

Implante ósseo liofilizado. Estudo experimental em cobaias

(1) Américo Marques
(2) João Bosco Freire Leite
(2) Francisco Marziona
(2) José Magrin
(2) Francisco Fonseca

(3) Osvaldo Giannotti Filho
(4) Fernando Moreira
(2) Donizetti Ramos
(2) Roberto Campos
(5) Fernando Gentil

RESUMO: Os autores estudaram experimentalmente o implante ósseo liofilizado. Utilizaram 20 cobaias que receberam osso liofilizado, implantando-o no osso parietal esquerdo.

Os animais foram sacrificados em lotes de 3 aos 15, 45, 90, 180 e 360 dias de pós-operatório e avaliados clinicamente, macroscópica, microscópica e radiologicamente.

Infecção foi observada em 5 animais que evoluíram para óbito.

No estudo radiológico aos 15 dias, os animais mostraram radiotransparência da área implantada. Aos 45, 90 e 180 dias houve evidentes sinais de tecido ósseo neoformado, estando aos 360 dias as áreas implantadas totalmente ocluídas por tecido radiopaco semelhante aos ossos receptores. Estes mesmos fatos foram comprovados na microscopia óptica.

Introdução

Os transplantes ósseos têm sido utilizados, clinicamente, para preencher soluções de continuidade deste tecido, como nas fraturas, processos destrutivos artrodeses, deformidades congênicas e adquiridas, além de luxações, paralisias e em periodontia^(2,5,7,8,10).

DUBAU et al.⁽¹⁾ e KREUZ et al.⁽⁴⁾ foram os primeiros a pesquisar os implantes ósseos liofilizados, cujo método foi bem descrito por FLOSDORF e HYATT⁽³⁾, onde submetem o fragmento ósseo a congelamento abaixo de 35°C e desidrataram-no pelo vácuo.

DUBAU et al.⁽¹⁾ e KREUZ et al.⁽⁴⁾ foram os primeiros a mostrar regeneração em 90% dos casos e

ainda NARANG et al.⁽⁸⁾, usando implante liofilizado em periodontia, notaram tempo menor de neoformação óssea quando comparado a osso autógeno.

A falta de vivência em nosso meio, com o osso liofilizado e seu comportamento biológico, levou-nos a esquematizar o presente estudo.

Material e método

Colheram-se 20 fragmentos ósseos isentos de periosteio, a partir de calotas cranianas de cobaias, com motor de Odontologia marca WH de média rotação. O procedimento foi executado com cuidados de assepsia e antisepsia.

Os fragmentos ósseos foram colocados em frascos

Trabalho realizado no Centro de Pesquisas Haroldo Levy do Instituto Central da Fundação Antonio Prudente.
Médico-Titular do Centro de Pesquisas Haroldo Levy do Instituto Central da Fundação Antonio Prudente. Professor Assistente Regente da Disciplina de Oncologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Católica de Campinas.
Pesquisador do Centro de Pesquisas Haroldo Levy do Instituto Central da Fundação Antonio Prudente.
Médico-Titular do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo da Fundação Antonio Prudente.
Radiologista do Hospital 9 de Julho.
Diretor do Departamento de Cirurgia Pélvica do Instituto Central — Hospital A. C. Camargo da Fundação Antonio Prudente.

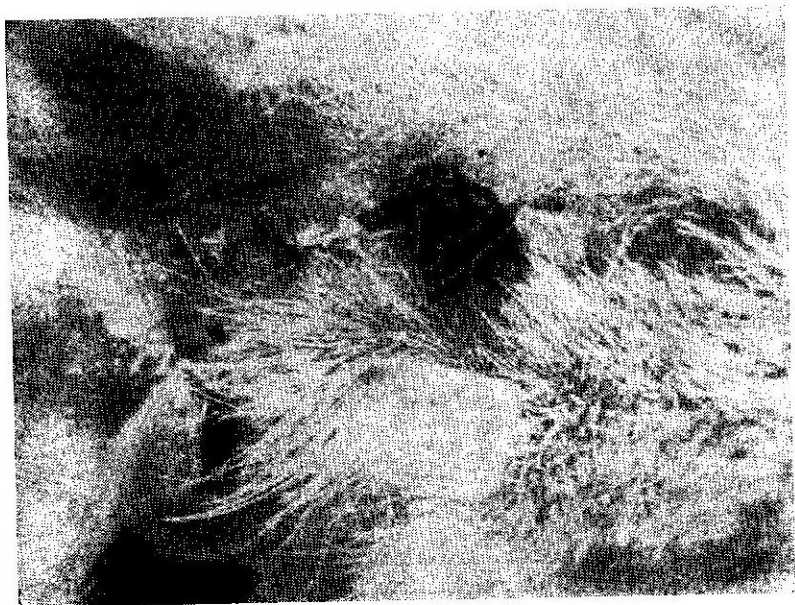


Fig. 1 — Implants ósseo liofilizado.
Presença de infecção e eliminação.

Fig. 2 — Observação radiológica dos
implantes liofilizados.
(A) — (15.^o dia) — área translúcida do
implante; (B) e (C) — (45.^o e 90.^o dias
respectivamente) sinais de neoformação
óssea; (D) — (180.^o dia) neoformação
óssea ocupando grande parte da área
transplantada. Em (E) — (360.^o dia) —
radiotransparência de toda calota
craniana, não se diferenciando a área
implantada.

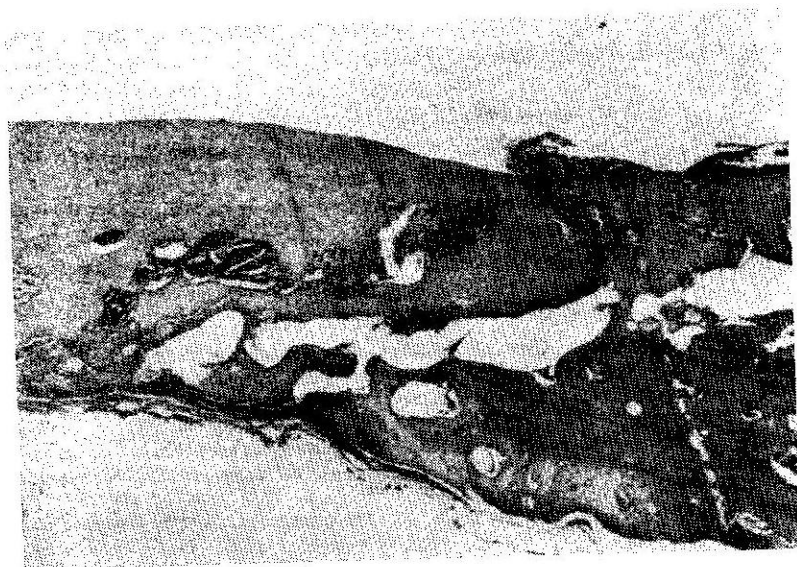
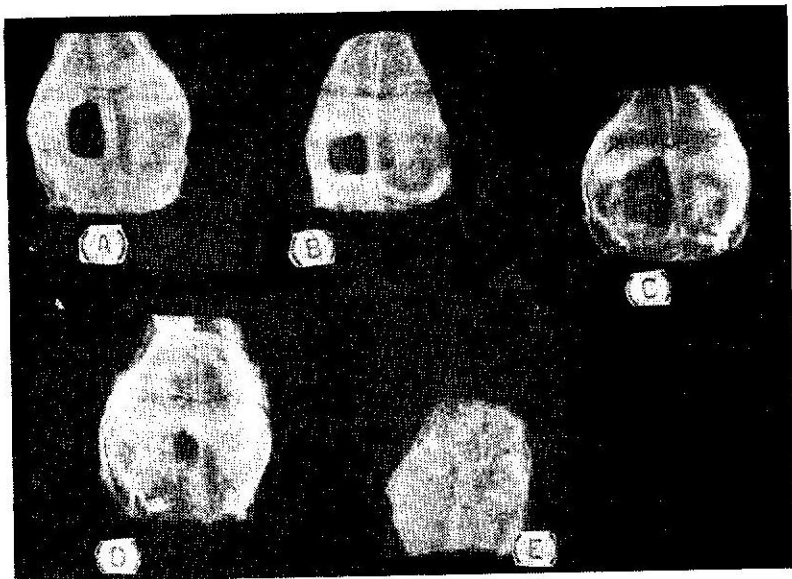
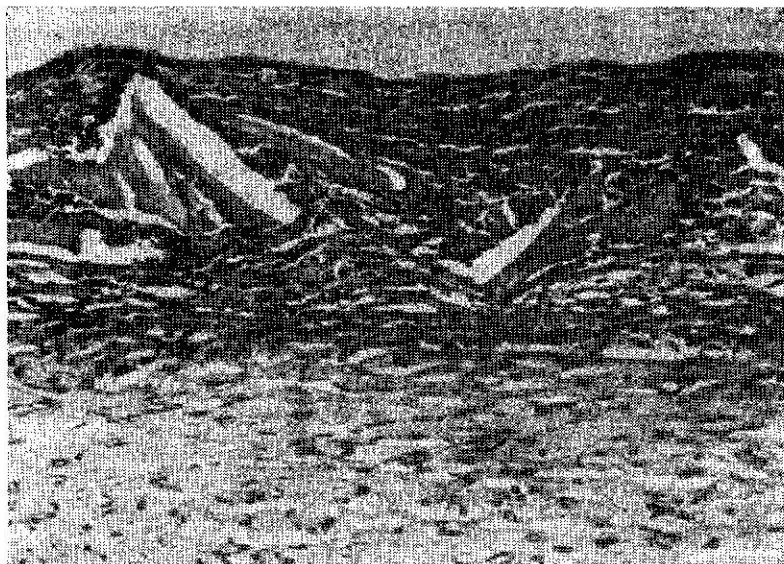


Fig. 3 — Observação pela microscopia
óptica do 15.^o dia de pós-operatório.
(H.E., 100 x).

Fig. 4 — Observação pela microscopia óptica do 90.º dia de pós-operatório — intensa fibrose com infiltrado linfocitário e nítidos sinais de reabsorção óssea. (H.E., 100 x)



estéreis, fixados em formol a 10% e submetidos a descalcificação pelo ácido fórmico a 5% por um período de 24 a 72 horas.

A liofilização consistiu em colocá-los em frascos de vidro contendo álcool etílico a 96° GL, à temperatura de -50°C no congelador Shell Freezer Usifroid, durante 30 minutos. A seguir, foram transportados para o liofilizador, onde em 15 minutos atingiram a temperatura de -40°C. O vácuo ideal era obtido em torno de 100 mμ no liofilizador, devendo a temperatura do produto manter-se abaixo de -40°C. Em seguida, realizou-se o aquecimento gradativo, durante um período de 48 horas, elevando-se a temperatura a 4°C. O aparelho foi descarregado desfazendo-se o vácuo para gás neutro (nitrogênio) estéril.

Técnica operatória

Foram utilizados 20 cobaias machos como receptores, com idade aproximada de 4 meses e de peso entre 300 a 400 g.

Os animais foram anestesiados por injeção intra-peritoneal de pentobarbital sódico, na dosagem de 30 mg/kg de peso corpóreo, colocados em decúbito ventral, após tricotomia da cabeça e antisepsia, e submetidos a incisão cutânea mediana parietal e dissecação sub-periosteal, rechaçando-se os músculos temporais e expondo-se a calota craniana. Foi retirado um quadrilátero do osso parietal esquerdo e preenchida esta solução de continuidade com o transplante ósseo liofilizado, previamente hidratado em solução salina fisiológica. Este foi fixado às costas de ponto em U, com fio de "nylon" monofilamentado 6-0 entre os dois músculos temporais superficiais, seguido da sutura da pele.

A avaliação dos transplantes foi praticada por observação clínica, macroscopia, radiologia e microscopia óptica.

A ferida operatória foi observada clinicamente com atenção à infecção, hematoma, deiscência e seqüestro ósseo.

Para o estudo da macroscopia, da radiologia e da microscopia óptica, os animais foram sacrificados em lotes de 3 cobaias no 15.º, 45.º, 90º, 180º e 360º dias de pós-operatório, quando então, foram ressecadas as calotas cranianas.

As calotas cranianas foram fixadas em formol a 10%, descalcificadas pelo ácido fórmico a 5% por período de 24 a 72 horas, submetidas à inclusão em parafina e coradas pela hematoxilina-eosina para o estudo da microscopia óptica do osso receptor, do implante e da linha de transição entre eles.

Para o estudo radiológico, as calotas cranianas foram radiografadas em aparelho com anódio de molibdênio.

Resultado

Na avaliação clínica dos 20 animais observou-se em 5 deles: infecção, deiscência e seqüestro ósseo (Fig. 1), evoluindo para óbito.

No estudo pela radiologia, notou-se aos 15 dias, áreas dos implantes translúcidas e aos 45, 90 e 80 dias evidentes sinais de tecidos ósseos neoformados. Aos 360 dias as áreas transplantadas encontravam-se totalmente preenchidas por tecidos de radiodensidade semelhante ao osso receptor (Fig. 2).

A observação pela microscopia óptica, revelou aos 15 dias de pós-operatório, ausência de núcleos nos implantes exceto nas suas extremidades, próximo à linha de transição, com aspecto de tecido neoformado, além de septações de tecido fibrilar nas áreas limítrofes (Fig. 3). Nos implantes do estudo de 45 dias, havia discreta fibrose com infiltrado histiocitário unindo-os às calotas cranianas, além de congestão intensa e ausência de sinais de vitalidade no plante. Nas observações de 90 dias, os implantes apresentavam intensa fibrose com infiltrado linfocitário revestindo toda sua porção inferior, unindo as duas extremidades dos implantes, além de evidentes sinais de reabsorção óssea (Fig. 4). Aos 180 dias notava-se fibrose nos locais implantados e

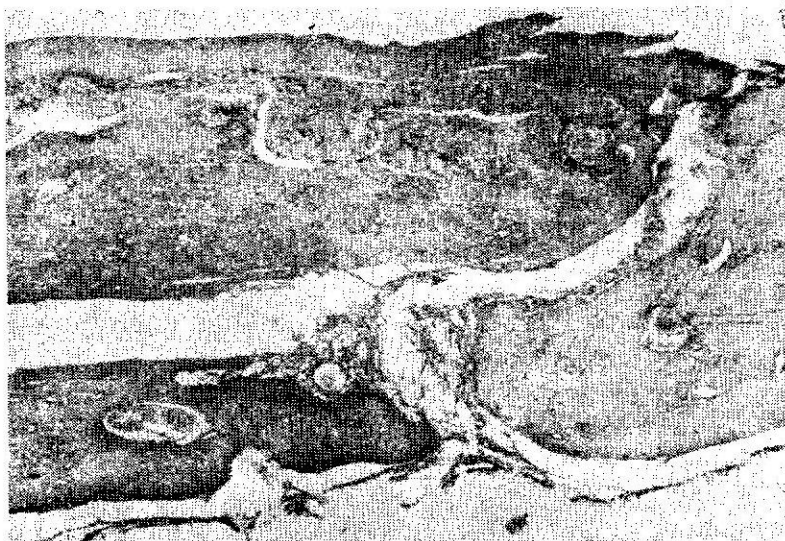


Fig. 5 — Observação pela microscopia óptica do 180.^o dia de pós-operatório — fibrose com ossificação metaplásica. (H.E., 100 x)

ossificação metaplásica (Fig. 5). No estudo de 360 dias, as áreas transplantadas encontravam-se totalmente ocupadas por osso normal com medula e pouca fibrose.

Discussão

O comportamento radiológico do osso liofilizado aos 15 dias de pós-operatório, mostrando-se radiotransparente, foi devido a descalcificação sofrida pelo osso, previamente à liofilização. A presença de radiopacidade vista nas observações seguintes foi consequente da neoformação provavelmente oriunda em ordem decrescente do periósteo, medular e cortical; utilizando o transplante como matriz ou ponte de crescimento.

O osso liofilizado mostrou uma capacidade de induzir a formação óssea pelo hospedeiro, mais rápida do que os ossos preservados em outros meios como a glicerina pura, álcool ou mesmo aqueles autólogos ou homólogos frescos ^(6,9).

O processo utilizado na liofilização não foi esterilizante, fato observado com a infecção em 5 implantes, sugerindo que este método de preservação deva ser acompanhado para tratamento do tecido ósseo

por uma solução bactericida ou bacteriostática. Dado este que poderá servir de base para futuros estudos, associando-se a liofilização a um meio armazenador em soluções preservadoras da desidratação e ainda esterilizantes. Talvez isto possa ser obtido às custas do armazenamento em glicerina.

SUMMARY

The authors have experimentally studied freeze-dried bone implant in guinea-pigs.

The left parietal bone of twenty animals was implanted with freeze-dried bone.

The guinea-pigs were killed in groups of three each, on the 15th, 45th, 90th, 180th and 360th post-operative day, at which time clinical evaluation with microscopy and radiology was carried out.

Infection was the cause of 5 deaths.

The radiological bone study on the 15th post-operative day showed radiotransparency of the implanted area. Evidence of bone neoformation was visualized on the 45th, 90th and 180th post-operative day while, on the 360th day, there was complete restoration. Microscopically the same results were observed.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DUBAU, R.; MEUNIER, J. P.; DEMARTY, R. & HENAFF, F. — Une nouvelle méthode de conservation des greffons osseux par dessiccation sous vide à partir de l'état congelé (lyophilisation). *Presse méd.* 60: 1402, 1952.
2. EPEKER, B. N.; WOLFORD, L. M. & WEST, R. A. — The use of freeze-dried bone in middle-third advancements. *Oral Surg.* 42: 278, 1976.
3. FLOSDORF, W. W. & HYATT, G. W. — The preservation of bone grafts by freeze-drying. *Surgery* 31: 716, 1952.
4. KREUZ, F. P.; HYATT, G. W.; TURNER, T. C. & BASSETT, A. L. — The preservation and clinical use of freeze-dried bone. *J. Bone Jt Surg.* 33-A: 863, 1951.
5. LIBIN, B. M.; WARD, H. L. & FISHMAN, L. — Decalcified lyophilized bone allografts for use in human periodontal defects. *J. Periodontol.* 46: 51, 1975.
6. MARQUES, A.; LEITE, J. B. F.; MARZIONA, F.; GIANNOTTI, O. F.; MOREIRA, F. A.; ABRAO, F. S.; GENTIL, F. C.; MAGRIN, J. & ERLICH, D. H. — Osso homólogo conservado em glicerina: estudo experimental em cobaios. *Rev. Paul. Med.* 95: 14, 1980.
7. MOREIRA, F. E. G. — Indicações dos transplantes ósseos em cirurgia ortopédica, São Paulo, 1939. (Tese da Faculdade de Medicina da USP).
8. NARANG, R.; REUBEN, M. P.; HARRIS, M. H. & WELLS, H. — Improved healing of experimental defects in the canine mandible by grafts of decalcified allogenic bone. *Oral Surg.* 30: 151, 1970.
9. NASSER, A. & PERES, N. C. — Enxertos ósseos conservados em álcool: trabalho experimental, resultados clínicos. *Rev. Ass. Méd. Bras.* 11: 477, 1965.
10. STAMATIN, S. I.; MARIN, I. M. & VUKOLOVA, V. V. — Reconstructive bone surgery for benign bone tumors and some precancerous bone conditions. *Ortop. Traum. Protez.* 10: 25, 1974.
11. URIST, M. R. — Bone formation by autoinduction. *Science* 190: 893, 1965.