

Comparação da resistência à compressão do osso bovino congelado e liofilizado*

CARLOS ALBERTO DE SOUZA MACEDO¹, CARLOS ROBERTO GALIA², ADRIANO LUÍS BRASIL DA SILVA³, PAULO CÉSAR DE CÉSAR⁴, PAULO ROBERTO STEFANI SANCHES⁵, LUCIANO DA SILVA DUARTE⁶, LUÍS MARCELO MÜLLER⁷

RESUMO

Recorrer a banco de ossos tem sido cada vez mais necessário nos últimos anos em virtude do aumento do número de cirurgias como: tumores ósseos, artrodeses de coluna, revisões de artroplastia total de quadril e traumatismos com perda óssea. Tem-se tentado criar alternativas de enxerto ósseo, como o uso de osso liofilizado, tanto bovino quanto humano. Os processos de liofilização e o tempo de reidratação do osso antes de sua utilização transoperatória têm sido implicados na alteração das propriedades biomecânicas do osso. Este trabalho comparou a resistência à compressão *in vitro* do osso bovino congelado e do osso bovino liofilizado reidratado. Utilizaram-se cilindros de 10 x 8mm provenientes de cêndilos femorais bovinos, que foram testados em uma máquina de compressão automatizada. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados. O enxerto ósseo bovino congelado e posteriormente descongelado durante uma hora suporta as mesmas cargas compressivas e possui a

mesma razão de deformação que o osso bovino liofilizado e reidratado durante 90 minutos antes do teste ou reidratado no momento do teste. O processo conjunto de liofilização e reidratação do osso não altera as suas propriedades biomecânicas de compressão.

Unitermos – Transplante ósseo; transplante heterólogo; liofilização; biomecânica; reidratação

ABSTRACT

Compressive resistance of deep frozen and lyophilized bovine bone: comparative study

The use of bone grafting in the latest years has become even more extensive, in view of the increased incidence of surgeries such as spinal arthrodesis or revision hip arthroplasty. Much effort has been made to create graft alternatives, such as the freeze-dried bone. The procedures of freeze-drying and rehydration before graft implantation may alter its biomechanical features. The present study compares the compressive resistance of both deep frozen and lyophilized bovine bone grafts. Cylinders (10 mm x 8 mm) made out of bovine femoral condyles were tested on an automatic comparison equipment. No statistically significant difference between groups was found. Deep frozen graft one hour after defrosting supports the same compressive strengths and presents an equal deformation ratio as the freeze-dried after 90 minutes of rehydration before the test or at the moment of the test. Together, lyophilization and rehydration do not alter its bone graft biomechanical compressive characteristics.

Key words – Bone transplantation; heterologous transplantation; freeze drying; biomechanics; rehydration

INTRODUÇÃO

Os princípios, indicações e técnicas de enxerto ósseo já estavam bem estabelecidas antes mesmo da “idade metalúrgi-

* Trabalho realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Recebido em 1/7/99. Aprovado para publicação em 22/10/99.

1. Professor Adjunto do Departamento de Cirurgia da Famed-UFRGS; Chefe do Grupo do Quadril do Serviço de Ortopedia e Traumatologia do HCPA.
2. Médico Ortopedista Contratado do Serviço de Ortopedia e Traumatologia do HCPA; Mestrando em Cirurgia.
3. Médico Ortopedista.
4. Médico Residente do 4º ano do Serviço de Ortopedia e Traumatologia do HCPA.
5. Engenheiro do HCPA; Mestrando em Engenharia de Materiais.
6. Mestrando em Engenharia Metalúrgica e de Materiais.
7. Acadêmico do 6º ano da Famed-UFRGS.

Endereço para correspondência: Carlos Alberto de Souza Macedo, Av. Dr. Nilo Peçanha, 25, apto. 501 – 90470-001 – Porto Alegre, RS. Tels.: Cons.: (051) 332-4101, HCPA: (051) 316-8000, Resid.: (051) 330-0531, Cel.: (051) 986-4469, E-mail: mullerlm@portoweb.com.br

ca” da cirurgia ortopédica. A enxertia óssea tem sido usada no tratamento cirúrgico de um amplo espectro de doenças músculo-esqueléticas, como artroplastias totais, cirurgias do trauma, artrodeses vertebrais, ressecções de tumor e várias cirurgias pediátricas⁽¹⁾.

O transplante de osso alo gênico como método de tratamento de várias doenças do esqueleto começou no final do século passado. O fator limitante do transplante ósseo naquela época era seu armazenamento. Desde 1912, quando Albee iniciou o armazenamento de enxertos ósseos em locais refrigerados, estes têm sido fervidos, congelados ou agitados em solução anti-séptica para sua conservação. O desenvolvimento dessas técnicas progrediu gradualmente até que o *United States Navy Tissue Bank* introduziu o aloenxerto de osso liofilizado para cirurgia ortopédica reparativa, em 1951⁽¹⁾.

A técnica de liofilização consiste na retirada de umidade do osso, que deve ser previamente desengordurado, o que permite a possibilidade de estocagem por longos períodos. Várias vantagens e desvantagens do osso liofilizado em relação ao osso congelado foram estabelecidas. Suas vantagens são a diminuição marcada da antigenicidade do aloenxerto, o menor risco de transmissão de doenças⁽²⁾, a maior disponibilidade por ser possível o uso de doadores mortos ou membros amputados⁽³⁾, a praticidade do armazenamento e manuseio transoperatório do enxerto (armazenado em pacotes em temperatura ambiente por até quatro a cinco anos) e a mínima alteração bioquímica^(1,4).

Aproximadamente 10 a 15% das cirurgias ortopédicas realizadas nos Estados Unidos a cada ano envolvem alguma forma de enxerto ósseo⁽³⁾. Com isso, cada vez mais se faz necessária a utilização de bancos de enxerto ósseo.

A utilização de osso bovino como enxerto em seres humanos vem cada vez mais aumentando em razão dos bons resultados notados e também pela fácil obtenção e disponibilidade de grandes quantidades de enxerto⁽⁵⁻⁷⁾.

A reidratação do osso liofilizado ocorre durante os procedimentos cirúrgicos em que ele é utilizado, seja antes da colocação no paciente com soluções fisiológicas ou após implantá-lo pela embebição em sangue e líquidos orgânicos. Esse processo tem sido implicado na diminuição da resistência biomecânica do osso liofilizado quando reidratado⁽³⁾.

O objetivo deste trabalho é verificar se existe alguma diferença na capacidade de resistência à compressão entre o osso bovino congelado e descongelado durante uma hora antes do teste, liofilizado e reidratado no momento do teste e o liofilizado e reidratado durante 90 minutos antes do teste, pois, na literatura, o tempo de reidratação transoperatória não é clara-

mente definido como um fator de redução ou aumento da resistência biomecânica do osso liofilizado.

MATERIAL E MÉTODO

Foram estudados 81 cilindros de osso esponjoso, com 10mm de altura e 8mm de diâmetro, retirados de côndilos femorais de bovinos. Os cilindros foram divididos em três grupos. O grupo I foi formado por cilindros de osso congelado e posteriormente descongelado durante uma hora; o grupo II foi formado por cilindros de osso liofilizado e reidratado no momento do teste; e o grupo III foi formado por cilindros de osso liofilizado e reidratado durante uma hora e meia antes do teste.

Os cilindros foram obtidos de côndilos femorais de nove joelhos de bovinos com idades entre três e cinco anos, de raças de origem européia e oriundas de uma mesma propriedade rural, com peso corporal médio de 450kg.

O fêmur distal foi cortado no sentido transversal, na região metafisária, sendo o ponto de corte proximal uma linha imaginária a 10cm acima da linha articular do joelho e o ponto de corte distal na inserção proximal dos ligamentos cruzados (figura 1). A peça tinha então o aspecto de um paralelepípedo. As peças foram divididas em anterior, média e posterior em relação ao plano sagital e, em média, central e lateral quanto ao plano coronal, tendo, portanto, nove áreas dentro de cada paralelepípedo (peça). Cada área recebeu um número de um a nove, conforme demonstrado na figura 2.

Os cilindros de cada grupo foram extraídos das áreas delimitadas nas peças, conforme demonstrado na figura 3. Com a finalidade de formar três grupos contendo 27 amostras de tamanho uniforme e coletadas de modo que representem todas as regiões do côndilo femoral, foi realizada a seguinte distribuição das áreas de coleta das amostras:

Primeiro ao terceiro paralelepípedo: o grupo I foi composto por peças retiradas das regiões 1, 5 e 9; o grupo II, das regiões 4, 8 e 3; e o grupo III, das regiões 2, 6 e 7, conforme a figura 3A.

Quarto ao sexto paralelepípedo: o grupo I foi composto por peças retiradas das regiões 4, 8 e 3; o grupo II, das regiões 2, 6 e 7; e o grupo III, das regiões 1, 5 e 9, conforme a figura 3B.

Sétimo ao nono paralelepípedo: o grupo I foi composto por peças retiradas das regiões 2, 6 e 7; o grupo II, das regiões 1, 5 e 9; e o grupo III, das regiões 4, 8 e 3, conforme a figura 3C.

Os cilindros do grupo I foram armazenados em um *freezer* de congelação profunda da marca *Revco Scientific* modelo ULT1786-5-D14 a uma temperatura de -80°C durante sete dias.

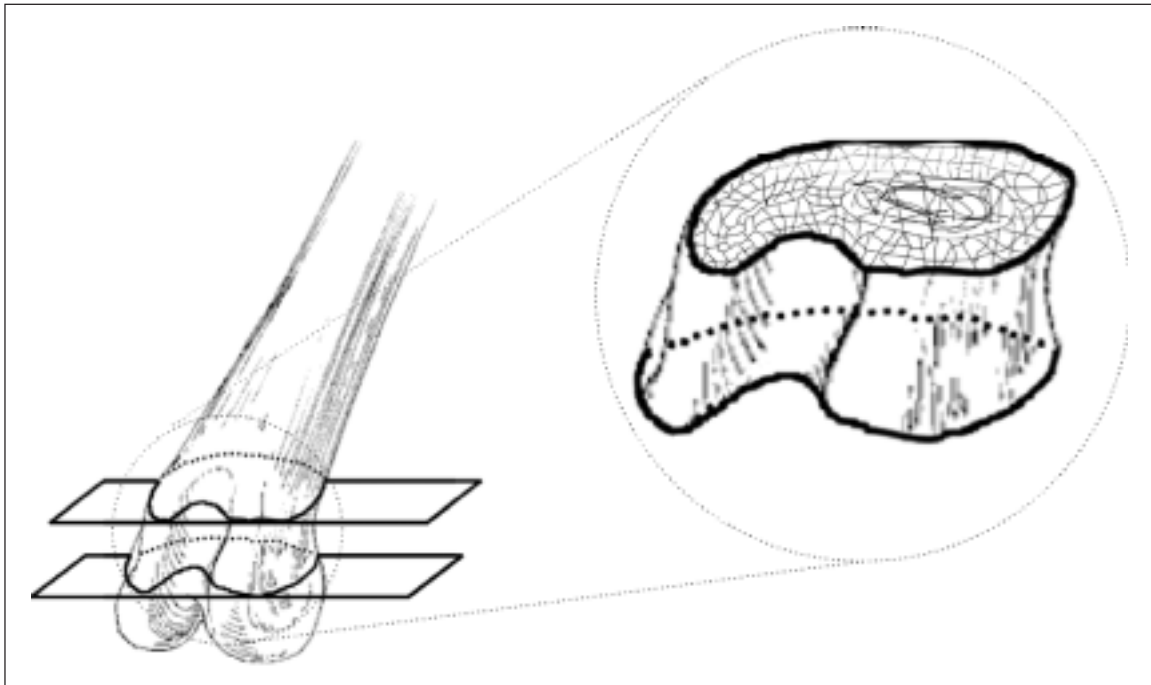


Fig. 1 – Cortes realizados no cômulo femoral e ampliação da amostra retirada

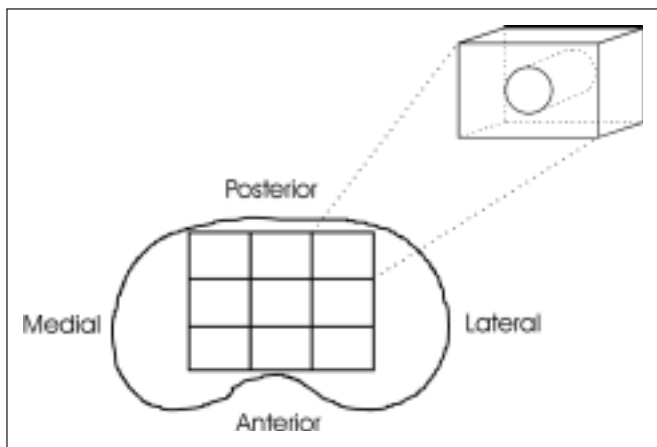


Fig. 2 – Vista da superfície articular da amostra extraída com suas áreas de divisão e demonstração da área de retirada do cilindro ósseo

Os cilindros dos grupos II e III, após congelação profunda durante cinco dias, foram processados em um banco de ossos desenvolvido no local de trabalho dos autores, baseado inicialmente no banco de ossos da Tailândia⁽⁸⁾. O processo de liofilização foi feito de acordo com o protocolo registrado sob o nº 96.285 do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do mesmo local, como se segue descrito: 1) Lavado em água filtrada; 2) Centrifugado; 3) Desengordurado em uma mistura de clorofórmio e metanol; 4) Centrifugado novamente; 5) Aerado

em contato direto com o ambiente; 6) Lavado novamente; 7) Centrifugado novamente; 8) Liofilizado a frio (-40°C) durante sete dias.

Os testes de compressão foram realizados em uma máquina de ensaios de tração e compressão marca *Kratos* modelo K-1000, com sistema de aquisição de dados controlado por um computador *AMD K5* 133 MHz, dotado de placa de aquisição *Eagle*. O software utilizado na confecção dos gráficos foi o *DIAdem* versão 3.02 da *GsFmbH* elaborado pela Universidade Aachen, Alemanha. Esses gráficos eram transferidos para o programa *Excel* versão 6.0 da *Microsoft*[®]. A partir daí, eram extraídos quatro pontos dessa curva e inseridos num programa de interpolação numérica que calculava a razão de deformação.

A figura 4 demonstra uma curva-padrão obtida em um ensaio de compressão. A variável carga compressiva máxima corresponde ao ponto A e a razão de deformação pode ser obtida a partir da inclinação dessa curva.

O grupo I foi mantido no *freezer* durante sete dias e retirado uma hora antes da realização do teste. O grupo II foi imerso em solução de NaCl (0,9%) imediatamente antes da realização do teste e o grupo III imerso durante 90 minutos em solução de NaCl (0,9%) antes da realização do teste.

A análise estatística dos resultados foi realizada com o método *ANOVA* tanto para a avaliação de carga máxima quan-

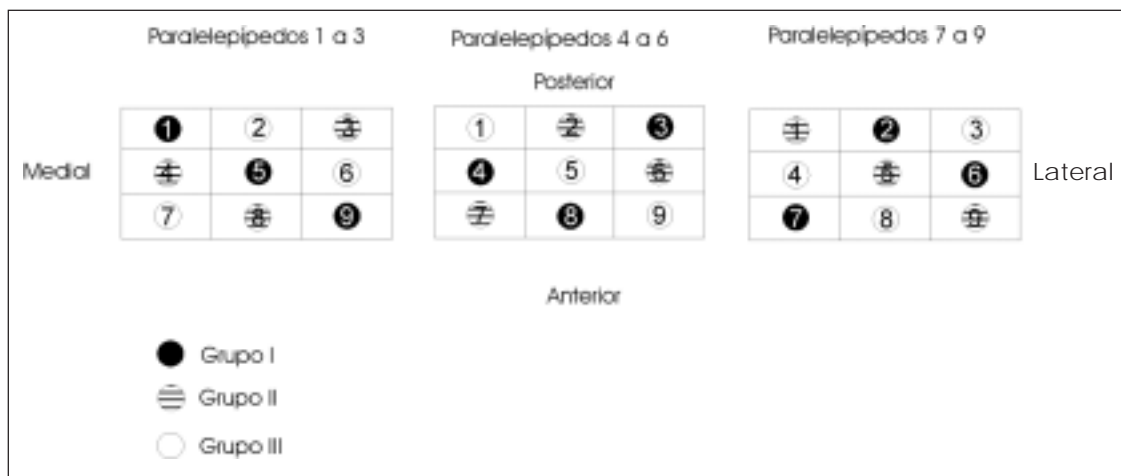


Fig. 3 – Distribuição das áreas de obtenção dos cilindros dentro dos paralelepípedos

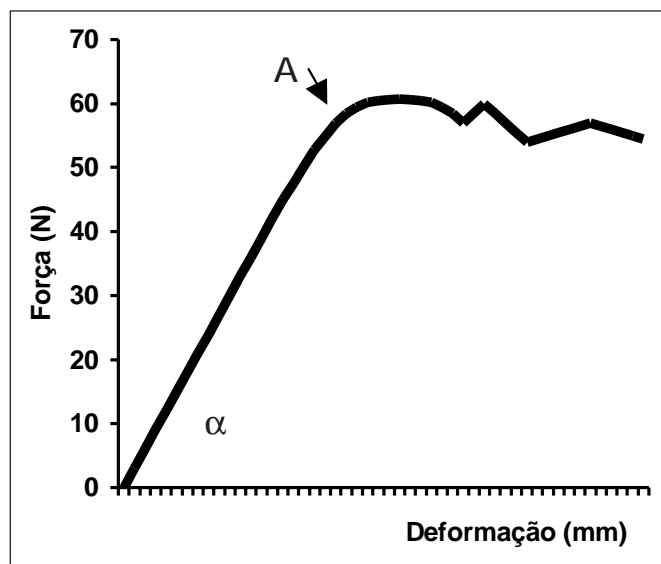


Fig. 4 – Curva padrão de deformação

to de razão de deformação, pois tínhamos duas variáveis contínuas (carga máxima e razão de deformação) e outra variável categórica (grupos I, II e III).

RESULTADOS

Na avaliação da carga máxima suportada pelos cilindros encontramos: grupo I – 46,55kgf (11,52-98,29kgf) com desvio-padrão (DP) = 25,8; grupo II – 30,90kgf (4,23-112,51kgf) com DP = 24,86; grupo III – 34,26kgf (9,05-85,6kgf) com DP = 21,7. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos avaliados ($p = 0,053$) (gráfico 1).

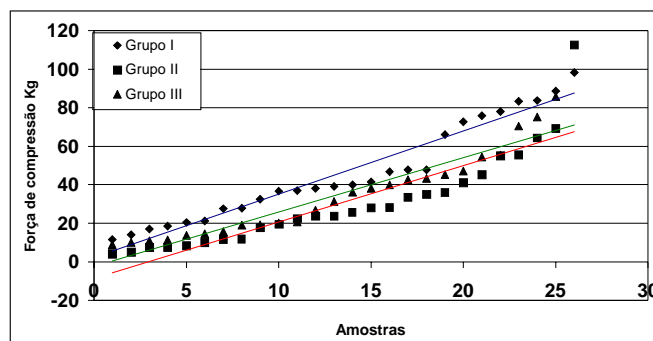


Gráfico 1 – Carga compressiva máxima

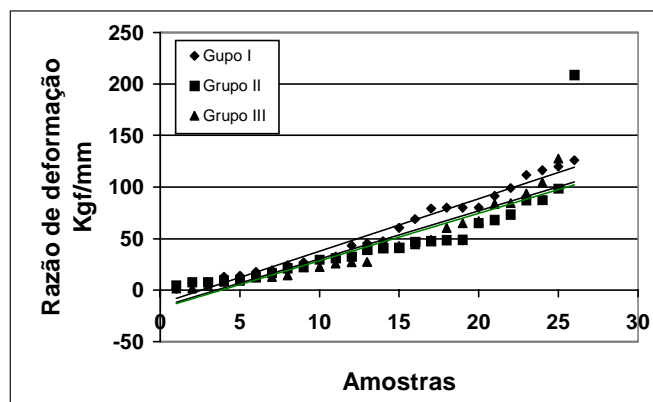


Gráfico 2 – Razão de deformação

A razão de deformação foi avaliada e demonstrou o seguinte: grupo I – 55,51kgf/mm (1,41-125,93kgf/mm) com um DP = 39,44; grupo II – 46,5kgf/mm (4,81-208,94kgf/mm) com DP = 42,62; grupo III – 48,32kgf/mm (1,6-127,89kgf/mm) com DP = 21,7. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos avaliados ($p = 0,473$) (gráfico 2).

DISCUSSÃO

Quando um osso é submetido a uma carga de compressão, sofre uma deformação, que se divide em dois momentos. No primeiro, se retirarmos a força deformadora, o osso retornará a sua forma inicial; é chamada deformação elástica. Num segundo momento, se maior estresse ou esforço for aplicado ao material, seu poder de retornar à forma original será excedido, e a isso denominamos deformação plástica. O ponto que delimita a divisão entre a deformação elástica da plástica é chamado de ponto de cessão ou limite de proporcionalidade⁽⁹⁾.

A carga máxima avaliada neste trabalho é o ponto de cessão, ou seja, o momento em que o osso deixa de sofrer deformação elástica e passa a apresentar comportamento de deformação plástica.

Quando se testa a resistência biomecânica do osso, cria-se uma curva, antes do ponto de cessão. A inclinação dessa curva é uma medida da rigidez do material. Quanto mais íngreme essa, mais rígido é o material⁽⁹⁾. A razão de deformação em nosso trabalho é a inclinação dessa curva, ou seja, a resistência compressiva do material.

O osso bovino foi o escolhido por dois motivos básicos: para permitir melhor uniformidade da amostra e sua crescente utilização como enxerto ósseo em humanos^(5,7). Se fosse utilizado osso humano, a resistência compressiva avaliada poderia ser modificada por fatores que não seriam facilmente controlados pelos autores, como: idade do doador, localização da amostra dentro do osso do doador e doenças sistêmicas presentes no doador, uma vez que se utiliza osso proveniente de artroplastias totais de quadril e de joelho. Utilizando o osso bovino, os autores buscaram uniformizar a amostra controlando dois desses fatores. Primeiro, a idade entre três e cinco anos, para termos somente animais esqueleticamente maduros (adultos). Segundo, a localização da amostra dentro do osso doador. Com a realização de um rodízio do local de extração, certificamo-nos de que havia cilindros extraídos de todas as partes do côndilo do animal, pois a resistência dentro do próprio côndilo poderia ser variável, dependendo da região anatômica estudada.

Adotamos o tamanho de cilindro de 10mm por 8mm numa tentativa de deixá-lo o menor possível pois, quanto menor o tamanho, mais homogênea seria a amostra.

Existem várias maneiras de armazenamento dos enxertos ósseos em banco de osso, dentre elas; a congelação profunda e a liofilização. A técnica de congelação profunda possui como vantagem sua praticidade, pois requer poucos recursos físicos (somente um *freezer* de congelação profunda a -80°C)⁽²⁾, e

como desvantagens: o risco de transmissão bacteriana e viral do receptor, a inutilização do enxerto se houver contaminação do mesmo, a baixa disponibilidade de doadores (somente doadores vivos livres de infecção detectável que são submetidos a artroplastias de quadril ou joelho)⁽¹⁾. A liofilização possui várias vantagens, como a redução sensível da transmissão de doenças infecto-contagiosas, com mínima alteração bioquímica^(1,3).

Em nosso trabalho não encontramos diferença estatisticamente significativa tanto na carga máxima de compressão quanto na razão de deformação quando analisamos o osso bovino congelado e o liofilizado reidratado. Isso concorda com o trabalho de Pelker⁽¹⁰⁾; entretanto, discorda de outros trabalhos que apresentam diferença entre os diversos tipos de enxerto, como o de Kübler⁽⁶⁾ e o de Triantafyllou⁽¹¹⁾. Ressaltamos, porém, que tanto o trabalho de Kübler quanto o de Triantafyllou têm uma amostra menor ($n = 10$ e $n = 12$, respectivamente) em cada grupo do que o presente trabalho.

Concluimos que, por nossa avaliação, o processo conjunto de liofilização e reidratação do osso não altera sua propriedade biomecânica de compressão.

Tanto o processo de reidratação por uma hora e meia antes do teste quanto o de reidratação no momento do teste apresentaram resultados estatisticamente semelhantes. Isso nos sugere que o tempo de reidratação durante o ato cirúrgico pode ser fugaz, pois, do ponto de vista da propriedade compressiva, não altera suas propriedades.

Um dos problemas dos testes de avaliação das propriedades biomecânicas é que estes são realizados *in vitro*; conseqüentemente são negligenciados os processos biológicos aos quais o osso é submetido *in vivo*. Tais processos seriam: a revascularização, a remodelação⁽¹⁰⁾, necrose do enxerto e algumas alterações bioquímicas do colágeno⁽¹²⁾. Por isso, a maioria dos dados provenientes de avaliações biomecânicas é extrapolada para a prática clínica e exigiria confirmações *in vivo* em seres humanos, necessitando de novos trabalhos clínicos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Laboratório de Engenharia de Transformação Mecânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela realização dos ensaios de compressão, principalmente a seu Coordenador, Prof. Lírio Schaeffer, e ao Graduando de Engenharia Elétrica da UFRGS Fabiano Carcuchinsk Haag.

REFERÊNCIAS

1. Crenshaw A.H.: "Bone grafting" in Campbell's Operative Orthopaedics. Missouri, Mosby Year Book, cap. 1, p.p. 12-22, 1991.
2. Zsacki W.: The efficacy of application of lyophilized, radiation-sterilized bone graft in orthopaedic surgery. Clin Orthop 272: 82-87, 1991.

3. Conrad E.U., Ericksen D.P., Tenser A.F., et al: The effects of freeze-drying and rehydration on cancellous bone. *Clin Orthop* 290: 279-284, 1993.
4. Mellonig J.T., Prewett A.B., Moyer M.P.: HIV inactivation in a bone allograft. *J Periodontol* 62: 979-983, 1992.
5. Donati D., Gagliardi S., Capanna R.: Innesti eteroplastici utilizzati in giovani pazienti trattati con osteotomia del tetto acetabolare. *Chir Organi Mov* 75: 59-65, 1990.
6. Kübler N., Reuther J., Kirchner T., et al: Osteoinductive, morphologic, and biomechanical properties of autolyzed, antigen-extracted, allogeneic human bone. *J Oral Maxillofac Surg* 51: 1346-1357, 1993.
7. Salama R.: Xenogeneic-bone grafting in humans. *Clin Orthop* 174: 113-121, 1983.
8. Vajaradul Y.: Bone banking in Thailand. A 10-year experience (1984-1994). *Clin Orthop* 323: 173-180, 1996.
9. Harkess J.W., Ramsey W.C., Harkess J.W.: "Princípios das fraturas e luxações" in *Fraturas em adultos*. São Paulo, Manole, cap. 1, p.p. 1-178, 1993.
10. Pelker R.R., Friedlaender G.E., Markham T.C., et al: Effects of freezing and freeze-drying on the biomechanical properties of rat bone. *J Orthop Res* 1: 405-411, 1984.
11. Triantafyllou N., Sotiropoulos E., Triantafyllou J.N.: The mechanical properties of the lyophilized and irradiated bone grafts. *Acta Orthop Belg* 41: 35-44, 1975.
12. Kang J.S., Kim N.H.: The biomechanical properties of deep freezing and freeze drying and their biomechanical changes after in-vivo allograft. *Yonsei Med J* 36: 332-335, 1995.