

EFEITOS DO PROCESSAMENTO QUÍMICO E DA ESTERILIZAÇÃO EM ÓXIDO DE ETILENO EM OSSO CORTICAL E ESPONJOSO DE RATAS: ESTUDO COM MICROSCOPIA DE LUZ E ELETRÔNICA DE VARREDURA

EFFECTS OF CHEMICAL PROCESSING AND OXIDE ETHYLENE STERILIZATION ON CORTICAL AND CANCELLOUS RAT BONE: A LIGHT AND ELECTRON SCANNING MICROSCOPY STUDY

Marcello Teixeira Castiglia¹,
Juliano Voltarelli F. da Silva¹,
José Antonio Thomazini²,
José Batista Volpon³

RESUMO

Objetivo: Avaliar, sob o ponto de vista microscópico, modificações estruturais do osso esponjoso e cortical, após serem submetidos a processamento químico e esterilização em óxido de etileno. **Métodos:** Amostras de osso esponjoso e cortical foram obtidas de fêmures de ratas albinas jovens (*Wistar*) e separadas em quatro grupos contendo osso cortical e esponjoso: I- Fragmentos secos em estufa; II- Fragmentos secos em estufa e esterilizados em óxido de etileno; III- Fragmentos processados quimicamente; IV- Fragmentos processados quimicamente e esterilizados em óxido de etileno. Metade desse material foi analisada em microscópio eletrônico de varredura e, a outra metade, em microscopia de luz convencional. **Resultados:** Houve preservação da morfologia geral das amostras em todos os grupos. Nos grupos submetidos ao processamento químico houve melhor preservação do conteúdo celular, enquanto que naqueles submetido ao óxido de etileno houve amalgamação fibrilar. **Conclusão:** O tratamento com óxido de etileno causou amalgamação das fibras possivelmente em decorrência do efeito do calor e o tratamento químico contribuiu para melhor preservação da estrutura óssea.

Descritores – Transplante ósseo; Óxido de etileno; Microscopia eletrônica; Esterilização; Ratos

ABSTRACT

Objective: To evaluate, under microscopic examination, the structural changes displayed by the trabecular and cortical bones after being processed chemically and sterilized by ethylene oxide. **Methods:** Samples of cancellous and cortical bones obtained from young female albinus rats (*Wistar*) were assigned to four groups according to the type of treatment: Group I- drying; Group II- drying and ethylene oxide sterilization; III- chemical treatment; IV- chemical treatment and ethylene oxide sterilization. Half of this material was analyzed under ordinary light microscope and the other half using scanning electron microscopy. **Results:** In all the samples, regardless the group, there was good preservation of the general morphology. For samples submitted to the chemical processing there was better preservation of the cellular content, whereas there was amalgamation of the fibres when ethylene oxide was used. **Conclusion:** Treatment with ethylene oxide caused amalgamation of the fibers, possibly because of heating and the chemical treatment contributed to a better cellular preservation of the osseous structure.

Keywords – Bone transplantation; Ethylene oxide; Microscopy, electron; Sterilization; Rats

1 – Médico Residente em Ortopedia e Traumatologia do Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

2 – Professor Assistente Doutor do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

3 – Professor Titular do Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Trabalho realizado no Laboratório de Bioengenharia e no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

Correspondência: José B. Volpon, Rua São José 655, Ribeirão Preto, SP, CEP 14010-160. E-mail: jbvopon@fmrp.usp.br

Declaramos inexistência de conflito de interesses neste artigo

INTRODUÇÃO

A ortopedia moderna cada vez mais tem se valido dos enxertos ósseos ou seus substitutos para tratamento de condições complexas como o traumatismo grave com falha óssea, revisões de artroplastia, cirurgia do quadril displásico e oncologia ortopédica, entre outras^(1,2).

Há muitas as opções para os vários tipos de enxerto ósseo, sendo a origem autóloga a ideal⁽³⁾, mas, por vezes, não há osso em quantidade suficiente para uso em grandes substituições, quando a região doadora tiver sido exaurida por colheitas prévias, quando o osso doador ou o paciente forem pequenos (pacientes pediátricos) ou houver doenças constitucionais que afetam a integridade do osso doador. Neste contexto surgem os bancos de osso congelado de cadáver, já comuns nos grandes centros, mas que requerem infra-estrutura cara e trabalhosa, o que, muitas vezes, limita o acesso de centros menores e/ou com menos recursos, além de não proporcionarem segurança absoluta quanto à transmissão de doenças infecto-contagiosas^(4,5).

Entretanto, o osso pode sofrer processos químicos e/ou físicos de modo a garantir a esterilização e propiciar métodos mais baratos de preservação, com o objetivo de ser usado como enxerto, mas preservando a capacidade osteogênica⁽⁶⁾.

A irradiação tem sido a forma mais comum de esterilização e um dos métodos mais aceitáveis de descontaminação do tecido humano⁽⁷⁾. Outra opção é a autoclavagem, recomendada como processo alternativo. As influências da preservação e esterilização no desempenho biológico de enxertos ósseos, bem como de suas propriedades mecânicas e imunológicas já foram investigadas em estudos prévios⁽⁸⁾.

O processamento químico com desidratação em álcool absoluto, desengorduramento em éter etílico e clareamento em água oxigenada, seguido de esterilização em óxido de etileno, desenvolvido por Volpon^(9,10) mostrou, em estudos experimentais, constituir enxerto com capacidade osteocondutora sendo, portanto, uma alternativa ao enxerto com osso autólogo, embora com desempenho menor. Este tipo de enxerto apresenta como vantagens o baixo custo, pois pode ser preparado segundo rotina básica de laboratório, esterilizado em óxido de etileno e estocado à temperatura ambiente,

além de poder ser transportado sem qualquer equipamento especial.

A potencialidade deste enxerto já foi testada em animais, tanto do ponto de vista de desempenho biológico, como de resistência mecânica^(10,11). Esta última característica é interessante estudar, pois pode ser desejável que o osso enxertado tenha resistência para permitir a inserção de implantes, ou para resistir a solicitações mecânicas locais⁽¹⁰⁾. Voggenreiter *et al.*⁽¹²⁾ mostraram que métodos de preparação do osso podem afetar a sua resistência mecânica pela alteração do colágeno ou pela produção de fissuras. Haje *et al.*⁽⁹⁾ estudaram as modificações microestruturais causadas pelo processamento do enxerto aqui descrito, encontrando amalgamação e produção de microfissuras. Entretanto, não identificaram quais dos passos do processamento empregados seriam os responsáveis pelas alterações. Além disso, esses autores investigaram apenas o osso cortical e, na prática, os enxertos esponjosos ou os corticoesponjosos são os mais utilizados.

Assim, o estudo das alterações da microestrutura do osso causadas pelos métodos de processamento é de interesse, não somente como maneira de ampliar o conhecimento sobre o osso a ser implantado, mas também do ponto de vista prático no sentido de se antecipar alguma limitação imposta pela preparação do enxerto.

O presente estudo tem por objetivo investigar, sob o ponto de vista de imagem, as possíveis alterações causadas no osso por uma sequência de tratamento químico (álcool, água oxigenada e éter etílico) associada ou não à esterilização em óxido de etileno. É nossa hipótese que os dois processos de tratamento produzam efeitos diferentes no osso.

MÉTODOS

Foram usadas oito ratas albinas jovens provenientes de descarte de rotina do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, com massa corporal média de 250 g. Estes animais foram mortos conforme as recomendações estabelecidas pela *American Veterinary Medical Association*⁽¹³⁾ e, após eutanásia, os fêmures foram retirados e limpos de tecidos moles.

Com auxílio de cortadora metalográfica (Isomet Buehler, USA), foram obtidos três anéis transversais da região mediodiafisária dos fêmures e, da região metafisioepifisária, foi obtido um corte frontal de 1,2

mm de espessura. Os espécimes obtidos da diáfise serviram como amostra de osso cortical e os fragmentos obtidos da região metafisoepifisária foram destinados ao estudo no osso esponjoso. Estes fragmentos foram separados em quatro grupos, contendo, em cada um, os dois tipos de osso. Os grupos foram estabelecidos com base no tipo de tratamento a que os ossos foram submetidos:

Grupo I – Fragmentos ósseos simplesmente secos em estufa (40°C);

Grupo II – Fragmentos ósseos secos em estufa (40°C) e esterilizados em óxido de etileno;

Grupo III – Fragmentos ósseos tratados quimicamente conforme Volpon et al⁽¹⁴⁾.

Grupo IV – Fragmentos ósseos tratados quimicamente da mesma maneira que no grupo III, mas esterilizados em óxido de etileno, da mesma maneira que no grupo II.

Os fragmentos ósseos foram conservados e submetidos ao processamento, conforme técnica já descrita por Volpon et al⁽¹⁴⁾, cujas etapas básicas compreendem: retirada dos resquícios de partes moles aderidas, imersão em álcool absoluto por 48 horas, tratamento em água oxigenada 40 volumes até o clareamento e banho em éter etílico, com trocas sucessivas, até o desaparecimento das gotículas de gordura sobrenadantes. Novamente, o material foi colocado em álcool absoluto para a desidratação residual e, por fim, secado em estufa (40°C). Depois, as amostras foram separadas nos respectivos grupos, em parcelas iguais de amostras cortical e esponjoso e embaladas individualmente.

A técnica de esterilização em óxido de etileno foi a de rotina hospitalar (2,0 kg de gás por ciclo de três horas, seguido por aeração e hiperventilação de duas horas cada, à temperatura de 55°C, pressão de 0,5 kgf/cm², com -0,5 kgf/cm² de vácuo, em aparelho marca *Sercon*[®]).

PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Os fragmentos ósseos de cada grupo foram separados em duas metades. A primeira foi reservada ao estudo com microscopia de luz convencional, em coloração com azul de toluidina e pironina e, a segunda, foi alocada ao estudo com microscopia eletrônica de varredura.

O processamento do material para confecção das lâminas foi iniciado pela fixação em solução de for-

malina tamponada 10% por 10 dias, trocada a cada dois dias. Depois, houve desidratação em solução alcalina seguindo seqüência crescente de concentração de álcool, sob agitação durante quatro horas por dia. A cada dois dias a solução foi substituída por uma de maior concentração de álcool. Após a desidratação, as peças foram incluídas em resina acrílica (*RL White, USA*) estabilizada com peróxido de benzoíla, mantidas em agitação por uma hora e refrigeradas durante a noite. Nos dias subseqüentes as amostras foram submetidas a um ciclo de agitação e estufa a vácuo (*Shell Lab*) para retirada de eventuais bolhas, voltando à refrigeração após o ciclo. Tal procedimento foi realizado durante nove dias, com troca da resina a cada 48 horas. No décimo dia foram incluídas em formas de teflon e levadas à estufa (60° C). Quando secas, as peças passaram por um processo de lixação manual seguida por polimento. Os blocos de acrílico com o fragmento ósseo incluído foram seccionados transversalmente em micrótomo, coladas em lâmina com resina, lixados manualmente e polidos até que atingissem a espessura de 10 a 20 µm.

Após o polimento as amostras foram coradas com azul de toluidina e pironina. O material foi examinado e microfotografado segmentarmente em microscópio de luz convencional (*Leica Microsystems GmbH Nussloch, Germany*), com aumento original de 25 vezes. As partes das imagens foram reconstituídas em imagem única, com o uso do programa *Adobe Photoshop*[®]. Particularidades das regiões de interesse foram examinadas em aumento até 100 vezes.

Para o exame em microscopia eletrônica, os fragmentos ósseos foram submetidos ao preparo específico: 1- desidratação em concentrações crescentes de etanol; 2- secagem em dióxido de carbono líquido em equipamento *CPD 030 (Critical Point Dryer, Bal-Tec*[®], *Germany*); 3- Fixação em suportes de alumínio (*stubs*) com cola condutora à base de prata e grafite para melhorar o escoamento dos elétrons; 4- cobertura com camada delgada de ouro 24 k em alto vácuo com aparelho *SCD 050 (Super Cool Sputtering System, Bal-Tec*[®], *Alemanha*), tornando as amostras refletivas ao feixe de elétrons.

Os espécimes foram examinados e eletronicografados em filmes de 120 mm *Fuji*[®] ACROS ISO 100, preto e branco, em microscópio eletrônico de varredura

(JSM-5200, *Jeol*[®], Japão), sendo analisados o córtex e o osso esponjoso em aumentos de 75x, 150x e 350 vezes. Nos aumentos menores foram observados o aspecto geral da peça, a preservação da morfologia global, o trabeculado ósseo e aspectos da superfície. Nos aumentos maiores, foram estudados detalhes da superfície e do trabeculado ósseo. As seguintes comparações foram realizadas:

a. Grupo I x Grupo II (osso seco em estufa x osso seco e esterilizado em óxido de etileno)

b. Grupo III x Grupo IV (osso tratado quimicamente x osso tratado quimicamente e esterilizado em óxido de etileno)

c. Grupo I x Grupo III (osso seco em estufa x osso tratado quimicamente)

d. Grupo II x Grupo IV (osso seco em estufa e esterilizado em óxido de etileno x osso tratado quimicamente e esterilizado em óxido de etileno).

RESULTADOS

Microscopia óptica com luz convencional

Em termos de comparação geral, os resultados foram bastante semelhantes entre os espécimes, qualquer que tenha sido o tipo de tratamento.

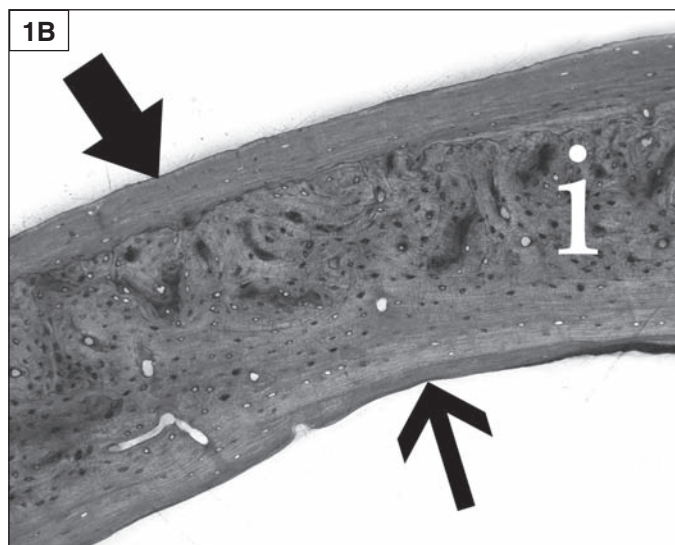
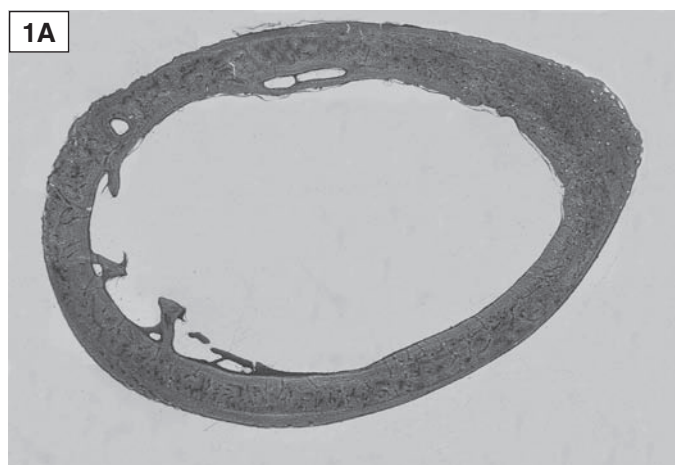
Os cortes transversais na região diafisária produziram anéis ósseos com a morfologia preservada (Figura 1A). Em aumentos maiores eram identificadas três camadas formando o córtex ósseo. A mais externa (subperiosteal) era composta por lamelas justapostas, sem espaço trabecular e colocadas transversalmente ao eixo longitudinal do osso. A camada intermediária, mais larga, era formada por osso compacto com as lamelas dispostas longitudinalmente, de modo que, no corte transversal, eram bem visíveis e típicos os osteons formados pelo vaso central e lamelas concêntricas conectadas pelo sistema de canaliculos entre as lacunas osteocíticas (sistema haversiano) que se apresentavam tanto vazias, como com manutenção do conteúdo celular (Figura 1B). Em algumas regiões apareciam vasos do sistema de Volkmann e, em outras, as camadas externa e interna eram separadas por linhas cimentantes.

A camada interna (endosteal) era formada com a mesma distribuição que a externa, porém, mais delgada (Figura 1B).

Na região correspondente à linha áspera do fêmur a separação entre as três camadas era menos típica, predominando osso com aspecto que se assemelhava mais ao da camada intermediária.

No osso esponjoso proveniente do segmento epifisiometafisário havia manutenção da anatomia da região, com preservação do formato e da estrutura geral do trabeculado ósseo que, na epífise, dispunha-se preferencialmente no sentido longitudinal e, na metafíse, as trabéculas eram mais espessas e apresentavam aspecto distribuição mais casual (Figura 1C).

Na comparação intergrupos o que chamou a atenção foi que nos grupos III e IV houve preservação do conteúdo celular, mais tipicamente ilustrado no osso trabeculado (Figura 1D). Com efeito, nos grupos I e II, praticamente não havia células ou restos da medula óssea, enquanto que, nos primeiros, eram abundantes os osteoblastos dispostos sobre as lamelas e presença de resíduos de medula óssea



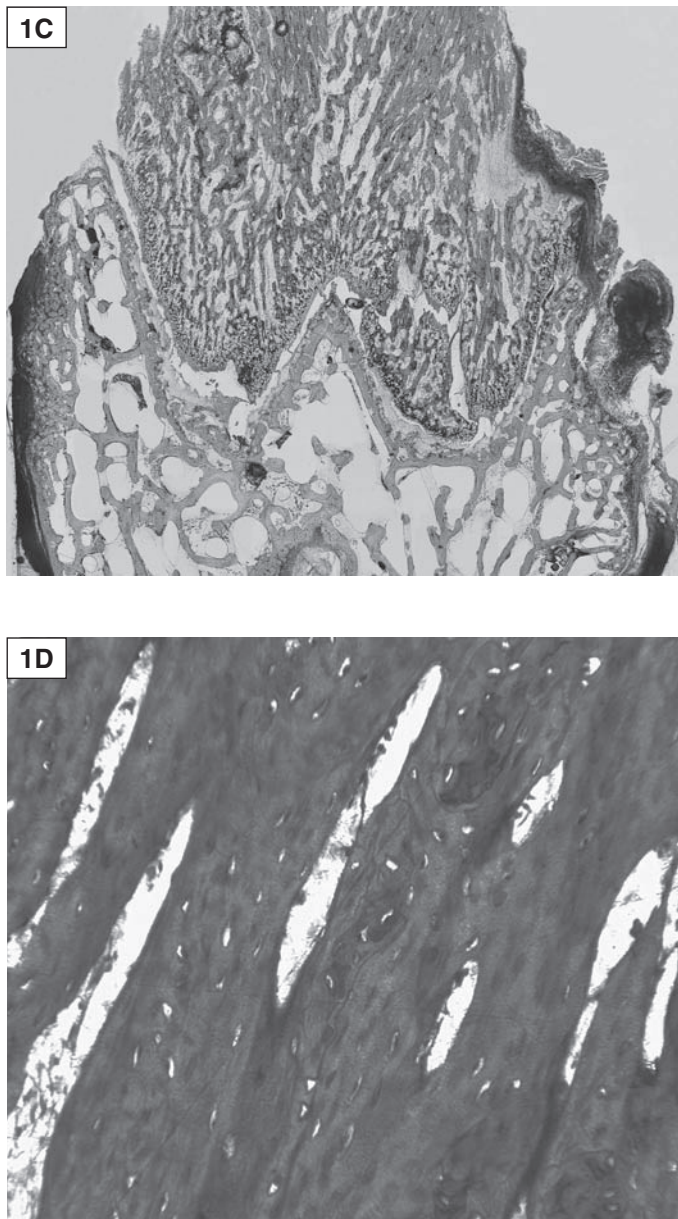


Figura 1 – Aspectos histológicos das amostras de osso diafisário e epifisiometafisário, provenientes do processamento químico (Grupo III) examinados sob microscopia óptica de luz convencional. A morfologia geral do osso está mantida. A - amostra de osso apenas seco (grupo I). B - detalhe da amostra anterior ilustrando as três camadas que formam o córtex: a camada externa apresenta osso compacto com as fibras dispostas circularmente (seta cheia). Na camada intermediária (i) as lamelas se dispõem longitudinalmente, o que é constatado pelos inúmeros sistemas de Havers visualizados. A camada interna é mais estreita e apresenta as lamelas dispostas circularmente, como na camada externa (seta estreita). C – corte frontal da extremidade distal do fêmur ilustrando a morfologia geral. D - detalhe do mesmo espécime ilustrando a preservação do conteúdo celular notada pela presença de inúmeros osteoblastos sobre as lamelas. (A e C: aumento 25x; B e D aumento 100x. Coloração: azul de toluidina e pironina).

Microscopia eletrônica de varredura

Nos aumentos menores havia preservação da microarquitetura espacial, tanto nos segmentos de osso compacto, quanto nos de osso esponjoso (Figura 2).

Nos segmentos diafisários, em aumentos de 75x, a superfície externa do córtex apresentava o aspecto fibrilar típico, perfurada pelos orifícios vasculares, enquanto que no osso esponjoso predominavam as lamelas com seus pontos de entrelaçamento, espaços intertrabeculares e orifícios vasculares (Figura 2).

No osso compacto, especialmente nos aumentos maiores, todos os grupos apresentavam microfraturas na superfície. A maior diferença ocorreu nos grupos II

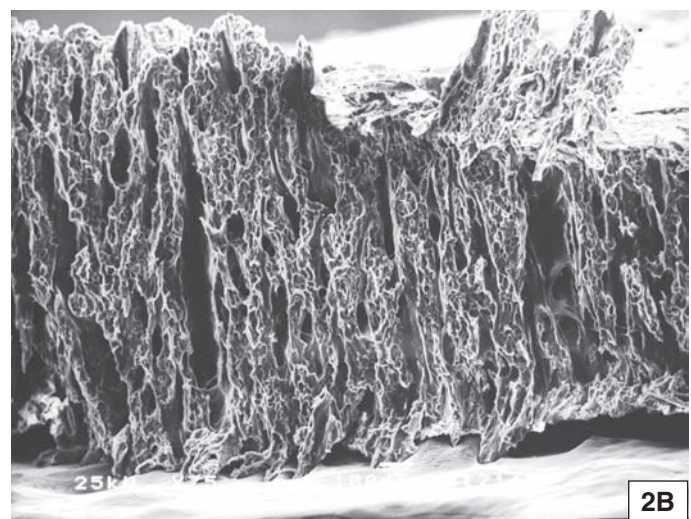
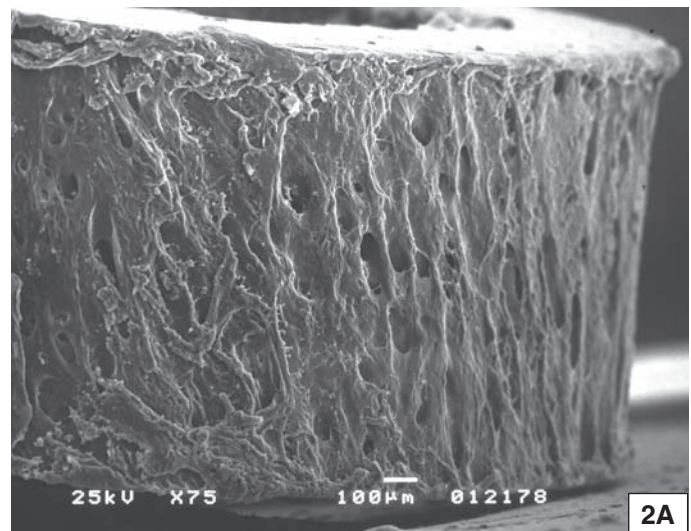


Figura 2 – Eletronmicrografias de amostras de osso diafisário (A) e metafisário (B) em aumentos de 75x. Ambas as amostras provem de osso apenas seco (Grupo I). A microarquitetura espacial está mantida para os dois tipos de amostras.

e IV que apresentavam amalgamação das microfibras (Figura 3 A,B). Este aspecto não foi encontrado nos grupos I e III.

Com relação ao osso esponjoso, houve achados semelhantes ao do osso cortical nas amostras nos grupos II e IV (Figura 3 C,D).

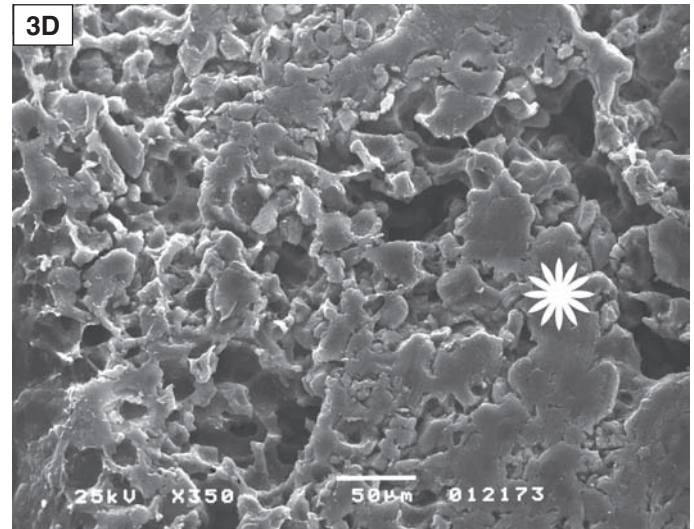
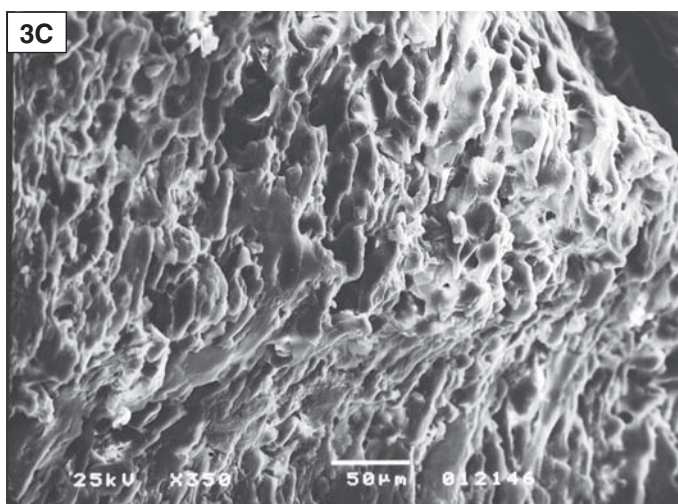
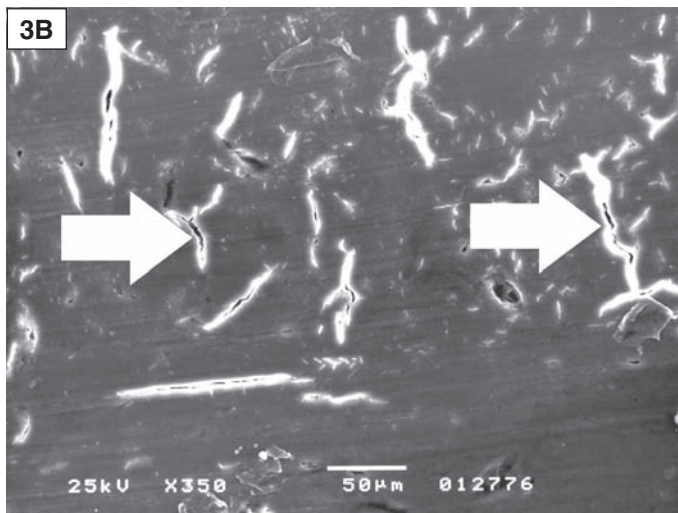
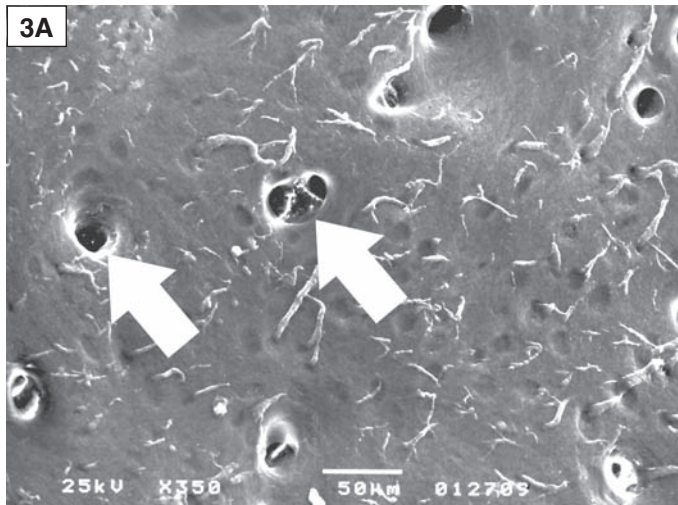


Figura 3 – Eletronmicrografias de varredura do córtex de osso diafisário e de osso esponjoso. A - No osso cortical seco, sem tratamento químico (grupo I) a superfície óssea está preservada e apresenta numerosos orifícios vasculares (setas; 350x), enquanto que no osso do grupo II (seco e esterilizado em óxido de etileno, figura B) a superfície está menos preservada e os orifícios menos nítidos (amalgamação). As microfaturas são evidentes (setas; 350x). C- Osso esponjoso seco (grupo I; 350x) D- osso esponjoso tratado quimicamente e esterilizado em óxido de etileno (grupo IV; 350x). O trabeculado é menos visível e há amalgamação das fibras que perdem a individualização e apresentam aspecto intumescido (asterisco).

DISCUSSÃO

A evolução da cirurgia ortopédica tem possibilitado a preservação de membros gravemente afetados. Contribuem para isto o maior controle do dano, entendimento mais profundo dos mecanismos fisiopatológicos do trauma, desenvolvimento de técnicas microcirúrgicas e controle da infecção. Assim, maior número de pacientes sobrevive, muitos deles com ossos apresentando distúrbios de consolidação que precisam ser reparados.

Mais recentemente, tem havido pesquisas no sentido de estimular a osteogênese com substitutos ósseos^(15,16), de fatores de crescimento⁽¹⁷⁾, uso de campos eletromagnéticos e estimulação ultra-sônica^(18,19). Porém, a enxertia óssea ainda persiste como o recurso mais empregado.

Entre os enxertos, os autógenos são os mais eficientes⁽²⁰⁾ porque não apresentam imunoincompatibilidade, mas pode haver limitações relacionadas com a quantidade disponível. Também, o fato de ser necessária uma cirurgia adicional para a colheita do osso causa aumento da morbidade⁽⁹⁾.

Assim, novas fontes de enxertia têm sido buscadas, e a mais antiga é a xenógena em que osso de espécies diferentes é usado. Este tipo de enxerto, apesar de alguns relatos favoráveis isolados de literatura⁽²¹⁾, apresenta como limitação a reação imunológica, o que compromete seu desempenho.

O enxerto homogêneo (ou homólogo) é uma situação intermediária entre as duas situações anteriores, pois envolve dois indivíduos da mesma espécie, mais assemelhados geneticamente. Entretanto, uma desvantagem é o risco potencial de transmissão de doenças⁽¹⁴⁾.

O processamento do osso, com finalidades de enxertia, com métodos químicos e físicos diminuem a possibilidade de transmissão de infecções e possibilitam estocagem e manuseio mais fáceis^(6,21), mas diminuem a capacidade osteogênica.

Investigações realizadas com o enxerto preparado segundo a técnica descrita neste trabalho mostraram bom desempenho osteogênico por mecanismo de osteocondução⁽¹⁴⁾ e possibilidades de confecções em blocos e mesmo parafusos ósseos⁽²²⁾. Buscamos aprofundar seu estudo, pois foi mostrado que o tipo de preparo usado no tratamento do osso modifica suas propriedades mecânicas^(11,22,23). Outros autores relataram que podem ocorrer mudanças estruturais nas superfícies dos ossos dependendo do tempo de exposição ao óxido de etileno, ou quando outro tipo de processamento é usado para a esterilização^(12,24,25).

No presente estudo buscamos investigar qual etapa do processo de preparo do enxerto (tratamento químico ou exposição ao óxido de etileno) poderia estar causando danos ao osso, alterando sua microestrutura e as propriedades mecânicas como já demonstrado^(11,22,23) e, basicamente constituídas por amalgamação, fissuras e enfraquecimento à torção. Estes achados podem ser clinicamente relevantes para realizar seleção do melhor tipo de enxerto e na usinagem do osso com a finalidade de se obter implantes com formas específicas.

Nossos resultados mostram que, quando apenas o processamento químico foi usado, houve maior preservação da microestrutura do osso, inclusive do seu conteúdo celular, o que pode ser explicado pelo uso álcool no início da preparação, que atua como fixador. Entretanto, do ponto de vista de osteogênese, estas células são inativas, pois estão mortas e este tipo de enxerto atua apenas como osteocondutor no processo de estimulação da neoformação óssea⁽¹⁰⁾. Este proces-

samento é importante, pois, além de fixar e desidratar, promove a retirada de todo o tecido gorduroso. Kakiuchi *et al.*⁽⁶⁾ mostraram que, para que o óxido de etileno realmente esterilize o tecido ósseo, é necessário que a água e o tecido gorduroso tenham sido removidos, de modo que o gás possa penetrar eficientemente no tecido ósseo. Além disso, a dissolução em solventes orgânicos como o etanol reduz a antigenicidade do aloenxerto⁽⁶⁾.

Outro ponto é que o óxido de etileno é gás tóxico e, após a esterilização do osso, deve ser garantido que ele seja totalmente removido, o que é feito eficientemente por aeração adequada, com resíduos que devem estar até em 100 partes por milhão para amostras de tamanho médio (10-100g)⁽⁶⁾. Entretanto, cautela deve ser observada ao se usar grandes fragmentos ósseos, pois, nestes casos, a esterilização é menos eficiente e os parâmetros técnicos do processo devem ser ajustados⁽⁶⁾.

Os achados com microscopia eletrônica de varredura mostraram que aplicação de óxido de etileno causou amalgamação das fibras, principalmente do osso cortical. Provavelmente, esta alteração também tenha ocorrido no osso esponjoso que, entretanto, por conter muito menos trabéculas e com orientação variada, possa ter dificultado a observação do fato. Esse achado já foi encontrado por outros^(6,22). Haje *et al.*⁽²²⁾ encontraram que o osso, quando submetido ao processamento descrito neste trabalho, apresenta aumento da força máxima em testes de flexão, mas torna-se mais frágil sob esforços de torção. Uma possível explicação para estas alterações pode ser a própria amalgamação.

Além disso, é provável que o aquecimento que ocorre durante a esterilização é que seja o fator causal da amalgamação e não o gás em si, pois ele é inerte, mas tóxico e atuante apenas para estruturas vivas. Este raciocínio é sugerido pelo fato de que a amalgamação foi encontrada apenas nos grupos aquecidos e reforçado pelos achados de Voggenreiter *et al.*⁽¹²⁾ que estudaram os efeitos da temperatura e irradiação sobre a microestrutura do osso cortical e encontraram que a autoclavagem produz desnaturação da matriz orgânica, com amalgamação e edema da matriz fibrilar.

Finalmente, em termos de limitação metodológica de nossa pesquisa, mais amostras poderiam ter sido usadas, embora neste tipo de investigação habitualmente o número de amostras seja pequeno^(6, 12), e também, pela metodologia os resultados sugerem, mas não de-

monstram cabalmente que o calor tenha sido o agente causador da amalgamação. Isto pode ser determinado em outra investigação com um desenho específico para esta finalidade.

CONCLUSÃO

O processamento químico usado em nesta investigação, bem como a esterilização em óxido de etileno, causou alterações mínimas quando examinado sob microscopia de luz convencional. No entanto, quando o material foi analisado microestruturalmente, houve de-

monstração de microfissuras comuns também ao grupo controle, bem como amalgamação fibrilar que parecem ser resultantes do aquecimento e que podem explicar as alterações de parâmetros mecânicos do osso encontradas por outros autores.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP pelo processamento das peças para o estudo sob microscopia eletrônica de varredura.

REFERÊNCIAS

- de Boer, HH The history of bone grafts. *Clin Orthop Rel Res.* 1988;(226):292-8.
- Liptak JM, Dernel WS, Ehrhart N, Lafferty, MH, Monteith, GJ, Withrow SJ. Cortical allograft and endoprosthesis for limb-sparing surgery in dogs with distal radial osteosarcoma: a prospective clinical comparison of two limb sparing techniques. *Vet Surg.* 2006;35(6):518-33.
- Friedlaender GE, Bone-Banking. *J Bone Joint Surg Am.* 1982;64(2):307-11.
- Centers for Disease Control (CDC). Transmission of HIV through bone transplantation: case report and public health recommendations. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1988;37(39):597-9.
- Conrad EU, Graetch DR, Obermeyer KR, Moogk MS, Sayers M, Wilson JJ, Strong DM. Transmission of the Hepatitis-C virus by tissue transplantation. *J Bone Joint Surg Am.* 1995;77(2):214-24.
- Kakiuchi M, Ono K, Nishimura A, Shikawa H. Preparation of bank bone using defatting, freeze-drying and sterilization with ethylene oxide. *Int Orthop.* 1996; 20(3):142-6.
- Bright RW, Smarsh, Gambill VM. Sterilization of human bone by irradiation. In: Friedlaender GE, Mankin HJ, Sell KW. *Osteochondral allografts.* Boston: Brown; 1984. p. 223-32.
- Burwell RG. Studies in the transplantation of bone. VII. The fresh composite homograft – autograft of cancellous bone; an analysis of factors leading to osteogenesis in marrow transplants and in marrow – containing bone grafts. *J Bone Joint Surg Br.* 1964;46:110-40.
- Haje DP, Thomazini JA, Volpon JB. Efeitos do processamento químico, da esterilização em óxido de etileno e da usinagem em parafusos de osso bovino: estudo com microscopia eletrônica de varredura. *Rev Bras Ortop.* 2007; 42(4):120-4.
- Castania VA, Volpon JB. Integração do enxerto ósseo corticoesponjoso homólogo, tratado quimicamente e esterilizado em óxido de etileno: estudo em cães. *Rev Bras Ortop.* 2007;42(6):173-80.
- Castania VA, Volpon JB. Enxerto ósseo processado quimicamente e esterilizado em óxido de etileno. Ensaio mecânico e teste em cães. *Rev Bras Ortop Pediatr.* 2003; 4(2):22-9.
- Voggenreiter G, Ascherl R, Blumel G, Schmit-Neuerburg KP. Effects of preservation and sterilization on cortical bone grafts. A scanning electron microscopic study. *Arch Orthop Trauma Surg.* 1994;113(5):294-6.
- American Veterinary Medical Association (2001) [Report of the AVMA Panel on Euthanasia. *J Amer Veter Med Ass.* 2002;218(5):669.
- Volpon JB, Costa RMP. Ensaio mecânico e uso clínico do enxerto homogêneo processado. *Rev Bras Ortop.* 2000;35(6):219-24.
- McAndrew MP, Gorman PW, Lange TA. Tricalcium phosphate as a bone graft substitute in trauma: preliminary report. *J Orthop Trauma.* 1988;2(4):333-9.
- Bucholz RW, Carlton A, Holmes R. Interporous hydroxiapatite as a bone graft substitute in tibial plateau fractures. *Clin Orthop Relat Res.* 1989;(240):53-62.
- Kolbeck S, Bail H, Schmidmaier G, Alquiza M, Raun K, Kappelgard A, et al. Homologous growth hormone accelerates bone healing – a biomechanical and histological study. *Bone.* 2003;33(4):628-37.
- Brighton CT. The treatment of non-unions with electricity. *J Bone Joint Surg Am.* 1981;21(3):847-51.
- Heckman JD, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ, Kilcoyne RF. Acceleration of tibial fracture healing by noninvasive, low-intensity pulsed ultrasound. *J Bone Joint Surg Am.* 1994;76(1):26-34.
- Volpon JB. A marcação do osso com substâncias fluorescentes. *Rev Bras Ortop.* 1985;20(5):207-10.
- Puranen J. Reorganization of fresh and preserved transplants. An experimental study in rabbits using tetracycline labeling. *Acta Orthop Scand.* 1966; Suppl 92:1-75.
- Haje DP, Moro CA, Volpon JB. Bovine bone screws: metrology and effects of chemical processing and ethylene oxide sterilization on bone surface and mechanical properties. *J Biomater Appl.* Aug 12. [Epub ahead of print]
- Haje DP, Volpon JB. Desenvolvimento de parafusos de osso bovino: método de usinagem e estudo metrológico com projetor de perfil. *Acta Ortop Bras.* 2005; 14(2):87-91.
- Doherty MJ, Mollan RA, Wilson DJ. Effect of ethylene oxide sterilization on human demineralized bone. *Biomaterials.* 1993;14(13):994-8.
- Bonar LC, Glimcher MJ. Thermal denaturation of mineralized and demineralized bone collagens. *J Ultrastruct Res.* 1970;32(5):545-8.