

RETALHO ÓSSEO PRÉ-FABRICADO COM OSSO HOMÓGENO: ESTUDO DA MATURAÇÃO ÓSSEA EM UM MODELO EXPERIMENTAL¹

Alfredo Benjamim Duarte da Silva², Leandro Rodrigues³, Wanda Jorgetti⁴, Júlio Moraes Besteiro⁵, Marcus Castro Ferreira⁶, Luciane Machado dos Reis⁷, Anne Karoline Groth⁸

Duarte da Silva AB, Rodrigues L, Jorgetti W, Besteiro JM, dos Reis LM, Groth AK. Retalho ósseo pré-fabricado com osso homogêneo: estudo da maturação óssea em um modelo experimental. Acta Cir Bras 2000; 15(supl.3): 65-68.

RESUMO: As opções convencionais de tratamento de perdas ósseas, como enxertos e retalhos não são satisfatórias. Com isso uma nova categoria de retalhos, o retalho pré-fabricado (RPF), passou a ser estudada. Foram retirados 42 ossos metatársicos-I das patas traseiras de 21 ratos Wistar. O grupo I (n=21) foi descalcificado e liofilizado e o grupo II (n=21) foi não descalcificado e congelado a -70°C. Após 3 semanas os ossos foram enxertados em 21 animais sobre os vasos epigástricos inferiores nas regiões inguinal direita e esquerda, individualizados por uma lâmina de silicone. Os grupos I e II foram divididos em três subgrupos cada, de acordo com o tempo de permanência (1, 2 e 4 semanas) após a pré-fabricação do retalho. No estudo histológico macroscópico os grupos apresentaram diferenças em morfologia e consistência: o grupo I mostrou perda da arquitetura óssea e da rigidez e grupo II mantiveram sua forma, rigidez e consistência. Na análise qualitativa alterações foram observadas nos fragmentos do grupo desmineralizado e liofilizado, especialmente no subgrupo de 2 semanas. O grupo II não apresentou alteração no aspecto do tecido ósseo mineralizado entre os diversos subgrupos. É nítida a diferença histológica entre os RPF com osso descalcificado e liofilizado quando comparado ao não descalcificado e congelado. A reabsorção óssea gradual sugere que a rotação do retalho deve ocorrer precocemente. Este estudo demonstra a aplicabilidade do osso homogêneo para pré-fabricação de retalhos.

DESCRITORES: Retalhos cirúrgicos. Osteogênese. Osso. Transplante ósseo. Ratos

Duarte da Silva AB, Rodrigues L, Jorgetti W, Besteiro JM, dos Reis LM, Groth AK. Prefabricated homogenous bone flap: bone maturation study as an experimental model. Acta Cir Bras 2000; 15(supl.3): 65-68.

SUMMARY: As conventional options for bone repair are not satisfactory, a new flap category was developed, the prefabricated flap (RPF). 42 metatarsic-I bone were obtained from 21 Wistar rats, and divided in two groups: group I (n=21) the bones were freeze-dried and decalcified and group II (n=21) was frozen to - 70° C. After 3 weeks the bones were grafted in 21 rats, onto the left na right inferior epigastric vessels wrapped in silicon sheet. Groups I and II were subdivided in 3 groups each, following the period of permanence (1,2 or 4 weeks). In macroscopic histologic study, group I revealed loss of bone architecture and group II manteined its consistency and shape. In quantitative analysis, alterations were observed in group I, mainly inthe 2 weeks group. There is a histologic difference in prefabricated bone flaps betwenn groups I and II. Gradual bone reabsorption suggests that the flap should be rotated early. This study shows the applicability of homogenous bone for flap prefabrication.

SUBJECT HEADINGS: surgical flaps. Osteogenesis. Bone. Bone transplantation. Rats.

INTRODUÇÃO

As perdas ósseas causadas por ressecções de tumores, infecções e traumas são um desafio em cirurgia reconstrutiva⁵. As opções convencionais de tratamento são a enxertia óssea^{8,9,11}, o uso de materiais aloplásticos e a transferência de retalhos ósseos. Ainda, os enxertos de osso apresentam riscos de infecção, grau significativo de reabsorção óssea, além de uma morbidade secundária da área doadora⁴. Os materiais aloplásticos usualmente evoluem para infecção e extrusão do material¹¹ e os retalhos apresentam vantagem sobre os enxertos e materiais aloplásticos por serem nutridos por um pedículo determinado, não necessitando da vascularização do leito receptor¹². Contudo, existe número limitado de áreas doadoras, maior morbidade além de requererem técnicas cirúrgicas complexas e conseqüentes riscos⁴.

Devido a essas limitações uma nova categoria de retalhos denominados retalhos pré-fabricados (RPF)⁷ foi desenvolvida. O enxerto sobre um vaso específico é utilizado para pré-fabricar o retalho^{1,7,12}. Esta técnica é realizada por estágios: no primeiro tempo o enxerto é revascularizado pelo vaso e em segundo período, é transferido^{6,7}.

O osso homogêneo não apresenta morbidade da área doadora e esse procedimento têm sido utilizado para a pré-fabricação de retalhos. Entretanto, não se sabe em que período ocorre a revascularização para que o mesmo possa ser transferido como retalho local ou microcirúrgico. Além disso, as diferentes técnicas de preparo e armazenamento do osso homogêneo² podem influenciar no processo de maturação do retalho pré-fabricado.

O objetivo deste estudo é determinar o tempo de revascularização, evidenciando o período ideal de transferência do retalho e a

influência das diferentes técnicas de preparo e armazenamento na maturação do RPF.

MÉTODOS

O animal de experimento foi o rato Wistar-Furth, macho, adulto, pesando entre 250 e 350 gramas. Durante a pesquisa, os animais permaneceram no biotério da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade de São Paulo, em gaiolas unitárias, com temperatura e luminosidade controladas e dieta "ad libitum".

A indução anestésica dos animais foi realizada com pentobarbital sódico intraperitoneal, na dose de 30 mg/kg

De 21 ratos foram retirados os metársicos-I das patas traseiras, totalizando 42 ossos divididos em dois grupos: grupo I, grupo descalcificado e liofilizado (n=21), no qual os ossos foram submetidos ao preparo descrito no [quadro 1](#) e permaneceram armazenados em temperatura ambiente e grupo II, grupo não descalcificado e congelado (n=21), no qual os ossos foram limpos de tecido muscular e armazenados em freezer a -70°C. Os metatarsicos-I ficaram estocados por 3 semanas.

Quadro 1 - Técnica de preparo do grupo I, descalcificado e liofilizado.

Preparação	7 dias a -70°C
Clorofórmio	3 h a 4°C
Ácido clorídrico (0,6 N)	3 h a 4°C
Clorofórmio:etanol (1:1)	3 h a 4°C
Cloreto de cálcio (2,0 M)	3 h a 4°C
EDTA (0,5M)	pH 7.4 / 20 min a 4°C
Cloreto de lítio (8,0 M)	3 h a 4°C
Liofilização	8h

Após este período os ossos foram enxertados, como homogêneos, em 21 animais sobre os vasos epigástricos superficiais inferiores nas regiões inguinais esquerdas e direitas dos ratos para realização do retalho pré-fabricado. O conjunto de: osso, tecido perivascular e vasos foi separado da gordura subcutânea adjacente por fina lâmina de silicone com tamanho de 0,8 cm por 0,8 cm.

Os metatarsicos-I foram retirados das regiões inguinais do rato em diferentes períodos de pós-operatório do primeiro estágio da pré-fabricação do retalho, criando-se quatro sub-grupos do grupo I e quatro sub-grupos do grupo II.

Após a retirada da região inguinal o material foi tratado da seguinte maneira: etanol a 70%, etanol a 100%, tolueno, solução A (metil metacrilato 75% + dibutilftalato 25%), permanência do bloco em estufa a 37° C até o seu endurecimento.

Os blocos obtidos foram seccionados em cortes, seguindo o sentido longitudinal, de cada bloco foram obtidos dez cortes, e coradas duas lâminas com azul de toluidina e em uma lâmina foi realizada coloração de Von Kossa.

O estudo histomorfométrico foi realizado com microscópio. Todas as lâminas foram vistas pelo mesmo observador sem identificação quanto à origem do material examinado. Foram analisados: 1) número de vasos por campo (aumento de 125 vezes); 2) espessura cortical em micra em quatro pontos equidistantes (aumento de 50 vezes); 3) espessura inter-cortical em micra (aumento de 50 vezes); 4) espessura da fibrose em micra (aumento de 50 vezes); presença ou ausência de mineral através da coloração de Von Kossa (aumento de 50 vezes).

A comparação estatística entre os grupos foi feita com teste t-não pareado, e o teste Anova foi utilizado para avaliar as variações nos três diferentes tempos. Foram considerados significativos os níveis descritos para $p < 0.05$.

RESULTADOS

No estudo histológico macroscópico os grupos apresentaram diferenças em morfologia e consistência: o grupo I mostrou perda da arquitetura óssea e da rigidez a medida que permaneciam mais tempo, terminando por apresentar "consistência coloidal" no sub-grupo de quatro semanas; já os fragmentos integrantes do grupo não desmineralizado e congelado mantiveram sua forma, rigidez e consistência.

Na análise qualitativa alterações foram observadas nos fragmentos do grupo I, que apresentou aspecto cartilaginoso, especialmente no sub-grupo de 2 semanas (grupo 1). Após esse período o aspecto microscópico mostra um tecido desorganizado com tecido fibroso circundante. O grupo II não apresentou alteração no aspecto do tecido ósseo mineralizado entre os diversos sub-grupos.

A análise quantitativa de vasos, espessura cortical, distância intercortical e espessura da fibrose peri-osso estão expressos na [tabela 1](#).

Tabela 1 - Análise quantitativa de número de vasos por campo, espessura cortical, distância intercortical e espessura da fibrose perimetatarso.

	1ª semana		2ª semana		4ª semana	
	Grupo I (n=6)	Grupo II (n=5)	Grupo I (n=4)	Grupo II (n=7)	Grupo I (n=7)	Grupo II (n=5)
Nº vasos/campo	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,02	0,04 ± 0,003	0,04 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01
Espessura cortical (µ)	346,6 ± 18,9	345,9 ± 39,6	304,5 ± 31,0	356,4 ± 65,7	331,0 ± 12,7	330,9 ± 59,9
Distância inter-cortical (µ)	425,6 ± 77,5	567,3 ± 240,5	374,0 ± 178,2	455,7 ± 196,3	640,0 ± 11,3	447,9 ± 144,8
Espessura da fibrose perimetatarso (µ)	454,6 ± 90,3 *	440,5 ± 61,7	231,3 ± 84,3 *	297,3 ± 122,4	203,9 ± 132,6 *	312,4 ± 218,9

DISCUSSÃO

Com a utilização de retalho pré-fabricado será possível construir um retalho na forma e no local desejado⁶.

A utilização do tecido homogêneo apresenta a vantagem de não possuir morbidade e área doadora ilimitada. Porém, existem diferentes técnicas de preparo e armazenamento do osso que podem influenciar no processo de maturação do retalho ósseo pré-fabricado. Além disso, este tecido causa uma resposta imunológica enxerto-hospedeiro que pode influenciar no processo de incorporação óssea¹⁵.

Neste trabalho estudamos a maturação e vascularização, em diferentes períodos da primeira fase da pré-fabricação do retalho ósseo com enxerto de osso homogêneo preparado e armazenado de duas formas diferentes.

A incorporação do osso homogêneo apresenta cinco estágios: 1) inflamatório, promovendo uma resposta celular do hospedeiro; 2) revascularização do tecido; 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^{3,8,9}.

No grupo I foi realizada a desmineralização óssea, já que as proteínas osteoindutoras (BMPs), encontradas na matriz óssea, apresentam grande atividade quando o osso é submetido a descalcificação pelo ácido clorídrico^{3,8,9}. Provavelmente, isso ocorre devido a um maior contato das proteínas da matriz com células mesenquimais do hospedeiro e uma diminuição da resposta imunológica, em consequência de serem eliminados os restos de células ósseas e endoteliais com grande atividade antigênica¹¹.

Outro fator que influencia na osteoindução do enxerto homogêneo é o modo de estocagem desses ossos^{11,13,15}. A liofilização para armazenamento do osso consiste no resfriamento do osso a -70°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°C, retirando até 95% da água¹³. Porém, tanto a liofilização quanto a desmineralização alteram a força mecânica do osso, impedindo seu uso em locais do esqueleto que necessitem de grande suporte^{10,11,15}. Provavelmente, essa seja a causa, associado a reabsorção óssea e hidratação do tecido, que fizeram com que os ossos desse grupo se apresentassem na macroscopia com características amolecidas. Isso é reforçado pela microscopia, em que observamos tecido avascular muito semelhante à cartilagem.

No grupo II o preparo do osso consistiu na limpeza e no armazenamento em congeladores especiais, a -70°C, já que em temperaturas maiores enzimas líticas permanecem ativas destruindo as propriedades osteoindutoras^{13,15}. Neste grupo, o material ósseo manteve sua forma e característica, porém microscopicamente o tecido parecia estar sendo gradativamente e lentamente absorvido por osteoclastos, que abrem lacunas no osso calcificado por onde crescem vasos e chegam células inflamatórias^{6,11,13}. A incorporação do osso homogêneo não descalcificado ocorre com maior lentidão porque o enxerto desencadeia uma maior resposta imunológica interferindo na osteoindução e na revascularização¹⁴.

É nítida a diferença histológica entre os retalhos pré-fabricados com osso homogêneo descalcificado e liofilizado quando comparado ao não descalcificado e armazenado congelado. Porém, os resultados obtidos na análise da vascularização, associados à sugerida reabsorção óssea, apontaram a maturação vascular do retalho de ambos os grupos em 1 semana. Isso somado à reabsorção óssea gradual, sugere que a rotação ou transferência do retalho deve ocorrer precocemente, inclusive antes de que ocorra mineralização tecidual.

Os dados obtidos neste estudo reafirmam a aplicabilidade do osso homogêneo para pré-fabricação de retalhos. Entretanto, novos estudos deverão abranger o comportamento desse osso quando em contato com outro osso, a interferência de drogas imunossupressoras e fatores de crescimento na maturação e incorporação do tecido ósseo.

REFERÊNCIAS

1. Abbase E-H A, Shenaq SM, Spira M, El-Falaky MH. Prefabricated flaps: experimental and clinical review. *Plast Reconstr Surg* 1995; 96: 1218-25. [[Links](#)]
2. Barros TEP, Rossi JDMBA, Rodrigues CJ, Lage LA, Burchardt H. Biology of bone transplantation. *Orthop Clin North Am* 1987; 18(2): 187-96 [[Links](#)]

3. Colen SR, Shaw WW, McCarthy JG. Review of morbidity of 300 free flap donor sites. *Plast. Reconst. Surg* 1986; 77:948-53.
[[Links](#)]
4. Converse JM, Kawamoto Jr HK, Wood-Smith, D. Deformities of the jaws. Philadelphia: Saunders, 1977. [[Links](#)]
5. Costa H, Cunha C, Guimarães I, Comba S, Malta A, Lopes A. Prefabricated flaps for the head and neck: a preliminary report. *Brit J of Plast Surg* 1993; 46:223-7. [[Links](#)]
6. Erol OÖ. The transformation of a skin graft into a vascularized pedicle flap. *Plast Reconstr Surg* 1976; 58:470-7. [[Links](#)]
7. Friedlander G. Current concepts review bone grafts. *J Bone and Joint Surg* 1987; 69:786-90. [[Links](#)]
8. Goldberg MV, Stevenson S. Natural history of autografts and allografts. *Clin Orthop Relat Res* 1987; 225:7-16. [[Links](#)]
9. Guo ZM, 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](#)]
10. Hobar PC, Byrd HS. Implantation: bone, cartilage and alloplasts (overview). *Select Read Plast Surg* 1990; 6:1-28. [[Links](#)]
11. Khouri RK, Upton J, Shaw WW. Principles of flap prefabrication. *Clin Plastic Surg* 1992; 19:763-71. [[Links](#)]
12. Pappas MA. Current methods of bone storage by freezing and freeze-drying. *Cryobiology* 1968; 4:358-75. [[Links](#)]
13. Reis PR. Poder osteogênico dos enxertos ósseos. Estudo experimental comparativo entre enxertos autólogo, homólogo irradiado e homólogo AAA. *Rev Bras Ortop* 1989; 24:36-40.
[[Links](#)]
14. Tomford WW, Doppelt SH, Mandin HJ, Friedlaender GE. 1983 bone bank procedures. *Clin Orthop Rel Res* 1983; 174: 15-21.
[[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 Doença 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.](#) Mestre em Medicina pela USP.
- [8.](#) Acadêmica de Medicina da UFPR.