

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

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

ANTÔNIO CARLOS PINTO OLIVEIRA<sup>1</sup>, MARCUS VINICIUS MARTINS COLLARES<sup>2</sup>, CARLOS ROBERTO GALIA<sup>3</sup>,  
MARIA ISABEL EDELWEISS<sup>4</sup>, RINALDO DE ANGELI PINTO<sup>5</sup>, LIDIANA KNEIBEL<sup>6</sup>

### RESUMO

**Objetivo:** 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. **Método:** Trinta ratos Wistar adultos foram divididos em três grupos submetidos a 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. **Resultados:** 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. **Conclusão:** 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.

### SUMMARY

**Objective:** 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. **Method:** 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:** 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. **Conclusion:** 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.

**Descriptors:** Bone transplantation. Bone bank. Freeze drying.

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

Correspondência: Antônio Carlos Pinto Oliveira  
Rua Marquês do Pombal, 250, s 301. - Bairro Moinhos de Vento - Porto Alegre - RS - Brasil - CEP 90540-000 - Tel/Fax: (51) 3222-4370  
E-mail: acpoliv@terra.com.br

## INTRODUÇÃO

O enxerto ósseo é um dos procedimentos mais utilizados na reparação das perdas ósseas causadas por má formações 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<sup>1-4</sup>.

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

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<sup>9</sup>.

A congelação profunda e a liofilização são os métodos de processamento mais utilizados nos dias atuais<sup>10</sup>. 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<sup>9,11</sup>. 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<sup>11,12</sup>.

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<sup>5</sup>. 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 transoperatório do enxerto. Após a liofilização, o tecido pode ser armazenado a temperatura ambiente por longos períodos e transportado facilmente<sup>5,6,12</sup>.

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

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.

## MÉTODO

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 removidos como os 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 subsequentemente.

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.

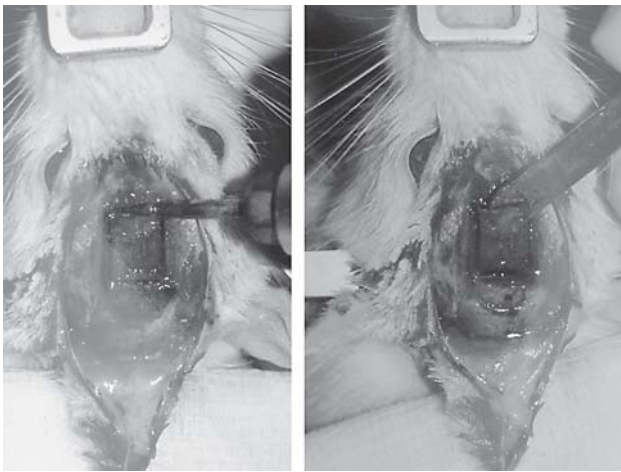
A anti-sepsia do campo cirúrgico foi feita com solução de clorohexidine a 2%.

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 (Figura 2). Cada

**Figura 1** – Elevação do retalho de pedículo occipital com exposição da calota craniana.



**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.



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 à 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:

- (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.

#### **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 semiquantitativa 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.

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



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<sup>15</sup>. Na comparação entre os grupos para a variável dicotômica viabilidade da medula óssea, utilizou-se o teste exato de Fisher 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 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.

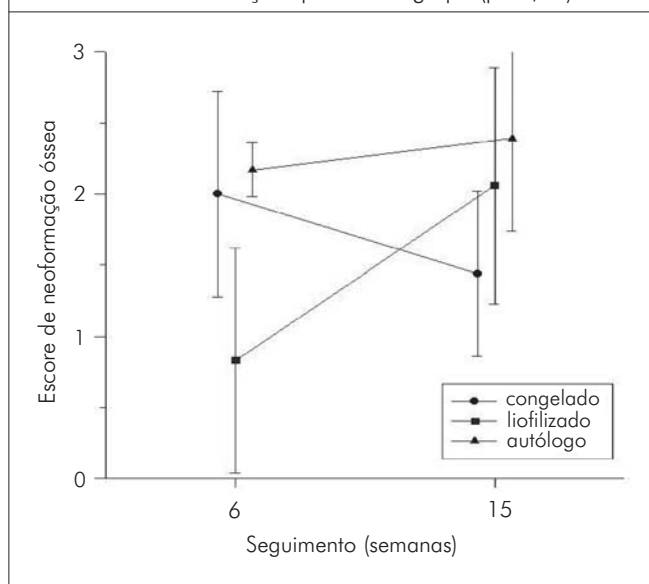
Na avaliação macroscópica da 6ª semana, o grupo 2 apresentou um pior resultado ( $p < 0,04$ ), caracterizado por fraca aderência ao leito receptor ou aspecto cartilaginoso, enquanto os grupos 1 e 3 já se encontravam fortemente aderidos ao leito receptor, com aspecto viável. Na 15ª semana já não existiam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

Na microscopia, a neoformação óssea (Figura 4), 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.

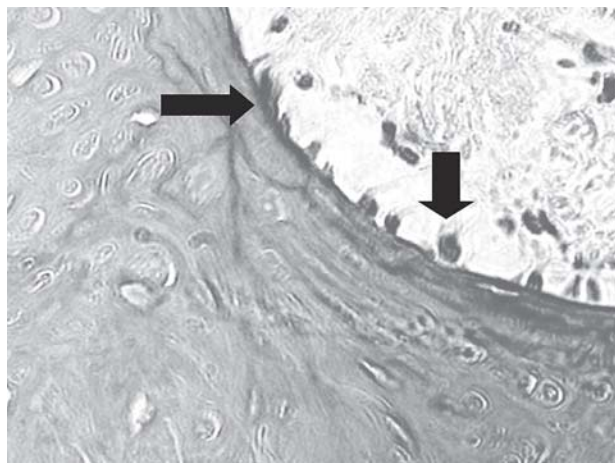
A atividade osteoblástica (Figura 5) também variou de acordo com o enxerto e o tempo, estabelecendo um comportamento diferente para cada grupo ( $p < 0,01$ ). Enquanto os grupos 1 e 3 tiveram uma diminuição acentuada, maior no primeiro, os liofilizados apresentaram escores que foram maiores na 15ª semana (Figura 6). 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 7) 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 significativa-

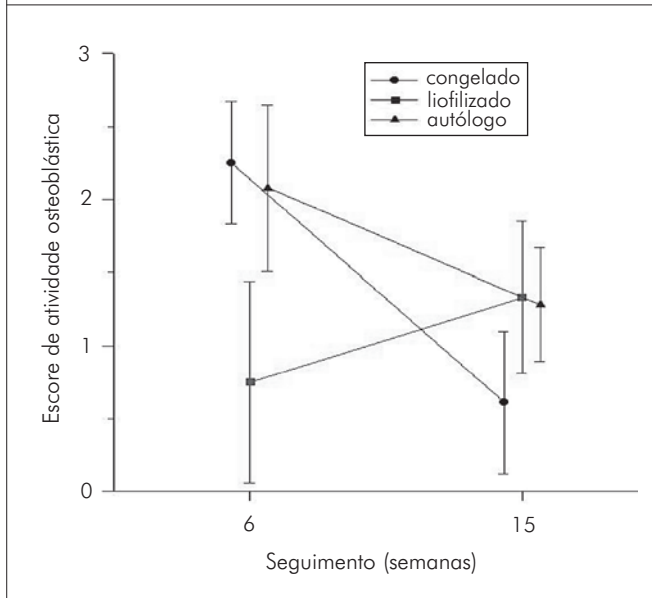
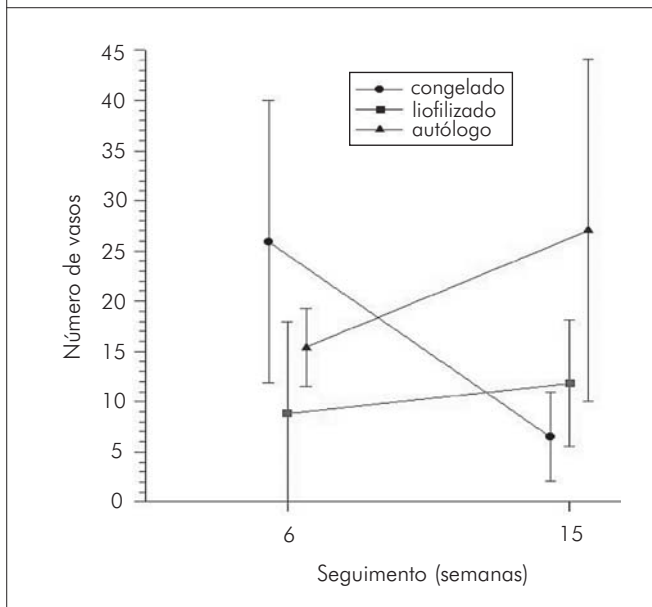
**Figura 4** – Evolução do índice de neoformação óssea médio nas duas avaliações para cada grupo ( $p < 0,03$ ).



**Figura 5** – Observação microscópica (200X) de um enxerto autólogo na 6ª semana mostrando osteoblastos (setas) em grande quantidade.

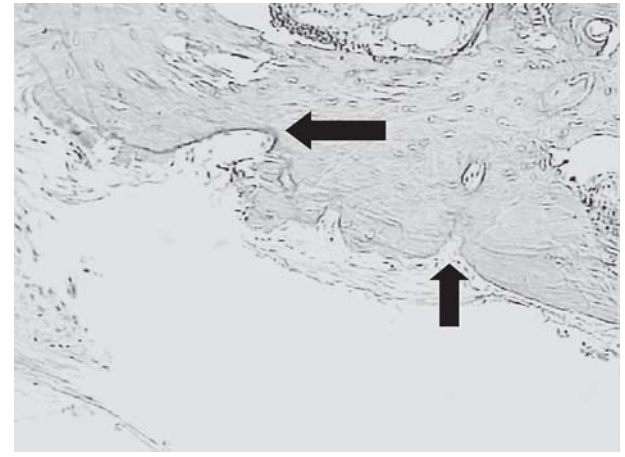


mente pelo tempo ( $p < 0,05$ ) com uma discreta interação com o tipo de enxerto. Manteve-se estável nos grupos 2 e 3 e diminuiu no grupo 1. O comportamento dos diferentes tipos de enxerto quanto ao número de vasos (Figura 8) foi dependente do enxerto e do tempo de evolução ( $p < 0,01$ ), com decréscimo 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.

**Figura 6** – Variação da atividade osteoblástica em cada grupo nos diferentes momentos (p<0,01).**Figura 8** – Variação do número de vasos por campo nos grupos com 6 e 15 semanas (p<0,01).

## 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 et al.<sup>16</sup> e Zellin et al.<sup>17</sup>, 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<sup>2,18</sup> mostrem

**Figura 7** – Espécime de enxerto liofilizado na 6ª semana mostrando à microscopia (200X) áreas de reabsorção óssea.

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 autólogos<sup>17</sup>. 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 et al.<sup>1</sup> e Silva et al.<sup>7</sup>, 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<sup>4,8,10</sup>.

Os parâmetros histopatológicos foram escolhidos baseados em trabalho realizado por Ferreira<sup>2</sup> 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<sup>7,18,19</sup> 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<sup>2</sup> e Zellin et al.<sup>17</sup>, 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<sup>1,2,8,16</sup>. 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<sup>2,19</sup>.

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 foi acompanhada 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 observada por Zellin et al.<sup>17</sup> e Thorén et al.<sup>20</sup> 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<sup>10,21</sup> ou à diminuição da vascularização e mineralização<sup>21</sup>. 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<sup>8,18,22</sup>. Os enxertos liofilizados mineralizados são basicamente osteocondutivos, não sendo capazes de induzir neoformação óssea quando implantados heterotopicamente<sup>23</sup>. Apesar destas observações, alguns autores têm descrito o osso liofilizado não desmineralizado como

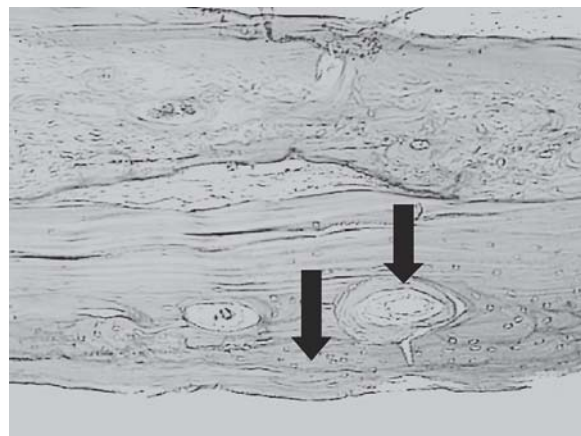
osteoindutivo<sup>22</sup>. Pode-se teorizar, segundo alguns estudos<sup>22,24</sup>, que fatores de crescimento, incluindo as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), que são sabidamente osteoindutivas, são liberados durante a reabsorção osteoclástica do implante. Isto pode explicar o atraso no início da incorporação do enxerto liofilizado quando comparado aos outros grupos no presente estudo. A presença de osso neoformado subperiosteal e perivascular (Figura 9) 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 et al.<sup>24</sup> 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<sup>4,12</sup>, além disto, como foi observado à macroscopia, este enxerto passa um período prolongado com alterações na sua consistência. Embora outros autores<sup>6,12,25</sup> relemem 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<sup>18</sup>.

A extração da gordura do tecido ósseo melhora a integração do enxerto congelado<sup>20,24</sup>. 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<sup>20</sup>.

**Figura 9** – Observação com aumento de 200X de enxerto liofilizado com 15 semanas mostrando áreas de neoformação óssea subperiosteal e peri-vascular.



Podemos concluir que, dentre os enxertos estudados, o autólogo é o melhor para repor as perdas ósseas na cirurgia craniomaxilofacial. Entretanto, os enxertos homólogos processados por congelamento 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.

## REFERÊNCIAS

- 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(1):53-8.
- 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: Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo;1997.
- Kline Jr RM, Wolfe SA. Complications associated with harvesting of cranial bone grafts. *Plast Reconstr Surg.* 1995;95(1):5-20.
- Nather A, Thambyah A, Goh JCH. Biochemical strength of deep-frozen versus lyophilized cortical allografts. *Clin Biomech.* 2004;19:526-33.
- Angermann P, Jepsen OB. Procurement, banking and decontamination of bone and collagenous tissue allografts: guidelines for infection control. *J Hosp Infect.* 1991;17(3):159-69.
- Conrad EU, Ericksen DP, Tencer AF, Strong DM, Mackenzie AP. The effects of freeze-drying and rehydration on cancellous bone. *Clin Orthop Relat Res.* 1993;290:279-84.
- 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.
- Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Evaluation of platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone in the rabbit cranium. *Clin Oral Implants Res.* 2005;16(2):250-7.
- 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(6):559-65.
- Malinin T, Temple HT. Comparison of frozen and freeze-dried particulate bone allografts. *Cryobiology.* 2007;55(2):167-70.
- Hardin CK. Banked bone. *Otolaryngol Clin North Am.* 1994;27(5):911-25.
- 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.
- Stevenson S, Emery SE, Goldberg VM. Factors affecting bone graft incorporation. *Clin Orthop Relat Res.* 1996;324:66-74.
- 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 Investig.* 2007;11(1):51-9.
- Montgomery DC. Design and analysis of experiments. 2<sup>nd</sup> ed. New York: John Wiley & Sons;1984.
- 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 Craniomaxillofac Surg.* 1998;1(1):16-8.
- 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;102(3):792-800.
- Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials: an overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res.* 2000;371:10-27.
- Albrektsson T. Repair of bone grafts: a vital microscopic and histological investigation in the rabbit. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1980;14(1):1-12.
- Thorén K, Aspenberg P, Thorgren KG. Lipid extracted bank bone: bone conductive and mechanical properties. *Clin Orthop Relat Res.* 1995;311:232-46.
- 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.
- Lohmann CH, Andreaacchio 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.
- 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(11):1127-31.
- Judas F, Figueiredo MH, Cabrita AMS, Proença A. Incorporation of impacted morselized bone allografts in rabbits. *Transplant Proc.* 2005;37(6):2802-4.
- 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.

Trabalho realizado na 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.

Trabalho realizado com verba para seus custos laboratoriais do Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE) do HCPA.

Artigo recebido: 5/8/2007

Artigo aceito: 31/10/2007