

Artigo Original

recebido: 22/10/1999 e aceito em 18/05/2000

Comparação da resistência à compressão de ossos bovinos congelados e liofilizados

Compression resistance of deep frozen and freeze dried bovine bone

L. S. Duarte

Engenheiro Mecânico.

Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Materiais pelo Laboratório de Transformação Mecânica - UFRGS. Av. Bento Gonçalves, 9500 - Centro de Tecnologia Campus do Vale, CEP 91501-970 Porto Alegre, RS. e-mail: lucianod@if1.if.ufrgs.br

L. Schaeffer

Doutor Engenheiro.

Professor Adjunto da Escola de Engenharia e Coordenador do Laboratório de Transformação Mecânica / UFRGS. e-mail: schaeffer@vortex.ufrgs.br

Resumo

Efetuiu-se o estudo de ossos bovinos congelados e liofilizados visando verificar a existência ou não de diferenças na resistência à compressão resultantes da utilização destes diferentes processos de estocagem de osso utilizados atualmente em bancos de enxertos ósseos. Foram comprimidos em uma máquina de ensaios mecânicos universal 78 corpos de prova cilíndricos retirados de côndilos femorais bovinos. Os corpos de prova foram divididos em três grupos de 26 peças. O grupo I foi composto por cilindros de osso liofilizado e reidratado durante uma hora e meia antes do ensaio; o grupo II foi composto por cilindros de osso congelado e posteriormente descongelado durante uma hora; e o grupo III foi composto por cilindros de osso liofilizado e reidratado no momento do ensaio. Os resultados mostraram que não há diferença estatisticamente significativa nem na resistência a compressão entre os grupos de estudo (Força máxima média de compressão e respectivo desvio padrão - GI 216 ± 147 N; GII 324 ± 245 N; GIII 284 ± 216 N), nem na razão de deformação (Razão de deformação média e respectivo desvio padrão - GI 422 ± 363 N/mm; GII 686 ± 500 N/mm; GIII 559 ± 481 N/mm).

Palavras-chave: Biomecânica, Ensaio de compressão, Liofilização, Osso bovino, Reidratação, Transplante ósseo.

Abstract

An investigation into the influence of two bone stockpile methods currently used in bone graft banks, i.e. deep frozen and freeze dried, on the compression resistance behavior was undertaken. Seventy eight cylindrical specimens machined from bovine femoral condyles were compressed in an universal testing machine. The specimens were divided into three groups of 26 specimens each. Group I consisted of specimens freeze dried and rehydrated for an 1 1/2 hour before the test; Group II consisted of specimens deep frozen and defrosted for 1 hour before the test; and Group III consisted of specimens freeze dried and rehydrated immediately prior to the test. Results indicated no statistically significant difference nor in the compression resistance among the groups (GI 216 ± 147 N; GII 324 ± 245 N; GIII 284 ± 216 N; presented as maximum compression force ± standard deviation) neither in the stiffness (GI 422 ± 363 N/mm; GII 686 ± 500 N/mm; GIII 559 ± 481 N/mm; presented as stiffness ± standard deviation).

Keywords: Biomechanics, Bone transplantation, Bovine bone, Compression test, Freeze-drying, Rehydration.

Introdução

A utilização do transplante de osso alo gênico como método de tratamento de várias patologias do esqueleto começou no final do século passado. O fator limitante do transplante ósseo naquela época era o armazenamento dos enxertos ósseos. Desde 1912, quando Albee (1912) iniciou o armazenamento destes enxertos em locais refrigerados, eles têm sido fervidos, congelados ou agitados em solução anti-séptica para sua conservação. O desenvolvimento destas técnicas progrediu gradualmente até que o United States Navy Tissue Bank introduziu o aloenxerto de osso liofilizado para cirurgia ortopédica reparativa em 1951 (Crenshaw, 1991).

Com a consolidação destas várias técnicas utilizadas na preparação de enxertos ósseos para o armazenamento, a existência de diferenças significativas entre as mesmas passou a ser discutida (Conrad *et al.*, 1993). No presente trabalho, a resistência à compressão de ossos bovinos preparados para implante por duas destas técnicas é comparada. As técnicas escolhidas são: liofilização e congelamento profundo.

A técnica de liofilização consiste na retirada de umidade do osso previamente desengordurado, o que permite a possibilidade de estocagem por longos períodos. Várias vantagens e desvantagens do osso liofilizado em relação ao osso congelado foram estabelecidas. Suas vantagens são a diminuição marcada da antigenicidade do aloenxerto, o menor risco de transmissão de doenças (Zasacki, 1991), a maior disponibilidade por possibilidade de uso de doadores mortos ou membros amputados (Conrad *et al.*, 1993), a praticidade do armazenamento e manuseio trans-operatório do enxerto (armazenado em pacotes em temperatura ambiente por até 4 a 5 anos) e a mínima alteração bioquímica (Mellonig *et al.*, 1992). Como desvantagens, são apontadas a baixa propriedade de osteointegração e a alteração de propriedades mecânicas como a perda de elasticidade e a fragilidade. Essas alterações, causam principalmente dificuldades técnicas na adaptação do tamanho e do formato do enxerto ao local de implante (Zasacki, 1991).

Outro fator associado ao desempenho estrutural de um enxerto ósseo é a reidratação do mesmo antes do implante. Existem trabalhos que mostram tanto a diminuição (Komander, 1976) como o aumento (Buchardt *et al.*, 1978; Sedlin, 1965) da resistência a compressão de corpos de prova liofilizados e até mesmo a não alteração significativa desta propriedade (Pelker *et al.*, 1983; Malinin *et al.*, 1989). Os estudos

realizados por Conrad (1993) não mostraram diferenças significativas quanto a força de compressão entre enxertos ósseos liofilizados reidratados por 24 horas e enxertos congelados, porém no mesmo estudo, enxertos liofilizados não reidratados pareceram ser mais resistentes à compressão. Esta incerteza de comportamento levou-nos a realizar o presente trabalho.

Material e método

Foram estudados 78 cilindros (10 mm de altura por 8 mm de diâmetro) de osso esponjoso retirados de côndilos femorais de joelhos de 9 bovinos. Os cilindros foram divididos em três grupos de estudo distintos formados por 26 peças cada. O grupo I (G I) foi composto por cilindros de osso liofilizado e reidratado durante 90 minutos antes do ensaio; o grupo II (G II) foi composto por cilindros de osso congelado e posteriormente descongelado por uma hora; e o grupo III (G III) foi composto por cilindros de osso liofilizado e reidratado no momento do ensaio.

Os animais doadores tinham entre 3 e 5 anos de idade, eram de raça de origem européia oriundos da mesma propriedade rural, e tinham peso corporal médio de 450 kg. Para a retirada dos corpos de prova, o fêmur distal foi cortado no sentido transversal, na região metafisária, sendo o ponto de corte proximal uma linha imaginária 10 cm acima da linha articular do joelho e o ponto de corte distal na inserção proximal dos ligamentos cruzados. A peça então tinha aspecto de um paralelepípedo que foi dividido em regiões anterior, média e posterior em relação ao plano sagital e em média, central e lateral em relação ao plano coronal. Os cilindros de osso foram então extraídos de cada região citada e processados por uma das técnicas de estocagem seguindo um plano de aleatorização previamente definido para evitar a influência da posição de extração do corpo de prova nos resultados. Uma ilustração do côndilo bovino assim como a distribuição das amostras pode ser observada na Figura 1.

Os cilindros do grupo II foram armazenados em um freezer de congelação profunda (Revco Scientific, modelo ULT1786-5-D14) a uma temperatura de -80 °C durante 7 dias e retirados para descongelamento 1 hora antes do ensaio. Os cilindros dos grupos I e III, após congelação profunda durante 5 dias, foram processados em banco de ossos desenvolvido no serviço de Ortopedia e Traumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O processo de liofilização utilizado consistiu das seguintes etapas:

a. lavagem em água filtrada; b. centrifugação; c. desengorduramento em solução de clorofórmio e metanol; d. centrifugação; e. aeração em meio ambiente; f. lavagem com água filtrada; g. centrifugação; h. liofilização à frio (-40 °C) durante 7 dias

Para a realização do ensaio, os cilindros do grupo I foram imersos em solução de NaCl (0,9 %), durante 90 minutos antes da compressão e os do grupo III apenas imediatamente antes da compressão. Os ensaios foram realizados em uma máquina de ensaios mecânicos universal (Kratos, modelo K 1000) com auxílio de um sistema de aquisição de dados via microcomputador (DIAdem 3.02, GsFmbH Alemanha). A velocidade de ensaio foi ajustada em 3 mm/min e a célula de carga utilizada tinha capacidade máxima de 5.000 N.

Os dados obtidos através do sistema de aquisição utilizado foram filtrados digitalmente no próprio programa de aquisição (DIAdem) através de rotina previamente definida. Os dados de ensaio filtrados foram então repassados para uma planilha eletrônica onde a análise de variância foi feita com o sistema da tabela ANOVA (Ribeiro, 1996).

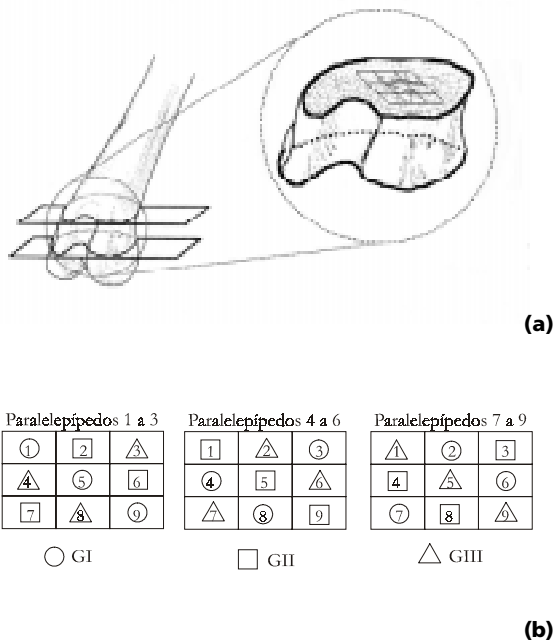


Figura 1. (a) Ilustração dos cortes realizados no côndilo femoral e ampliação da região de retirada das amostras. (b) Distribuição das áreas de extração dos corpos de prova nos paralelepípedos retirados dos côndilos bovinos.

Resultados

Para efeito de análise, a Força Máxima de Compressão (FMC) foi considerada como o pico de força atingido durante o ensaio de compressão e logo após a zona de deformação elástica (Chiaverini, 1977). O fator Razão de Deformação (RD) foi considerado como o coeficiente angular da zona de deformação elástica dos gráficos *Força de Compressão X Deslocamento* obtidos. A representação gráfica dos fatores de estudo pode ser visualizada na Figura 2.

Os valores dos dados para FMC variaram entre 20 e 545 N para o GI com um valor médio e um desvio padrão de 213 ± 146 N; entre 25 e 796 N para o GII com um valor médio e um desvio padrão de 326 ± 243 N; e entre 29 e 809 N para o GIII com um valor médio e um desvio padrão de 288 ± 212 N. Já os valores dos dados para RD variaram entre 26 e 1197 N para o GI com um valor médio e um desvio padrão de 424 ± 359 N/mm; entre 19 e 1595 N para o GII com um valor médio e um desvio padrão de 685 ± 504 N/mm; e entre 64 e 1730 N para o GIII com um valor médio e um desvio padrão de 560 ± 482 N/mm. Os gráficos das Figuras 3 e 4 mostram a distribuição dos valores destes dois fatores para as amostras de acordo com o grupo a que pertencem. Estes gráficos foram montados de maneira semelhante a utilizada por Hamer *et al.* (1996) e Conrad *et al.* (1993) em seus trabalhos.

O comportamento de RD observado na Figura 4, um crescimento gradual, indica uma relação direta entre os dois fatores de estudo. Esta relação pode ser melhor visualizada na Figura 5, onde as curvas de FMC e RD são sobrepostas, ressaltando o incremento gradual de ambos os fatores. Como RD pode ser considerada como uma medida de rigidez do corpo de prova, este comportamento é esperado e pode ser explicado considerando-se que quanto maior for a

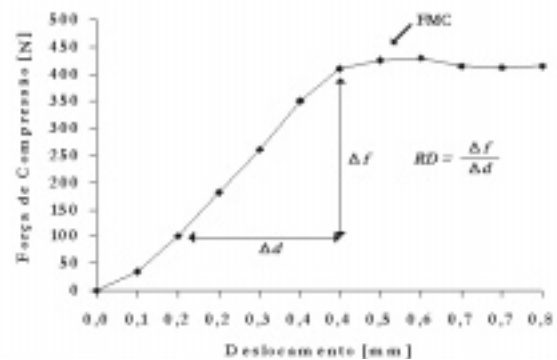


Figura 2. Representação dos fatores de estudo em um gráfico típico resultante dos ensaios realizados.

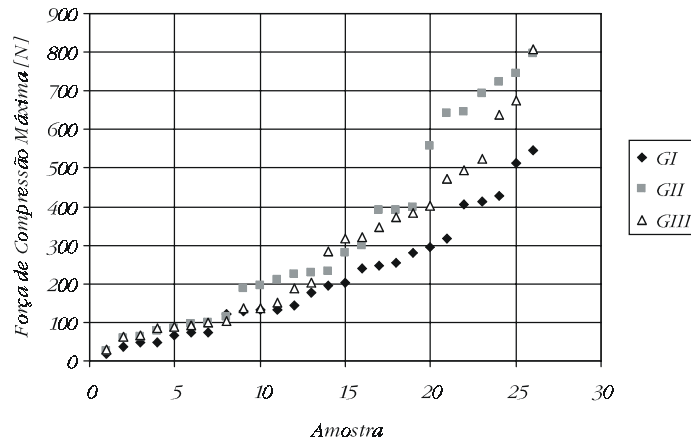


Figura 3. Distribuição dos valores de FMC para os três grupos de estudo. Nota-se a formação de patamares de força o que provavelmente decorre da influência do local de extração da amostra (região do côndilo) neste fator.

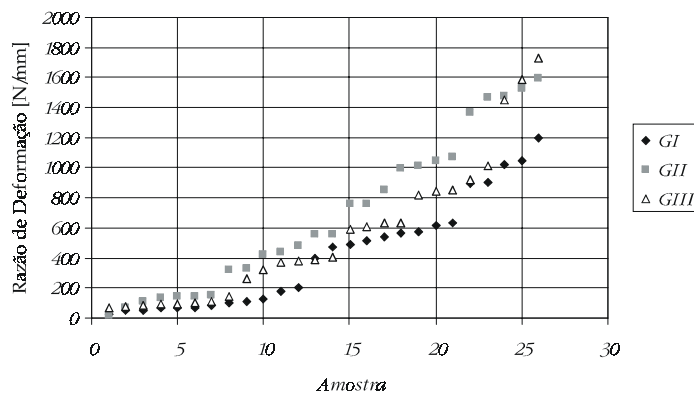


Figura 4. Distribuição dos valores de RD para os três grupos de estudo. Nota-se um comportamento semelhante ao descrito na Figura 3.

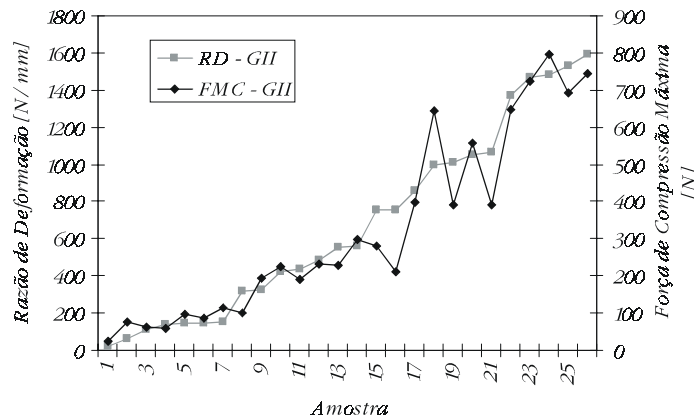


Figura 5. Comparação entre FMC e RD entre os corpos de prova do grupo II. Nota-se a tendência da FMC crescer com o aumento da rigidez (RD) do corpo de prova.

rigidez de um corpo, maior será a força necessária para deformá-lo, tanto elástica quanto plasticamente.

Discussão e Conclusões

A análise estatística, com nível de significância $\alpha = 0,05$, mostrou que não há diferenças significativas entre os grupos de estudo tanto para o fator Força Máxima de Compressão quanto para o fator Razão de Deformação. Estes resultados concordam com os obtidos por outros autores (Pelker *et al.*, 1983; Malinin *et al.*, 1989; Conrad *et al.*, 1993; Hamer *et al.*, 1996) que mencionam não terem encontrado diferenças significativas entre as propriedades mecânicas de enxertos ósseos congelados e liofilizados. Além disso, o estudo aponta a relação direta entre a força máxima de compressão esperada e a razão de deformação ou rigidez do enxerto ósseo, independente do processo de armazenamento utilizado e da reidratação ou não do enxerto pré-ensaio. O tempo de reidratação de enxertos liofilizados mostrou, também, não desempenhar um papel significativo, sugerindo a não necessidade de reidratação durante o ato cirúrgico.

A formação de patamares para os valores de FMC e RD observados nas Figuras 3 e 4, indicando a influência do local de extração da amostra (região do côndilo), não pode ser analisada. Devido ao procedimento experimental adotado para a realização dos ensaios a relação entre um corpo de prova e o local de origem do mesmo não foi registrada, impossibilitando a análise desta interação. Deixa-se esta análise como sugestão para trabalhos futuros.

A opção entre o processo de estocagem a ser utilizado, portanto, deve levar em consideração aspectos principalmente práticos e econômicos. A escolha de um determinado tipo de enxerto deve considerar os requisitos específicos exigidos para cada aplicação. Como outros autores têm mostrado (Zasacki, 1991), existe diferenças entre o comportamento bioquímico de enxertos dependendo do

processo utilizado para sua estocagem, assim como a possibilidade de transmissão de doenças infecto-contagiosas, inclusive do vírus HIV (Nemzek *et al.*, 1994; Buck *et al.*, 1990; Simonds *et al.*, 1992). Esses fatores, portanto devem ser avaliados com extremo cuidado no momento da escolha do método de estocagem ou do enxerto a ser utilizado.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Serviço de Ortopedia e Traumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial aos doutores Carlos Alberto de Souza Macedo, Carlos Roberto Galia, Adriano Luís Brasil da Silva, Paulo César de César e Luís Marcelo Müller e ao engenheiro Paulo Roberto Stefani Sanches do Serviço de Engenharia Biomédica do mesmo hospital pela oportunidade de participação na pesquisa e pela liberação para publicação dos dados dos ensaios realizados. Agradecemos também ao acadêmico de Engenharia Elétrica da UFRGS Fabiano Carcuchinsk Haag pelo inestimável apoio na aquisição dos dados de ensaio.

Referências

- Albee, F. H. (1912). "Discussion of preservation of tissues and its application in surgery by Alexix Carrel". *JAMA*, v. 59, p. 527.
- Buck, B.E., Resnick, L., Shah, S.M., Malinin, T.I. (1990). "Human-immunodeficiency-virus cultured from bone - implications for transplantation". *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v. 251, p. 249-253.
- BurchardT, H., Jones, H., Glowcsewski, F., Rudner, C., Enneking, W.F. (1978). "Freeze-dried allogeneic segmental cortical-bone grafts in dogs". *Journal of Bone and Joint Surgery - American Volume*, v. 60, n. 8, p. 1082-1090.
- Chiaverini, V. (1977). *Tecnologia Mecânica*, v. 1, São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 478 p.
- Conrad, E.U., Ericksen, D.P., Tenser A.F., Strong, D.M., Mackenzie, A.P. (1993). "The effects of freeze-drying and rehydration on cancellous bone". *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v. 290, p. 279-284.
- Crenshaw, A.H. (1991). "Bone grafting". In: *Campbell's Operative Orthopaedics*, Missouri: Mosby Year Book, p. 12-22.
- Hamer, A.J., Strachan, J.R., Black, M.M. (1996). "Biomechanical properties of cortical allograft bone using a new method of bone strength measurement - A comparison of fresh, fresh-frozen and irradiated bone". *The Journal of Bone and Joint Surgery - British Volume*, v. 78B, n. 3, p. 363-368.
- Komander, A. (1976). "Influence of preservation on some mechanical properties of human haversian bone". *Mater Med Pol* v. 8, p. 13.
- Kübler, N., Reuther, J., Kirchner, T. (1993). "Osteoinductive, morphologic, and biomechanical properties of autolyzed, antigen-extracted, allogeneic human bone". *J Oral Maxillofac Surg*. v. 51, p. 1346-1357.
- Nemzek, J.A., Arnoczky, S.P., Swenson, C.L. (1994). "Retroviral transmission by the transplantation of connective-tissue allografts - An experimental study". *Journal of Bone and Joint Surgery - American Volume*, v. 76A, n. 7, p. 1036-1041.
- Pelker, R.R., Markham, T. Friedlander, G.E., Moen, C., Panjabi, M. (1982). "The effects of preservation on allograft strength". *ORS 28th Annual Meeting*, New Orleans, Louisiana, 21-25 Jan.
- Malinin, T., Latta, L., Milne, E., Saitoh, S., Winter, R., Flores, A., Buck, B. (1989). "Effects of freeze drying on the femoral strength and notch sensitivity of human femoral diaphysis". *ORS 35th Annual Meeting*, Las Vegas, Nevada, 6-9 Fev.
- Mellonig, J.T., Prewett, A.B., Moyer, M.P. (1992). "HIV inactivation in a bone allograft". *Journal of Periodontology*, v. 63, n. 12, p. 979-983.
- Ribeiro, J.L.D. (1996). *Projeto de experimentos na otimização de produtos e processos*. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção, UFRGS, apostila de aula.
- Sedlin, E.D., Hirsch, C. (1966). "Factors affecting the determination of the physical properties of femoral cortical bone". *Acta Orthop Scand* v. 37, p. 29-48.
- Simonds, R.J., Holmberg, S.D., Hurwitz, R.L. (1992). "Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a seronegative organ and tissue donor". *N Engl J Med* v. 326, p. 726-732.
- Zasacki, W. (1991). "The efficacy of application of lyophilized, radiation-sterilized bone graft in orthopedic surgery". *Clin Orthop* v. 272, p. 82-87.