

Antônio Carlos Pinto Oliveira

**Comparação entre enxerto ósseo autólogo,
homólogo congelado e homólogo liofilizado
em modelo de cranioplastia em ratos**

Dissertação de Mestrado

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Martins Colares

Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Corrêa Chem

Porto Alegre

2002

**Comparação entre enxertos ósseos autólogo, homólogo
congelado e homólogo liofilizado em modelo de
cranioplastia em ratos**

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia

Nível: Mestrado

Faculdade de Medicina

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Antônio Carlos Pinto Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Martins Collares

Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Corrêa Chem

Oliveira, Antônio Carlos Pinto

Comparação entre enxertos ósseos autólogo, homólogo congelado e homólogo liofilizado em cranioplastia de ratos. Porto Alegre, 2002.

Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Faculdade de Medicina.

1. Transplante ósseo. 2. Banco de ossos. 3. Liofilização. 4. Congelação profunda

- **DEDICATÓRIA**

A **Sirlei e Fernanda,**

fontes de estímulo e alegria na minha vida.

Aos meus pais, **Nilza e Carlos,**

exemplos de vida e de amor,

por tudo que representam para nós.

- **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Marcus Vinicius Martins Collares**, por sua clareza de objetivos e seu rigor científico que nortearam este trabalho. A confiança na minha capacidade científica e profissional que demonstrou, desde o meu começo na cirurgia plástica, foi estímulo para o meu aperfeiçoamento. Este estudo é o fruto desta longa caminhada de amizade e aprendizado.

Ao **Prof. Dr. Roberto Corrêa Chem**, co-orientador neste estudo, pelo exemplo de perseverança e dinamismo na conquista de seus objetivos.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia da FAMED da UFRGS, seus professores e funcionários**, pelo aprendizado e pela atenção dispensada a cada um dos seus alunos. O respeito ao programa e a preocupação em realmente formar mestres e pesquisadores faz este PPG estar no local de destaque em que hoje se encontra.

À **Prof^a. Dr. Maria Izabel Edelweiss**, pela dedicação e entusiasmo contagiantes com que realizou a avaliação histopatológica e pelos grandes ensinamentos de patologia que me proporcionou.

Ao **Prof. Rinaldo de Angeli Pinto**, pelas oportunidades de convivência que tem me permitido e pelo aprendizado de ética e cirurgia plástica que dela resultou.

Ao **Dr. Carlos Roberto Galia**, responsável pela estruturação e modernização do banco de ossos do HCPA, pelo companheirismo e incentivo. Seu auxílio na idealização deste trabalho foi fundamental para que ele se concretizasse.

Aos **Drs. Lidiana Kneibel e Paulo Waldeci Worm**, ex-monitores da Disciplina de Cirurgia Experimental da FAMED-UFRGS, pela ajuda inestimável na viabilização e execução da parte laboratorial deste estudo.

Aos **acadêmicos de medicina** pelo auxílio nos procedimentos cirúrgicos, em especial ao **acadêmico Marcos Härter** pela disponibilidade e dedicação a este trabalho.

À **Srta. Tielle Muller de Mello**, funcionária do banco de ossos do HCPA, pelo cuidadoso preparo e armazenamento dos enxertos.

Ao Sr. Jorge Alberto, funcionário do Serviço de Patologia do HCPA, pelo preparo do material para o exame histopatológico, sempre com a mesma presteza tantas e quantas vezes foram necessárias.

Aos **funcionários do Instituto de Biociências e do Biotério da UFRGS** pela dedicação com que trataram os animais.

Aos **pós-graduandos e residentes** do Serviço de Cirurgia Plástica do HCPA, pela oportunidade de descobrir bons amigos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – detalhes do procedimento cirúrgico_____	40
Figura 2 – detalhes do procedimento cirúrgico_____	41
Figura 3 – calota craniana removida_____	42

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – escores de neoformação óssea_____	48
Gráfico 2 – escores de atividade osteoblástica_____	49
Gráfico 3 – escores de reabsorção óssea_____	49
Gráfico 4 – número de osteoclastos_____	50
Gráfico 5 – número de vasos_____	51
Gráfico 6 – presença de medula óssea_____	51

SUMÁRIO.

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
3. OBJETIVO	34
3.1. Objetivo geral	35
3.2. Objetivo específico	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1. Grupos de pesquisa	37
4.2. Preparo dos enxertos	38
4.3. Preparo dos animais	39
4.4. Métodos de avaliação	42
4.5. Análise estatística	44
5. RESULTADOS	45
6. DISCUSSÃO	52
7. CONCLUSÃO	64
8. BIBLIOGRAFIA	66
9. ANEXO	75
10. ARTIGO	80

RESUMO

Com a evolução da cirurgia craniomaxilofacial, quantidades cada vez maiores de osso são necessárias para reconstrução. Nas situações de extenso déficit ósseo ou quando é necessário diminuir tempo e morbidade cirúrgica, o uso de enxerto homólogo deve ser considerado. O objetivo deste experimento é comparar, em um modelo experimental de cirurgia craniomaxilofacial, o comportamento de ossos processados e armazenados pelos métodos disponíveis em nosso meio, a liofilização com autoclavagem e a congelação profunda, com o enxerto autólogo. Trinta ratos Wistar adultos foram divididos em três grupos submetidos à cranioplastia com reconstrução com enxerto ósseo. O grupo 1 recebeu homoenxertos congelados, o grupo 2 recebeu homoenxertos liofilizados e o grupo 3 foi reconstruído com enxertos autólogos frescos. Quatro animais de cada grupo foram sacrificados na 6ª semana. Os 6 restantes foram sacrificados na 15ª semana. Os resultados foram avaliados por parâmetros macroscópicos e histopatológicos. Na primeira avaliação os grupos 1 e 3 apresentavam resultados semelhantes, enquanto o grupo 2 mostrava resultados significativamente piores em vários parâmetros avaliados. Na avaliação tardia enquanto o grupo 1 mostrou uma diminuição na neoformação óssea e na atividade osteoblástica, o grupo 2 apresentou índices significativamente maiores para estes parâmetros. O grupo 3 manteve sua proporção de osso neoformado inalterada, com uma diminuição da atividade dos osteoblastos. Conclui-se que o enxerto autólogo fresco

permanece como primeira opção na reparação do esqueleto facial. Embora os enxertos homólogos tenham apresentado resultados satisfatórios, com capacidade de osteoindução e osteocondução, os enxertos homólogos liofilizados parecem ter um melhor comportamento em longo prazo.

ABSTRACT

This experiment was designed to compare, in an experimental model of craniomaxillofacial surgery, the behavior of processed and banked bones through lyophilization with autoclave or deep-freezing with autogeneic grafts. Thirty Wistar rats were divided in three groups and submitted to cranioplasty with reconstruction using bone graft. Group 1 received deep-frozen allografts, group 2 received lyophilized allografts, and group 3 was reconstructed with fresh autografts. Four animals of each group were sacrificed at week 6. The remaining 6 were sacrificed at week 15. Results were evaluated by macroscopic and histopathologic parameters. In the first evaluation, groups 1 and 3 showed similar results, while group 2 showed significantly worse results in several parameters. In the late evaluation, group 1 showed diminished bone neoformation and osteoblastic activity, whereas group 2 showed significantly higher indexes in these parameters. Group 3 kept its proportion of neoformed bone unchanged, with a decrease in osteoblastic activity. It is concluded that fresh autografts remain as the first choice in repairing the facial skeleton. Although allografts presented satisfactory results, with osteoinductive and osteoconductive properties, lyophilized allografts appear to show a better behavior in the follow up.

1. INTRODUÇÃO

As malformações congênitas e as perdas ósseas causadas por ressecções de tumores, infecções ou traumas são um desafio na cirurgia reconstrutiva da face. O osso é um dos tecidos mais utilizados nas cirurgias de transplantes humanos ^{1,2,3,4,5}. A utilização de osso armazenado cresceu nos EUA de uma estimativa de 100.000 casos em 1971 para aproximadamente 250.000 em 1991^{5,6}. Na última década, o uso clínico de homoenxertos ósseos atingiu 355 000 casos por ano ⁷. Destes, estima-se que 200.000 são para uso médico e o restante para uso odontológico ⁸. Aproximadamente 10 a 15 % das cirurgias ortopédicas realizadas nos Estados Unidos a cada ano envolvem alguma forma de enxerto ósseo ¹⁰.

A grande maioria dos enxertos utilizados na cirurgia craniomaxilofacial é autólogo, retirado da calota craniana ^{1,4,11,12,13,14}. A literatura está repleta de estudos clínicos e laboratoriais ^{1,3,4,11,12,13,14,15,16,17,18} que mostram a superioridade dos enxertos membranosos e as vantagens da utilização de osso isotópico, que se adapta melhor ao sítio receptor.

Com a evolução da cirurgia craniomaxilofacial, quantidades cada vez maiores de osso são necessárias para reconstrução. Nestas situações de extenso déficit ósseo ou quando é necessário diminuir tempo e morbidade cirúrgica, o uso do enxerto homólogo está indicado ^{3,4,12,13}. Os xenoenxertos bovinos são correntemente comercializados como material inerte, livre de antígenos, mas tem apresentado respostas insatisfatórias. Talvez mais promissores sejam os materiais de substituição óssea que podem mimetizar o arcabouço ósseo. As vantagens destes materiais incluem a preservação de uma possível zona doadora, a eliminação do risco de transmitir doenças infecciosas, a disponibilidade ilimitada e riscos de infecção cirúrgica menor. Estes materiais

também são de particular interesse para serem utilizados como veículos para proteínas osteogênicas. Os biomateriais da hidroxiapatita são osteocondutivos, mas não intrinsecamente osteoindutivos. Estes materiais são biocompatíveis mas apresentam uma performance biofísica inadequada em termos de remodelação, resultando em migração, deiscência, ulceração e extrusão ⁴.

O osso homólogo não é um tecido imunoprivilegiado como já foi pensado. Ao contrário, tem se demonstrado a ocorrência de resposta imunológica mediada por células e reação antígeno-anticorpo ao enxerto. Os modelos animais mostram que a incorporação dos homoenxertos aumenta com a diminuição das diferenças de histocompatibilidade entre enxerto e receptor. Para o seu sucesso, por outro lado, é necessário manter os componentes orgânicos capazes de promover a osteoindução. Isto torna a escolha do processo de armazenamento e de seleção do enxerto mais complexa e representa uma área de crescente pesquisa ⁵.

No banco de ossos do Serviço de Traumatologia e Ortopedia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), os métodos de armazenamento utilizados são a congelação profunda do osso sem esterilização e a liofilização com esterilização em autoclave ¹⁰.

A congelação profunda é uma técnica simples. A maior vantagem do osso congelado é sua simplicidade de preparação e armazenamento. Tem como desvantagens a persistência de risco significativo de transmissão bacteriana e viral para o receptor e pequena alteração da antigenicidade do enxerto ^{5,10}.

A liofilização tem sido utilizada nos últimos 50 anos, tornando-se um dos métodos de preservação de osso e tecido colágeno de resultados mais satisfatórios ².

A liofilização para preservação de enxertos ósseos não afeta de forma adversa a capacidade osteoindutiva do transplante. Ela pode, entretanto, alterar significativamente a biomecânica destes enxertos se utilizados como implantes estruturais^{10,13,18}.

A tarefa de quem utiliza procedimentos de enxerto ósseo é escolher o enxerto correto para o meio biológico e mecânico onde este será colocado⁹. A opção entre o processo de armazenamento a ser utilizado deve levar em consideração aspectos práticos e econômicos com o máximo de segurança possível para os pacientes. O cirurgião é obrigado a estar familiarizado com as propriedades dos vários materiais de enxertia óssea disponíveis, sua performance, indicações, contra-indicações e risco de transmissão de doenças^{5,10}.

A congelação profunda e a liofilização apresentam resultados adequados como métodos de armazenamento, mas ainda imperfeitos.

A existência de estudos avaliando o comportamento, especificamente na cirurgia craniomaxilofacial, das diferentes formas disponíveis de ossos de banco, permitirá um maior uso destes nas cirurgias reconstrutoras e estéticas da face, seja como enxertos ou associados ao desenvolvimento da bioengenharia.

O objetivo deste experimento é comparar, em um modelo experimental de cirurgia craniomaxilofacial, o enxerto autólogo com homoenxertos processados e armazenados pelos métodos disponíveis em nosso meio, liofilização com autoclavagem e congelação profunda.

2. REVISÃO DA LITERATURA.

O procedimento que primeiro incluiu um enxerto ósseo foi descrito em 1668 por van Meekeren ¹⁹. Macewen ¹⁸, em 1880, foi o primeiro a descrever o uso do homoenxerto como forma de reconstituir o tecido ósseo. Neste procedimento ele utilizou com sucesso a tíbia de uma criança para reconstruir o úmero de um menino de quatro anos. A base científica do transplante ósseo foi estabelecida na metade do século XIX, com as observações feitas por Ollier, em 1867, sobre as propriedades osteogênicas do osso e perióstio ²⁰.

Desde 1912, quando Albee ²¹ iniciou o armazenamento de enxertos ósseos em locais refrigerados, estes têm sido fervidos, congelados ou agitados em solução anti-séptica para a sua conservação. O desenvolvimento destas técnicas progrediu até que o United States Navy Tissue Bank introduziu o homoenxerto de osso liofilizado em 1951 ¹⁰.

A publicação de Parrish, em 1966, é, sem dúvida, a contribuição clínica mais importante para o armazenamento ósseo, desde que demonstrou que os ossos armazenados em bancos e utilizados em cirurgias de substituição nos tumores ósseos foram subseqüentemente substituídos e incorporados pelo hospedeiro e que poderiam ser preservados por períodos longos ^{4,22}. Friedlander ampliou o uso do enxerto ao comprovar a influência benéfica do frio para a preservação de suas características osteogênicas ²⁰.

O Instituto de Ortopedia e Traumatologia (IOT) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), inaugurado há 43 anos, conta desde sua fundação com um banco de tecidos. Com o passar dos anos vem evoluindo junto com a evolução das técnicas de armazenamento e

enxertia óssea, e em conformidade com a legislação ²³.

Na Europa, o desenvolvimento de bancos de tecido foi lento após a II Guerra Mundial, exceto na extinta URSS. O maior e mais antigo banco de tecidos da Europa, o German Central Tissue Bank, já retirou mais de 50 000 enxertos ósseos desde 1956 ²⁴.

Na última década, uma nova categoria de retalhos denominados retalhos pré-fabricados foi desenvolvida. O enxerto ósseo implantado sobre um vaso específico é utilizado para pré-fabricar o retalho. Esta técnica é realizada por estágios, primeiro o enxerto é revascularizado e, em segundo tempo, o retalho é transferido ^{12,25}.

Os conceitos básicos da cicatrização e integração óssea foram formulados ainda no final do século XIX por Barth. Em teoria, mostrou que a remoção do osso necrótico ocorreria simultaneamente com o depósito do novo osso. Este processo chamado de “creeping substitution” foi demonstrado indiretamente em exames histopatológicos em espécimes mortos ²⁶.

A compreensão da fisiologia dos enxertos ósseos pelos conceitos introduzidos por Urist ²⁷, colaborou muito para que sua utilização proporcionasse bons resultados. Com a descoberta que os eventos celulares responsáveis pelo desenvolvimento embriológico do tecido ósseo e pela cicatrização de fraturas eram reproduzíveis seqüencialmente quando enxertos desmineralizados eram colocados no espaço subcutâneo ou submuscular em ratos, passou-se a questionar a possibilidade de existir uma participação ativa do enxerto no processo cicatricial. Demonstrou-se aí que a neoformação óssea envolvia interações entre células mesenquimais do

hospedeiro e proteínas presentes no enxerto, chamadas posteriormente de proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), levando a diferenciação destas células em osteoblastos^{27,28,29}.

As definições de enxerto ósseo e material de substituição óssea podem causar confusão. Pensa-se num enxerto ou transplante como a transferência de um tecido ou órgão contendo células que devem sobreviver sítio receptor, enquanto o implante é geralmente considerado um material não viável. Os homoenxertos são diferentes da maioria dos transplantes de órgãos sólidos, porque neles as células são removidas intencionalmente para minimizar a resposta imunológica. Desta maneira, um enxerto homólogo em que a remoção das células foi feita de maneira eficiente poderia ser definido como um implante. Hoje, alguns autores defendem que sejam definidos como material de enxertia óssea qualquer material implantado que, sozinho ou em combinação com outros materiais, promova reparação óssea. Estes materiais de enxertia óssea podem ser divididos grosseiramente em auto-enxertos, homoenxertos, xenoenxertos, materiais sintéticos ou uma combinação de todos eles²⁹.

Os enxertos autólogos são aqueles retirados e implantados no mesmo indivíduo. Embora somente uma pequena fração das células transplantadas sobreviva, elas contribuem significativamente para melhorar o processo de integração óssea. Os homoenxertos são, por definição, retirados de um indivíduo e implantados em outro da mesma espécie, portanto espera-se que provoque uma reação imunológica do receptor contra suas células. Sendo assim, os homoenxertos são preparados e processados para remover as células e reduzir esta reação imune. A remoção eficaz dos restos celulares também diminui o risco de transmissão de

partículas virais intracelulares. Na ausência de células viáveis, os enxertos homólogos não promovem osteogênese como ocorre nos auto-enxertos, e suas propriedades osteoindutivas e osteocondutivas variam dependendo do método de processamento empregado. Os xenoenxertos, que são transplantes entre espécies diferentes, produzem uma reação intensa do hospedeiro. Quando são desproteinizados e desengordurados mostram uma resposta imune reduzida, mas este processo também destrói a capacidade osteoindutiva do implante da matriz óssea e, quando comparados ao homoenxerto, são considerados menos efetivos²⁹.

O termo incorporação de um enxerto é utilizado para descrever as interações biológicas entre o material enxertado e o sítio receptor que resultam em formação óssea, levando ao estabelecimento de propriedades mecânicas adequadas²⁹.

A formação óssea é um processo complexo e altamente regulado. Normalmente ocorre em áreas de reabsorção óssea osteoclástica. As células controlam a distribuição dos elementos orgânicos e inorgânicos. Os osteoblastos, que derivam de uma linhagem celular mesenquimal osteoprogenitora, secretam e mantêm o componente orgânico da matriz óssea que é principalmente colágeno e osteóide^{3,30}. Os eventos celulares envolvidos incluem a quimiotaxia dos precursores dos osteoblastos, diferenciação e mineralização. Está claro que estes eventos devem estar sob forte controle regulador e são os fatores locais, ou citocinas, produzidos na micro-estrutura celular óssea, que regulam o recrutamento, número e atividade de osteoblastos e osteoclastos^{31,32}.

Talvez os reguladores da fisiologia óssea mais estudados sejam os fatores de crescimento, que são polipeptídios que se ligam a receptores de membrana

celular específicos para estimular ou inibir determinadas funções entre as células²⁸. Entre eles estão as proteínas morfogenéticas ósseas, ou osteogênicas, (BMP) e os fatores de crescimento “insulina-like”, muitos dos quais já foram geneticamente clonados e produzidos. Uma substância é denominada BMP se é capaz de induzir formação óssea ectópica, regulando o processo de osteoindução e osteogênese. As BMPs estão envolvidas na diferenciação das células da linhagem osteoblástica^{3,28,32,33}. Os fatores de crescimento são encontrados na matriz óssea e têm efeito significativo na formação óssea³². O fator de crescimento derivado das plaquetas é outro modulador poderoso da mitose das células ósseas. Estes fatores de crescimento ósseo poderão ter muita utilidade clínica, acelerando a consolidação de fraturas e preenchendo defeitos ósseos, com ou sem enxerto^{9,28,32}.

A enxertia óssea é um processo que sofre influência de múltiplas variáveis, modificando o padrão e a intensidade desta incorporação ou integração^{9,29}.

A presença do enxerto desencadeia uma resposta que inclui a reação inflamatória ao trauma cirúrgico e a reação imune do hospedeiro ao enxerto. Este processo promove a migração, proliferação e diferenciação celular e a revascularização, resultando na formação de um estroma fibrovascular que representa a primeira fase do complexo processo de integração^{6,19,29}. Este processo de revascularização é necessário para carrear nutrientes e células ao enxerto e os fatores que alteram a resposta inflamatória podem alterar a incorporação do enxerto, como a indometacina que mostrou retardar o início da mineralização se administrada nos primeiros 6 dias de cicatrização²⁹.

O último estágio neste processo é o período de remodelação óssea, com

características de formação e reabsorção contínua de osso ^{6,19}. Um resultado inicial satisfatório é algumas vezes seguido por uma piora pela reabsorção do enxerto ou remodelação do leito receptor ^{12,34,35}.

Estudos ^{19,31} indicam que a integração é precedida de reabsorção, o que permite a invasão vascular e osteoblástica da periferia do enxerto, ocorrendo uma gradual substituição do enxerto por osso do receptor, no processo conhecido de “creeping substitution”. Demonstrou-se *in vitro* que osteoblastos humanos liberam fatores indutores da atividade osteoclástica quando expostos ao enxerto, possivelmente estimulados por constituintes da matriz deste. Este efeito diminui após seis dias, permanecendo detectável por 3 semanas, estando presente tanto nos enxertos autólogos quanto nos homólogos, sugerindo que não há reação imunológica envolvida neste processo ³¹.

Os enxertos ósseos podem promover neoformação óssea por osteocondução, osteoindução ou osteogênese ^{3,33}. Na osteocondução, o osso serve de suporte para o crescimento, oferecendo a estrutura para o depósito ósseo. Um enxerto osteoindutivo induz a formação de tecido ósseo por um estímulo biológico, promovendo o recrutamento ativo das células mesenquimais do receptor, modulado pelas BMPs, que se diferenciarão em osteoblastos ^{3,5,6,29,33}. A osteoindução é definida como a capacidade de um material causar a formação de tecido ósseo em tecidos que de outra maneira não formariam osso ³⁶. Osteogênese é a síntese óssea por células sobreviventes do enxerto ^{3,19,29,33}. Acredita-se que estas funções, principalmente as primeiras, são importantes na seqüência de eventos histológicos envolvidos na incorporação do homoenxerto ¹⁹. De acordo com experimento que estudou em coelhos a consolidação de auto-

enxertos ósseos *in vivo*, o osso esponjoso consolida primariamente por osteogênese seguido por uma fase tardia de reabsorção ^{26,29}. Neste estudo, a revascularização iniciou 5 dias após a enxertia e com 20 dias o enxerto estava completamente vascularizado e a osteogênese, nesta fase, já era evidente. Quarenta dias após a enxertia a reabsorção teve início ²⁶.

No osso cortical a revascularização ocorreu de maneira mais lenta do que a observada no osso medular, em parte porque a densidade do osso cortical dificulta a penetração vascular ²⁹. Primeiro o enxerto passou por uma fase de reabsorção, criando cavidades no osso denso ^{26,29}. A vascularização dos enxertos completou-se com 30 dias. Esta fase foi seguida por osteogênese difusa nas áreas primeiramente revascularizadas, enquanto outras, tardiamente vascularizadas, ainda permaneciam na fase de reabsorção. Com 40 dias, a osteogênese, que nunca foi predominante, interrompeu-se e a reabsorção passou a dominar o processo. Aos 60 dias ou mais pós-enxertia, surgiu uma nova fase de osteogênese, mais intensa que a primeira. Nos ossos corticais, observou-se, mais claramente, evidências de “creeping substitution” ²⁶.

Outro experimento que comparou a revascularização do osso membranoso e osso endocondral não encontrou diferença significativa na velocidade de revascularização entre os dois tipos de enxerto, mas confirmou quantitativamente que a porção medular de ambos foi primeiramente vascularizada ^{12,37}.

Vários estudos defendem que o transplante ósseo depende primariamente da resposta fisiológica do receptor e não da preservação de células vivas ou da resposta fisiológica do enxerto. Desta maneira, uma zona receptora saudável é extremamente importante para o sucesso da enxertia óssea ^{29,34,38,39,40,41}. Os

autores enfatizam que dois são os fatores essenciais que afetam o grau de integração ou reabsorção do enxerto: a vascularização do leito receptor e a existência dos precursores das células endoteliais e do tecido conjuntivo. As situações onde ocorre deficiência destas células precursoras em uma zona receptora incluem extensas cicatrizes no leito receptor, déficit vascular, defeitos ósseos maiores, hospedeiros imunodeprimidos, infecção ou radioterapia prévia. Pacientes que estejam utilizando agentes farmacológicos, como a nicotina, também podem apresentar o nível de células precursoras comprometido ²⁹.

Os enxertos variam da quase autonomia dos enxertos vascularizados até a profunda dependência do meio receptor de um homoenxerto congelado. Quanto menos ativo biologicamente e mais dependente do meio for o enxerto, melhores condições deverá ter o leito receptor, e vice-e-versa ^{9,29}. Observa-se que tanto a reabsorção quanto a neoformação óssea não ocorrem antes da revascularização do enxerto ³⁴. Não interessa se proveniente do enxerto ou do receptor, a neoformação óssea ocorrerá de modo muito discreto sem vascularização abundante. A vascularização e a neoformação óssea são imprescindíveis à integração óssea. A correlação entre neoformação de tecido ósseo, vascularização e o efeito da sua ausência é ilustrada pela ocorrência de fraturas em enxertos vários anos após sua implantação, onde a biópsia do foco da fratura revelou o déficit vascular ⁹.

Especula-se que uma lenta revascularização do enxerto poderia diminuir sua reabsorção ³⁴, porém estudo *in vivo* mostrou que esta pode iniciar em parte do enxerto mesmo antes deste estar revascularizado ²⁶. A rápida revascularização do homoenxerto pode ser prejudicial, uma vez que células do sistema imunológico do

receptor invadem o enxerto e disparam a resposta imune, o que não ocorre nos auto-enxertos, apesar destes também serem rapidamente revascularizado ⁴².

A calota craniana do receptor, por sua rica vascularização, seria mais vulnerável à pressão e, conseqüentemente, à remodelação. Dessa forma, as alterações no leito receptor podem ser as responsáveis pela perda de contorno do esqueleto após transplantes ósseos em muitos casos ^{12,34,35}.

O perióstio tem atividade osteogênica no jovem, diminuindo na fase adulta, e esta atividade parece também ser dependente da origem do osso implantado, endocondral ou mesenquimal ^{34,36}. Já foi demonstrado que o perióstio apresenta população de células mesenquimais osteoprogenitoras, e culturas destas células foram utilizadas com sucesso no reparo de defeitos na calota craniana de coelhos. Neste estudo ⁴³, o osso neoformado foi membranoso. A dissecção subperiosteal para colocação de placas de osteossíntese e implantes é muito empregada nos procedimentos ortopédicos, no entanto este tecido deve ser preservado e reaproximado para aumentar o processo de cicatrização ³. Especula-se que o perióstio não produz muita pressão sobre o enxerto e o mantém livre da ação muscular intermitente que poderia afetar negativamente a integração e absorção do enxerto ³⁴. A colocação trans-periosteal, embora teoricamente mantenha a continuidade do perióstio, tem a desvantagem da necrose periosteal subsequente à compressão, causando micro-movimentos do enxerto ^{1,3,38}.

Um dos principais fatores para que ocorra fusão do osso receptor e enxerto é a estabilidade do contato entre os dois ^{9,29}. Se o enxerto não permanece fixo ou não se consegue uma estabilidade adequada, o tecido de granulação e a fibrose se

desenvolverão na interface entre enxerto e hospedeiro, prejudicando a sua integração²⁹. Não se observa falha na proliferação vascular ao redor do enxerto que está estável e, caso este esteja menos estável, quase nenhuma fusão será observada⁹. A fixação parece contribuir para a manutenção do volume do enxerto por limitar a velocidade de revascularização do enxerto. Esta fixação ao contrário de facilitar a revascularização óssea, pode reduzi-la por eliminar o espaço entre o enxerto e o leito receptor, diminuindo a neovascularização interóssea³⁷. Uma vez aderido ao leito receptor, o tipo de fixação não seria de maior importância³⁴.

Baseado na origem embriológica, o tecido ósseo é classificado como endocondral ou membranoso (mesenquimal). O osso endocondral se forma a partir da cartilagem hialina. Os ossos do esqueleto axial são deste tipo. O osso membranoso se desenvolve das membranas mesenquimais sem intervenção de cartilagem. A calota craniana, o esqueleto facial e grande parte da mandíbula são de origem mesenquimal. Em contraste com os enxertos endocondrais, a reabsorção é muito menos freqüente nestes últimos^{1,3,35,37}. Em experimento em coelhos, os enxertos de origem membranosa obtiveram maior manutenção de seu volume e peso em todos os grupos estudados quando comparados ao osso endocondral¹. A diferença de arquitetura entre os dois tipos de enxerto explicaria este comportamento diferenciado. Alguns autores afirmam que a proporção entre cortical e medular é a responsável pelo comportamento dos enxertos, não interessando o sítio de origem^{12,37}. Estudo demonstra que a vascularização precoce está associada a um aumento da atividade osteoclástica, ambos ocorrendo predominantemente no osso medular³⁷. No osso membranoso, como a cortical ocupa uma fração maior do osso e é menos sujeita à reabsorção, o seu

volume original se manteria ^{1,12,44}. É consenso que os enxertos ósseos cranianos devem ser a primeira escolha nas reconstruções faciais ^{1,12,17,35,37,44}.

Em geral, os eventos que envolvem a incorporação dos homoenxertos são qualitativamente semelhantes aos que ocorrem na incorporação dos auto-enxertos, mas ocorrem mais lentamente e são acompanhados de uma quantidade variável de reação inflamatória que pode ser atribuída a uma resposta imunológica do hospedeiro ²⁹.

O tecido ósseo é uma complexa combinação de colágeno orgânico e sais inorgânicos, sendo que a matéria orgânica é responsável por aproximadamente 35% do tecido e os minerais pelos 65% restantes. O principal componente da matriz óssea é a hidroxiapatita e o componente orgânico mais abundante é o colágeno tipo I ^{3,30,34}.

O tecido ósseo é imunogênico e os elementos celulares são os maiores responsáveis pelos problemas de histocompatibilidade. Os antígenos do tecido ósseo não diferem dos de outros tecidos, e neste caso estão associados às células nucleadas da medula óssea ^{29,45}. Os antígenos mais comumente associados com transplantes de órgãos são os antígenos HLA classe I e II relacionados às células do enxerto. Eles estimulam anticorpos celulares que destroem as células proliferativas e a matriz, enquanto o componente inorgânico não produz resposta imunológica ^{5,29,30,45}. Apesar disto, em alguns experimentos, a remoção das células da medula óssea não eliminou a resposta imunológica mediada pelos linfócitos T. A melhor preparação de implante homólogo procura eliminar a antigenicidade do tecido ósseo. Quanto mais celular o osso, maior sua antigenicidade e por esta razão o osso esponjoso é raramente empregado como

enxerto congelado sem eliminação do conteúdo celular. Na cirurgia craniomaxilofacial, o osso cortical é preferido pela sua alta proporção de colágeno, que tem baixa atividade antigênica. Vários estudos experimentais mostram uma integração satisfatória dos homoenxertos quando as diferenças de histocompatibilidade são minimizadas por provas cruzadas entre doador e receptor ou pelos métodos de armazenamento aplicados ao enxerto ^{5,29,30,38,45}. Os achados de que a revascularização precoce dos enxertos homólogos pode levar a um processo de rejeição como ocorre nos transplantes renais e cardíacos, apontam ainda mais para a necessidade de um cruzamento entre enxerto e receptor como estratégia para melhorar os resultados. Além disto, a rápida rejeição dos homoenxertos em receptores pré-sensibilizados salienta a importância de uma história clínica cuidadosa, procurando por passado de outros transplantes ^{29,42}.

Alguns autores ⁷ defendem que a antigenicidade de um homoenxerto é o maior determinante da sua revascularização. Quando são comparados aos enxertos autólogos, um déficit vascular tem sido relatado. O endotélio vascular e os osteoblastos são os alvos primários da resposta imune que ocorre nestes enxertos ⁴².

Em um estudo clássico publicado em 1963, Burwell ⁴⁶ estudou a capacidade de tecidos ósseos homólogos estimularem imunidade entre doador e receptor. Para isto comparou o tempo de rejeição de um homoenxerto de pele em ratos que haviam recebido homoenxertos ósseos do mesmo doador. O tempo foi de 8,1 dias no controle. Os resultados mostraram uma rejeição mais precoce nos que haviam recebido enxertos frescos. O tempo se aproximava do normal quando a

medula óssea era removida, confirmando a maior antigenicidade celular. Os ossos processados por fervura ou congelamento apresentaram tempos de rejeição normais. A liofilização aumentou o tempo de rejeição dos enxertos de pele.

A possibilidade do desenvolvimento de anticorpos Rhesus após enxertos homólogos deve ser considerada. Existem relatos de casos de imunização Rh em mulheres submetidas a homoenxertia óssea^{2,24}.

O uso dos enxertos autólogos, além de promover neoformação óssea por osteogênese, osteoindução e osteocondução, elimina o risco de reações imunológicas, mas, quando a morbidade é considerada, oferece menos vantagens sobre os enxertos homólogos²⁹.

O osso homólogo fresco tem encontrado pouca utilização clínica, devido ao tempo necessário para a avaliação do doador e à sua maior antigenicidade⁵.

A congelação profunda é uma técnica simples. O osso é retirado estéril e processado por congelamento em temperaturas que oscilam de -20°C até -170°C^{5,24}. Temperaturas menores que -70°C são geralmente recomendadas para o armazenamento até 5 anos, porém são baseadas em conhecimentos empíricos de sucesso^{31,47}. A maior vantagem do osso congelado é sua simplicidade de preparação e armazenamento. Requer poucos recursos físicos (somente um freezer de congelação profunda). Diminui, mas não elimina a antigenicidade e o risco de transmissão de doenças do enxerto. O congelamento não inativa muitos vírus e bactérias, principalmente esporos^{5,10,48}.

O homoenxerto congelado tem as mesmas qualidades de manuseio que o osso

fresco^{2,5}, porém uma vez descongelados e não utilizados devem ser descartados, pois os repetidos congelamentos enfraquecem a estrutura óssea e aumentam o risco de contaminação⁴⁷.

Autores relatam que os enxertos homólogos congelados são lentamente incorporados ao sítio receptor⁴⁵.

O efeito modulador das células osteoblásticas humanas é mantido após 6 meses quando congelado e armazenado a uma temperatura de -80°C. Enxertos armazenados a -20°C perdem este efeito neste período, embora ele esteja presente com 2 semanas de congelamento^{26,48}. Alguns autores defendem a técnica de congelamento lento a -20°C por 8 horas e o armazenamento a -80°C, pois evitaria a formação de cristais na membrana ou intracelulares²⁴.

O osso fresco ou congelado produz resposta imunológica. Estudos em animais têm demonstrado que a integração destes enxertos é influenciada por reações imunes mediadas pelos linfócitos T^{5,29,45}. Em um estudo⁵ realizado em cães a imunossupressão demonstrou um aumento da resistência e da qualidade da integração dos homoenxertos, melhorando o resultado final. Outro experimento⁴⁵ não conseguiu reproduzir estes resultados. Alguns autores⁹ afirmam que, se o enxerto está estável, uma demora ou falha na penetração das células precursoras deve ser atribuída a disparidades de histocompatibilidade entre doador e receptor.

Os homoenxertos congelados não contêm células vivas, e sua incorporação depende da sua capacidade osteocondutiva e osteoindutiva. Muitos trabalhos mostram que o congelamento pode realmente diminuir a antigenicidade do homoenxerto^{5,45,48}. Experimento com ratos demonstrou que o auto-enxerto

cortical fresco está plenamente revascularizado em 4 semanas. Quando é submetido à congelação profunda ele não é completamente revascularizado até 4 meses após a cirurgia. Um período semelhante encontrou-se nos homoenxertos que apresentavam incompatibilidade aos fatores menores de histocompatibilidade, entretanto, os enxertos com incompatibilidade aos fatores maiores de histocompatibilidade não foram completamente revascularizados mesmo após os quatro meses de observação⁹.

Para alguns cirurgiões a antigenicidade da medula óssea não parece ser problema nos homoenxertos congelados não-vascularizados. Outros removem-na rotineiramente na mesa de cirurgia. Esta remoção é incompleta e não parece ser significativa na diminuição dos fatores de rejeição⁵.

A extração efetiva da gordura melhora a integração do homoenxerto congelado. Este efeito parece ser consequência de uma diminuição da resposta imunológica provocada, uma vez que o desengorduramento não alterou a incorporação dos enxertos autólogos. A remoção da gordura não alterou as propriedades biomecânicas do osso⁴⁹.

Alguns autores consideram a congelação profunda compatível com a criopreservação de cartilagem, ao contrário da liofilização. Para isto é necessária a imersão da cartilagem em glicerol ou dimetil-sulfóxido antes do congelamento. Estes agentes preservariam até 40% dos condrócitos em um estado funcional^{19,22}. Outros autores afirmam que este processo não previne a degeneração tardia da cartilagem nos homoenxertos²⁴.

A publicação da experiência inicial da Escola Paulista de Medicina com enxerto

homólogo congelado, em 1992, apresentou um índice de 87% de resultados excelentes ou bons. Estes resultados iniciais no nosso meio são encorajadores, embora os autores alertem para a necessidade de tempo para a confirmação destes resultados ²².

A liofilização (desidratação a frio) tem sido utilizada nos últimos 50 anos, tornando-se um dos métodos de preservação de osso e tecido colágeno de resultados mais satisfatórios ².

A liofilização requer um processo complexo e só está disponível nos centros com maior avanço tecnológico ^{4,8,50}. A técnica consiste no resfriamento a -70°C do osso previamente desengordurado. Após o material é colocado em um liofilizador. Este aparelho forma um vácuo enquanto a temperatura é mantida a -40°C , retirando até 95% da água ^{6,12}. A realização desse procedimento necessita de um liofilizador a frio, uma centrífuga para grandes volumes, um agitador, espaço físico apropriado e os reagentes químicos, o que aumenta os investimentos iniciais ². Suas vantagens são a diminuição marcada da antigenicidade do homoenxerto, o menor risco de transmissão de doenças, a praticidade do armazenamento e manuseio trans-operatório do enxerto e a mínima alteração bioquímica. Após a liofilização o tecido pode ser armazenado a temperatura ambiente por longos períodos e transportado facilmente ^{2,10,13,47,51}.

O uso corrente dos homoenxertos liofilizados e desmineralizados nas cirurgias ortopédicas e maxilofaciais baseia-se na sua capacidade osteoindutiva. Sua habilidade em induzir neoformação óssea quando implantado em sítio heterotópico está relacionada à presença e difusão das BMPs presente na matriz óssea ^{36,52}.

Os ossos liofilizados mineralizados em modelos animais não se mostraram osteoindutivos quando implantados heterotopicamente em ratos. Quando implantados ortotopicamente atuaram apenas como matriz osteocondutiva ⁵². Apesar destas observações alguns trabalhos descrevem os homoenxertos mineralizados como osteoindutivos. Esta suposição é reforçada pelo fato de ter-se isolado fatores de crescimento, incluindo as BMPs que são sabidamente osteoindutivas, destes enxertos, tanto de ossos de origem endocondral como mesenquimal ⁵³. Acredita-se que estes fatores são liberados durante o processo de reabsorção osteoclástica do implante ³⁶.

Experimento realizado em coelhos concluiu que microperfurações artificialmente produzidas no enxerto cortical liofilizado desmineralizado melhoram a integração destes. Estas microperfurações atuam como centros de osteoindução, produzindo uma substituição óssea centrífuga e mais rápida ^{54,55,56}. Estes resultados não foram reprodutíveis nos enxertos mineralizados ⁵⁴.

A liofilização mostra efeitos similares aos do desengorduramento na incorporação dos enxertos, mas pode-se detectar uma resposta imune com exames mais sensíveis, mesmo que em um nível bem menor ^{5,49,57}. Mesmo assim, a incorporação do osso liofilizado parece ser superior a do congelado ^{2,49}.

A liofilização pode alterar significativamente a biomecânica dos enxertos se utilizados como implantes estruturais. Estudos realizados sugerem que a força de torção e a elasticidade diminuem com o processo. Outros autores relatam que a liofilização aumenta a rigidez e a resistência à compressão do enxerto ^{18,51}. Embora tenha se especulado que a reidratação poderia restaurar as propriedades ósseas alteradas, um experimento que procurou controlar as outras variáveis,

mostrou um efeito deletério da reidratação sobre a força do enxerto. Segundo estes autores, o efeito da reidratação após a liofilização parece ter significância biomecânica e necessita mais investigações ¹³. Em estudos desenvolvidos com a colaboração do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, não encontrou-se diferenças significativas entre os enxertos liofilizados reidratados e congelados em relação à compressão e ao fator de deformação. O tempo de reidratação do enxerto liofilizado mostrou não desempenhar um papel significativo, sugerindo a não necessidade de reidratação antes do ato cirúrgico ^{10,51}. Outros autores relatam que o processamento pode, inclusive, aumentar a resistência mecânica do osso processado ²⁰.

Os homoenxertos ósseos liofilizados têm uma trajetória de 20 anos de segurança e eficácia no uso odontológico. Relatos de casos e ensaios clínicos têm mostrado o potencial do homoenxerto liofilizado em reconstruir defeitos causados pela periodontite, promovendo a regeneração óssea. Resultados de longo prazo mostram que a técnica de crescimento ósseo guiado é mais eficaz quando associada a estes enxertos, principalmente nos defeitos ósseos maiores ⁵⁷.

Autores relatam um índice de sucesso de até 92% com o uso de enxerto liofilizado, porém existe a publicação de uma série com resultados insatisfatórios, com 75% de insucesso e complicações ^{8,58}.

Os enxertos liofilizados oferecem a vantagem do armazenamento mais simples e barato, facilitando seu uso e maximizando seu potencial de benefício para o paciente. Eles são uma fonte efetiva de material osteocondutivo e osteoindutivo, mas o seu papel como implante estrutural deve ser mais bem investigado ¹³.

Em qualquer transplante de tecido de um indivíduo para outro existe o risco de transmissão coincidente de doenças infecciosas ^{5,48,59}. A transferência de células neoplásicas é um risco teórico nos transplantes ósseos, embora nenhum caso tenha sido relatado ^{2,60}.

Numa análise histológica de 1146 cabeças de fêmur consideradas adequadas para a doação, encontrou-se 8% de incidência de doenças ósseas. Três pacientes tinham tumores ósseos malignos não diagnosticados. Como não se conhece com certeza o efeito dos métodos de processamento sobre estas células, estes autores recomendam a realização de rotina de exames histológicos ou radiológicos dos ossos aceitos para homoenxertia ⁶¹.

A maioria dos cirurgiões concorda que uma história de infecção local é uma contra-indicação relativa e uma infecção ativa é uma contra-indicação absoluta ao uso de enxertos ¹⁸.

Os índices de contaminação de homoenxertos ósseos variam de 5 a 40%, dependendo da técnica de obtenção, preservação e do controle bacteriológico. Sob condições ideais, uma taxa global de infecção de 1 a 15% tem sido relatada nas publicações da experiência na utilização de enxertos congelados ^{1,7,18,19,24,38,47,59}. A infecção é responsável por mais de 40% das falhas na homoenxertia ³⁹. Estima-se que este índice deve ser aproximadamente o dobro do que ocorre nos transplantes autólogos ². Bactérias patogênicas são encontradas no sangue ou osso removidos de doadores cadáveres 12 a 24 horas após a morte. A correlação entre hemocultura positiva e cultura óssea positiva é fraca, entretanto a presença de bactéria patogênica em um único fragmento ósseo removido implica na inutilização de todos os ossos do doador quando não se

emprega um processo de esterilização secundária^{24,47,48}. A retirada de tecidos de pacientes em morte cerebral diminui o risco desta contaminação pós-morte porque ficam diminuídas as possibilidades de desenvolvimento de microorganismos. Isto chama a atenção para a necessidade da equipe do banco de ossos atuar em sincronia com outras equipes de transplante⁴⁷.

O risco de transmissão viral depende principalmente da prevalência da infecção e das medidas tomadas para excluir o material destes doadores^{1,24,62}. O vírus da hepatite B (HBV) pode sobreviver ao congelamento e o índice de infecção após transplante de osso de banco pode ser tão alto quanto 45%. O vírus da imunodeficiência humana (HIV) tem sido transmitido a pacientes receptores de rins, coração e fígado. Também é relatada a transmissão de HIV em enxertos de pele e osso^{1,24,63}. Nos casos dos homoenxertos ósseos, todos eram congelados. Demonstrou-se em experimento animal que duas semanas após receberem enxertos congelados contaminados com HIV os receptores estavam infectados⁶². Baseado no contexto norte-americano, calcula-se que o risco de transmissão em homoenxertos de doadores mortos, quando nenhum exame é feito, pode chegar a 6%. Quando existe uma investigação médica e social e os testes anti-HIV são realizados, o risco é de 0,09% no máximo². No nosso meio, a taxa de rejeição de doadores de ossos por sorologia positiva foi de 10%, sendo a hepatite B a causa mais freqüente⁶³.

A seleção dos doadores é importante para a segurança do banco de tecidos e para o sucesso do transplante^{1,48,60,63}. A Associação Americana de Banco de Tecidos (AATB) exclui sistematicamente doadores com infecção sistêmica ativa, infecção envolvendo o tecido desejado, hepatite ativa ou passada, história de

icterícia de causa desconhecida, doenças malignas que não o carcinoma basocelular, o carcinoma *in situ* do útero ou os tumores intracranianos, doenças ósseas metabólicas, doença difusa do tecido conjuntivo, doenças de causas desconhecidas, incluindo as neurológicas e reumatológicas, abuso de drogas parenterais, ingestão de substâncias tóxicas, e morte de causa desconhecida^{1,7,24}. O banco de tecidos do IOT-HCFMUSP exclui também os portadores de patologias ortopédicas tais como osteoporose, osteonecrose e artrite reumatóide²³. Seguindo as normas da AATB, tecidos de doadores vivos devem permanecer em quarentena por 90 dias e então re-testados para infecção por HIV^{1,60}. Em países com uma baixa prevalência de doenças transfusionais, este tempo pode ser reduzido para 2 meses. Com esta abordagem, calcula-se uma redução do risco de transmissão do HIV em 7 vezes e estima-se que infecções por HBV e pelo vírus da hepatite C (HCV) irão ocorrer nos receptores de enxertos ósseos a cada 100 e 200 anos, respectivamente⁶⁰. O re-teste pode ser substituído pela pesquisa do ácido ribonucleico (RNA) viral por reação em cadeia da polimerase (PCR) ou do antígeno p24. Estes testes reduzem a janela viral pela metade^{60,64}. Tecidos de doadores cadáveres não disponíveis para re-teste são necessariamente submetidos à pesquisa viral por PCR para HIV, HBV e HCV⁶³.

Por outro lado, alguns autores estimam que cerca de 3/10000 pacientes submetidos à revisão de prótese de quadril morrem de alguma infecção relacionada ao enxerto, um risco 1000 vezes maior do que o de adquirir o HIV (3/10.000.000), mesmo quando não há re-teste. Dessa forma, defendem que os recursos consumidos para o re-teste do HIV salvariam mais vidas se empregados para minimizar os riscos de contaminação bacteriana²⁴.

Em pacientes provenientes de zonas endêmicas de Doença de Chagas, como várias regiões do Brasil, a pesquisa do *Trypanossoma cruzi* deve ser feita ^{23,63}.

Baseados em estudos que demonstraram uma diminuição da capacidade osteoindutiva dos transplantes ósseos dependente da idade do doador, vários bancos de tecidos descartam doadores acima de 55 anos ^{23,36}.

Quando o cirurgião está seguro que o banco de osso que utiliza executa os procedimentos adequados na seleção de doadores, o próximo passo é pensar na melhor maneira de conseguir um enxerto ósseo estéril ^{5,48}. O primeiro método é retirar e processar o tecido de modo estéril. A segunda maneira envolve a esterilização do enxerto no processo final, ou logo antes de utilizá-lo. Cada método tem suas vantagens e desvantagens ^{5,48}.

Os tecidos do doador são normalmente removidos sob condições de assepsia ². Retirar o osso de maneira estéril requer um ambiente estéril no mesmo nível do encontrado em uma sala cirúrgica. As bactérias da pele do doador são os agentes mais comuns de contaminação ^{2,5}. O *Stafilococos epidermidis* é o mais comum, responsável por 51% dos casos ²⁴. Em uma casuística brasileira, do estado de São Paulo, o índice de rejeição por cultura positiva foi de 5,8 %, sendo o *Enterobacter aerogenes* o de maior incidência ⁶³. No doador cadáver, o enxerto deve ser retirado nas primeiras 24 horas da sua morte. O tecido retirado deve ser monitorizado por cultura durante o período de processamento. Este é o método utilizado pela maioria dos bancos ^{2,24}. Centros de excelência registram, por testes de seleção alterados ou erros técnicos, um índice de 24% de descarte de ossos processados por congelamento profunda ²⁴.

Em contraste com os demais órgãos, os tecidos colágenos e ósseos homólogos são preferencialmente não-viáveis no momento do transplante, e os métodos de armazenamento e esterilização destes enxertos não dependem da preservação das células. Mesmo considerando as medidas de seleção dos doadores, o risco de agentes infecciosos estarem presentes no tecido obtido não pode ser negligenciado e um método factível e seguro para uma esterilização secundária sem danos ao tecido certamente deve ser procurado ².

As propriedades osteoindutivas dos enxertos podem ser afetadas pelos vários métodos de esterilização. Fatores como custo e segurança relacionados aos implantes ósseos processados levam a procura de novas alternativas biologicamente benignas para a esterilização. O procedimento ideal para esterilizar os homoenxertos deveria ser efetivo contra uma grande variedade de microorganismos infecciosos e também preservar as propriedades mecânicas e biológicas do tecido ⁶⁴.

A esterilização secundária do osso pode ser feita pela utilização de produtos químicos ou pela radiação gama ^{2,5,60,64,65,66}. Os vírus são geralmente mais radorresistentes que as bactérias, porém não existe um consenso sobre a sensibilidade do HIV à radiação ionizante ². A radiação gama destrói o HIV em culturas líquidas experimentais. Em estudos subseqüentes, quando o HIV foi irradiado em uma simulação de osso congelado, a quantidade de radiação necessária para a esterilização foi maior do que a previamente recomendada ^{5,60,67}.

Sabe-se que altas doses de radiação gama modificam a biomecânica óssea e podem diminuir o potencial osteoindutivo do enxerto ^{2,5,41,57,61,65,67,68}. As

propriedades mecânicas do osso irradiado são afetadas pelas alterações na molécula do colágeno e pela inativação das BMPs^{2,7,66}. Alguns estudos indicam que o efeito destrutivo da radiação é mais pronunciado no osso liofilizado enquanto pequenas alterações ocorrem no osso congelado em doses moderadas^{2,67}. Os experimentos que estudaram os efeitos da radiação em baixas doses, não mostraram diferenças entre os grupos, irradiados ou não, numa avaliação após os 6 meses⁷. A irradiação do osso cortical em congelação profunda parece dar proteção parcial contra a fragilização comparada com a irradiação em temperatura ambiente^{7,67}, tendo sido demonstrado em ratos que baixas temperaturas durante a irradiação podem proteger as propriedades osteoindutivas do enxerto, provavelmente por reduzir o dano à matriz⁶⁷. A irradiação de um osso osteoindutivo resulta numa pequena matriz residual que induz uma igualmente pequena quantidade de neoformação óssea⁶⁹.

Recentes estudos^{66,67} demonstram que uma dose de pelo menos 25 kGy a uma temperatura de -70°C é necessária para a completa inativação do HIV. Um destes experimentos⁶⁶ encontrou que esta dose é equivalente a doses mais baixas a 15°C . Mesmo que a dose de irradiação para inativação do HIV a temperatura ambiente ainda não esteja determinada, sua eficácia em eliminar o vírus provavelmente é proporcional ao seu efeito destrutivo no colágeno.

A irradiação pós-operatória de reconstruções mandibulares com enxertos ósseos em cães não mostrou falhas na integração dos transplantes, sugerindo que esta é uma boa opção em pacientes que necessitem ressecções radicais e radioterapia no seu tratamento, evitando as dificuldades causadas pela radioterapia pré-operatória⁴¹. A irradiação imediatamente após a cirurgia demonstrou inibir a

revascularização do enxerto ⁹.

Experimentos animais indicam que, apesar da irradiação de enxertos ósseos ser destrutiva para a capacidade osteoindutiva em altas doses, ela pode melhorar a integração do homoenxerto em baixas doses, aparentemente devido à redução da antigenicidade do transplante ^{2,7}. O congelamento e a irradiação não se mostraram efetivos em melhorar a vascularização dos enxertos, embora se saiba que o padrão de revascularização do enxerto está relacionado a sua antigenicidade ⁷. Alguns autores salientam a importância do desengorduramento nos enxertos submetidos à radiação gama ou ultravioleta com a finalidade de evitar a liberação de componentes tóxicos para as células precursoras dos osteoblastos ⁷⁰.

Vários produtos químicos têm sido empregados para esterilizar osso, mas o mais utilizado é o óxido de etileno. Estudo experimental demonstrou a toxicidade do óxido de etileno em tecidos humanos e existem relatos na literatura da presença de seus resíduos em enxertos que não integraram ^{5,71,72}. A seqüência do processo se mostrou importante para diminuir a concentração de resíduo, indicando que quando a liofilização é realizada antes da esterilização com gás, o resíduo é menor ^{69,71,72,73}. Estes mesmos estudos encontraram que mesmo pequenas concentrações de óxido de etileno afetam o crescimento de fibroblastos ^{70,71}. O gás de óxido de etileno é muito lipófilo e hidrossolúvel e a diferença na concentração residual do gás é proporcional ao desengorduramento e desidratação do osso ^{69,71,72,73}. Outro fator que interferiu com a osteoindução do enxerto em estudo experimental foi a temperatura em que os implantes são expostos ao gás, que quanto mais baixa, menor será o efeito negativo ⁶⁶. Alguns

estudos concluem que se o processo é realizado de maneira adequada, este risco é desprezível^{5,69,73}. Este achado não se confirmou em outros trabalhos, onde os autores mostram que mesmo com concentrações residuais bem inferiores as recomendadas, o efeito deletério na integração do enxerto permanece. Uma possível explicação para esta redução na incorporação do enxerto nestes experimentos pode ser a alquilação de aminoácidos induzida pelo óxido de etileno⁷².

O óxido de etileno mostrou-se um importante agente esterilizador que pode inativar o HIV e os esporos mais resistentes e tem sido largamente utilizado para esterilização de ossos liofilizados, porém taxas inaceitáveis de falhas clínicas e complicações têm sido publicadas^{2,5}.

A esterilização com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma técnica relativamente nova de esterilização de materiais sintéticos. Atua pela exposição dos agentes infecciosos a radicais livres derivados do oxigênio, que são gerados pela estimulação elétrica do H_2O_2 . Suas vantagens são os baixos custos operacionais, ausência de resíduos tóxicos e um ciclo de esterilização rápido⁶⁴. Este método está sendo amplamente utilizado no HCPA para esterilização de materiais cirúrgicos. O emprego do H_2O_2 na esterilização de tecidos ósseos vem sendo recentemente pesquisado e o custo envolvido na produção de homoenxertos e seus derivados podem ser substancialmente reduzidos com a sua utilização⁶⁴. Autores relatam que ela parece não ter efeito sobre a biomecânica do enxerto e tem se mostrado efetiva contra vários tipos de vírus, inclusive o HIV em estudos *in vitro*. Entretanto, estudo recente indica que a esterilização com H_2O_2 tem efeitos negativos sobre a capacidade de osteoindução da matriz óssea⁶⁴.

Quando os processos de esterilização com radiação, óxido de etileno e H₂O₂ foram comparados, demonstrou-se que a desnaturação protéica causada pela radiação e H₂O₂ tem menor efeito sobre o crescimento ósseo que o produzido pelo óxido de etileno ⁷².

O calor coagula as proteínas e, em temperaturas superiores a 60°C, as BMPs são destruídas, o que resulta em redução da resposta osteogênica ^{2,44}. A quase totalidade dos vírus pode ser inativada pelo aquecimento à 60°C por 10 horas, em particular agentes como o HIV e o HCV, que são completamente inativados, e o HBV, que é inativado a um nível de 1/1000 ⁶⁸. Em meio líquido o HIV é inativado em poucos minutos, mas no osso liofilizado a inativação pode levar horas ^{2,5}. O calor também foi relacionado à redução da força do enxerto, mas este achado não é significativo para algumas cirurgias craniomaxilofaciais ^{44,68}. Em outro estudo, a estrutura do colágeno permaneceu inalterada após autoclavagem a 100°C por 30 minutos em ossos mineralizados ². No Japão, espera-se que a autoclavagem venha a se tornar o método padrão para esterilização secundária, conforme recomendação da Associação Ortopédica Japonesa. No momento, já existem disponíveis autoclaves que esterilizam a 80°C por 10 minutos. Embora caros, os Bancos de Ossos Japoneses acreditam que a segurança dos enxertos ósseos aumentará significativamente quando utilizados largamente ⁶⁸.

No banco de ossos do Serviço de Traumatologia e Ortopedia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), os métodos de armazenamento utilizados são a congelação profunda do osso sem esterilização e a liofilização com esterilização com autoclave. O doador é pesquisado quanto a grupos de risco e submetido aos seguintes exames: anti-HIV, anti-HCV, anti-HBc, HBsAg, HIV PCR, HCV PCR,

VDRL. Também são feitos testes imuno-hematológicos para os grupos ABO e Rh.

A congelação profunda e a liofilização são métodos satisfatórios de armazenamento, mas o objetivo dos pesquisadores deve ser desenvolver estratégias terapêuticas que promovam uma reconstrução mecanicamente competente e com segurança para os pacientes ⁷⁴.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo é comparar a capacidade de integração dos enxertos de osso de origem membranosa autólogos, homólogos congelados e homólogos liofilizados num modelo de cranioplastia em ratos.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Verificar se o homoenxerto ósseo liofilizado tem capacidade de integração superior ao enxerto congelado, aproximando-se dos resultados obtidos com o auto-enxerto.

4. MATERIAL E MÉTODOS.

Este estudo foi realizado na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Participaram deste projeto os Serviços de Cirurgia Plástica, Ortopedia e Traumatologia do HCPA, através da Unidade de Cirurgia Craniomaxilofacial e do Banco de Ossos, respectivamente, e o Departamento de Patologia da FAMED da UFRGS.

4.1 Grupos de pesquisa

Foram utilizados 37 ratos adultos da raça Wistar com peso entre 350 e 400g.

4.1.1 Grupo doador: sete animais foram os doadores primários de enxertos ósseos para o estudo. Foram submetidos a uma craniectomia para remoção de fragmento de calota craniana medindo 0,8 x 1,0 cm. Estes animais foram submetidos à eutanásia após o procedimento.

Os 30 animais restantes foram divididos em 3 grupos com 10 ratos cada, assim denominados:

4.1.2 Grupo 1: cada animal foi submetido a uma craniectomia semelhante as do grupo doador e recebeu um fragmento de osso homólogo congelado sobre o defeito criado cirurgicamente.

4.1.3 Grupo 2: cada animal recebeu um fragmento de osso homólogo liofilizado sobre o defeito criado.

4.1.4 Grupo 3: estes animais tiveram fragmentos de sua calota craniana removidas como as do grupo doador, porém o fragmento foi recolocado no local de origem após sua retirada.

Todos os fragmentos ósseos retirados dos grupo 1 e 2 eram processados e utilizados para enxertia nos animais operados subseqüentemente.

4.2 Preparo dos enxertos ósseos

Os fragmentos de calota removidos do grupo doador e dos grupos 1 e 2 foram encaminhados para o banco de ossos do Serviço de Ortopedia do HCPA.

Cada fragmento ósseo foi limpo de todo tecido adjacente.

Os enxertos ósseos foram processados e armazenados de forma randomizada por congelação profunda ou liofilização.

4.2.1 *Enxerto homólogo congelado*

Metade dos fragmentos ósseos preparados foi armazenada pelo método de congelação profunda (-80°C) sem esterilização de acordo com o protocolo do banco de ossos do Serviço de Ortopedia e Traumatologia do HCPA. Cada fragmento acondicionado em duplo frasco estéril, e mantido em freezer especial a -80°C.

Duas horas antes da utilização, os enxertos eram colocados em solução de cefalotina e soro fisiológico com 50mg/ml.

4.2.2 *Enxerto homólogo liofilizado*

A segunda metade dos fragmentos ósseos foi armazenada pelo processo de liofilização seguindo, igualmente, o protocolo do banco de ossos do Serviço de Ortopedia e Traumatologia do HCPA. O processo de preparação foi o seguinte:

- imersão por 1 hora em solução de hipoclorito de sódio a 0,5 %;

- lavagem em água filtrada a 4 °C;
- centrifugação a 2500 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos;
- desengorduramento em temperatura ambiente em uma solução de clorofórmio e metanol na diluição de 1:1. Durante este processo, a mistura de clorofórmio e metanol será continuamente agitada e trocada nas primeiras horas, e depois a cada hora de acordo com a sua coloração, permanecendo nesta mistura por 48 horas;
- centrifugação a 2500 rpm durante 10 minutos;
- aeração em contato direto com o meio ambiente por 24 horas para evaporação do metanol e do clorofórmio;
- lavagem e agitação em água filtrada a 4°C por 24 horas;
- centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos;
- liofilização a frio (-40°C) durante 7 dias;
- empacotamento em embalagens gás permeáveis;
- esterilização em autoclave por 10 minutos a 121°C.

4.3 Preparo dos animais

Os pesquisadores seguiram todas as normas em bioética e a legislação vigente sobre experimentos com animais.

Todos os procedimentos cirúrgicos, inclusive a retirada dos enxertos ósseos, realizaram-se sob cuidados estritos de assepsia.

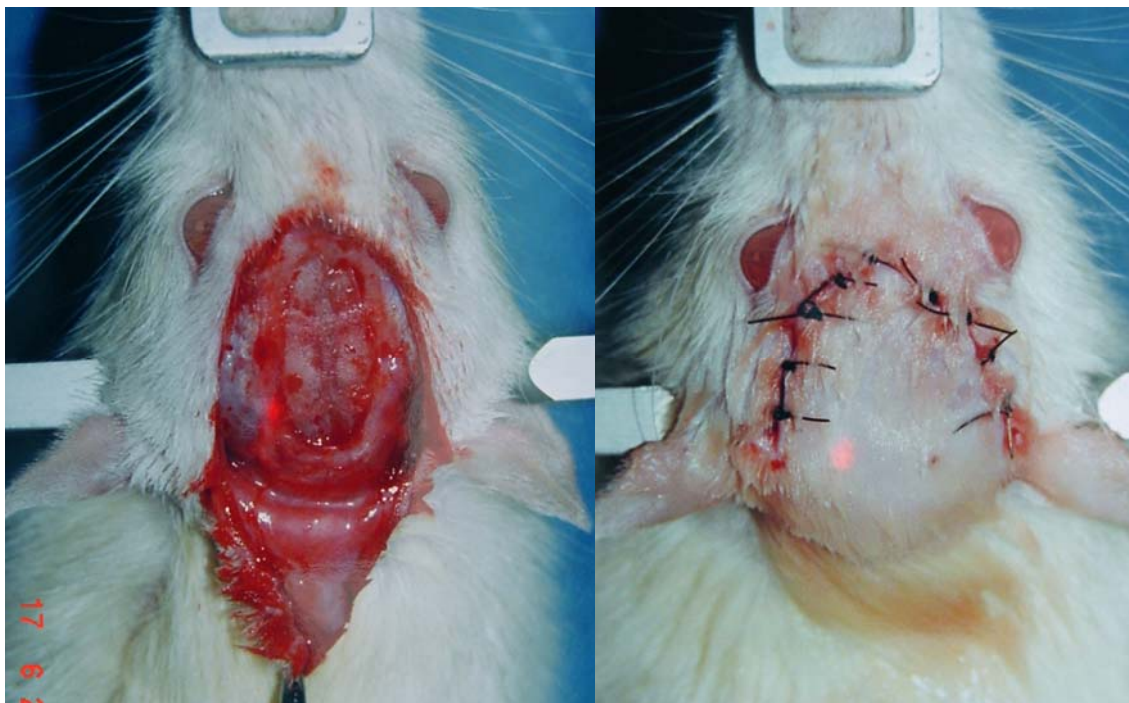
A técnica anestésica consistiu de injeção intraperitoneal de fentobarbital sódico na dose de 30 mg/Kg de peso, complementada com infiltração local de solução de

lidocaína 2% com adição de adrenalina numa concentração de 1:200000, observando-se a dosagem máxima de 0,7 mg/kg. Antibioticoterapia profilática foi feita na indução anestésica com 15.000 UI de Sulbactam-trimetropin intramuscular.

Aplicou-se solução de clorhexidina a 2% em toda a cabeça do animal para a anti-sepsia, isolando a região operatória com campos estéreis. A área da incisão cirúrgica foi tricotomizada.

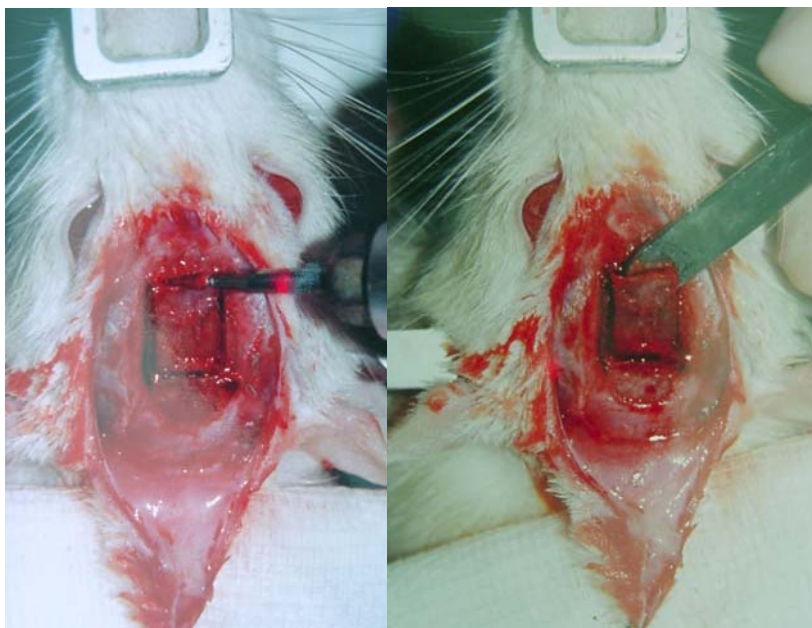
Os enxertos de calota craniana foram removidos por meio de incisão em “U” na pele do rato com pedículo occipital, incisando o periósteo (figura 1). Uma craniectomia de 0,8 x 1,0 cm foi feita em todos os animais com broca de corte, sob irrigação contínua para evitar dano ao osso (figura 2).

Figura 1: elevação do retalho de pedículo occipital com exposição da calota craniana e após suturado.



Cada animal, escolhido aleatoriamente, recebeu um enxerto ósseo sobre o defeito criado.

Figura 2: A retirada do fragmento de calota craniana foi realizado com broca de corte e descolador de ponta romba, com especial cuidado ao seio sagital.



Após a colocação do transplante, a incisão cirúrgica foi suturada com fio de náilon monofilamentar 4-0 (figura 1).

No período pós-operatório os animais foram mantidos em gaiolas com ciclos de 12 horas de luz, com acesso a água e a comida *ad libitum*.

Os animais foram submetidos à eutanásia na 6^a (quatro animais) e 15^a (seis animais) semana pós-operatória, sua calota craniana removida e encaminhada para a avaliação histopatológica.

Os animais foram mortos por injeção intraperitoneal letal de fentobarbital sódico, removendo-se suas calotas cranianas logo após (figura 3).

Figura 3: Após a eutanásia a calota craniana foi removida em bloco. Neste caso, na 6ª semana ainda pode-se visualizar a área enxertada.



4.4 Métodos de avaliação

4.4.1 Avaliação macroscópica do enxerto

Os enxertos foram avaliados semiquantitativamente em escores, no momento da sua remoção, quanto a sua aderência ao leito receptor ou aspecto macroscópico do enxerto, como segue:

- (0) ausência de osso;
- (1) não aderido ao leito receptor, consistência coloidal ou aspecto necrótico;
- (2) facilmente removido ou aspecto cartilaginoso;
- (3) fortemente aderido, com rigidez e consistência preservadas.

Esta observação foi feita por dois observadores independentes.

4.4.2 Avaliação histológica

A avaliação histológica realizou-se por um mesmo patologista e pelo autor em microscópio de co-observação, mascarados quanto ao tipo de enxerto.

Os espécimes foram enviados à patologia em solução de formol.

Os enxertos foram descalcificados em solução de ácido nítrico e seccionados na sua porção média.

Após ter-se definido o corte mais representativo de cada lâmina, observaram-se três áreas de interesse definidas: as duas extremidades e a secção média do enxerto.

A avaliação foi semi-quantativa em escores definidos de 0 a 3.

Os parâmetros avaliados foram:

- *Neoformação óssea*, seguindo o critério abaixo: (0) ausente: ausência de trabéculas ósseas neoformadas; (1) leve: trabéculas finas, não ultrapassando 1/3 do campo; (2) moderada: trabéculas isoladas, ocupando entre 1/3 e 2/3 do campo; (3) acentuada: trabéculas espessas, ocupando mais de 2/3 do campo.
- *Atividade osteoblástica* (presença de osteoblastos); (0) ausente: atividade inexistente; (1) leve: menos de 1/3 das trabéculas com osteoblastos; (2) moderada: entre 1/3 e 2/3 das trabéculas com osteoblastos; (3) acentuada: mais de 2/3 das trabéculas com osteoblastos.

- *Absorção do enxerto*; (0) ausente: ausência de áreas de lise óssea; (1) leve: reabsorção de até 1/3 do enxerto; (2) moderada: reabsorção entre 1/3 e 2/3 do enxerto; (3) acentuada: reabsorção de mais de 2/3 do enxerto.

Os enxertos ainda foram avaliados pela presença ou não de medula óssea viável e quantitativamente por:

1. *número absoluto de osteoclastos* no campo com maior número de osteoclastos em cada área de interesse (aumento de 100 x);
2. *número de vasos por campo* (aumento de 100 x);
3. *espessura do osso* em milímetros nas três áreas avaliadas.

4.5 Análise Estatística

A análise estatística consistiu em uma descrição dos escores média \pm desvio-padrão e avaliação do efeito dos fatores em estudo, período de avaliação (momento) e grupo (congelado, liofilizado ou autólogo fresco), pela análise de variância fatorial com duplo critério de classificação, permitindo a apreciação de um fator de interação. Esta abordagem segue as recomendações de Campbell & Machin ²⁵ e Snedecor & Cochran ²⁶ sobre a utilização de procedimentos paramétricos (ANOVA) na análise de variáveis ordinais. Os testes utilizados foram todos confirmados pela ANOVA aplicada sobre a transformação em “rank” dos dados, o que, segundo Montgomery ²⁷, representa o uso do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Na comparação entre os grupos para a variável dicotômica

viabilidade da medula óssea utilizou-se o teste exato de Fischer com ajuste de valor p pelo método de Finner-Bonferroni.

Considerou-se um valor $p \leq 0.05$ como significativo.

Os dados foram processados e analisados com o auxílio dos programas PEPI v. 3.0 e SPSS v. 10.0.

O projeto foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais pela Comissão Científica e Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

5. RESULTADOS

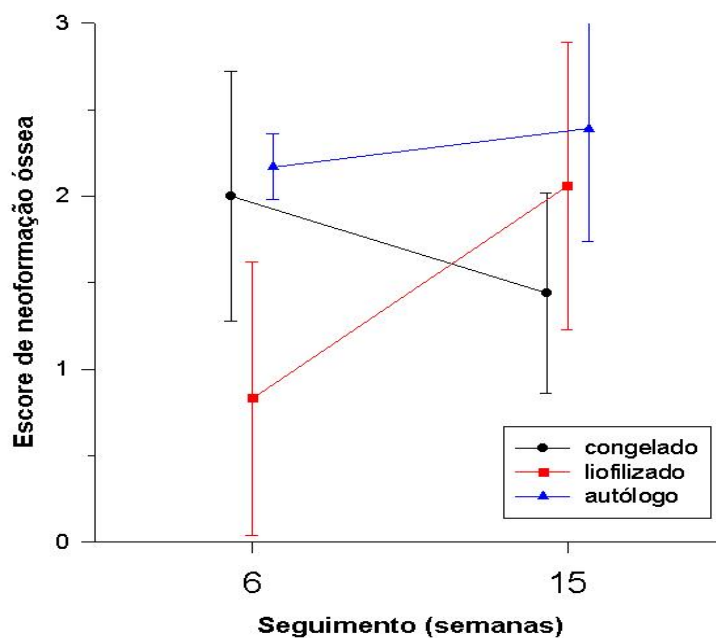
Dos animais operados, um morreu devido a laceração e sangramento do seio sagital como complicação do procedimento cirúrgico. Não houve perdas no período pós-operatório tardio nem complicações como infecção ou necrose do retalho.

Na avaliação macroscópica da 6ª semana, o grupo 2 apresentou um pior resultado ($p < 0,04$) caracterizado por fraca aderência ao leito receptor ou aspecto cartilaginoso, enquanto os grupos 1 e 3 já se encontravam fortemente aderidos ao leito receptor, com aspecto viável. Na 15ª semana já não existiam diferenças entre os grupos e, macroscopicamente, todos os enxertos estavam integrados ao osso receptor.

A avaliação histopatológica mostrou comportamentos diferentes para cada grupo nos diversos parâmetros avaliados.

Em relação a neoformação óssea (gráfico 1), enquanto o grupo 3 permaneceu estável nas diferentes semanas, o grupo 2 teve um aumento e o grupo 1 apresentou uma diminuição nos escores ($p < 0,03$). Quando comparados na 15ª semana, as diferenças entre eles não se mostraram estatisticamente significativas.

Gráfico 1: evolução do índice de neoformação óssea médio nas duas avaliações para cada grupo ($p < 0,03$).



A atividade osteoblástica (gráfico 2) também variou de acordo com o enxerto e o tempo, estabelecendo um comportamento diferente para cada grupo ($p < 0,01$). Enquanto os grupos 1 e 3 tiveram uma diminuição acentuada, maior no primeiro, os liofilizados apresentaram escores que foram maiores na 15ª semana. Os animais comparados na avaliação mais tardia apresentaram diferenças significativas dependendo do tipo de enxerto ($p < 0,03$).

Gráfico 2: *variação da atividade osteoblástica em cada grupo nos diferentes momentos ($p < 0,01$).*

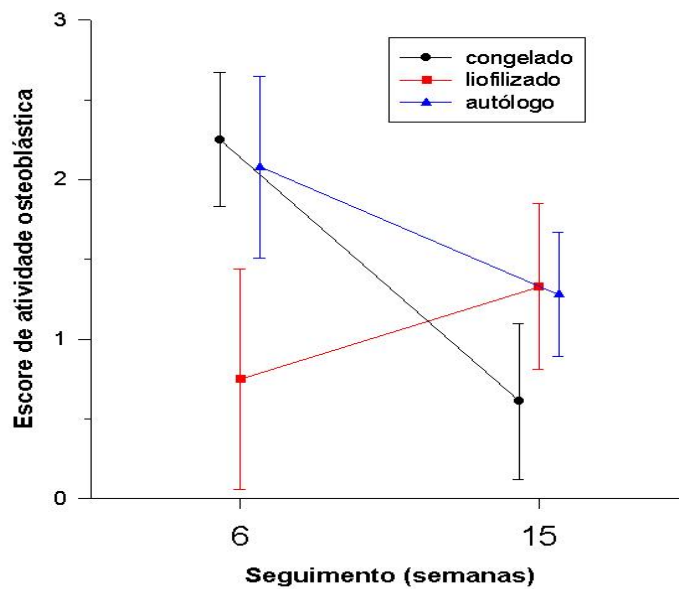
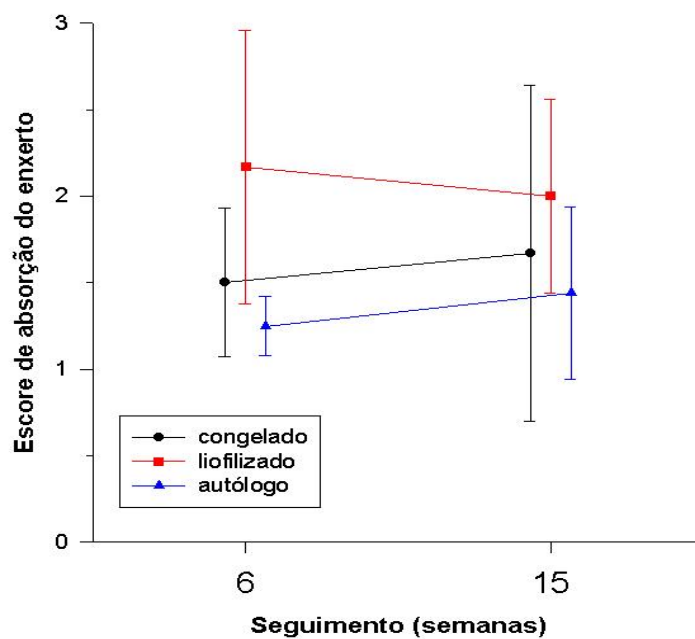


Gráfico 3: *escores de reabsorção dos enxertos nos grupos avaliados na 6ª e 15ª semanas ($p > 0,05$).*



As médias de absorção do enxerto (gráfico 3) não tiveram uma variação significativa, mostrando uma diminuição no grupo 2 e aumento nos grupos 1 e 3 ($p>0,05$). O número de osteoclastos por campo (gráfico 4) foi influenciado significativamente pelo tempo ($p<0,05$) com uma discreta interação com o tipo de enxerto. Manteve-se estável nos grupos 2 e 3 e diminuiu no grupo 1. O comportamento dos diferentes tipos de enxerto quanto ao número de vasos (gráfico 5) foi dependente do enxerto e do tempo de evolução ($p<0,01$), com decréscimo nos enxertos congelados e elevação nos autólogos, mantendo-se estável nos liofilizados. A viabilidade da medula óssea (gráfico 6) variou basicamente entre os grupos. O grupo 3 sempre manteve maior positividade ($p<0,05$). Nos outros parâmetros analisados os enxertos tiveram padrões de comportamento que não variaram significativamente.

Gráfico 4: *variação do número de osteoclastos por campo nos diferentes momentos avaliados para cada grupo ($p<0,05$).*

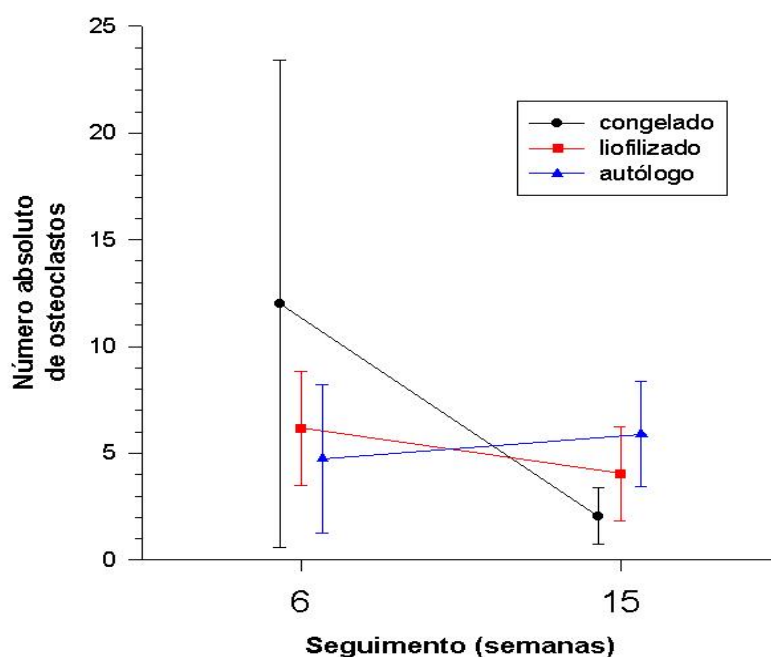


Gráfico 5: *variação do número de vasos por campo nos grupos com 6 e 15 semanas ($p < 0,01$).*

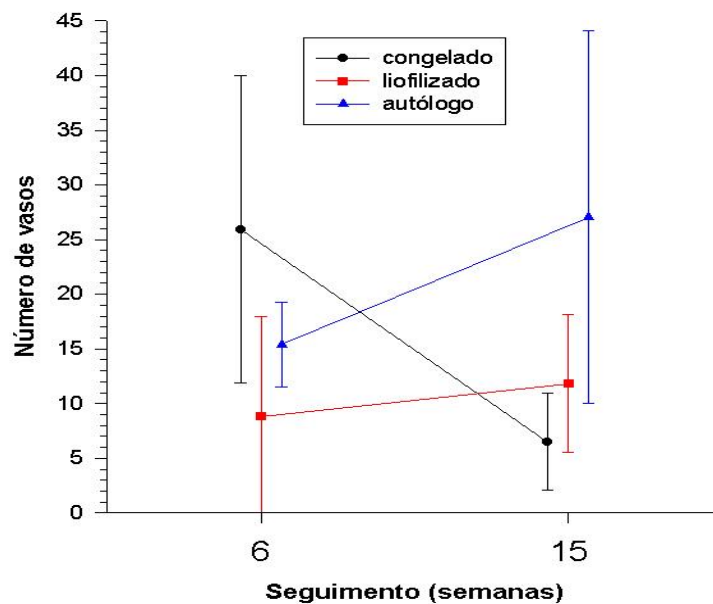
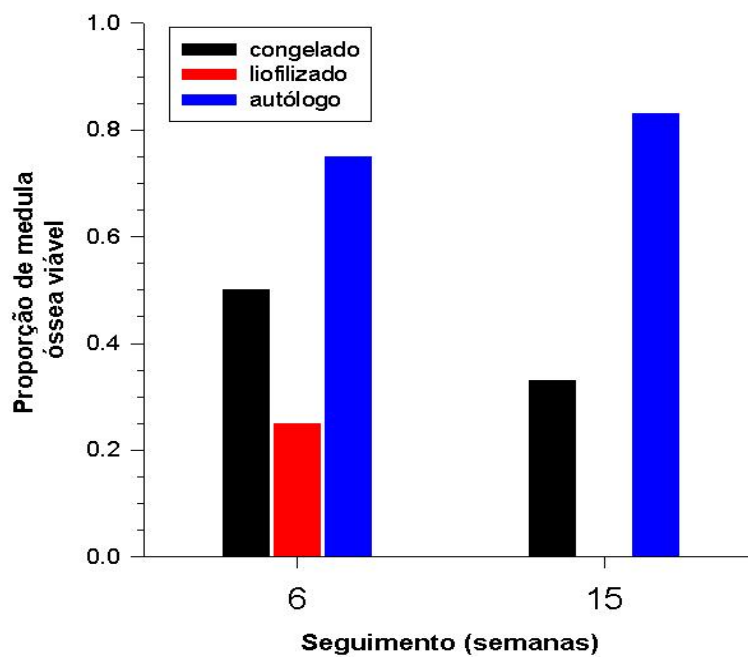


Gráfico 6: *presença de medula óssea viável nos dois momentos avaliados ($p < 0,05$).*



5. DISCUSSÃO

A reparação dos defeitos ósseos craniofaciais pode ocorrer por mecanismos semelhantes ou distintos daqueles que acontecem nos ossos endocondrais, em particular, sua resposta aos materiais osteoindutivos ⁷⁵. Os defeitos ósseos na calota craniana de indivíduos adultos são geralmente considerados não osteogênicos por apresentarem uma pequena capacidade regenerativa, atribuída a deficiência de medula óssea, de células precursoras de osteoblastos e de vascularização, o que explica a necessidade de enxertos ósseos, substitutos ósseos ou outros métodos que facilitem sua reparação. Estas observações tornam estas perdas ideais para investigações experimentais ¹⁴. Schimitz e Hollinger postularam uma racionalização para testar materiais de engenharia tecidual na região cranimaxilofacial utilizando um modelo animal de déficit ósseo crítico na calota craniana. Estes autores concluem que o teste inicial deve ser feito em um defeito de 8 mm de diâmetro no crânio de ratos ⁷⁵

Neste experimento optou-se pelo rato Wistar por sua resistência, sua facilidade de manuseio e confinamento e seu baixo custo. Foram utilizados animais adultos por apresentarem um índice menor de absorção óssea. Além disto, os defeitos ósseos podem ser reparados mais facilmente nos imaturos ^{4,75}.

O osso membranoso possui reconhecida superioridade quando empregado no esqueleto facial, o que levou os autores a utilizarem um modelo animal semelhante ao utilizado por Collares e cols.⁷⁶ na pesquisa do comportamento de diferentes formas de hidroxiapatita e Zellin e cols.⁴⁴ no estudo de enxertos autoclavados, ambos na reconstituição de defeitos na calota craniana de ratos. O defeito ósseo produzido na calota craniana de 8 milímetros de diâmetro foi fundamentado no trabalho ⁷⁵ citado anteriormente. A orientação do enxerto em

relação ao osso receptor não foi uma preocupação dos autores, pois não existe comprovação que isto tenha alguma influência sobre a integração do transplante³⁵. Os enxertos foram colocados sobre o defeito da maneira que permanecessem mais estáveis e com maior contato ósseo. O retalho periosteal foi preservado com o objetivo de isolar o enxerto dos tecidos adjacentes. Estudos^{14,34} demonstram que a ação intermitente dos grupos musculares e a interposição de tecidos interferem na integração e aumentam a reabsorção dos enxertos. Segundo conceitos de regeneração óssea guiada, o periósteo age como uma barreira de proteção macroporosa, sendo permeável às proteínas morfogenéticas ósseas e à migração das células mesenquimais necessárias à osteogênese¹⁴. A fixação do enxerto não influenciou significativamente a incorporação de enxerto em alguns estudos³⁴, desde que este permanecesse clinicamente estável durante o procedimento. Lin e cols., citados por Alberius e col.³⁴, postulam que uma vez aderido ao leito receptor para resistir às forças mecânicas externas, o tipo de fixação empregada no enxerto é de menor importância. No modelo utilizado no presente estudo, a mínima mobilidade do sítio receptor permitiu ao enxerto integrar-se sem que fosse necessário algum tipo de fixação interna ou externa. Embora outros experimentos^{4,29} mostrem que a fixação rígida produz melhores resultados que a fixação não rígida, os resultados obtidos no grupo 3, o grupo autólogo, foram compatíveis com a literatura e confirmam a correção do modelo utilizado.

Os períodos de observação foram determinados na tentativa de privilegiar fases distintas da integração do enxerto. Albrektsson²⁶, estudando a incorporação de enxertos corticais autólogos, determinou que sua completa revascularização

ocorre em torno de 30 dias, nesta fase a formação e a reabsorção óssea estão ocorrendo simultaneamente. Esperava-se que na avaliação inicial, fixada em seis semanas, estes fenômenos da neoformação óssea estivessem em plena atividade. Na avaliação tardia, na 15ª semana, esperava-se verificar a fase de conclusão da incorporação óssea. Isto confirmou-se nos enxertos autólogos, porém os grupos congelado e liofilizado ainda mostravam variações importantes em alguns parâmetros avaliados. Segundo estudo experimental ⁴⁴, a completa integração e revascularização dos enxertos autólogos ocorre em um período de 12 semanas. Stevenson e cols.⁹ já haviam encontrado estas diferenças quando observaram a revascularização dos auto-enxertos em 4 semanas, enquanto os enxertos congelados não eram completamente revascularizados até 4 meses após o procedimento. Observou-se, em experimento realizado em cães, que o ciclo de substituição óssea que envolve revascularização, reabsorção e neoformação óssea em homoenxertos corticais maiores pode levar até 2 anos ¹⁴.

A avaliação de três pontos distintos no enxerto, sugerida por Ferreira ⁴ e Zellin e cols.⁴⁴, permitiu uma avaliação global da resposta de cada osso transplantado.

A avaliação macroscópica feita por dois observadores independentes baseou-se em escores adaptados de experimentos anteriores de Almeida e cols.¹ e Silva e cols.¹² onde avaliaram a integração do osso ao sítio receptor e sua morfologia e consistência. Um destes trabalhos ¹², que utilizou osso desmineralizado, observou que com 2 semanas o enxerto liofilizado apresentava aspecto cartilaginoso ou de osso inviável, o que também foi observado aqui, só que num período mais tardio (6 semanas). Os outros dois grupos mantiveram seu aspecto e consistência. Na avaliação de 15 semanas não havia diferença macroscópica entre os enxertos,

todos pareciam viáveis e integrados ao osso receptor. Estes dados concordam com os autores ^{4,9} que afirmam que o fenômeno da fusão entre transplante e osso do receptor depende da estabilidade e do contato destes e não da tendência do osso para maior ou menor integração.

Os parâmetros histopatológicos foram escolhidos baseados em trabalho realizado por Ferreira ⁴ com o objetivo de determinar a intensidade da neoformação óssea (osso neoformado e atividade dos osteoblastos) e a atividade osteolítica (absorção do enxerto, espessura do osso e número de osteoclastos). A estes parâmetros foram dados escores de 0 a 3, utilizado em muitos experimentos ^{4,36}, permitindo na sua análise a utilização de testes paramétricos com maior poder estatístico. Albrektsson ²⁶ afirma que reabsorção e a formação óssea não iniciam antes da revascularização óssea e junto com outros autores ^{12,29} cita a neovascularização do enxerto como parâmetro confiável para estimar sua viabilidade. Aplicando a experiência destes pesquisadores procuramos avaliar a vascularização dos enxertos determinando número de vasos em áreas específicas de cada enxerto.

Na avaliação histopatológica, os testes estatísticos permitiram múltiplas comparações, sugerindo comportamentos específicos para cada tipo de enxerto em cada um dos parâmetros analisados.

O padrão de integração óssea dos enxertos autólogos observado à microscopia foi concordante com trabalho que relatou um período de 4 a 6 semanas para a revascularização destes enxertos ⁹. Avaliados na 6ª semana, eles já estavam vascularizados, melhorando ainda mais este padrão de vascularização entre os períodos estudados. A proporção de osso neoformado era significativa nesta

primeira fase, com neoformação intramembranosa e perivascular. A presença de osteoblastos nas trabéculas neoformadas e na periferia do enxerto era acentuada. Hulth e cols.⁵² avaliaram a capacidade osteoindutiva dos enxertos pela presença das células mesenquimais, num primeiro momento, e pela capacidade de neoformação óssea numa fase mais tardia. Os achados histopatológicos reafirmam a capacidade osteogênica e osteoindutiva do enxerto autólogo, reforçando sua indicação como excelente opção nas reconstruções do esqueleto facial^{1,4,44}. Nos animais sacrificados na 15ª semana esta atividade havia diminuído, mas a neoformação óssea manteve-se inalterada sem mostrar sinais de reabsorção do enxerto ou aumento significativo no número de osteoclastos. Este equilíbrio entre o processo de reabsorção e produção óssea, onde o volume do enxerto se mantém inalterado, permite concluir que neste momento o enxerto autólogo estava completamente incorporado. Apesar disto, ainda permaneciam áreas de osso necrótico entre as trabéculas neoformadas, o que, segundo Ferreira³ e Albrektsson²⁶, não altera a estrutura e resistência do enxerto. Lemperle e cols.¹⁴ afirmam que a substituição óssea completa só é atingida nos enxertos esponjosos, enquanto os enxertos corticais permanecem indefinidamente uma combinação de tecido ósseo necrótico e viável, sendo este um dos fatores responsáveis pela maior manutenção do volume destes últimos.

O homoenxerto congelado na 6ª semana apresentava um padrão de integração muito próximo do enxerto autólogo, com um número significativo de vasos e osteoclastos e escores para neoformação óssea e atividade dos osteoblastos altos. Estes achados determinam a capacidade de osteoindução destes enxertos, uma vez que os osteoclastos também migram e diferenciam-se pelo estímulo

osteointutivo do material orgânico do enxerto e devem preceder a ação osteoblástica ⁴. Entretanto, nos animais avaliados tardiamente, houve uma diminuição na intensidade da vascularização do enxerto acompanhada de um menor número de osteoblastos e de uma menor proporção de osso neoformado. Em concordância com o experimento de Ferreira ⁴, também se observou uma diminuição no número de osteoclastos e um aumento no índice médio de reabsorção do enxerto. Esta degradação não osteoclástica do osso foi também observado por Zellin e cols.⁴⁴ e Thorén e cols.⁴⁹ em estudos anteriores. Estes autores ^{44,49} responsabilizam a diminuição da vascularização do enxerto por esta piora nos parâmetros do osso congelado. Leunig e cols. ⁴² observaram uma diminuição da densidade vascular dos homoenxertos e atribuem este achado à resposta imune do hospedeiro. Outros autores ^{7,42} também descrevem a antigenicidade como maior determinante da revascularização dos enxertos, mas concordam que, embora as reações imunes prejudiquem a revascularização, o congelamento produz uma redução na antigenicidade dos homoenxertos. Jinno e cols.⁷ não conseguiram demonstrar que o processamento do enxerto por congelação profunda aumente o número de vasos como conseqüência de uma menor resposta imune. Ekelund e cols.⁴⁵ concluem, em suas investigações, que as reações imunes dependentes das células T não produzem efeito significativo nas propriedades osteocondutivas do enxerto. Este achado contraria vários experimentos animais que mostram que a incorporação dos enxertos homólogos é influenciada por estas reações ^{29,45}.

Alguns autores ⁴² relacionam uma rápida revascularização do enxerto com um fenômeno de rejeição como o visto em transplantes cardíacos e renais,

salientando a necessidade de provas cruzadas entre doador e receptor, principalmente em pacientes já sensibilizados por outros transplantes e que serão submetidos a retalhos ósseos livres homólogos.

O presente estudo indicou um decréscimo no número de vasos dos homoenxertos congelados, não observado nos outros dois grupos, concordando com os achados da literatura. Embora pareça sugestivo, não foi possível confirmar a participação de antígenos de histocompatibilidade neste fenômeno.

O grupo que recebeu homoenxertos liofilizados apresentou nítido retardo na incorporação quando comparado aos outros grupos. Na avaliação inicial, apesar de já haver ocorrido o surgimento de vasos, havia mínima quantidade de osteoblastos e de osso neoformado, que era principalmente subperiosteal. O enxerto tinha aspecto necrótico. Os escores de reabsorção óssea foram elevados. No grupo avaliado posteriormente, com 15 semanas, o número de vasos aumentou acompanhado de uma elevação significativa na atividade dos osteoblastos e na proporção de osso neoformado. Heiple, citado por Baptista e cols.⁵⁸, encontrou este retardo na incorporação dos enxertos liofilizados quando comparado aos auto-enxertos. Este autor observou que, com 4 semanas, os liofilizados apresentavam menor reparação, mas esta diferença se tornava pequena na reavaliação com 3 meses e que era ainda menor no final de um ano.

A liofilização é empregada para preservar as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), que são sabidamente osteoindutivas e foram isoladas nos enxertos ósseos de origem mesenquimal⁵³. Assim, é evidente que elas permanecem ativas nos enxertos liofilizados. As propriedades osteoindutivas e osteocondutivas dos enxertos liofilizados e desmineralizados estão bem documentadas e têm sido

utilizadas com sucesso clinicamente ^{29,36}. Os enxertos liofilizados mineralizados são basicamente osteocondutivos com mínima atividade osteoindutiva, não sendo capazes de induzir neoformação óssea quando implantados heterotopicamente ^{36,52}. Hulth e cols ⁵² não observaram osso neoformado nos homoenxertos mineralizados em 50 dias de estudo. Apesar destas observações, alguns autores têm descrito o osso liofilizado mineralizado como osteoindutivo ^{13,14,36}. Pode-se teorizar, segundo Lohmann e cols. ³⁶, que estes fatores são liberados durante a reabsorção osteoclástica do implante quando colocados em situação ortotópica. Estes autores ³⁶ observaram áreas de neoformação óssea focal nos enxertos liofilizados mineralizados, indicando que fatores osteoindutivos devem ter sido liberados nestes locais. Isto pode explicar o atraso no início da incorporação do enxerto liofilizado quando comparado aos outros grupos no presente estudo. A presença de osso neoformado subperiosteal e perivascular observada neste experimento indica sua atividade osteocondutiva e, com menos intensidade e mais tardiamente, osteoindutiva, em conformidade com os autores ⁵² que entendem que o osso neoformado perivascular ou endosteal depende de células mesenquimais que migram dos vasos.

Apesar da avaliação tardia no presente estudo indicar uma melhora do desempenho do homoenxerto liofilizado no longo prazo, somente estudos com seguimentos maiores permitirão afirmar se esta é uma tendência verdadeira ou se ocorrerá um decréscimo nesta performance como o que ocorreu nos enxertos congelados.

A força de torção e a elasticidade diminuem com o processo de liofilização ⁷², além disto, como foi observado à macroscopia, estes enxertos passam um

período prolongado com alterações na sua consistência. Embora outros autores^{10,13,51} relatem que a liofilização aumenta a rigidez e a resistência à compressão do enxerto, a utilização de enxertos liofilizados como enxertos estruturais deve ser executada com cautela.

A presença de medula óssea viável variou basicamente entre os grupos. Os enxertos autólogos apresentaram 100% de positividade, evidenciando a superioridade deste grupo. A viabilidade da medula óssea e a sobrevivência de osteoblastos no transplante permitem que o enxerto participe ativamente da sua incorporação, concordando com os autores que defendem que mesmo a pequena fração das células transplantadas que permanece viável no auto-enxerto desempenha papel importante no seu processo de integração^{29,42}. Da mesma forma, a completa remoção celular promovida pela liofilização e a demora em formar medula óssea observada nos liofilizados somariam para um maior retardo na neoformação óssea nestes enxertos.

A extração da gordura do tecido ósseo melhora a integração do enxerto congelado, como demonstrado por Thorén e cols.⁴⁹. Este efeito parece ser consequência de uma diminuição da resposta imunológica provocada, uma vez que o desengorduramento não alterou a incorporação dos enxertos autólogos. A remoção da gordura não alterou as propriedades biomecânicas do osso. Este estudo⁴⁹ não investigou os ossos liofilizados, entretanto o processo de liofilização implica na remoção da gordura e deve produzir efeitos similares na integração dos enxertos^{23,33}. A resposta imunológica está reduzida nestes enxertos, mas ainda é possível detectá-la⁷. Estes achados sugerem fortemente que uma resposta imunológica a antígenos de histocompatibilidade pode ser importante, e

é minimizada pelo desengorduramento ⁴⁹. Moreau e cols.⁷⁰ salientam a importância do desengorduramento nos enxertos submetidos à radiação gama ou ultravioleta com a finalidade de evitar a peroxidação lipídica e a liberação de componentes tóxicos para as células precursoras dos osteoblastos. Estes autores preconizam o desengorduramento como rotina no processamento dos homoenxertos ósseos pelos bancos de tecidos. Mesmo quando outro método de esterilização secundária, como o óxido de etileno é empregado, a remoção de componentes ósseos como a gordura e a água diminui a toxicidade do processo por permitir maior difusão e evaporação do gás e seus resíduos. Estes métodos tornam-se menos prejudiciais às propriedades osteoindutivas quando o enxerto é liofilizado ⁷⁰.

O método de esterilização secundária empregado nos enxertos liofilizados neste experimento foi a autoclavagem a 121°C por 10 minutos, que é o método de rotina do banco de ossos do HCPA. Os enxertos congelados foram tratados sob cuidados estritos de assepsia, sem nenhum processo de esterilização posterior.

Embora os resultados atuais sejam adequados, eles ainda são imperfeitos. Apesar dos avanços, opções e descobertas, mais de 20 bilhões de dólares de custos diretos e indiretos são gastos para o tratamento de fraturas ou defeitos ósseos nos EUA ⁷⁴.

Sendo assim, as pesquisas em enxertia óssea devem continuar nos vários centros e num grande número de áreas de interesse. Com um maior número de pesquisadores estudando o problema, espera-se que maiores descobertas ocorram, e que uma taxa de sucesso alta e previsível seja alcançada, estimulando

os cirurgiões a acrescentarem este armamento no tratamento das grandes perdas ósseas.

6. CONCLUSÃO

1. O enxerto autólogo membranoso é o melhor material, entre os que foram estudados, para repor perdas ósseas na cirurgia craniomaxilofacial.
2. Os enxertos homólogos processados por congelação profunda ou liofilização apresentam resultados satisfatórios na reparação de perdas ósseas de tamanho crítico no esqueleto craniofacial.
3. A tendência de reparação dos grupos estudados indica um melhor resultado dos liofilizados no longo prazo quando comparados aos congelados.
4. O modelo animal utilizado é adequado para a pesquisa de substitutos ósseos em cirurgia craniomaxilofacial.

7. BIBLIOGRAFIA.

1. Almeida OM, Alonso N, Buchipiguel C, Pinheiro EA, Ferreira MC. Enxerto ósseo membranoso e endocondral: estudo comparativo e cintilográfico de perda de volume. *Rev Soc Bras Cir Plast* 1995; 10:53-8.
2. Angermann P, Jepsen OB. Procurement, banking and decontamination of bone and collagenous tissue allografts: guidelines for infection control. *J Hosp Infect* 1991; 17: 159-69.
3. Delacure MD. Physiology of bone healing and bone grafts. *Otolaryngol Clin North Am* 1994; 27: 859-74.
4. Ferreira JCR. Avaliação cintilográfica e histopatológica de transplantes ósseos autógenos, homogêneos frescos e homogêneos congelados do arco zigomático: estudo experimental em coelhos [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Escola Paulista de Medicina – Univ. Federal de São Paulo; 1997.
5. Hardin CK. Banked bone. *Otolaryngol Clin North Am* 1994; 27(5): 911-25.
6. Ozaki W, Buchman SR. Volume maintenance of onlay bone graft in the cranial skeleton: microarchitecture versus embryologic origin. *Plast Reconstr Surg* 1998 Aug; 102(2): 291-9.
7. Jinno T, Miric A, Feighan J, Kirk SK, Davy DT, Stevenson S. The effects of processing and low dose irradiation on cortical bone grafts. *Clin Orthop Rel Res* 2000; (375): 275-85.
8. Zasacki, W. The efficacy of application of lyophilized, radiation-sterilized bone graft in orthopedic surgery. *Clin Orthop Rel Res* 1991; (272): 82-7.
9. Stevenson S, Emery SE, Goldberg VM. Factors affecting bone graft incorporation. *Clin Orthop Rel Res* 1996; (323): 66-74.
10. Macedo CAS, Galia CR, Silva ALB, César PC, Sanches PRS, Duarte LS, et al. Comparação à resistência do osso bovino congelado e liofilizado. *Rev Bras Ortop* 1999; 34(9-10):529-34.

11. Kline Jr RM, Wolfe SA. Complications associated with harvesting of cranial bone grafts. *Plast Reconstr Surg* 1995 Jan; 95(1): 5-20,.
12. Silva ABD, Rodrigues L, Jorgetti W, Besteiro JM, Ferreira MC, Reis LM, et al. Retalho ósseo pré-fabricado com osso homogêneo: estudo da maturação óssea em um modelo experimental. *Acta Cir Bras* 2000; 15(S3): 65-8.
13. Conrad EU, Ericksen DP, Tencer AF, Strong DM, Mackenzie AP. The effects of freeze-drying and rehydratation on cancellous bone. *Clin Orthop Rel Res* 1993; (290): 279-84.
14. Lemperle SM, Calhoun CJ, Curran RW, Holmes RE. Bone healing of large cranial and mandibular defects protect from soft tissue interposition: a comparative study of spontaneous bone regeneration, osteoconduction, and cancellous autografting in dogs. *Plast Reconstr Surg* 1998 Mar;101(3): 660-71.
15. Deluca L, Raszewski R, Tresser N, Guyuron B. The fate of preserved autogenous bone graft. *Plast Reconstr Surg* 1997 Apr; 99(5): 1325-8.
16. Isaksson S, Alberius P, Klinge B, Jonsson J, Hallberg E, Wendel M. Regenerative response to membranous and endochondral lyophilized allogenic bone in rabbit skull defects. *Scand Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1992; 26(2):147-53.
17. Ozaki W, Buchman SR, Goldstein SA, Fyhrie DP. A comparative analysis of the microarchitecture of cortical membranous and cortical endochondral onlay bone grafts in the craniofacial skeleton. *Plast Reconstr Surg* 1999 Jul; 104(1): 139-47.
18. Perry CR. Bone repair techniques, bone graft and bone graft substitutes. *Clin Orthop Rel Res*, (360): 71-86,1999.
19. Andersen JR, Detlie T, Griffiths HJ. The radiology of bone allografts. *Radiol Clin North Am* 1995; 33(2): 391-400.
20. Volpon JB, Costa RMP. Ensaio mecânico e uso clínico do enxerto homogêneo processado. *Rev Bras Ortop* 2000; 35(6): 219-24.
21. Albee FH. Bone graft surgery. *Clin Orthop Rel Res* 1996; (324): 5-12.

22. Jesus-Garcia Filho R, Laredo Filho JL, Korukian M, Lomônaco ET. Enxerto homólogo de banco no tratamento dos tumores ósseos: experiência inicial da Escola Paulista de Medicina. *Rev Bras Ortop* 1992; 27: 844-8.
23. Amatuzzi MM, Croci AT, Giovani AMM, Santos LAU. Banco de tecidos: estruturação e normatização. *Rev Bras Ortop* 2000; 35(5): 165-172.
24. Aho AJ, Hirn M, Aro HT, Heikkilä JT, Meurman O. Bone bank service in Finland: experience of bacteriologic, serologic and clinical results of the Turku Bone Bank. *Acta Orthop Scand* 1998; 69: 559-65.
25. Lee JH, Cornelius CP, Schwenger N. Neo-osseous flaps using demineralized allogeneic bone in a rat model. *Ann Plast Surg* 2000; 44(2): 195-204.
26. Albrektsson T. Repair of bone grafts: a vital microscopic and histological investigation in the rabbit. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1980; 14: 1-12.
27. Urist MR. Bone formation by autoinduction. *Science* 1965 Nov; 150(698): 893-9.
28. Riley EH, Lane JM, Urist MR, Lyons KM, Lieberman JR. Bone morphogenetic protein – 2: biology and applications. *Clin Orthop Rel Res* 1996; (324): 39-45.
29. Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials: an overview of the basic science. *Clin Orthop Rel Res* 2000; (371): 10-27.
30. Cutting CB, McCarthy JG, Knize DM. Repair and grafting of bone. In: McCarthy JG, editor. *Plastic Surgery*. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders. 1990; p.583-629.
31. Mejdahl S, Hansen CA, Skjedt H, Reimann I. Human bone bank allografts stimulate bone resorption and inhibit proliferation in cultures of human osteoblast-like cells. *Acta Orthop Scand* 1998; 69(1): 63-68.
32. Mundy GR. Regulation of bone formation by bone morphogenetic proteins and other growth factors. *Clin Orthop Rel Res* 1996; (323): 24-28.
33. Cook SD, Rueger DC. Osteogenic protein – 1: biology and applications. *Clin Orthop Rel Res* 1996; (324): 29-38.

34. Alberius P, Gordh M. Osteopontin and bone sialoprotein distribution at the bone graft recipient site. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998 Dec; 124:1382-6.
35. Gosain AK, Song L, Santoro TD, Amarante MTJ, Simmons DJ. Long-term remodeling of vascularized and nonvascularized onlay bone grafts: a macroscopic and microscopic analysis. *Plast Reconstr Surg* 1999 Apr; 103(5): 1443-9.
36. Lohmann CH, Andreacchio D, Köster G, Carnes Jr DL, Cochran DL, Dean DD et al. Tissue response and osteoinduction of human bone grafts in vivo. *Arch Orthop Trauma Surg* 2001; 121(10): 583-90.
37. Chen NT, Glowacki J, Bucky LP, Hong HZ, Kim WK, Yaremchuk MJ. The roles of revascularization and resorption on endurance of craniofacial onlay bone grafts in the rabbit. *Plast Reconstr Surg* 1994; 93(4): 714-22.
38. Mankin HJ, Gebhardt MC, Jennings LC, Springfield DS, Tomford WW. Long terms results of allograft replacement in the management of bone tumors. *Clin Orthop Rel Res* 1996; (324): 86-97.
39. Doi K, Akino T, Shigetomi M, Maramatsu K, Kawai S. Revascularized intercalary bone allografts with short-term immunosuppression with cyclosporine in the canine. *Plast Reconstr Surg* 1998 Mar; 101(3):793-801.
40. Gosain AK, Song L, Capel CC, Corrao MA, Lim TH. Biomechanical and histologic alteration of facial recipient bone after reconstruction with autogenous bone graft and alloplastic implants: 1-Year study. *Plast Reconstr Surg* 1998 May; 101(6): 1561-71.
41. Schwartz HC, Leake DL, Kagan AR, Snow H, Pizzoterrato A. Postoperative irradiation of autogenic cancellous bone grafts. *Plast Reconstr Surg* 1986 Jan; 77(1):122-6.
42. Leunig M, Demhartner TJ, Sckell A, Fraitzi CR, Gries N, Schenk RK et al. Quantitative assessment of angiogenesis and osteogenesis after transplantation of bone. *Acta Orthop Scand* 1999; 70(4): 374-80.

43. Breibart AS, Grande DA, Kessler R, Ryaby JT, Fitzsimmons RJ, Grant RT. Tissue engineered bone repair of calvarial defects using cultured periosteal cells. *Plast Reconstr Surg* 1998 Mar; 101(3): 567-74.
44. Zellin G, Alberius P, Linde A. Autoclaved bone for craniofacial reconstruction: effects of supplementation with bone marrow or recombinant human fibroblast growth factor-2. *Plast Reconstr Surg* 1998 Sep; 102(3):792-800.
45. Ekelund A, Aspenberg P, Nilsson O. No effect of immunosuppression with cyclosporine A detected on bone ingrowth into cancellous allo and xenografts in the rat. *Acta Orthop Scand* 1999; 70(5): 491-6.
46. Burwell RG. Studies in the transplantation of bone: V. The capacity of fresh and treated homografts of bone evokes transplantation immunity. *J Bone Joint Surg Br* 1963; 45: 386-401.
47. Feofiloff ET, Jesus-Garcia R. Técnicas de obtenção, processamento, armazenamento e utilização de homoenxertos ósseos. *Rev Bras Ortop* 1996; 31(11): 895-903.
48. Stefani AE, Oliveira LF, Fernandez P. Banco de osso: um método simplificado. *Rev Bras Ortop* 1989; 24(3): 66-72.
49. Thorén K, Aspenberg P, Thorngren KG. Lipid extracted bank bone. *Clin Orthop Rel Res* 1995; (311): 232-46.
50. Frost DE, Fonseca RJ, Burkes Jr EJ. Healing of interpositional allogenic lyophilized bone grafts following total maxillary osteotomy. *J Oral Maxillofac Surg* 1982; 40:776-86.
51. Duarte LS, Schaeffer L. Comparação da resistência à compressão de ossos bovinos congelados e liofilizados. *Rev Bras Eng Biom* 2000; 16(2): 89-93.
52. Hulth A, Johnell O, Henricson A. The implantation of demineralized fracture matrix yields more new bone formation than does intact matrix. *Clin Orthop Rel Res* 1988; (234):235-9.
53. Scott CK, Bain SD, Hightower JA. Intramembranous bone matrix is osteoinductive. *Anat Rec* 1994 Jan; 238(1): 23-30.

54. Sigholm G, McKellop H, Marshall J, Moore TM, Sarmiento A. Graft perforations favor osteinduction: studies of rabbit cortical grafts sterilized with ethylene oxide. *Acta Orthop Scand* 1992; 63(2): 177-82.
55. Delloye C, Simon P, Nyssen-Behets C, Banse X, Bresler F, Schmitt D. Perforations of cortical bone allografts improves their incorporation. *Clin Orthop Rel Res* 2002; (396): 240-7.
56. Lewandrowski KU, Rebmann V, Pässler M, Schollmeier G, Ekkernkamp A, Grosse-Wilde H et al. Immune response to perforated and partially demineralized bone allografts. *J Orthop Sci* 2001; 6(6): 545-55.
57. Mellonig JT. Bone allografts in periodontal therapy. *Clin Orthop Rel Res* 1996; (324): 116-25.
58. Baptista PPR, Polesllo G, Guimarães RP, Fernandes ML. Emprego do enxerto ósseo liofilizado em lesões ósseas. *Rev Bras Ortop* 1997; 32(11): 845-8.
59. Vajaradul Y. Bone banking in Thailand: a ten-year experience (1984-1994). *Clin Orthop Rel Res* 1996; (323):173-80.
60. Hirn MYJ, Krusius T. Retesting of bone donors 2 months after donation guarantees sufficient safety of bone allografts. *Arch Orthop Scand* 1998; 69(6): 566-9.
61. Palmer SH, Gibbons CLMH, Athanasou NA. The pathology of bone allografts. *J Bone Joint Surg Br* 1999 Mar; 81(2): 333-5.
62. Cook SD, Salkeld SL, Prewett AB. Simian immunodeficiency virus (human HIV-II) transmission in allograft bone procedures. *Spine* 1995; 20: 1338-42.
63. Biagini S, Melende S, Wendel RF, Wendel S, Rudelli AS, Amatuzzi M. Padronização de rotina operacional em banco de ossos realizada por um serviço hemoterápico: propostas de elaboração de normas. *Rev Bras Ortop* 1999; 34(6): 381-4.
64. Ferreira SD, Dernel WS, Powers BE, Schochet RA, Kuntz CA, Withrow SJ et al. Effect of gas-plasma sterilization on the osteoconductive capacity of demineralized bone matrix. *Clin Orthop Rel Res* 2001; (388):233-9.

65. Viceconti M, Toni A, Brizio L, Rubbini L, Borreli A. The effect of autoclaving on the mechanical properties of bank bovine bone. *Chir Organi Mov* 1996; 81(1): 63-8.
66. Fideler BM, Vangsness Jr T, Lu B, Orlando C, Moore T. Gamma irradiation: effects on biomechanical properties of human bone-patellar tendon-bone allografts. *Am J Sports Med* 1995; 23(5): 643-6.
67. Hamer AJ, Stockley I, Elson RA. Changes in allograft bone irradiated at different temperatures. *J Bone Joint Surg Br* 1999 Mar; 81(2): 342-4.
68. Hachiya Y, Sakai T, Narita Y, Izawa H, Iwata H, Yoshizawa H et al. Status of bone banks in Japan. *Transpl Proc* 1999; 31: 2032-5.
69. Zhang Q, Cornu O, Delloye C. Ethylene oxide does not extinguish the osteoconductive capacity of demineralized bone: a reappraisal in rats. *Acta Orthop Scand* 1997; 68(2): 104-8.
70. Moreau MF, Gallois Y, Baslé MF, Chappard D. Gamma irradiation of human bone allografts alters medullary lipids and releases toxic compounds for osteoblast-like cells. *Biomaterials* 2000 Feb; 21(4): 369-76.
71. Arizono T, Iwamoto Y, Okuyama K, Sugioka Y. Ethylene oxide sterilization of bone grafts. *Acta Orthop Scand* 1994; 65(6): 640-42.
72. Thorén K, Aspenberg P. Ethylene oxide sterilization impairs allograft incorporation in conduction chamber. *Clin Orthop Rel Res* 1995; (318):259-64.
73. Kakiuchi M, Ono K, Nishimura A, Shiokawa H. Preparation of bank bone using defatting, freeze-drying and sterilization with ethylene oxide gas: part 1. Experimental evaluation of its efficacy and safety. *Int Orthop* 1996; 20: 142-6.
74. Goldstein SA, Patil BS, Moalli MR. Perspectives on tissue engineering of bone. *Clin Orthop Rel Res* 1999; (367S): S419-23.
75. Einhorn TA. Clinically applied models of bone regeneration in tissue engineering research. *Clin Orthop Rel Res* 1999; (367S): S59-67.

76. Collares MV, Kuyven CR, Edelweiss MI, Gross P, Colvero M, Fraga R et al. Comparison of hidroxyapatite cement and porous hidroxyapatite for cranioplasty in rats. *Braz J Craniomaxillof Surg* 1998; 1(1):16-8.

7. ANEXO.

TABELAS DE AVALIAÇÃO

	enxerto	TON	AO	Abs Enx	osteoclas	vasos	espessura mm	medula
15 sem								
rato 1	liofiliz.	1	1	2	4	2	0,2	não
		1	0	2	3	6	0,5	
		0	0	3	0	5	0,2	
2		3	2	3	5	1	0,25	não
		3	2	1	1	4	0,20	
		3	1	2	3	17	0,40	
4		1	1	1	3	5	0,45	não
		2	2	2	14	9	0,25	
		2	2	3	8	9	0,30	
5		2	2	3	5	12	0,80	não
		3	1	3	0	9	0,50	
		2	1	2	8	9	0,30	
6		2	1	2	3	14	0,30	não
		2	2	2	3	32	0,40	
		2	2	2	4	22	0,40	
23		3	1	1	2	12	0,35	não
		2	1	1	3	16	0,40	
		3	2	1	4	29	0,50	
		2,05556	1,3333	2	4,05556	11,833	0,37	
		0,8726	0,686	0,766965	3,298346	8,706	0,15	
		0,43377	0,3206	0,328654	1,441645	3,7906	0,08	
15 sem								
7	controle	1	1	1	5	42	0,20	
		3	1	1	14	38	0,50	
		2	2	2	5	38	0,40	
8		3	2	1	9	53	0,35	
		3	1	2	8	40	0,85	
		3	2	2	10	50	0,60	
9		2	0	1	0	6	0,35	não
		1	1	1	5	7	0,40	
		1	2	1	3	7	0,70	
10		3	2	1	6	28	0,50	
		3	1	2	5	38	0,45	
		3	1	2	5	51	0,90	
11		2	0	1	0	7	0,80	sim
		2	1	1	8	11	0,80	
		3	1	1	3	18	0,55	
12		3	2	2	4	16	0,50	sim
		2	1	1	4	15	0,40	
		3	2	1	12	22	0,70	
média		2,38889	1,2778	1,333333	5,88889	27,056	0,552777778	
DP		0,77754	0,6691	0,485071	3,724148	16,816	0,198873461	

15 sem								
3	congelado	0	0	3	0	0	0	não
		0	0	3	0	0	0	
		2	1	2	0	5	0,15	
13		2	0	1	0	9	0,60	não
		1	0	1	0	10	0,40	
		2	0	0	4	3	0,60	
14		1	1	2	0	0	0,65	sim
		2	0	1	5	3	0,80	
		1	0	0	2	7	0,80	
15		1	1	2	1	6	0,60	não
		1	1	1	2	4	0,50	
		1	1	2	4	3	0,80	
16		2	1	3	3	11	0,95	não
		2	1	3	4	7	0,50	
		1	2	3	5	7	0,80	
17		3	1	1	3	15	0,60	sim
		1	0	1	0	16	0,50	
		3	1	1	4	11	0,10	
média		1,44444	0,6111	1,66667	2,05556	6,5	0,519444444	
DP		0,85559	0,6077	1,028992	1,954549	4,8172	0,28806601	
		0,39526	0,2807	0,475365	0,902916	2,2254	0,133046686	
6 sem								
18	congelado	1	2	1	0	19	0,55	sim
		1	2	1	2	17	0,50	
		1	3	1	5	16	0,70	
24		1	2	1	2	12	0,30	sim
		2	1	2	4	22	0,40	
		3	2	2	3	18	0,50	
26		2	3	1	21	23	0,55	sim
		2	1	1	20	17	0,60	
		3	3	2	9	27	0,70	
27		3	3	2	24	58	0,70	não
		3	3	2	39	50	0,50	
		2	2	2	15	32	0,55	
	controle							
19		2	1	1	1	5	0,50	sim
		2	2	1	0	15	0,45	
		2	1	1	7	18	0,80	
20		2	2	1	0	8	0,40	sim
		3	2	2	4	9	0,50	
		2	2	1	2	22	0,60	
25		2	2	1	2	10	0,40	não
		2	3	1	15	28	0,50	
		2	2	2	12	25	0,70	
30		3	3	1	7	10	0,60	sim
		2	3	2	5	15	0,80	
		2	2	1	2	20	0,55	
		2,16667	2,0833	1,25	4,75	15,417	0,57	
		0,38925	0,6686	0,452267	4,769696	7,2921	0,14	

	0,38146	0,6552	0,443213	4,674213	7,1461	0,14	
	liofilizado						
21	1	2	1	4	6	0,30	não
	1	1	1	1	9	0,25	
	2	1	2	2	14	0,40	
22	1	1	1	3	16	0,50	sim
	2	1	2	4	26	0,50	
	2	2	2	12	22	1,00	
28	0	0	3	0	0	0,10	não
	1	1	3	17	8	0,50	
	0	0	2	8	2	0,30	
29	0	0	3	2	0	0,60	não
	0	0	3	14	1	0,40	
	0	0	3	7	2	0,50	

liofilizados	15ª sem	controle	15ª sem	congelado	15ª sem
rato 1	1	rato 7	1	rato 13	1
	2		1		1
rato 2	1	rato 8	1	rato 14	1
	1		1		1
		rato 9	2	rato 15	1
			1		1
rato 4	1	rato 10	1	rato 16	1
	1		1		2
rato 5	1	rato 11	1	rato 17	2
	1		1		2
rato 6	1	rato 12	1		
	1		1		
rato 23	1				
	1				
média	1,083333	média	1,083333		1,3
DP	0,288675	DP	0,288675		0,483046

liofilizados	6ª sem	controle	6ª sem	congelado	6ªsem
rato 21	2	rato 19	1	rato 18	1
	2		1		1
rato 22	1	rato 20	1	rato 24	1
	2		1		1
rato 28	2	rato 25	1	rato 26	1
	2		1		2
rato 29	3	rato 30	1	rato 27	1
	3		1		1
média	2,125		1		1,125
DP	0,64087		0		0,353553

9. ARTIGO

Comparação entre enxerto ósseo autólogo, homólogo congelado e homólogo liofilizado em modelo experimental de cranioplastia¹

Comparison between autogenous, deep-frozen homologous, and lyophilized homologous bone grafts in an experimental model of cranioplasty

*Antônio Carlos Pinto Oliveira*²

*Marcus Vinicius Martins Collares*³

*Carlos Roberto Galia*⁴

*Maria Isabel Edelweiss*⁵

*Rinaldo de Angeli Pinto*⁶

*Lidiana Kneibel*⁷

1. Unidade de Cirurgia Craniomaxilofacial do Serviço de Cirurgia Plástica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FAMED-UFRGS), RS, Brasil.
2. Cirurgião Plástico. Mestre em Medicina: Cirurgia. Médico contratado do Serviço de Cirurgia Plástica do HCPA.
3. Doutor. Professor do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia da FAMED-UFRGS. Chefe da Unidade de Cirurgia Craniomaxilofacial do Serviço de Cirurgia Plástica do HCPA
4. Doutor. Médico contratado do Serviço de Ortopedia e Traumatologia do HCPA. Responsável pelo Banco de Tecidos do HCPA.
5. Doutor. Professor Titular de Patologia da FAMED-UFRGS. Professor do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia da FAMED-UFRGS.
6. Professor Adjunto de Cirurgia Plástica da FAMED-UFRGS. Chefe do Serviço de Cirurgia Plástica do HCPA..
7. Médico Residente em Cirurgia Plástica. Monitor da Disciplina de Cirurgia Experimental da FAMED-UFRGS.

Endereço para correspondência

Rua Marquês do Pombal, 250, s 301.

Bairro Moinhos de Vento, Porto Alegre, RS, Brazil. CEP 90540-000

fone/fax: 51 32224370, e-mail: acpoliv@terra.com.br

RESUMO

O objetivo deste experimento é comparar, em um modelo experimental de cirurgia craniomaxilofacial, o comportamento de ossos processados e armazenados pelos métodos de liofilização e a congelação profunda, com o enxerto autólogo. Trinta ratos Wistar adultos foram divididos em três grupos submetidos à cranioplastia com reconstrução com enxerto ósseo. O grupo 1 recebeu homoenxertos congelados, o grupo 2 recebeu homoenxertos liofilizados e o grupo 3 foi reconstruído com enxertos autólogos frescos. Os animais foram sacrificados na 6ª e na 15ª semana. Os resultados foram avaliados por parâmetros macroscópicos e histopatológicos. Na primeira avaliação os grupos 1 e 3 apresentavam resultados semelhantes, enquanto o grupo 2 mostrava resultados significativamente piores em vários parâmetros avaliados. Na avaliação tardia enquanto o grupo 1 mostrou uma diminuição na neoformação óssea e na atividade osteoblástica, o grupo 2 apresentou índices significativamente maiores para estes parâmetros. O grupo 3 manteve sua proporção de osso neoformado inalterada, com uma diminuição da atividade dos osteoblastos. Conclui-se que o enxerto autólogo fresco permanece como primeira opção na reparação do esqueleto facial. Embora os enxertos homólogos tenham apresentado resultados satisfatórios, com capacidade de osteoindução e osteocondução, os enxertos homólogos liofilizados parecem ter um melhor comportamento em longo prazo.

DESCRITORES

Transplante ósseo; banco de osso; liofilização.

ABSTRACT

This experiment was designed to compare, in an experimental model of craniomaxillofacial surgery, the behavior of processed and banked bones through lyophilization with autoclave or deep-freezing with autogeneic grafts. Thirty Wistar rats were divided in three groups and submitted to cranioplasty with reconstruction using bone graft. Group 1 received deep-frozen allografts, group 2 received lyophilized allografts, and group 3 was reconstructed with fresh autografts. Four animals of each group were sacrificed at week 6. The remaining 6 were sacrificed at week 15. Results were evaluated by macroscopic and histopathologic parameters. In the first evaluation, groups 1 and 3 showed similar results, while group 2 showed significantly worse results in several parameters. In the late evaluation, group 1 showed diminished bone neoformation and osteoblastic activity, whereas group 2 showed significantly higher indexes in these parameters. Group 3 kept its proportion of neoformed bone unchanged, with a decrease in osteoblastic activity. It is concluded that fresh autografts remain as the first choice in repairing the facial skeleton. Although allografts presented satisfactory results, with osteoinductive and osteoconductive properties, lyophilized allografts appear to show a better behavior in the follow up.

KEYWORDS:

bone graft, bone bank, lyophilization.

INTRODUÇÃO

O enxerto ósseo é um dos procedimentos mais utilizados na reparação das perdas ósseas causadas por malformações congênicas faciais, ressecções de tumores, infecções ou traumas do esqueleto facial. O enxerto ósseo autólogo é considerado o melhor material para este propósito e pode ser obtido de zonas doadoras apropriadas no mesmo ato operatório ^{1,2,3,4}.

A grande maioria dos enxertos utilizados na cirurgia craniomaxilofacial é autólogo, retirado da calota craniana, que por ser de origem embriológica semelhante a maioria dos ossos da face, apresenta índices superiores de integração ^{1 2 3 5 6 7}. A retirada do enxerto autólogo tem morbidade associada, seja da calota craniana ou de sítios fora do esqueleto craniofacial ^{3 8}. Nas situações de extenso déficit ósseo ou quando é necessário diminuir tempo e morbidade cirúrgica, o uso de enxerto homólogo deve ser considerado ^{2 6 7}.

Os modelos animais demonstram que a incorporação dos homoenxertos é dependente da intensidade da resposta imunológica mediada por células e da reação antígeno-anticorpo que ocorrem a partir do transplante e que diminui com a remoção da porção celular do osso. Por outro lado, a presença dos componentes orgânicos é importante para promover a osteoindução. Isto torna a escolha do processo de armazenamento e de seleção do enxerto mais complexa e representa uma área de crescente pesquisa ⁹.

A congelação profunda e a liofilização são os métodos de processamento mais utilizados nos dias atuais ¹⁰. A congelação profunda é uma técnica simples. Geralmente é recomendada para o armazenamento até 5 anos, porém este tempo baseia-se em conhecimentos empíricos de sucesso ^{9 11}. A maior vantagem do osso congelado é sua simplicidade de preparação e armazenamento. Requer poucos recursos físicos. Diminui, mas não elimina, o risco de transmissão bacteriana e viral para o receptor e a antigenicidade do enxerto ^{11 12}.

A liofilização tem sido utilizada nos últimos 50 anos, tornando-se um dos métodos de preservação de osso e tecido colágeno de resultados mais satisfatórios ⁵. Suas vantagens são a diminuição marcada da antigenicidade do homoenxerto e do risco de transmissão de doenças, aumentando a disponibilidade de doadores e a praticidade do armazenamento e manuseio trans-operatório do enxerto. Após a liofilização o tecido pode ser armazenado a temperatura ambiente por longos períodos e transportado facilmente ⁵

A tarefa de quem utiliza procedimentos de enxerto ósseo é escolher o enxerto correto para o meio biológico e mecânico onde este será colocado ^{STEVENSON GALIA}. A existência de estudos avaliando o comportamento, especificamente na cirurgia craniomaxilofacial, das diferentes formas disponíveis de ossos de banco, permitirá um maior uso destes nas cirurgias reconstrutoras e estéticas da face, seja como enxertos ou associados ao desenvolvimento da bioengenharia e células troncos ^{8 14}.

O objetivo deste trabalho é comparar o comportamento de ossos processados e armazenados pelos métodos disponíveis em nosso meio, liofilização com autoclavagem e congelação profunda, com o enxerto autólogo em um modelo de cirurgia craniomaxilofacial.

MÉTODOS

Este estudo foi realizado na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Participaram deste projeto os Serviços de Cirurgia Plástica, Ortopedia e Traumatologia do HCPA, através da Unidade de Cirurgia Craniomaxilofacial e do Banco de Ossos, respectivamente, e o Departamento de Patologia da FAMED da UFRGS.

Foram utilizados 37 ratos adultos da raça Wistar com peso entre 350 e 400g.

Grupo doador: sete animais foram os doadores primários de enxertos ósseos para o estudo. Foram submetidos a uma craniectomia para remoção de fragmento de calota craniana medindo 0,8 x 1,0 cm. Estes animais foram submetidos à eutanásia após o procedimento.

Os 30 animais restantes foram divididos em 3 grupos com 10 ratos cada, assim denominados: *Grupo 1:* cada animal foi submetido a uma craniectomia semelhante as do grupo doador e recebeu um fragmento de osso homólogo congelado sobre o defeito criado cirurgicamente. *Grupo 2:* cada animal recebeu um fragmento de osso homólogo liofilizado sobre o defeito criado. *Grupo 3:* estes animais tiveram fragmentos de sua calota craniana removidas como as do grupo doador, porém o fragmento foi recolocado no local de origem após sua retirada.

Os fragmentos ósseos retirados do grupo 1 e 2 eram utilizados para enxertia nos animais operados subseqüentemente.

Os fragmentos de calota removidos do grupo doador e dos grupos 1 e 2 foram processados e armazenados de forma randomizada por congelação profunda ou liofilização.

Enxerto homólogo congelado: metade dos fragmentos ósseos preparados foi armazenada pelo método de congelação profunda (-80°C) sem esterilização de acordo com o protocolo do banco de ossos do Serviço de Ortopedia e Traumatologia do HCPA. Cada fragmento acondicionado em duplo frasco estéril, e mantido em freezer especial a -80°C. Duas horas antes da utilização, os enxertos eram colocados em solução de cefalotina e soro fisiológico com 50mg/ml.

Enxerto homólogo liofilizado: a segunda metade dos fragmentos ósseos foi armazenada pelo processo de liofilização seguindo, igualmente, o protocolo do banco de ossos do Serviço de Ortopedia e Traumatologia do HCPA.

Todos os procedimentos cirúrgicos, inclusive a retirada dos enxertos ósseos, realizaram-se sob cuidados estritos de assepsia. A técnica anestésica consistiu de injeção intraperitoneal de fentobarbital sódico na dose de 30 mg/Kg de peso, complementada com infiltração local de solução de lidocaína 2% com adição de adrenalina numa concentração de 1:200000. Antibioticoterapia profilática foi feita na indução anestésica com 15.000 UI de Sulbactam-trimetropin intramuscular.

A anti-sepsia do campo cirúrgico foi feita com solução de clorexidina a 2%.

Os enxertos de calota craniana foram removidos por meio de incisão em “U” na pele do rato com pedículo occipital, incisando o perióstio (figura 1). Uma craniectomia de 0,8 x 1,0 cm foi feita em todos os animais com broca de corte, sob irrigação contínua (figura 2). Cada animal, randomizado, recebeu um enxerto ósseo sobre o defeito criado. Após a colocação do transplante, a incisão cirúrgica foi suturada com fio de náilon monofilamentar 4-0.

No período pós-operatório os animais foram mantidos em gaiolas com ciclos de 12 horas de luz, com acesso à água e a comida *ad libitum*.

Os animais foram submetidos à eutanásia na 6ª (quatro animais) e 15ª (seis animais) semana pós-operatória, sua calota craniana removida e encaminhada para a avaliação histopatológica (figura 3).

Avaliação macroscópica do enxerto

Os enxertos foram avaliados semiquantitativamente em escores, no momento da sua remoção, quanto a sua aderência ao leito receptor ou aspecto macroscópico do enxerto, como segue:

- (4) ausência de osso;
- (5) não aderido ao leito receptor, consistência coloidal ou aspecto necrótico;
- (6) facilmente removido ou aspecto cartilaginoso;
- (7) fortemente aderido, com rigidez e consistência preservadas.

Esta observação foi feita por dois observadores independentes.

Avaliação histopatológica

A avaliação histológica realizou-se por um mesmo patologista e pelo autor em microscópio de co-observação, mascarados quanto ao tipo de enxerto. Os enxertos foram descalcificados e seccionados na sua porção média. Após ter-se definido o corte mais representativo de cada lâmina, observaram-se três áreas de interesse definidas: as duas extremidades e a secção média do enxerto. A avaliação foi semi-quantativa em escores definidos de 0 a 3.

Os parâmetros avaliados foram:

Neoformação óssea, seguindo o critério abaixo: (0) ausência de trabéculas ósseas neoformadas; (1) trabéculas finas; (2) trabéculas isoladas, ocupando entre 1/3 e 2/3 do campo; (3) trabéculas espessas, ocupando mais de 2/3 do campo.

Atividade osteoblástica (presença de osteoblastos); (0) atividade inexistente; (1) menos de 1/3 das trabéculas com osteoblastos; (2) entre 1/3 e 2/3 das trabéculas com osteoblastos; (3) mais de 2/3 das trabéculas com osteoblastos. *Absorção do enxerto*; (0) ausência de áreas de lise óssea; (1) reabsorção de até 1/3 do enxerto; (2) reabsorção entre 1/3 e 2/3 do enxerto; (3) reabsorção de mais de 2/3 do enxerto.

Os enxertos ainda foram avaliados pela presença ou não de medula óssea viável e quantitativamente por: *número absoluto de osteoclastos* no campo com maior número de osteoclastos em cada área de interesse (aumento de 100 x); *número de vasos por campo* (aumento de 100 x).

Avaliação estatística

A análise estatística consistiu em uma descrição dos escores média \pm desvio-padrão e avaliação do efeito dos fatores em estudo, período de avaliação e grupo, pela análise de variância fatorial com duplo critério de classificação, permitindo a apreciação de um fator de interação. Os testes utilizados foram todos confirmados pela ANOVA aplicada sobre a transformação em "rank" dos dados ^{MONTGOMERY}. Na comparação entre os grupos para a variável dicotômica viabilidade da medula óssea utilizou-se o teste exato de Fischer com ajuste de valor p pelo método de Finner-Bonferroni. Considerou-se um valor $p \leq 0.05$ como significativo. Os dados foram processados e analisados com o auxílio dos programas PEPI v. 3.0 e SPSS v. 10.0.

O projeto foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais pela Comissão Científica e Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

RESULTADOS

Dos animais operados, um morreu devido à laceração e sangramento do seio sagital como complicação do procedimento cirúrgico. Não houve perdas no período pós-operatório tardio nem complicações como infecção ou necrose do retalho.

Na avaliação macroscópica da 6ª semana, o grupo 2 apresentou um pior resultado ($p < 0,04$) caracterizado por fraca aderência ao leito receptor ou aspecto cartilaginoso, enquanto os grupos 1 e 3 já se encontravam fortemente aderidos ao leito receptor, com aspecto viável. Na 15ª semana já não existiam diferenças entre os grupos e, macroscopicamente, todos os enxertos estavam incorporados ao osso receptor.

Na microscopia, a neoformação óssea (gráfico 1), permaneceu estável no grupo 3 nas diferentes semanas, enquanto o grupo 2 teve um aumento e o grupo 1 apresentou uma diminuição nos escores ($p < 0,03$). Quando comparados na 15ª semana, as diferenças entre eles não se mostraram estatisticamente significativas.

A atividade osteoblástica (figura 4) também variou de acordo com o enxerto e o tempo, estabelecendo um comportamento diferente para cada grupo ($p < 0,01$). Enquanto os grupos 1 e 3 tiveram uma diminuição acentuada, maior no primeiro, os liofilizados apresentaram escores que foram maiores na 15ª semana (gráfico 2). Os animais comparados na avaliação mais tardia apresentaram diferenças significativas dependendo do tipo de enxerto ($p < 0,03$).

As médias de absorção do enxerto (figura 5) não tiveram uma variação significativa, mostrando uma diminuição no grupo 2 e aumento nos grupos 1 e 3 ($p > 0,05$). O número de osteoclastos por campo foi influenciado significativamente pelo tempo ($p < 0,05$) com uma discreta interação com o tipo de enxerto. Manteve-se estável nos grupos 2 e 3 e diminuiu no grupo 1. O comportamento dos diferentes tipos de enxerto quanto ao número de vasos (gráfico 3) foi dependente do enxerto e do tempo de evolução ($p < 0,01$), com decréscimo nos enxertos congelados e elevação nos autólogos, mantendo-se estável nos liofilizados. A viabilidade da medula óssea variou basicamente entre os grupos. O grupo 3 sempre manteve maior positividade ($p < 0,05$). Nos outros parâmetros analisados os enxertos tiveram padrões de comportamento que não variaram significativamente.

DISCUSSÃO

O desejo de trabalhar com osso membranoso por sua reconhecida superioridade quando empregado no esqueleto facial levou os autores a utilizarem o modelo animal semelhante ao utilizado por Collares e cols.¹⁶ e Zellin e cols.¹⁷, ambos na reconstituição de defeitos na calota craniana de ratos. A preservação de retalho periosteal e a mínima mobilidade do sítio receptor permitiram ao enxerto integrar-se sem que fosse necessário algum tipo de fixação interna ou externa. Embora vários experimentos^{2 18} mostrem que a fixação rígida produz melhores resultados que a fixação não rígida, os resultados obtidos no grupo 3, o grupo autólogo, foram compatíveis com a literatura, e confirmam a correção do modelo utilizado.

Os períodos de observação foram determinados na tentativa de privilegiar fases distintas da integração do enxerto. Na avaliação inicial, fixada em seis semanas, esperava-se que os fenômenos de neoformação óssea estivessem em plena atividade, e na avaliação tardia, na 15ª semana, esperava-se verificar a fase de conclusão da incorporação óssea. Experimento animal similar refere um período de 12 semanas como adequado para a completa integração e revascularização dos enxertos autólogos¹⁷. Isto se mostrou verdadeiro nos enxertos autólogos, porém os grupos congelado e liofilizado ainda mostravam variações importantes em alguns parâmetros avaliados.

A avaliação macroscópica feita por dois observadores independentes baseou-se em escores adaptados de experimentos anteriores de Almeida e cols.¹ e Silva e cols.⁷, mostrando-se confiável pela comparação estatística. Apesar do primeiro ter utilizado osso desmineralizado, o aspecto cartilaginoso ou de osso inviável do enxerto liofilizado também foi observado neste experimento, só que num período mais tardio (6 semanas) do que o relatado por aqueles autores. Os outros grupos tiveram comportamento semelhante nos vários experimentos mantendo seu aspecto e consistência. Entretanto, na avaliação de 15 semanas não havia diferença macroscópica entre os enxertos, todos pareciam viáveis e integrados ao osso receptor, resultados, semelhantes a outros estudos publicados^{4 8 10}.

Os parâmetros histopatológicos foram escolhidos baseados em trabalho realizado por Ferreira² com o objetivo de determinar a intensidade da neoformação óssea (osso neoformado e atividade dos osteoblastos) e a atividade osteolítica (absorção do enxerto, espessura do osso e número de osteoclastos). Vários autores^{7 18 19} citam a neovascularização do enxerto como parâmetro confiável para estimar sua viabilidade, neste sentido determinou-se o número de vasos por campo. A avaliação de três pontos

distintos do enxerto, sugerida por Ferreira ² e Zellin e cols.¹⁷, teve como finalidade uma avaliação global da resposta de cada osso transplantado.

A avaliação microscópica confirmou o padrão de integração óssea dos enxertos autólogos, reforçando sua indicação como primeira opção nas reconstruções do esqueleto facial ^{1 2 8 16}. Os enxertos avaliados na 6ª semana já estavam vascularizados, melhorando ainda mais este padrão de vascularização entre os períodos. A proporção de osso neoformado era significativa nesta primeira fase, com neoformação intramembranosa e perivascular, reafirmando a capacidade osteogênica e osteoindutiva do enxerto autólogo. A presença de osteoblastos nas trabéculas neoformadas e na periferia do enxerto era acentuada. Nos animais sacrificados na 15ª semana esta atividade havia diminuído, mas a neoformação óssea manteve-se inalterada sem mostrar sinais de reabsorção do enxerto ou aumento significativo no número de osteoclastos. Isto permite concluir que neste momento o enxerto autólogo estava completamente integrado com equilíbrio entre produção e reabsorção óssea. Apesar disto, ainda permaneciam áreas de osso necrótico entre as trabéculas neoformadas, o que não altera a estrutura e resistência do enxerto ^{2 19}.

O homoenxerto congelado na 6ª semana apresentava um padrão de integração muito próximo do enxerto autólogo, com um número significativo de vasos e escores para neoformação óssea e atividade dos osteoblastos altos. Entretanto, nos animais avaliados tardiamente, houve uma diminuição da intensidade da vascularização do enxerto que se acompanhou de diminuição da presença de osteoblastos e na proporção de osso neoformado. Embora acompanhada de uma diminuição no número de osteoclastos, houve um discreto aumento no índice médio de reabsorção do enxerto. Esta degradação não osteoclástica do osso foi também observado por Zellin e cols.¹⁷ e Thorén e cols.²⁰ em estudos anteriores. Poderia-se creditar esta piora nos parâmetros do osso congelado a algum tipo de reação imunológica entre o hospedeiro e o enxerto ^{10 21} ou à diminuição da vascularização e mineralização ²¹. O presente estudo indicou um decréscimo no número de vasos dos homoenxertos congelados, concordando com os achados da literatura, o que não foi observado nos outros grupos. Embora nos pareça possível, não podemos confirmar a participação de agentes de histocompatibilidade neste fenômeno.

O grupo liofilizado mostrou nítido retardo na incorporação quando comparado aos outros grupos. Na avaliação inicial, apesar de já haver ocorrido o surgimento de vasos, havia pequena quantidade de osteoblastos e de osso neoformado que era principalmente subperiosteal. Os escores de reabsorção óssea foram elevados. No grupo avaliado com

mais tempo de evolução, o número de vasos aumentou acompanhado de uma elevação significativa na atividade dos osteoblastos e na proporção de osso neoformado. As propriedades osteoindutivas e osteocondutivas dos enxertos liofilizados e desmineralizados estão bem documentadas e têm sido utilizadas com sucesso clinicamente ^{8 18 22}. Os enxertos liofilizados mineralizados são basicamente osteocondutivos, não sendo capazes de induzir neoformação óssea quando implantados heterotopicamente ²³. Apesar destas observações, alguns autores têm descrito o osso liofilizado não desmineralizado como osteoindutivo ²². Pode-se teorizar, segundo alguns estudos ^{22 24}, que fatores de crescimento, incluindo as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), que são sabidamente osteoindutivas, são liberados durante a reabsorção osteoclástica do implante. Isto pode explicar o atraso no início da incorporação do enxerto liofilizado quando comparado aos outros grupos no presente estudo. A presença de osso neoformado subperiosteal e perivascular (figura 6) indica sua capacidade de osteocondução e sugere uma atividade osteoindutiva, respectivamente. Apesar da avaliação tardia indicar uma tendência de melhores resultados no longo prazo, somente estudos com seguimentos maiores permitirão afirmar se esta é uma tendência verdadeira ou se ocorrerá um decréscimo nesta performance como o que ocorreu nos enxertos congelados. Judas e cols. ²⁴ mostram resultados contrários, mas em estudos de tempo de avaliação ainda mais curtos.

A força de torção e a elasticidade diminuem com o processo de liofilização ^{4 12}, além disto, como foi observado à macroscopia, este enxerto passam um período prolongado com alterações na sua consistência. Embora outros autores ^{6 12 25} relatem que a liofilização aumenta a rigidez e a resistência à compressão do enxerto, a utilização de enxertos liofilizados como enxertos estruturais deve ser feita com cautela.

A presença de medula óssea viável variou basicamente entre os grupos. Os enxertos autólogos apresentaram 100% de positividade, muito superior aos outros grupos. Este pode ser um dos fatores que explicaria a superioridade destes enxertos, concordando com os autores que defendem que mesmo a pequena fração das células transplantadas que permanece viável no auto-enxerto desempenha papel importante no seu processo de integração ¹⁸.

A extração da gordura do tecido ósseo melhora a integração do enxerto congelado ^{20 24}. Este efeito parece ser consequência de uma diminuição da resposta imunológica provocada, uma vez que o desengorduramento, também utilizado na liofilização, não

alterou a incorporação dos enxertos autólogos. Estes achados sugerem fortemente que uma resposta imunológica a antígenos de histocompatibilidade pode ser importante ²⁰.

Podemos concluir que dos enxertos estudados, o autólogo é o melhor para repor as perdas ósseas na cirurgia craniomaxilofacial. Entretanto os enxertos homólogos processados por congelação profunda ou liofilização apresentam resultados satisfatórios na reparação destas falhas ósseas. Os achados sugerem um melhor desempenho dos enxertos liofilizados no longo prazo quando comparados aos congelados, mas mais estudos são necessários para confirmar esta tendência.

BIBLIOGRAFIA

1. Almeida OM, Alonso N, Buchipiguel C, Pinheiro EA, Ferreira MC. Enxerto ósseo membranoso e endocondral: estudo comparativo e cintilográfico de perda de volume. *Rev Soc Bras Cir Plást* 1995; 10:53-8.
2. Ferreira JCR. Avaliação cintilográfica e histopatológica de transplantes ósseos autógenos, homogêneos frescos e homogêneos congelados do arco zigomático: estudo experimental em coelhos [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Escola Paulista de Medicina – Univ. Federal de São Paulo; 1997.
3. Kline Jr RM, Wolfe SA. Complications associated with harvesting of cranial bone grafts. *Plast Reconstr Surg* 1995 Jan; 95(1): 5-20.
4. Nather A, Thambyah A, Goh JCH. Biochemical strength of deep-frozen versus lyophilized cortical allografts. *Clin Biomech* 2004; 19:526-33.
5. Angermann P, Jepsen OB. Procurement, banking and decontamination of bone and collagenous tissue allografts: guidelines for infection control. *J Hosp Infect* 1991; 17: 159-69.
6. Conrad EU, Ericksen DP, Tencer AF, Strong DM, Mackenzie AP. The effects of freeze-drying and rehydration on cancellous bone. *Clin Orthop Rel Res* 1993; (290): 279-84.
7. Silva ABD, Rodrigues L, Jorgetti W, Besteiro JM, Ferreira MC, Reis LM. Retalho ósseo pré-fabricado com osso homogêneo: estudo da maturação óssea em um modelo experimental. *Acta Cir Bras* 2000; 15(3S): 65-8.

8. Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Evaluation of platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone in the rabbit cranium. *Clin Oral Impl Res* 2005; 16:250-7
9. Aho AJ, Hirn M, Aro HT, Heikkilä JT, Meurman O. Bone bank service in Finland: experience of bacteriologic, serologic and clinical results of the Turku Bone Bank. *Acta Orthop Scand* 1998; 69: 559-65.
10. Malinin T, Temple HT. Comparison of frozen and freeze-dried particulate bone allografts. *Cryobiology* 2007; 55:167-70.
11. Hardin CK. Banked bone. *Otolaryngol Clin North Am* 1994; 27: 911-25.
12. Macedo CAS, Galia CR, Silva ALB, César PC, Sanches PRS, Duarte LS. Comparação à resistência do osso bovino congelado e liofilizado. *Rev Bras Ortop* 1999; 34(9-10):529-34.
13. Stevenson S, Emery SE, Goldberg VM. Factors affecting bone graft incorporation. *Clin Orthop Rel Res* 1996; (323): 66-74.
14. Ilgenli T, Dündar N, Kal BI. Demineralized freeze-dried bone allograft and platelet-rich plasma versus platelet-rich plasma alone in infrabony defects: a clinical and radiographic evaluation. *Clin Oral Invest* 2007; 11:51-9.
15. Montgomery DC. Design and analysis of experiments. 2nd ed. New York (NY): John Wiley & Sons; 1984.
16. Collares MV, Kuyven CR, Edelweiss MI, Gross P, Colvero M, Fraga R. Comparison of hidroxyapatite cement and porous hidroxyapatite for cranioplasty in rats. *Braz J Craniomaxillof Surg* 1998; 1(1):16-8.
17. Zellin G, Alberius P, Linde A. Autoclaved bone for craniofacial reconstruction: effects of supplementation with bone marrow or recombinant human fibroblast growth factor-2. *Plast Reconstr Surg* 1998 Sep; 102(3): 792-800.
18. Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. *Clin Orthop Rel Res* 2000; (371): 10-27.
19. Albrektsson T. Repair of bone grafts: a vital microscopic and histological investigation in the rabbit. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1980; 14: 1-12.
20. Thorén K, Aspenberg P, Thorngren KG. Lipid extracted bank bone. *Clin Orthop Rel Res* 1995; (311): 232-46.

21. Leunig M, Demhartner TJ, Sckell A, Fraitzi CR, Gries N, Schenk RK. Quantitative assessment of angiogenesis and osteogenesis after transplantation of bone. *Acta Orthop Scand* 1999; 70(4): 374-80.
22. Lohmann CH, Andreacchio D, Köster G, Carnes Jr DL, Cochran DL, Dean DD. Tissue response and osteoinduction of human bone grafts in vivo. *Arch Orthop Trauma Surg* 2001; 121(10): 583-90.
23. Piattelli A, Scarano A, Corigliano M, Piattelli M. Comparison of bone regeneration with the use of mineralized and demineralized freeze-dried bone allografts: a histological and histochemical study in man. *Biomaterials* 1996; 17:1127-31.
24. Judas F, Figueiredo MH, Cabrita AMS, Proença A. Incorporation of impacted morselized bone allografts in rabbits. *Transplant Proc* 2005; 37:2802-4.
25. Cornu O, Libouton X, Naets B, Godts B, Van Tomme J, Delloye C et al. Freeze-dried irradiated bone brittleness improves compactness in an impaction bone graft model. *Acta Orthop Scand* 2004; 75(3):309-14.