

# ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM ENXERTO DE OSSO HOMÓGENO PREPARADO E ARMAZENADO COM DUAS TÉCNICAS DIFERENTES<sup>1</sup>

Alfredo Benjamin Duarte da Silva<sup>2</sup>, Leandro Rodrigues<sup>3</sup>,  
Wanda Jorgetti<sup>4</sup>, Júlio Moraes Besteiro<sup>5</sup>, Marcus Castro  
Ferreira<sup>6</sup>, Carolina Gomes Gonçalves<sup>7</sup>, Luciane Machado dos  
Reis<sup>8</sup>

---

Duarte da Silva AB, Rodrigues L, Jorgetti W, Besteiro JM, Ferreira MC, Gonçalves CG, dos Reis LM. Alterações histológicas em enxerto de osso homogêneo preparado e armazenado com duas técnicas diferentes. Acta Cir Bras 2000; 15 (supl 3): 74-77.

**RESUMO:** Esta pesquisa analisa as alterações histológicas de enxerto ósseo homogêneo preparado de diferentes modos. Em um grupo, ossos metatársicos-I de ratos foram armazenados a -70° Celsius e em outro grupo, os ossos foram descalcificados e estocados em temperatura ambiente após terem sido liofilizados. Esses ossos foram enxertados nas regiões inguinais de ratos e retirados para estudo histológico no trigésimo dia de pós-operatório. Macroscopicamente os ossos não descalcificados e armazenados a -70°C estavam envoltos por uma cápsula delgada, facilmente desprendida e apresentavam consistência de osso cortical. Microscopicamente observou-se absorção da superfície endosteal com diminuição da camada cortical e aumento da cavidade medular. A cortical estava sofrendo processo de reabsorção e a superfície óssea externa possuía uma cápsula fibrosa delgada e células inflamatórias. Os ossos descalcificados e liofilizados, na macroscopia, apresentavam-se de consistência amolecida e estavam envoltos por uma cápsula espessa e firmemente aderida. Microscopicamente, a maior parte da arquitetura óssea estava preenchida por material acelular e avascular, muito semelhante à cartilagem e envolvendo o tecido, uma cápsula fibrosa espessa com células inflamatórias. Portanto, existiam diferenças histológicas dos enxertos ósseos homogêneos, dependendo do preparo e do armazenamento do osso.

**DESCRITORES:** Liofilização. Ósseo-integração. Transplante ósseo. Ratos

Duarte da Silva AB, Rodrigues L, Jorgetti W, Besteiro JM, Ferreira MC, Gonçalves CG, dos Reis LM. Histological alterations in homogenous bone graft with two techniques of preparation and storage. Acta Cir Bras 2000; 15 (supl 3): 74-77.

**SUMMARY:** This research analyzes histologic alterations in allogenic bone graft from rats which were prepared in two different ways. In one group (n=6), metatarsic-I bones not descalcified were stored at -70°C. In the other (n=6), the bones were desmineralised and freeze-drying. The bones were grafted into the groin region of rats and studied 30 days after. In the macroscopic evaluation, the bones not descalcified and stored at -70°C were surrounded by a thin capsule with consistency of cortical bone. Microscopically, it was observed reabsorption of endostal area with a decrease in the cortical thickness, and increase in the intracortical cavity. The bones descalcified and freeze-drying, in a macroscopic evaluation, were surrounded by a thick capsule and the consistency of the bone was softened. Microscopically, the bone showed a tissue without cells and vases, which was very similar to cartilage; and a thick and fibrous capsule with inflammatory cells. Therefore, there were histologic differences in the allogenic bone grafts, and these differences depend on the way the bone was prepared and stored.

**SUBJECT HEADINGS:** Freeze drying. Bone transplantation. Osseointegration. Rats.

---

## INTRODUÇÃO

Enxerto ósseo é o tecido ósseo sem vascularização, transplantado para outra região com a finalidade de reconstruir perdas do esqueleto causadas por traumas, infecções e ressecções de tumores<sup>7</sup>. Ele pode ser: autógeno; homogêneo ou xenógeno. Tanto o autógeno quanto o homogêneo têm sido amplamente utilizados na prática cirúrgica; já o xenógeno, por apresentar grande resposta antigênica, é menos empregado<sup>1</sup>.

As perspectivas de utilização do enxerto homogêneo aumentaram após Urist (1965) ter observado formação de osso quando se realizava transplante de fragmentos ósseos sem células<sup>13</sup>. Isto se deve ao fato de que substâncias originárias do tecido ósseo transplantado em forma de enxerto têm a capacidade de induzir células mesenquimais do hospedeiro a se transformarem em osteoblastos, esse processo foi denominado de osteoindução<sup>4,7,10</sup>. Essas substâncias são proteínas conhecidas como "bone morphogenetic proteins" (BMPs)<sup>13</sup>.

Existem várias técnicas de preparo do osso homogêneo para enxerto, todas com o objetivo de diminuir a antigenicidade do osso e evitar a destruição das proteínas osteoindutoras<sup>10,11,12</sup>. O enxerto ósseo pode ser esponjoso ou cortical, utilizado a fresco ou armazenado congelado em diferentes temperaturas<sup>11,12</sup>, parcial ou totalmente desmineralizado<sup>1,6,8</sup>. Pode, ainda, ser submetido ao processo de liofilização e estocado em temperatura ambiente<sup>11,12</sup>. Estes métodos causam diferenças biológicas durante a incorporação óssea, que parecem influenciar no sucesso da enxertia óssea homogênea<sup>1,6,8,11,12</sup>.

Embora os conceitos de enxertia homogênea sejam bastante difundidos, os centros que utilizam esse procedimento para reconstrução óssea não apresentam um consenso no padrão de preparo e armazenamento desses ossos.

Tendo em vista esses fatos, o objetivo deste trabalho é estudar, em ratos, as alterações histológicas de enxerto de osso homogêneo preparado e armazenado com duas técnicas diferentes: osso não descalcificado e armazenado a  $-70^{\circ}\text{C}$  e osso descalcificado e armazenado em temperatura ambiente após liofilização.

## MÉTODOS

O animal de experimento foi o rato Wistar-Furth, macho, adulto, pesando entre 350 e 450 gramas. Após as cirurgias, os ratos que foram submetidos a enxertia do osso homogêneo permaneciam em gaiolas unitárias, com temperatura e luminosidade controladas e dieta "*ad libitum*".

De 6 animais foram retirados os ossos metatársicos-I das patas traseiras, totalizando 12 ossos, os quais foram divididos em dois grupos: grupo 1 (n=6), onde os metatársicos foram unicamente congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$ ; grupo 2 (n=6), no qual os metatársicos foram descalcificados e liofilizados. Posteriormente, esses ossos foram enxertados, como osso homogêneo, nas regiões inguinais direita e esquerda de outros seis ratos. A região inguinal direita foi receptora de osso do grupo 1 e a região inguinal esquerda de osso do grupo 2. Após, trinta dias os enxertos foram retirados e submetidos a estudo histológico.

A indução anestésica foi realizada com pentobarbital sódico intraperitoneal, na dose de 30 mg/kg, e a manutenção com doses fracionadas de 10 mg/kg, quando necessário.

Foi realizada incisão longitudinal da pele da face interna de ambas as patas traseiras dos ratos e retirados os ossos metatársicos-I, dos quais foi removido o perióstio com lâmina de bisturi com auxílio de microscópio cirúrgico. As incisões das patas traseiras foram fechadas com dois pontos separados, subdérmicos, de fio monofilamentar de náilon 6-0.

Para a realização do enxerto de osso homogêneo foi realizada incisão de 3,5 cm em ambas as regiões inguinais. No subcutâneo da região inguinal direita era enxertado o osso homogêneo congelado e no subcutâneo da região inguinal esquerda era enxertado o osso homogêneo descalcificado-liofilizado. As incisões eram fechadas como já descrito.

### **Preparo do osso homogêneo**

Após a retirada dos ossos metatársicos da pata traseira dos ratos de ambos os grupos, os mesmos foram limpos de tecidos adjacentes com o auxílio de microscópio. A seguir os ossos foram estocados em geladeira a  $-70^{\circ}$  Celsius. Na segunda semana, os ossos do grupo 2 foram descongelados e submetidos a desmineralização. Este processo foi realizado através de banhos

químicos que estão descritos no [quadro 1](#), sendo o último passo a liofilização do osso por 2 horas.

Quadro 1 - Técnica utilizada para preparo dos ossos do grupo 2

Armazenamento transitório dos ossos em congeladores	Temperatura de -70° C 2 semanas
Solução clorofórmio-etanol 1:1	4 horas
HCl (0,6 N)	4 horas
Solução clorofórmio-etanol 1:1	4 horas
HCl (0,6 N)	4 horas
CaCl (2,0 M)	4 horas
EDTA (0,5M) – pH 7,4	4 horas
LiCl (8.0 M)	4 horas
Liofilização	2 horas

### Preparo histológico dos ossos

Após a retirada dos ossos da região inguinal, no trigésimo pós operatório, os mesmos foram fixados em álcool a 70%. As amostras foram processadas sem descalcificação e embebidas em metilmetacrilato. De cada caso foram realizadas quatro lâminas com dois cortes de cinco micrômetros, coradas com azul de toluidina (pH 6,8). Por fim, as lâminas foram estudadas com auxílio de microscópio óptico.

## RESULTADOS

A macroscopia dos ossos do grupo 1 (não descalcificados e congelados a -70°C) mostrou que estes estavam envoltos por uma cápsula fibrosa delgada. Apresentavam consistência endurecida como a observada em osso cortical. Já os ossos do grupo 2 (descalcificados e liofilizados) estavam envoltos por uma cápsula fibrosa espessa e firmemente aderida ao osso. Sua consistência era bastante amolecida, com características de cartilagem.

Na microscopia do grupo 1, observou-se absorção da superfície endostal com diminuição da camada cortical e aumento da cavidade medular, sendo que a cortical estava sofrendo processo de trabeculação. A superfície óssea externa apresentava cápsula fibrosa e células inflamatórias que englobavam todo o tecido ósseo.

Na microscopia do grupo 2, viu-se um tecido homogêneo, que em sua maior parte era acelular e avascular, porém com limites externos precisos e semelhantes ao de osso metatársico. Em algumas poucas regiões encontrou-se presença de tecido ósseo mineralizado e a deposição de tecido osteóide. Todo esse conjunto

estava envolto por uma cápsula aderente, espessa e rodeada por células inflamatórias.

## DISCUSSÃO

Os enxertos ósseos homogêneos estão sendo utilizados na prática clínica com bons resultados<sup>1</sup>. Alguns centros médicos criaram serviços específicos, denominados de "Banco de Ossos", para o desenvolvimento dessa nova modalidade de reconstrução óssea<sup>9</sup>. Cada centro apresenta uma preferência por determinado tipo de osso, havendo controvérsias quanto ao modo de preparo e armazenamento dos mesmos<sup>1,11</sup>.

Considerando estes aspectos, este trabalho procurou estabelecer parâmetros que auxiliassem o desenvolvimento de pesquisas experimentais de enxerto homogêneo em nosso meio.

O animal escolhido para desenvolver essa pesquisa foi o rato Whistr-Furth, por ser de fácil manuseio e freqüentemente utilizado em estudos de enxerto ósseo<sup>9</sup>.

A incorporação do enxerto ósseo apresenta cinco estágios: 1) inflamatório, com aumento da atividade osteoclástica; 2) revascularização do enxerto; 3) osteocondução, na qual o enxerto tem a função de arcabouço para o crescimento de vasos e formação de osso; 4) osteoindução, na qual células mesenquimais do hospedeiro são induzidas, por proteínas (BMPs) encontradas no enxerto, a se transformarem em osteoblastos e 5) remodelação óssea, com características de formação e reabsorção contínua de osso<sup>3,5,7</sup>.

O sucesso do enxerto ósseo homogêneo está relacionado a sua atividade osteoindutora, já que o mesmo não possui células ósseas vivas para iniciar a osteogênese<sup>3,5,7</sup> e na resposta imunológica causada pela histocompatibilidade enxerto-hospedeiro<sup>10,12</sup>.

Em nosso estudo realizamos no grupo 2 a desmineralização óssea, pois as proteínas osteoindutoras (BMPs) apresentam grande atividade quando o osso é submetido a descalcificação pelo ácido clorídrico<sup>3,5</sup>.

O tempo de desmineralização óssea está relacionado com a quantidade de cálcio presente no osso e varia de acordo com o tipo de osso e animal em experimento<sup>8</sup>. Utilizamos o metatársico-I de ratos, que apresenta 70-80% do volume do osso calcificado<sup>2</sup>. Baseado na literatura que estabelece tempos de desmineralização entre 1 e 24 horas<sup>8,9</sup> e na observação das características de consistência do material durante o processo de descalcificação, estabeleceu-se um tempo médio de 4 horas de desmineralização do osso.

Outro fator que influencia na osteoindução do enxerto homogêneo é o modo de armazenamento desses ossos. No momento os métodos utilizados são a congelação do material a baixas temperaturas e a liofilização óssea<sup>10,11</sup>.

A temperatura ideal de congelação do osso é  $-70^{\circ}\text{C}$ , já que em temperaturas mais elevadas enzimas líticas permanecem ativas destruindo as propriedades osteoindutoras. Além do congelador, pode ainda ser empregado o nitrogênio líquido para obter temperaturas de até  $-179^{\circ}\text{C}$ <sup>11</sup>.

A liofilização ou "freeze-drying" para armazenamento do osso consiste no resfriamento do osso a  $-70^{\circ}\text{C}$  por um período após o qual o material é colocado em um liofilizador. Esse aparelho forma um vácuo enquanto a temperatura é mantida a  $-35^{\circ}\text{C}$ , retirando até 95% da água<sup>11</sup>. O osso pode ser armazenado em temperatura ambiente o que facilita o envio do material para hospitais de diferentes localidades<sup>1</sup>. Outra vantagem é que o tempo de armazenamento é indefinido. Ainda, a liofilização óssea diminui a resposta imunológica enxerto-hospedeiro<sup>10</sup>.

Porém, tanto a liofilização quanto a desmineralização alteram a força mecânica do enxerto, impedindo seu uso em locais do esqueleto ósseo que necessitem de grande suporte<sup>8,10</sup>.

No grupo 2, em que realizou-se a descalcificação e a liofilização do osso, observou-se, macroscopicamente, que o mesmo apresentava resistência mecânica diminuída e, conseqüentemente, pouca função de suporte. Esse dado é reforçado pela microscopia, na qual viu-se tecido avascular muito semelhante à cartilagem. É possível explicar essas alterações, já que o processo de ossificação do osso desmineralizado ocorre de maneira endocondral<sup>6</sup>.

No grupo 1, em que ossos não descalcificados foram armazenados congelados, o enxerto parecia estar sendo gradativa e lentamente absorvido por osteoclastos<sup>3,5,7</sup>. A incorporação do osso homogêneo ocorre com maior lentidão porque o enxerto desencadeia uma resposta imunológica interferindo na osteoindução e na revascularização<sup>7</sup>.

Portanto, foi nítida a diferença histológica entre o enxerto homogêneo não descalcificado e armazenado congelado quando comparado ao modelo de enxerto homogêneo descalcificado e liofilizado. Entretanto, esta pesquisa deverá ser estendida por um período superior a quatro semanas para que possam ser observados estágios mais avançados da incorporação óssea.

## CONCLUSÕES

1. Existem diferenças histológicas entre o enxerto de osso homogêneo, em ratos, armazenado a  $-70^{\circ}\text{C}$  quando comparado ao enxerto de osso homogêneo descalcificado e liofilizado .
2. O enxerto de osso homogêneo armazenado a  $-70^{\circ}\text{C}$  apresenta grande quantidade de osso mineralizado sofrendo processo de absorção no trigésimo dia após a enxertia.
3. O enxerto de osso homogêneo descalcificado e liofilizado apresenta, no trigésimo dia após a enxertia, tecido homogêneo avascular e acelular, na sua maior parte, muito semelhante a cartilagem.

## REFERÊNCIAS

1. Aro HT, Aho AJ. Clinical use of allografts. Ann Med 1993; 25: 403-12. [ [Links](#) ]
2. Baron R. Anatomy and ultrastructure of bone. In: Favus M J. Primer on the metabolic bone diseases of mineral metabolism. Virginia: Byrd Press; 1990. p.3-7. [ [Links](#) ]
3. Burchardt H. Biology of bone transplantation. Orthop Clin of North Am 1987; 18(2):187-96. [ [Links](#) ]
4. Enneking WF, Burchardt H, Puhl JJ, Piotrowski G. Physical and biological aspects of repair in dog cortical bone transplants. J Bone Joint Surg 1975; 57A:232-40. [ [Links](#) ]
5. Friedlander G. Current concepts review bone grafts. J Bone Joint Surg 1987; 69:786-90. [ [Links](#) ]
6. Glowacki J, Kaban LB, Murray JE, Folkman J, Mulliken JB. Application of the biological principle of induced osteogenesis for craniofacial defects. Lancet 1981; 1: 959-62. [ [Links](#) ]
7. Goldberg MV, Stevenson S. Natural history of autografts and allografts. Clin Orthop Rel Res 1987; 225:7-16. [ [Links](#) ]
8. Guo Z M, Xia SZ, Lin LB. The mechanical and biological properties of desmineralized cortical bone allografts in animals. J. Bone Joint Surg 1991; 73-B: 791-4. [ [Links](#) ]
9. Hallfeldt KKJ, Stutzle H, Puhlmann M, Kessler S. Sterilization of partially desmineralized bone matrix: The effects of different sterilization techniques on osteogenetic properties. J Surg Res 1995; 59:614-20. [ [Links](#) ]
10. Hobar PC, Byrd HS. Implantation: bone, cartilage and alloplasts (overview). Sel Read Plast Surg 1990; 6:1-28. [ [Links](#) ]
11. Pappas MA . Current methods of bone storage by freezing and freeze-drying. Cryobiology 1968; 4: 358-75.12. [ [Links](#) ] Prolo DJ, Rodrigo JJ. Contemporary bone graft physiology and surgery. Clin Orthop Rel Res 1985; 200: 322-42. [ [Links](#) ]
12. Tomford WW, Doppelt SH, Mandin HJ, Friedlaender GE. 1983 bone bank procedures. Clin Orthop 1983; 174: 15-21. [ [Links](#) ]
13. Urist M. Bone formation by osteoinduction. Science 1965; 150:893-9. [ [Links](#) ]

## NOTAS

- [1.](#) Trabalho realizado na Disciplina de Cirurgia Plástica e Queimaduras da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
- [2.](#) Mestre em Cirurgia Plástica e Preceptor da Residência de Cirurgia Plástica do Hospital Univeritário Cajuru.
- [3.](#) Acadêmico de Medicina.
- [4.](#) Doutora em Medicina da USP, Médica da Disciplina de Nefrologia da USP, responsável pelo laboratório de Doenças Ósseas da USP.
- [5.](#) Titular da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica, Doutor em Medicina, Médico da Disciplina de Cirurgia Plástica FMUSP.
- [6.](#) Titular da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica, Doutor em Medicina, Médico da Disciplina de Cirurgia Plástica FMUSP.
- [7.](#) Acadêmica de Medicina.
- [8.](#) Mestre em Medicina pela USP.