

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL OSTEOGÊNICO DO PERIÓSTEO EM ASSOCIAÇÃO COM UMA MEMBRANA DE COLÁGENO

EVALUATION OF OSTEOGENIC CAPACITY OF THE PERIOSTEUM IN COMBINATION WITH A COLLAGEN MEMBRANE

WAGNER COSTA ROSSI JUNIOR, LÍVIA CECÍLIA DE OLIVEIRA BARBOSA, ALESSANDRA ESTEVES

RESUMO

Objetivos: Este trabalho avaliou o potencial osteogênico de enxertos de perióstio livre associado a uma membrana de colágeno. **Métodos:** Vinte ratos albinos Wistar com idade média de 100 dias foram submetidos à cirurgia para criação de um defeito ósseo de 2,5 a 3,0 mm de comprimento na diáfise das fíbulas. Após 30 dias os animais foram então divididos em dois grupos: Grupo I recebeu o implante de perióstio associado à membrana de colágeno e Grupo II, somente a membrana de colágeno. Os animais foram radiografados antes do implante de perióstio e 15 ou 30 dias após o mesmo. **Resultados:** Os resultados mostraram que o enxerto de perióstio livre associado à membrana de colágeno não foi eficiente no processo de reparo do defeito ósseo. **Conclusão:** Sugere-se que enxertos periosteais não vascularizados não apresentem potencial para formar novo osso. O fato de o enxerto ter sido implantado 30 dias após a criação do defeito ósseo interferiu negativamente no processo de osteogênese.

Descritores: Regeneração óssea. Ratos Wistar. Transplante.

ABSTRACT

Objective: The present study evaluated the osteogenic potential of free periosteum graft in combination with collagen membranes. **Methods:** Twenty white Wistar rats aged 100 days underwent surgery to create a bone defect measuring 2.5-3.0 mm in length in the diaphysis of the fibula. After thirty days, the animals were divided into two groups. Group I received periosteum along with a collagen membrane, while Group II received only a collagen membrane. The animals were X-rayed before the implant surgery and 15 or 30 days post-operation. **Results:** The results demonstrated that free periosteum graft in combination with collagen membranes was not efficient in the repair of bone defects. **Conclusion:** We suggest that nonvascularized periosteal grafts do not show potential to form new bone, and that making the implant 30 days after the creation of the bone defect may have interfered negatively in osteogenic process.

Keywords: Bone regeneration. Wistar rats. Transplantation.

Citação: Rossi Junior WC, Barbosa LC, Esteves A. Avaliação do potencial osteogênico do perióstio em associação com uma membrana de colágeno. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2010;18(6):327-30. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

Citation: Rossi Junior WC, Barbosa LC, Esteves A. Evaluation of osteogenic capacity of the periosteum in combination with a collagen membrane. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2010;18(6):327-30. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

INTRODUÇÃO

A regeneração óssea é um assunto extremamente importante e bastante estudado. No processo de regeneração, é muito importante o estudo das condições em que existe perda óssea, tais como aquelas decorrentes de traumas, tumores ou processos infecciosos, condições bastante comuns no organismo humano. Normalmente, defeitos de grandes dimensões não sofrem reparo espontâneo, devido à interposição de tecido mole entre os cotos da fratura.^{1,2} Para se tentar solucionar este problema, iniciaram-se as terapias de regeneração tecidual guiada (GTR - guided tissue regeneration) ou

regeneração óssea guiada (GBR - guided bone regeneration). A GTR, devido às suas propriedades, tem sido uma técnica muito utilizada no tratamento de defeitos ósseos. De grande interesse, são as membranas biodegradáveis, pois se evita um estágio cirúrgico posterior para a remoção da membrana. Dentre estas membranas, destacam-se as constituídas de poliglactina 910 (Vicryl)[®] e as membranas de colágeno, materiais degradados lentamente e, aparentemente, sem causar reações teciduais agressivas.^{3,4} Embora existam vários materiais para a reposição do osso (como osso de origem bovina ou hidroxiapatita), enxertos ósseos autógenos são muito utilizados, pois o material é colhido do próprio paciente.

Todos os autores declaram não haver nenhum potencial conflito de interesses referente a este artigo.

Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), MG

Trabalho realizado no Instituto de Ciências Biomédicas – Laboratório de Anatomia - Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), MG

Endereço para Correspondência: Universidade Federal de Alfenas – Instituto de Ciências Biomédicas - UNIFAL - MG Laboratório de Anatomia Humana – Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 Centro - Cep 37130-000. Alfenas-MG. Brasil. Email: wcrj@unifal-mg.edu.br

Trabalho recebido em 25/11/08, aprovado em 25/08/09

Acta Ortop Bras. 2010;18(6):327-30

Para que se inicie o processo de reparo de uma fratura, os restos celulares e restos de matriz que foram rompidos devem ser removidos através da ação de macrófagos. Simultaneamente, periósteo e endósteo respondem com intensa proliferação, originando um tecido muito rico em células osteoprogenitoras que formam um colar em torno da fratura e que vai penetrar entre as extremidades ósseas fraturadas. Este processo evolui de modo a aparecer, após algum tempo, um calo ósseo e finalmente sua completa substituição por osso secundário. Ressalta-se que todos estes estágios são regulados por fatores bioquímicos e biofísicos que devem ser levados em consideração, tais como a presença de substâncias químicas na região, liberadas por células (fatores plaquetários, fatores liberados por células ósseas, mediadores da inflamação existentes no local, especialmente as prostaglandinas etc.), a bioeletricidade nos tecidos envolvidos, a vascularização da região, a presença ou ausência de oxigênio e outros fatores.^{5,6}

O periósteo consiste de células mesodérmicas multipotenciais, com capacidade para formar todas as variedades de tecido conectivo, apresentando grande potencial osteogênico, mas podendo também ser usado para promover formação de cartilagem quando em um meio condrotrófico (com pouco oxigênio).⁷⁻¹⁰ Por apresentar tais propriedades, o periósteo tem sido empregado em várias formas de enxertos onde há necessidade de reposição de tecidos do esqueleto, como fraturas com perda óssea, fraturas não consolidadas, pseudoartroses, defeitos ósseos congênitos e lesões das superfícies articulares.¹¹

Apesar de ser utilizado clinicamente, os resultados experimentais sobre a capacidade osteocondrogênica do periósteo são contraditórios e conflitantes. As contradições e os diferentes resultados obtidos nos experimentos parecem resultar de uma série de fatores que podem influenciar qualitativa e/ou quantitativamente sua capacidade osteogênica.

Estudos têm indicado que retalhos de periósteo obtidos de diferentes ossos do esqueleto podem produzir maior ou menor quantidade de osso quando utilizados na forma de enxertos e o suprimento sanguíneo parece ser um dos fatores preponderantes na sobrevivência e proliferação das células da camada câmbio do periósteo e consequente formação de osso.^{12,13}

Há três locais onde os retalhos periosteais devem ser obtidos: da fossa ilíaca, pediculado à artéria circunflexa ilíaca profunda; do terço distal do úmero, pediculado à artéria braquial profunda; e do terço distal do fêmur, pediculado a artéria descendente do joelho.¹⁴ Outro fator relevante é a diminuição do potencial osteogênico do periósteo com a idade.⁷ O reparo de fraturas em indivíduos jovens é mais rápido e eficaz que em indivíduos adultos, uma vez que os tecidos moles têm excelente capacidade de regeneração e o periósteo pode induzir a formação de novo osso.¹⁵

Estudos experimentais em fíbulas de ratos demonstraram que fraturas com perda óssea, realizadas entre os terços proximal e médio do osso, apresentam regeneração espontânea em defeitos de tamanho não crítico (menores ou iguais a 2,5 mm). Porém defeitos de grande extensão ou de tamanho crítico (maiores que 2,5 mm) não permi-

tem reconstituição espontânea, sendo necessária à implantação de membranas de barreira ou, até mesmo, fragmentos de periósteo induzindo o processo de regeneração.¹⁶⁻¹⁸

Com base nestes estudos, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade osteogênica de enxertos de periósteo, retirados da face ântero-medial do terço distal do fêmur, associados a uma membrana de colágeno. Os enxertos foram implantados em defeitos ósseos de grande extensão criados em fíbulas de ratos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 20 ratos albinos Wistar, fêmeas, com idade média de 100 dias. Em todos os animais foi realizada a ressecção de um fragmento de 2,5 a 3,0mm da diáfise das fíbulas direita e esquerda, ao nível da união do terço proximal com o terço médio. O trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da UNIFAL-MG.

Trinta dias após a cirurgia, os animais foram radiografados e divididos em dois grupos experimentais contendo 10 animais cada. No grupo I, no membro posterior esquerdo, foi realizado o enxerto de periósteo medindo aproximadamente 7x5 mm, retirado da face ântero-medial do terço distal do fêmur homolateral associado a um fragmento de uma membrana de colágeno da marca Pro-Tape (Pro-Line) medindo 9x6mm. Nos animais do grupo II, foi realizado apenas implante da membrana de colágeno, também no membro posterior esquerdo. A fíbula direita, onde não foi realizado o enxerto periosteal serviu como controle, para verificar se ocorre ou não regeneração espontânea.

Os animais foram radiografados e sofreram eutanásia 15 ou 30 dias após o segundo procedimento cirúrgico, sendo usado neste procedimento dose excessiva do anestésico usado nas cirurgias.

Para radiografar os animais foi utilizado filme *Kodak insight*, periapical, tamanho 2 (Película simples) com tempo de exposição de 0,8 segundos e potência de 60Kv, através de aparelho de Raios-X Intra-bucal Modelo Radio Esfera (Siemens); e revelado em processadora automática A/T 2000 *Plus* (Air Techniques).

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste Qui-quadrado para comparação de proporções em um nível de significância de 10% (0,10).

TÉCNICA CIRÚRGICA

Para a criação dos defeitos ósseos, os animais foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de uma mistura de cloridrato de cetamina (Ketalar® - 50 mg/ml) e cloridrato de xilazina (Rompum® - 1g/100ml) na proporção de 1:1 e na dose de 0,15 ml/100g de peso. No local da cirurgia realizou-se tricotomia e assepsia com PVPI. Uma incisão de 3 cm de comprimento foi realizada na face lateral das pernas dos animais (Figura 1A), afastando-se os tecidos subcutâneos e descolando cuidadosamente os músculos da fíbula. (Figura 1B) Com o auxílio de um alicate de cutícula criou-se um defeito ósseo no terço médio da fíbula, com o cuidado de traumatizar o mínimo possível. (Figura 1C) Os músculos e tecidos subcutâneos foram reposicionados e a pele suturada. Todos os procedimentos cirúrgicos



Figura 1 – Criação do defeito ósseo: (A) Incisão na face lateral da perna; (B) Fíbula exposta; (C) Defeito ósseo.

foram realizados sob irrigação com solução fisiológica estéril. Para obtenção e transplante do enxerto periosteal, foi feita uma incisão de 3,5 cm de comprimento na face medial da coxa do animal. Os músculos foram afastados e o fêmur exposto. (Figura 2A) Com lâmina de bisturi nº 15, o periosteio foi descolado do fêmur, tomando-se cuidado de raspar firmemente a cortical do osso para trazer com o enxerto a camada osteogênica (câmbio) do periosteio. (Figura 2B) Somente no final do ato de retirada do enxerto é que a artéria descendente do joelho, responsável pela irrigação do periosteio desta região, foi seccionada. (Figura 2A) O enxerto periosteal, medindo 7x5 mm, foi mantido em solução fisiológica estéril até o momento do implante. Os músculos com sua fáscia e a pele foram suturados. Logo em seguida, nova incisão foi feita na face lateral da perna esquerda dos animais; os músculos foram afastados para novamente expor o defeito ósseo da fíbula. A membrana de colágeno foi levada entre os cotos da fratura e sobre ela, foi colocado o enxerto de periosteio com a camada osteogênica voltada para o centro do defeito. (Figura 3A) Então, a membrana com o periosteio foram enrolados sobre si mesmos e mantidos por meio de três pontos, um em cada uma das extremidades e um na região central da membrana, com fio de poliglactina 910 (Vicryl) 6.0. Assim, membrana e fragmento periosteal envolveram o defeito ósseo formando um “tubo” no local. (Figura 3B) Os músculos foram reposicionados e a pele suturada.

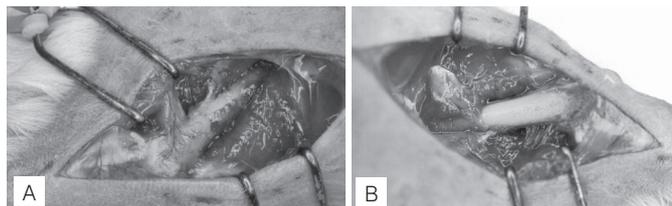


Figura 2 – Obtenção do retalho de periosteio: (A) Periosteio com artéria descendente do joelho (seta); (B) Periosteio descolado.

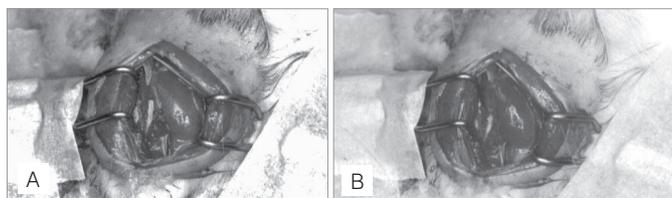


Figura 3 – Implante de periosteio: (A) Membrana posicionada; (B) “Tubo” de membrana e periosteio.

RESULTADOS

As fraturas foram avaliadas radiograficamente levando-se em consideração a reconstituição das fíbulas esquerdas (enxertadas) e direitas (não enxertadas). Foram consideradas completamente regeneradas aquelas que apresentaram no local do enxerto, completa união entre os cotos de fratura. (Figuras 4A e 4B)

Foi observado que tanto os animais que receberam periosteio associado à membrana de colágeno (grupo I – Tabela 1), quanto os que receberam somente a membrana (grupo II – Tabela 2), comparando-se fíbula esquerda (enxertada) e fíbula direita (não enxertada) nos dois grupos, a taxa de regeneração foi extremamente baixa, sendo ainda menor nos animais do grupo I. (Tabela 1)

No grupo I (membrana de colágeno associada a periosteio), dentre os cinco animais que sofreram eutanásia 15 dias após a segunda cirurgia, apenas um apresentou regeneração completa. Os outros cinco, sacrificados com 30 dias, não apresentaram regeneração.

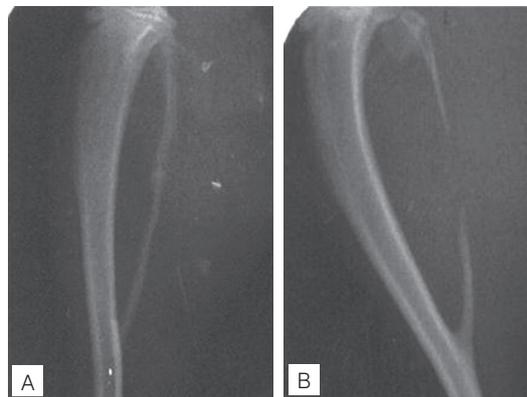


Figura 4 – Aspecto radiográfico de uma fíbula regenerada (A) e de uma fíbula não regenerada (B).

Tabela 1 – Resultado numérico dos animais que receberam a membrana de colágeno associada ao periosteio (Grupo I).

	Fíbula direita	Fíbula esquerda
Com	2 animais	1 animal
Regeneração	20%	10%
Sem	8 animais	9 animais
Regeneração	80%	90%
TOTAL	10 animais 100%	10 animais 100%

(Tabela 3) Das dez fíbulas direitas analisadas, duas estavam regeneradas 30 dias após a cirurgia. (Tabela 1) Nenhuma destas fíbulas direitas correspondiam ao mesmo animal que apresentou regeneração da fíbula esquerda.

No grupo II (somente membrana de colágeno) houve regeneração completa em dois dos cinco animais com eutanásia sofrida 15 dias após a segunda cirurgia. Nos cinco animais restantes, sacrificados com 30 dias após a cirurgia, apenas um se apresentou regenerado. (Tabela 3) Das fíbulas direitas analisadas neste grupo, três apresentaram regeneração completa e sete não tiveram regeneração. (Tabela 2)

Pela simples observação dos resultados (Tabelas 1, 2 e 3), podemos constatar que não existem diferenças significativas, as quais foram constatadas pelo teste estatístico utilizado. (Tabelas 1, 2 e 3)

Tabela 2 – Resultado numérico dos animais que receberam apenas membrana de colágeno (Grupo II).

	Fíbula direita	Fíbula esquerda
Com	3 animais	3 animais
Regeneração	30%	30%
Sem	7 animais	7 animais
Regeneração	70%	70%
TOTAL	10 animais 100%	10 animais 100%

Tabela 3 – Resultado numérico observado nas fíbulas esquerdas dos animais sacrificados 15 ou 30 dias após a cirurgia.

	Grupo I		Grupo II	
	15 dias	30 dias	15 dias	30 dias
Com	1 animal	0	2 animais	1 animal
Regeneração	20%	(zero)	40%	20%
Sem	4 animais	5 animais	3 animais	4 animais
Regeneração	80%	100%	60%	80%
TOTAL	5 animais 100%	5 animais 100%	5 animais 100%	5 animais 100%

DISCUSSÃO

Diversos autores têm concluído, através de experimentos, que o uso do periosteio em diversas formas de enxerto é capaz de produzir a proliferação e diferenciação de suas células, possuindo participação importante e indispensável na consolidação de fraturas.^{5,6,8,11} Mesmo quando mantido sem suprimento sanguíneo por algum tempo, o periosteio é capaz de conservar seu potencial osteogênico.¹⁷

Nos resultados observados neste estudo, avaliando o potencial osteogênico do periosteio associado a uma membrana de colágeno, o enxerto de periosteio livre não interferiu no processo de reparo do defeito ósseo, talvez pelo fato de estar associado à membrana de colágeno, a qual pode ter interferido na revascularização local do enxerto e contribuído para baixas taxas de regeneração. Porém, em defeitos na fíbula com perda de grande quantidade de substância óssea, os enxertos de periosteio não resistem à pressão dos músculos adjacentes e acabam por interferir mecanicamente na regeneração.¹⁷

Em nosso experimento, o enxerto de periosteio foi envolto em uma membrana de colágeno e implantado no espaço situado entre os cotos, na forma de um "tubo". A membrana foi utilizada para facilitar o manuseio do enxerto periosteal e para evitar que os tecidos musculares adjacentes entrassem em contato com o enxerto. O uso da membrana pode de certa forma, ter dificultado um maior contato do periosteio enxertado com o periosteio existente nas extremidades dos cotos, tornando difícil a revascularização e interferindo no seu potencial osteogênico. Quando o enxerto de periosteio livre é colocado em um meio pouco vascularizado, este perde seu potencial osteogênico. Esse potencial pode ser aumentado se o enxerto for colocado em contato com periosteio intacto.¹³

A utilização de membranas de colágeno é eficiente nos processos onde é necessário o uso de regeneração tecidual guiada e impede que os tecidos circunjacentes invadam o defeito ósseo e atrasem ou impeçam a consolidação da fratura.¹⁶ Membranas de colágeno também foram utilizadas para isolar implantes intramedulares realizados em fêmures de coelhos, observando que nos animais onde foi colocada a membrana havia maior quantidade de osso que nos animais que não receberam a membrana.²

Pelo nosso estudo, observamos que o enxerto livre de periosteio não foi capaz de auxiliar no processo de reparo do defeito ósseo. É importante ressaltar que todos os animais utilizados eram jovens,

descartando a variante "idade do animal" como possível justificativa para a ineficiência do enxerto.^{7,15}

Através dos resultados obtidos, foi possível observar que, no grupo I, uma fíbula esquerda e duas direitas se apresentaram regeneradas. Salientamos que estas fíbulas pertenciam a animais distintos. Também, no grupo II, ressaltamos que um dos 10 animais analisados apresentou as duas fíbulas (esquerda e direita) regeneradas.

As cirurgias para o implante dos enxertos foram realizadas 30 dias após o defeito ósseo ter sido criado. Em alguns animais foi possível observar que, ao invés de ocorrer regeneração dos cotos proximal e distal da fíbula houve a reabsorção dos mesmos, especialmente do coto distal. É possível que esse espaço de tempo, entre a cirurgia de criação do defeito e a segunda cirurgia, de implante do enxerto de periosteio, possa ter interferido negativamente no processo de osteogénia, inibindo o potencial osteogênico do periosteio.

Estudos indicam que há alguns locais de onde os enxertos periosteais devem ser obtidos¹⁴, sendo um deles o terço distal do fêmur (pediculado à artéria descendente do joelho); local este que demos preferência neste trabalho por nos fornecer enxertos de periosteio de tamanho e espessura consideráveis.

Resultados positivos foram obtidos com a utilização de enxertos de periosteio, porém, utilizando enxertos revascularizados.^{8,11} Através de implantes de periosteio revascularizado retirados do fêmur de coelhos, observou-se também que onde foi realizada a anastomose vascular dos pedículos do retalho de periosteio, ocorreu a formação de novo osso, ao passo que onde não foi realizada a anastomose, o enxerto se degenerou e foi absorvido. Logo a vascularização do enxerto periosteal é fundamental para que ocorra a osteogênese.¹²

CONCLUSÃO

Através da metodologia utilizada para avaliar o potencial osteogênico de enxertos livres de periosteio associados a uma membrana de colágeno, podemos concluir:

1. O enxerto de periosteio livre não foi eficiente no reparo de um defeito ósseo criado em fíbulas de ratos;
2. O uso da membrana de colágeno envolvendo o retalho periosteal interferiu no potencial osteogênico do periosteio;
3. O enxerto periosteal livre (não vascularizado) não foi eficiente quando usado tardiamente após a fratura, perdendo o seu potencial osteogênico.

REFERÊNCIAS

1. Chakkalakal DA, Strates BS, Mashoof AA, Garvin KL, Novak JR, Fritz ED. Repair of segmental bone defects in the rat: an experimental model of human fracture healing. *Bone*. 1999;25:321-32.
2. Zhang X, Awad HA, O'Keefe RJ, Guldberg RE, Schwarz EM. A perspective: engineering periosteum for structural bone graft healing. *Clin Orthop Relat Res*. 2008;(466):1777-87.
3. Aaboe M, Pinholt EM, Hjørting-Hansen E. Healing of experimentally created defects: a review. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1995;33:312-8.
4. Rossi Junior WC. Influência de uma membrana de colágeno associada a extrato etanólico de própolis na consolidação de fraturas com perda óssea [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2002.
5. Ham AW, Cormack DH. *Histologia*. 8a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1983. p.122-4.
6. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*. 9a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p.122-4.
7. O'Driscoll SW, Saris DB, Ito Y, Fitzimmons JS. The chondrogenic potential of periosteum decreases with age. *J Orthop Res*. 2001;19:95-103.
8. Xiao MZ, Huang XY. [An experimental study on the repair of the necrotic tubular bone with pedicled vascular periosteum grafting in rabbits]. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*. 2003;19:329-31.
9. Malizos KN, Papatheodorou LK. The healing potential of the periosteum molecular aspects. *Injury*. 2005;36(Suppl 3):S13-9.
10. Augustin G, Antabak A, Davila S. The periosteum. Part 1: Anatomy, histology and molecular biology. *Injury*. 2007;38:1115-30.
11. Doi K, Sakai K. Vascularized periosteal bone graft from the supracondylar region of the femur. *Microsurgery*. 1994;15:305-15.
12. Liu JY, Wang D, Cheng HH. Experimental study of the osteogenic capacity of periosteal allografts: a preliminary report. *Microsurgery*. 1994;15:87-92.
13. Reynders P, Becker JH, Broos P. Osteogenic ability of free periosteal autografts in tibial fractures with severe soft tissue damage: an experimental study. *J Orthop Trauma*. 1999;13:121-8.
14. Penteado CV, Masquelet AC, Romana MC, Chevrel JP. **Periosteal flaps: anatomical bases of sites of elevation.** *Surg Radiol Anat*. 1990;12:3-7.
15. Define D. A aplicação em cirurgia ortopédica do poder osteogénico do periosteio na infância. *Rev Bras Ortop*. 2002;37:415-23.
16. Caiazza S, Colangelo P, Bedini R, Formisano G, De Angelis G, Barrucci S. Evaluation of guided bone regeneration in rabbit femur using collagen membranes. *Implant Dent*. 2000;9:219-25.
17. Sant'anna MF. Capacidade osteogénica de enxertos periosteais livres [tese]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista; 1997.
18. Steiner GG, Kallet MP, Steiner DM, Roulet DN. The inverted periosteal graft. *Compend Contin Educ Dent*. 2007;28:154-61.