of viability. At the medullar region there are signs of bone reabsorbtion and diminished cellular density (HE 100x).

Figure 10 – Photomicrography of immunohistochemical sample with presence of lumen structures with a brownish coloration, characterizing the presence of blood vessels at the medullar region (HE with immunohistochemical marker anti-CD34 200x).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 11 – Photomicrography of immunohistochemical sample with absence of lumen structures with a brownish coloration, characterizing the absence of blood vessels at the medullar region (HE with immunohistochemical marker anti-CD 34 200x).

Table I – Evaluation of agreement when comparing direct observation, HE and anti-CD34

For Peer Review

Analysis	Agreement n (%)	Kappa (CI 95%)	P
Direct observation vs. HE	19/21 (90,5)	0,79 (0,51-1,00)	<0,001
Direct observation vs. anti-CD34	19/21 (90,5)	0,79 (0,51-1,00)	<0,001
HE vs. anti-CD34	21/21 (100,0)	1,00 (0,68-1,00)	<0,001

HE: Hematoxylin-eosin; CI: confidence interval; p: statistical significance

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

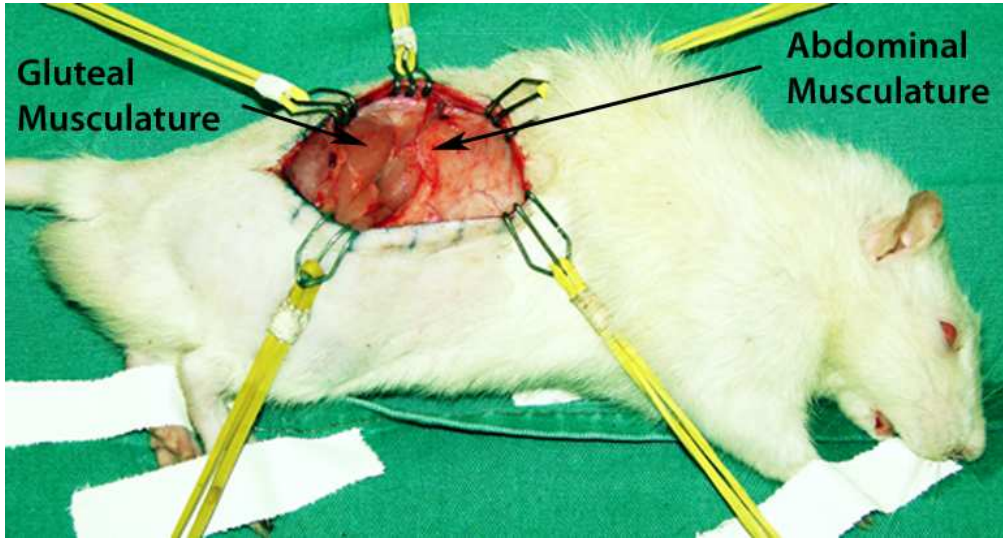
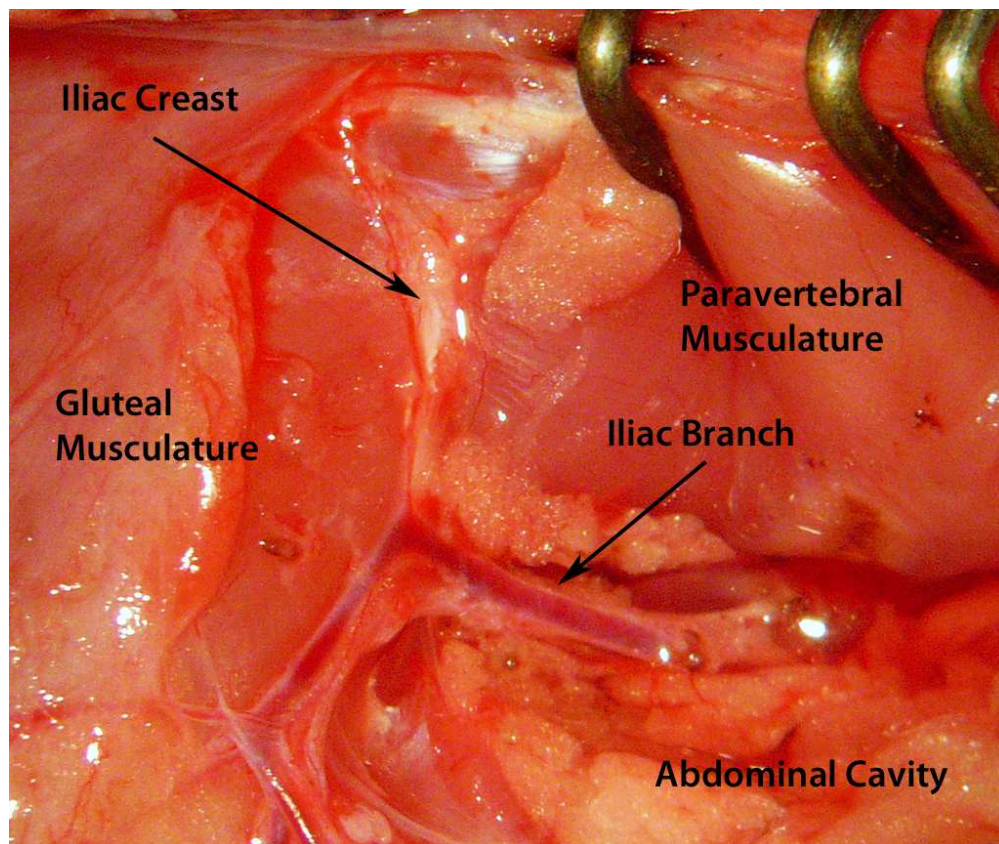


Figure 1 - Surgical access and localization of the transition between the gluteal and abdominal musculature, reference points for the correct localization of the pedicle.
130x69mm (150 x 150 DPI)

Peer Review



36 Figure 2 □ Laparotomy with dissection of the iliac branch of the iliolumbar artery through its origin
37 in abdominal aorta.
38 130x109mm (200 x 200 DPI)

39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

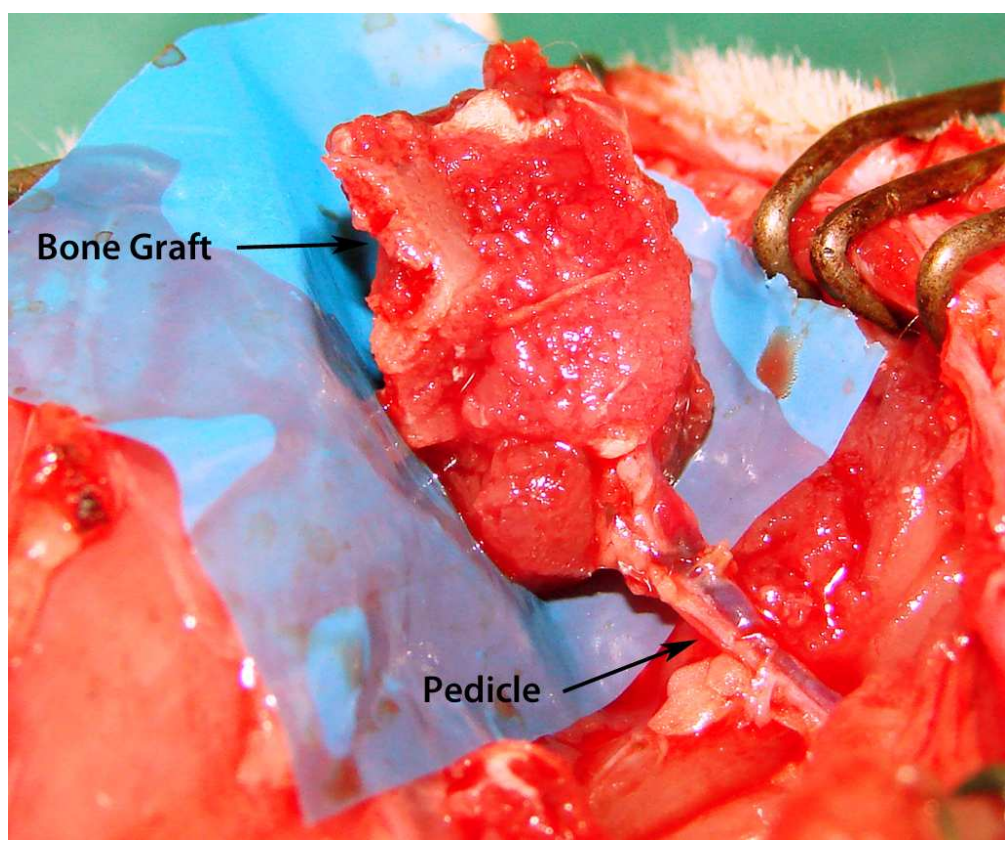


Figure 3 □ Iliac crest vascularised bone graft based on the iliac branch of the iliolumbar artery.
130x107mm (200 x 200 DPI)

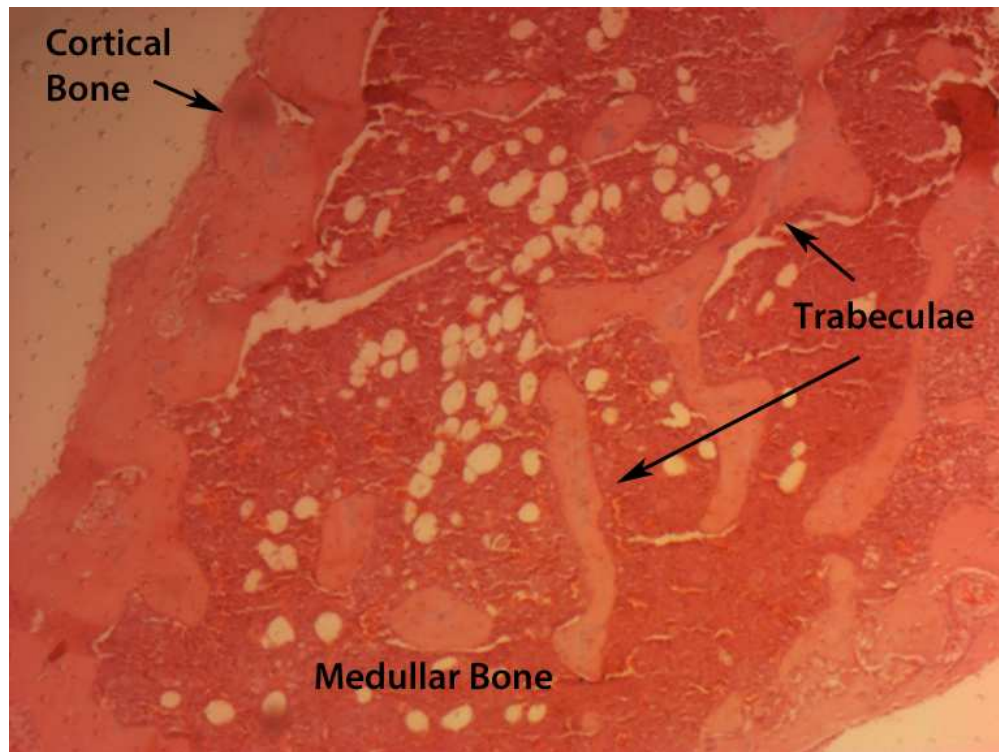


Figure 4 □ Macroscopic aspect of the vascularised bone graft
79x79mm (250 x 250 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Figure 5 □ Macroscopic aspect of the non-vascularised bone graft
73x79mm (250 x 250 DPI)



33 Figure 6 □ Photomicrography of the histological sample of bone graft showing viability (HE 50x).
34 130x97mm (150 x 150 DPI)
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

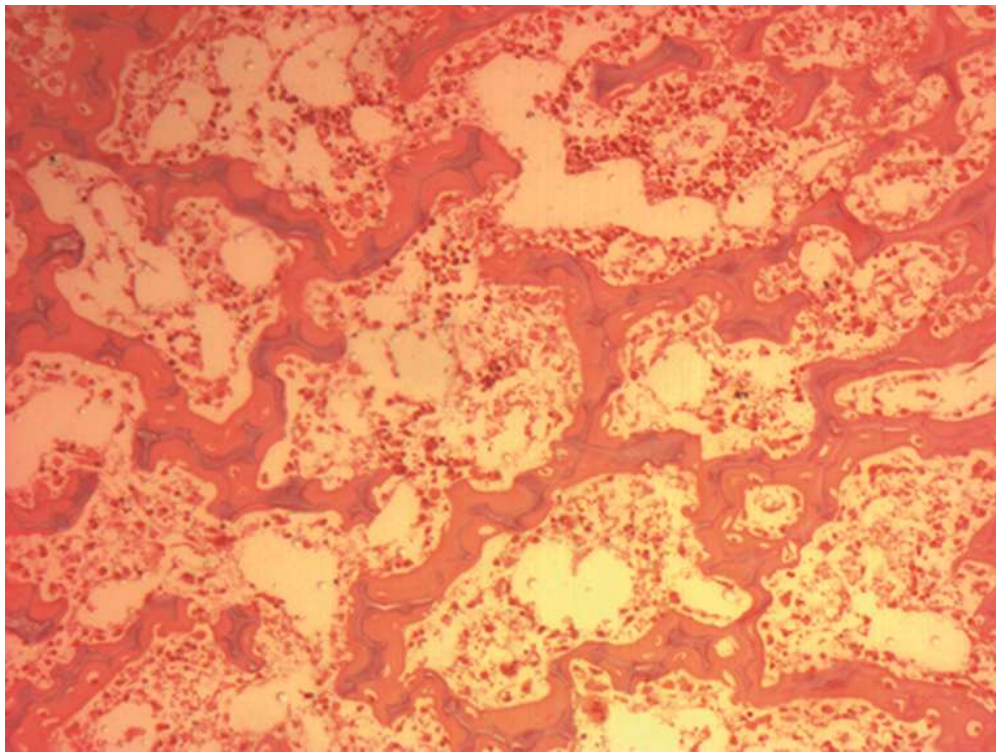
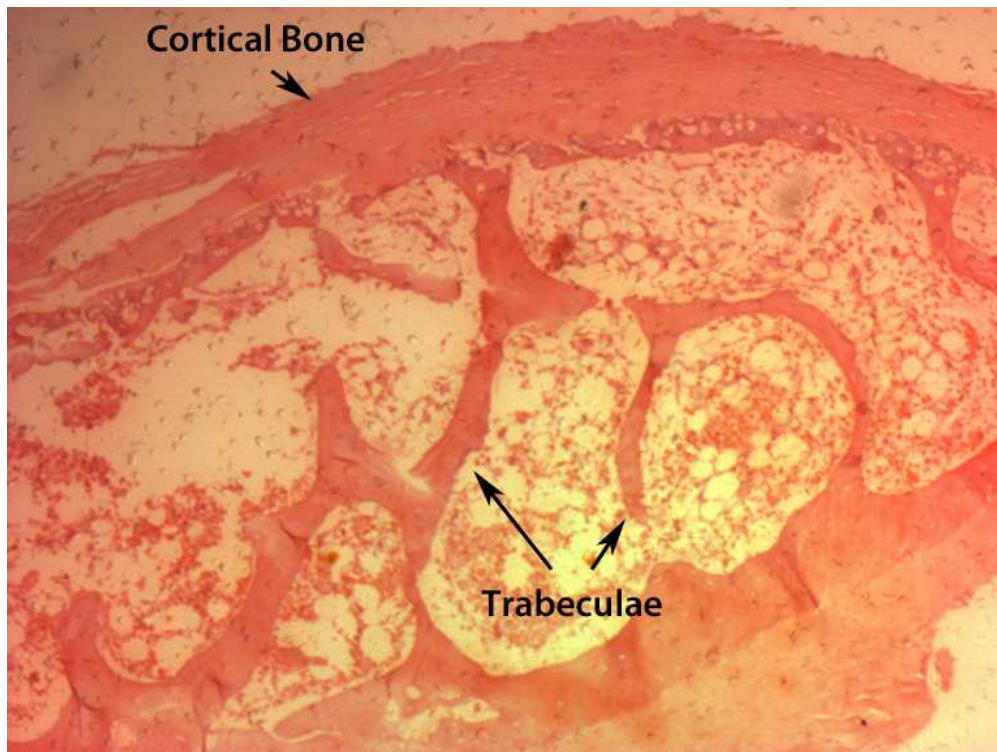


Figure 7 □ Photomicrography of the histological sample of bone graft showing viability. In the medullar region there are large quantity of cellular elements and osteogenic matrix (HE 100x). 130x97mm (150 x 150 DPI)

Review



33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 8 □ Photomicrography of histological sample of bone graft with a non-vascularised pattern (HE 50x).
130x97mm (150 x 150 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

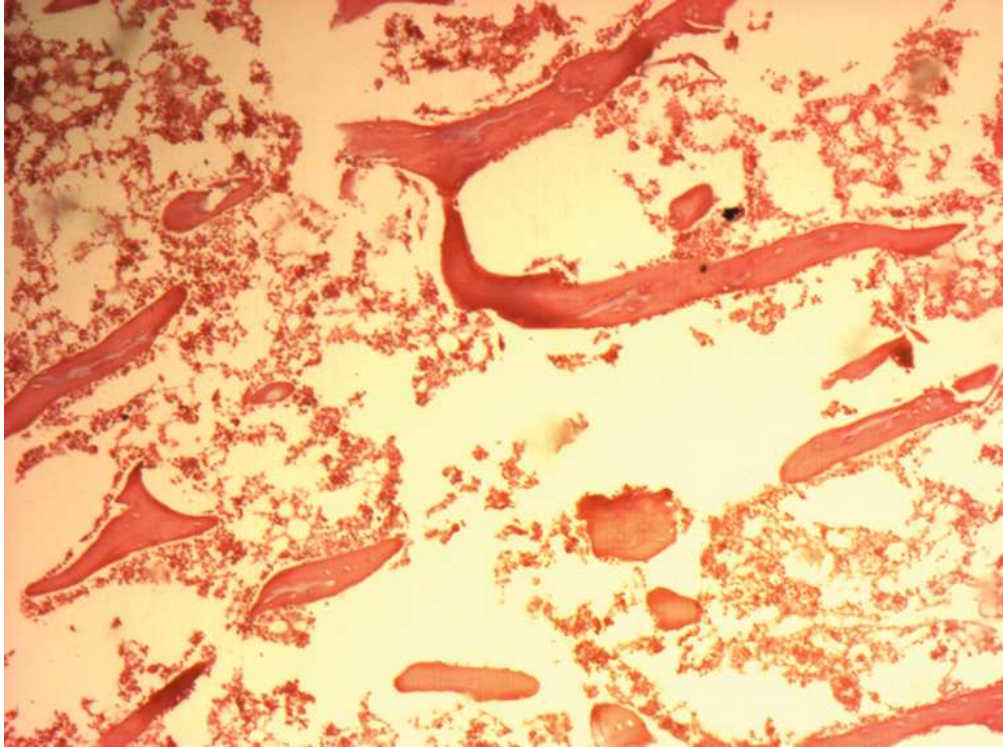


Figure 9 - Photomicrography of histological sample of bone graft characterizing absence of viability. At the medullar region there are signs of bone reabsorbtion and diminished cellular density (HE 100x).
130x97mm (150 x 150 DPI)

view

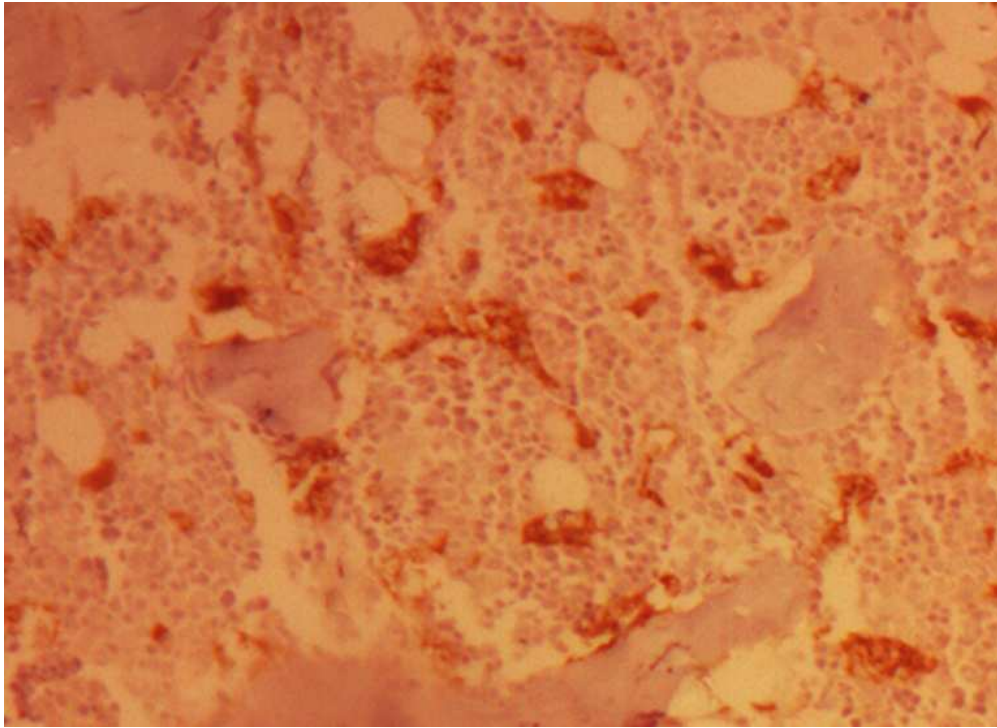


Figure 10 □ Photomicrography of immunohistochemical sample with presence of lumen structures with a brownish coloration, characterizing the presence of blood vessels at the medullar region (HE with immunohistochemical marker anti-CD34 200x).
130x94mm (150 x 150 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

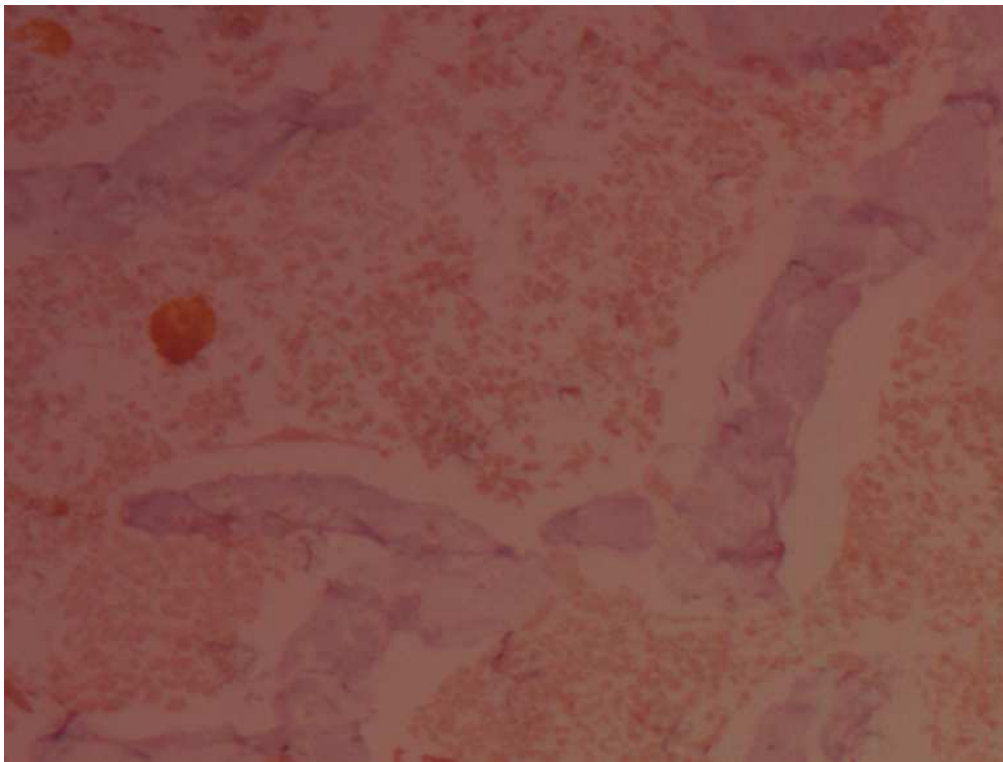


Figure 11 □ Photomicrography of immunohistochemical sample with absence of lumen structures with a brownish coloration, characterizing the absence of blood vessels at the medullar region (HE with immunohistochemical marker anti-CD 34 200x). 130x98mm (150 x 150 DPI)

view