

VIABILIDADE DO ENXERTO ÓSSEO DA CRISTA ILÍACA VASCULARIZADO PELO RAMO ILÍACO DA ARTÉRIA ILIOLOMBAR: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS

VIABILITY OF VASCULARIZED BONE GRAFT FROM THE ILIAC CREST USING THE ILIAC BRANCH OF THE ILIOLUMBAR ARTERY: EXPERIMENTAL STUDY ON RATS

Fabian Maccarini Peruchi¹, Alessandra Deise Sebben², Martina Lichtenfels³, Marcos Ricardo de Oliveira Jaeger⁴, Jefferson Braga Silva⁵

RESUMO

Objetivo: Através de um modelo experimental, pretendemos criar inferências sobre a viabilidade do enxerto ósseo vascularizado da crista ilíaca em ratos e verificar suas características histológicas. **Método:** Foram utilizados 21 ratos, que foram divididos em dois grupos: o primeiro consistindo por animais submetidos à técnica de enxerto ósseo vascularizado e pediculado sobre o ramo ilíaco da artéria iliolumbar; o segundo (grupo controle) sofreu o mesmo procedimento do primeiro com a adição da ligadura do pedículo vascular. A viabilidade dos enxertos ósseos foi verificada durante três semanas, através da visualização direta do enxerto, histologia e imunohistoquímica. **Resultados:** Todos os enxertos vascularizados avaliados na primeira semana apresentaram viabilidade segundo a observação direta, histologia e imunohistoquímica. Entretanto, na segunda e terceira semanas os enxertos mostraram-se inviáveis em 75% dos casos quando submetidos à avaliação segundo a observação direta e em 50% dos casos quando realizada a análise histológica e imunohistoquímica. **Conclusão:** Alguns enxertos vascularizados em sua concepção tornaram-se inviáveis e passaram a se comportar como enxertos não vascularizados sob a análise da observação direta e histológica. Apesar da possibilidade de falha, o uso de enxertos ósseos vascularizados deve ser incentivado, pois a histologia descritiva demonstrou maior densidade celular na porção óssea medular, osteócitos com maior funcionalidade na deposição de matriz óssea, com rede vascular intraóssea preservada.

Descritores - Transplante Ósseo; Matriz Óssea; Histologia; Imunohistoquímica; Modelos Animais

ABSTRACT

Objective: Through an experimental model, our aim was to create inferences about the viability of vascularized bone grafts from the iliac crest in rats and investigate their histological features. **Methods:** Twenty-one rats were used, divided into two groups: the first consisted of animals that were subjected to the technique of vascularized bone graft pedicled onto the iliac branch of the iliolumbar artery; the second (control group) underwent the same procedure as performed on the first group, with the addition of ligation of the vascular pedicle. The viability of the bone grafts was observed for three weeks, by means of direct observation of the graft, histology and immunohistochemistry. **Results:** All the vascularized grafts evaluated in the first week showed viability according to direct observation, histology and immunohistochemistry. However, in the second and third weeks, direct observation showed that 75% of the grafts were unviable, while histological analysis and immunohistochemistry showed that 50% were unviable. **Conclusions:** Some grafts that are designed to be vascularized became unviable and began to behave like non-vascularized grafts under direct observation and histology. Despite the possibility of failure, use of vascularized bone grafts should be encouraged, because descriptive histology shows greater cell density in the medullary bone portion, and osteocytes that function better regarding deposition of bone matrix, with preservation of the intraosseous vascular network.

Keywords - Bone Transplantation; Bone Matrix; Histology; Immunohistochemistry; Models, Animal

1 – Mestre em Medicina e Ciências da Saúde – PUCRS – Porto Alegre, RS, Brasil.

2 – Bióloga e Doutoranda em Medicina e Ciências da Saúde – PUCRS – Porto Alegre, RS, Brasil.

3 – Bióloga, Mestranda em Medicina e Ciências da Saúde – PUCRS – Porto Alegre, RS, Brasil.

4 – Doutor em Medicina e Ciências da Saúde – PUCRS – Porto Alegre, RS, Brasil.

5 – Professor Titular do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina – PUCRS – Porto Alegre, RS, Brasil.

Trabalho realizado na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS, Porto Alegre, RS.

Correspondência: Av. Ipiranga, 6.690, conj. 216, Jardim Botânico – 90610-000 – Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: jeffmao@terra.com.br

Trabalho recebido para publicação: 07/07/2011, aceito para publicação: 04/08/2011.

Os autores declaram inexistência de conflito de interesses na realização deste trabalho / The authors declare that there was no conflict of interest in conducting this work

INTRODUÇÃO

Os enxertos ósseos continuam sendo utilizados com frequência na resolução de situações clínicas com perda de substância óssea. Sua aplicabilidade é vasta na cirurgia reconstrutiva, principalmente na área ortopédica, sendo empregados para o reparo da perda tecidual óssea, que pode ser decorrente de traumas, pseudoartroses, correção de deformidades, ressecção tumoral e estímulo à osteogênese⁽¹⁻⁴⁾.

A viabilidade das células ósseas transferidas com o enxerto é um dos fatores determinantes para as propriedades mecânicas, como a resistência a forças externas, porosidade e densidade óssea, e também determina propriedades fisiológicas como a capacidade de osteogênese e osteoindução. Por isso, fatores que contribuem para a sobrevivência celular deveriam ser respeitados para a obtenção de enxertos com qualidades superiores, determinando, desta forma, melhor prognóstico nas intervenções que visam a reconstrução de defeitos o aparelho esquelético.

Existe uma dúvida inerente ao procedimento cirúrgico quando se utiliza enxertos ósseos vascularizados: será que o enxerto ósseo manterá sua viabilidade através do pedículo vascular com o decorrer do tempo? Alguns eventos poderiam obstruir o pedículo, como compressão externa, edema, imobilização pós-operatória, trombose devido estase venosa e lesão do pedículo devido manipulação. Ao ocorrer uma obstrução do pedículo, o enxerto ósseo vascularizado transforma-se em não vascularizado.

Através de um modelo experimental, almejamos criar inferências sobre a viabilidade do enxerto ósseo vascularizado da crista ilíaca em ratos sustentada pelo pedículo vascular e verificar suas características histológicas.

MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 21 ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*) destinados exclusivamente à pesquisa, provenientes e mantidos no Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica da PUCRS, em condições ambientes adequadas para a espécie, com controle da temperatura, umidade, ventilação, luz, ruído, odores e interação social. Foram mantidos em gaiolas individuais, recebendo água e alimento em qualidade e quantidade adequadas para a espécie. O protocolo de estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da PUCRS.

Os animais foram divididos em dois grupos de comparação:

Grupo 1: enxerto ósseo vascularizado da crista ilíaca (n = 12).

Grupo 2 (controle): enxerto ósseo não vascularizado da crista ilíaca (n = 9).

Procedimento cirúrgico

Por via intramuscular era administrada a anestesia, consistindo numa solução de 0,2ml de clorpromazina e 0,8ml de quetamina, na dose de 3ml/kg. Doses de manutenção anestésica eram administradas no transcorrer do ato cirúrgico, conforme a necessidade.

A incisão cirúrgica era longitudinal, paralela e afastada 2cm da linha mediana dorsal, iniciando 1cm abaixo do último arco costal e terminando na altura do quadril (Figura 1).

No plano subfascial, o ramo ilíaco da artéria e da veia iliolombar foram identificados e cuidadosamente dissecados em direção proximal até o ponto onde entravam na cavidade abdominal. Para acessar a cavidade abdominal, a inserção dos músculos abdominais foi liberada na crista ilíaca. A dissecação do pedículo vascular foi realizada, até a sua origem na artéria aorta e na veia cava inferior (Figura 2).

O ramo para o osso ilíaco foi então identificado, e distalmente a ele foi realizada a ligadura da artéria (Figura 3). A fâscia toracolombar foi incisada no bordo lateral da coluna vertebral e a porção medial do osso ilíaco foi exposta. Paralelo a 1cm da borda superior do osso ilíaco, o músculo glúteo máximo foi incisado na face externa do ilíaco e o músculo ilíaco foi incisado expondo a face interna do osso ilíaco (Figura 4).

Uma osteotomia bicortical separou o terço superior do osso ilíaco dos dois terços inferiores articulados ao

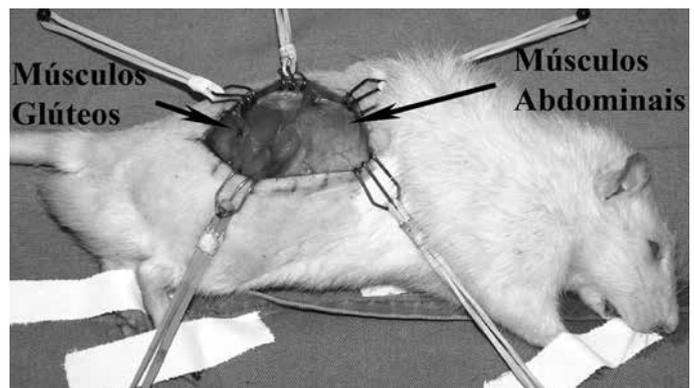


Figura 1 – Acesso cirúrgico e localização da transição entre as musculaturas glútea e abdominal, pontos de referência para a localização do pedículo.

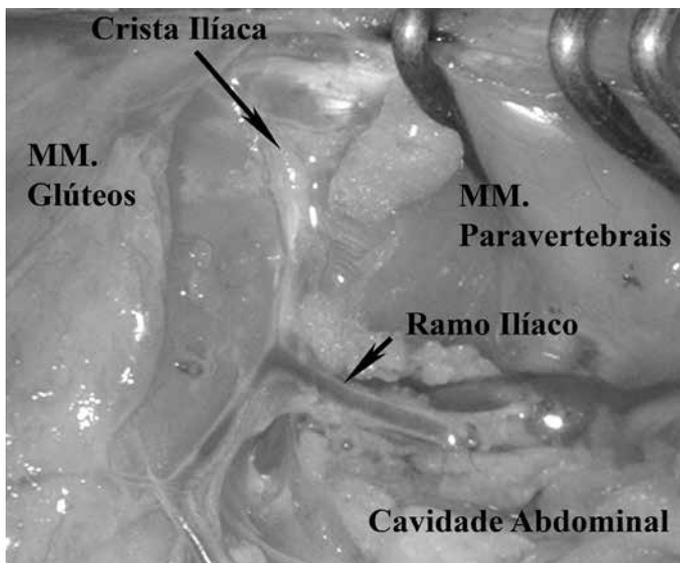


Figura 2 – Laparotomia com dissecção do ramo ilíaco da artéria iliolumbar em direção à sua origem na aorta abdominal.

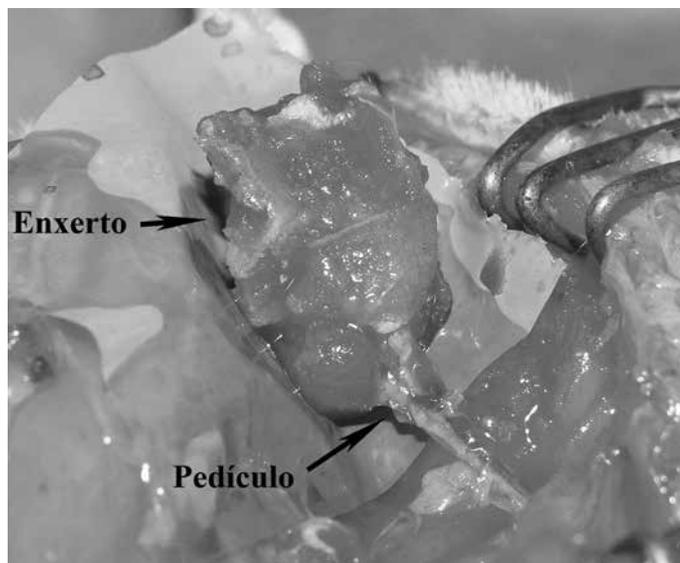


Figura 4 – Enxerto ósseo vascularizado do osso ilíaco baseado no ramo ilíaco da artéria iliolumbar.

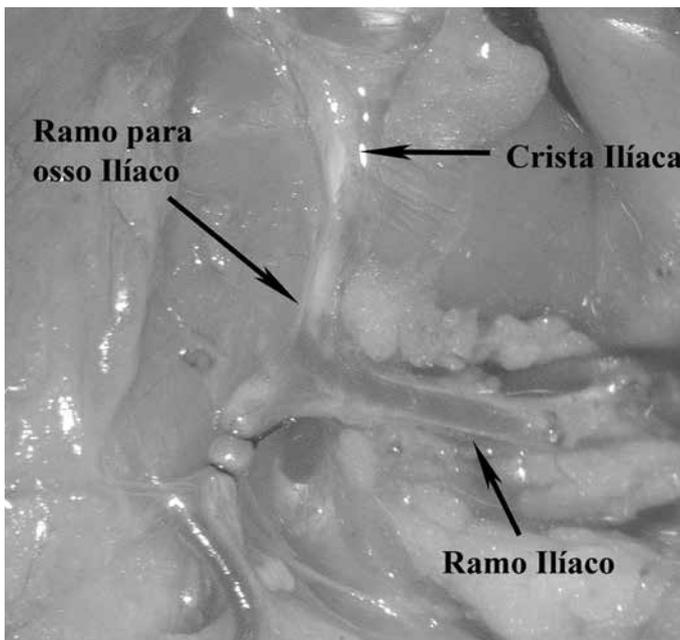


Figura 3 – Ligadura do ramo ilíaco distalmente à emergência de vaso para o osso ilíaco.

sacro e ao quadril. As partes moles inseridas na metade superior foram liberadas, permitindo a obtenção do enxerto ósseo vascularizado pelo ramo ilíaco da artéria e da veia iliolumbar (Figura 5).

O enxerto ósseo foi envolvido por uma lâmina de silicone; desta forma, foi criada uma barreira mecânica que dificultou a invasão e diminuiu a influência de tecidos vizinhos na viabilidade do enxerto ósseo, tornando-se este dependente do seu pedículo vascular para manter-se viável.

O grupo 2 foi utilizado como grupo controle. Nele,

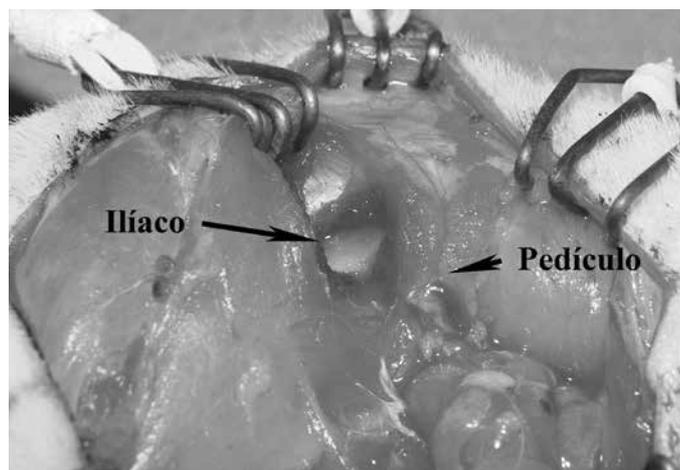


Figura 5 – Exposição da face externa do osso ilíaco após incisão e afastamento da musculatura glútea.

realizou-se o mesmo procedimento descrito para o grupo 1, com o adendo de que o pedículo vascular foi ligado e seccionado.

O enxerto envelopado pela lâmina de silicone foi colocado dentro da cavidade abdominal com a finalidade de minimizar as chances de extrusão para o meio externo.

Dos 21 animais, sete foram sacrificados após uma semana do procedimento cirúrgico; sete, após duas semanas; e sete, após três semanas. Dentre os sete animais sacrificados semanalmente, quatro pertenciam ao grupo 1 e os outros três ao grupo 2.

Histologia

Os enxertos foram fixados em formalina tamponada a 10% por 24h, submetidos à lavagem com água, mantidos em água por 12h e descalcificados por 24h,

utilizando-se uma solução de ácido fórmico a 22% e citrato de sódio a 10%. Após este procedimento, foi realizada a inclusão da peça em parafina de acordo com o processamento para tecidos convencionais e realizados cortes histológicos de 3µm, com coloração com HE.

Imunoistoquímica

As mesmas peças fixadas e descalcificadas para a histologia foram utilizadas no preparo de lâminas para análise imunoistoquímica. Foi utilizado um marcador endotelial denominado anti-CD34 para avaliação da vascularização intraóssea.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis foram descritas através de frequências absolutas e relativas.

Para avaliar a concordância entre os métodos, foi aplicado o coeficiente de concordância de Kappa. Para estimar a magnitude do coeficiente Kappa, o intervalo com 95% de confiança foi calculado.

O nível de significância adotado foi de 5% e as análises foram realizadas nos programas SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 13.0 e PEPI (*Programs for Epidemiologists*) versão 4.0.

RESULTADOS

Observação direta

As diferenças nas características macroscópicas entre o enxerto vascularizado e o não vascularizado foram evidentes. Nos primeiros, foi encontrada uma porção óssea com tonalidade avermelhada, com osso medular abundante e sangrante. Ao manuseio, apresentou plasticidade semelhante ao osso encontrado no momento da realização do procedimento cirúrgico inicial, embora com perda da resistência. Os enxertos ósseos não vascularizados apresentavam coloração amarelo-esbranquiçada, com escassa quantidade de osso medular, eram menos plásticos e mais friáveis, sem nenhuma evidência de sangramento, mostrando-se ressecados.

Em todos os ratos cujo procedimento visava a obtenção de um enxerto não vascularizado, ectoscopicamente foram observadas porções ósseas com as características descritas acima para tal. Entretanto, dentre os enxertos cujo procedimento visava a integridade da vascularização, todos os da primeira semana foram caracterizados ectoscopicamente como vascularizados. Somente um foi classificado como vascularizado dentre os da segunda

semana e os da terceira semana. Com isso, foi constatada ausência de vascularização em 75% (três de quatro) dos enxertos inicialmente vascularizados na segunda e terceira semanas.

Histologia

Ao observar as lâminas coradas com hematoxilina e eosina (Figura 6), pode-se classificar o osso como vascularizado ou não vascularizado, conforme as estruturas visualizadas. Nos enxertos vascularizados foram encontradas trabéculas bem estruturadas na região medular óssea, nas quais identificou-se grande quantidade de osteócitos com abundante deposição de matriz osteoide ao seu redor, com alta densidade de elementos celulares na região medular óssea. De modo oposto, quando foi encontrada uma lâmina com osteócitos em menor quantidade, acompanhada de menor quantidade de matriz

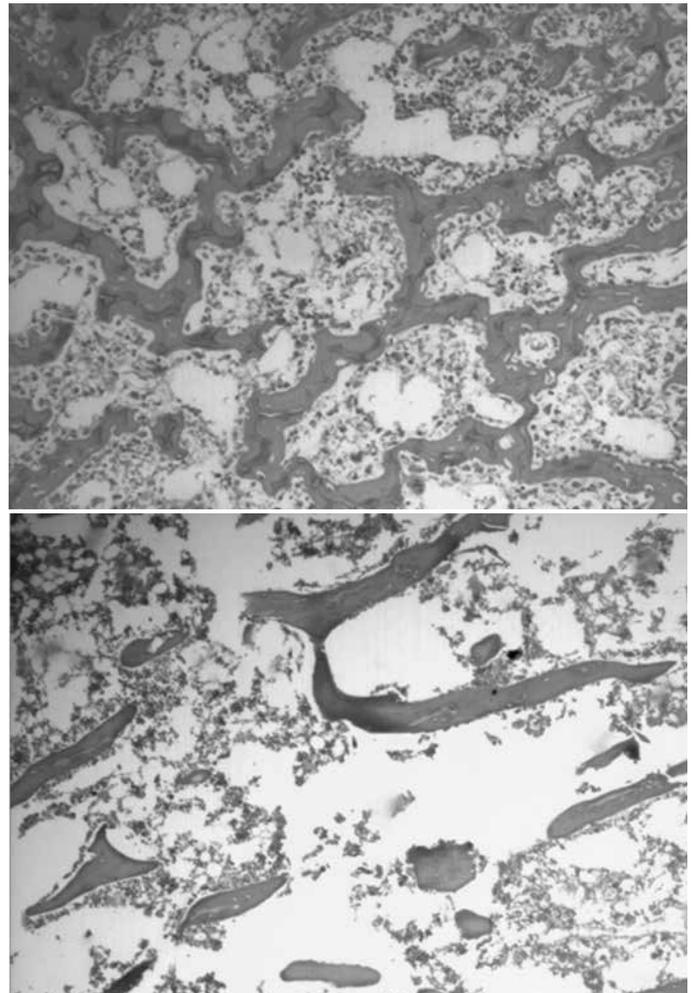


Figura 6 – Fotomicrografia de corte histológico de enxerto ósseo com características de viabilidade (esquerda), na qual a região medular óssea apresenta abundância de elementos celulares e matriz osteogênica, e de ausência de viabilidade (direita), em que há sinais de reabsorção óssea e diminuição da densidade celular na medula óssea (HE, 100x).

óssea depositada ao seu redor e escassa quantidade de osso medular, esta foi caracterizada como padrão de osso não vascularizado. Todas as lâminas do grupo 2 foram classificadas como não vascularizadas. As lâminas das peças histológicas do grupo 1 da primeira semana foram classificadas como vascularizadas. Entretanto, somente 50% (dois de quatro) das lâminas obtidas após a segunda semana e na terceira semana foram classificadas como vascularizadas.

As lâminas coradas com o marcador imunoistoquímico anti-CD 34 para tecido endotelial também mostraram diferenças na análise descritiva histológica. Ao se avaliar as lâminas classificadas como padrão de osso vascularizado, foi encontrada grande quantidade de estruturas marcadas com coloração de tonalidade marrom (coloração por DAB), com a presença de lúmen e hemáceas no seu interior, caracterizando vasos sanguíneos. As lâminas com osso não vascularizado demonstravam ausência das estruturas descritas acima. Em todas as lâminas do grupo 2 não foram observadas estruturas correspondentes a vasos sanguíneos. Dentre as lâminas com enxerto vascularizado, todas da primeira semana demonstravam sinais de vascularização, enquanto somente 50% das lâminas da segunda e da terceira semanas possuíam vasos sanguíneos.

Correlação entre a observação direta e a histologia

Houve concordância estatisticamente significativa entre todos os métodos ($p < 0,001$), conforme apresenta a Tabela 1. Percebe-se que o coeficiente Kappa apresenta uma boa concordância entre todos os métodos ($\geq 0,79$), sendo completamente concordante entre a coloração HE e o CD 34 ($k = 1,00$). Apenas duas das 21 avaliações (9,5%) foram discordantes entre a observação direta e a histologia com coloração HE e CD 34. Nestas, a observação direta demonstrou desvascularização e os demais métodos apresentaram vascularização.

Tabela 1 – Avaliação da concordância entre observação direta, HE e CD 34.

Comparação	Concordância	Kappa (IC 95%)	p
	n (%)		
Observação direta x HE	19/21 (90,5)	0,79 (0,51 – 1,00)	<0,001
Observação direta x CD 34	19/21 (90,5)	0,79 (0,51 – 1,00)	<0,001
HE x CD 34	21/21 (100,0)	1,00 (0,68 – 1,00)	<0,001

DISCUSSÃO

Os enxertos ósseos são fundamentais para a reconstrução de defeitos esqueléticos. O sucesso do tratamento pode ser influenciado pelo tipo de enxerto utilizado devido às diferenças nas propriedades entre os enxertos ósseos vascularizados e os não vascularizados.

As propriedades dos enxertos ósseos vascularizados possibilitam a sobrevivência de grande parte de seus elementos celulares⁽⁵⁾, a consolidação e a integração mais precoce no leito receptor^(6,7), a maior manutenção da massa óssea⁽⁵⁾, a maior capacidade de hipertrofia⁽⁵⁾ e a maior resistência a infecções quando comparados aos enxertos ósseos não vascularizados^(8,9).

Fisiologicamente, os enxertos ósseos vascularizados apresentam maior capacidade de osteogênese, osteoindução e osteocondução quando comparados aos enxertos ósseos não vascularizados, e sua utilidade clínica se torna imperativa em algumas situações em que o índice de falha com o uso do enxerto ósseo convencional seria demasiadamente alto para justificar seu emprego, como em defeitos ósseos extensos, em leito receptor mal vascularizado ou até mesmo desvascularizado^(10,11) e em procedimentos prévios com uso de enxerto e que resultaram em falha do procedimento. Todavia, se o prognóstico melhora com o uso do enxerto vascularizado nos casos com pior prognóstico, ele também poderia ser utilizado com maior frequência ou até como primeira escolha, em situações consideradas menos graves.

Uma pergunta frequente sobre enxertos ósseos vascularizados aborda a viabilidade do enxerto com o transcorrer do tempo: seria justificável a opção por uma técnica que prolonga o tempo cirúrgico ou o encaminhamento para profissionais mais habilitados a realizar o procedimento? O enxerto inicialmente vascularizado comprovadamente no transoperatório poderia deixar de sê-lo por diversos motivos, por exemplo: estase venosa, microtrauma vascular, distúrbios de coagulação, alterações sistêmicas do paciente, compressão externa, edema, processo inflamatório ou infeccioso.

Linsell *et al*⁽¹²⁾, em um estudo experimental em ratos, relataram viabilidade em 88% de seus enxertos vascularizados do fêmur após uma semana de seguimento, utilizando microanastomose arteriovenosa.

Sempuku *et al*⁽¹³⁾ detectaram neoformação óssea em duas semanas utilizando um modelo de enxerto ósseo vascularizado em cauda de rato, sendo que no grupo de enxertos não vascularizados ocorreu necrose completa após uma semana, e após cinco semanas foi detectada

neoformação óssea envolvendo o osso necrótico sugerindo revascularização e osteogênese por invasão tecidual circunjacente.

Nasir *et al*⁽¹⁴⁾ constataram histologicamente em ratos que após uma semana o enxerto ósseo vascularizado da crista ilíaca, baseado na artéria femoral circunflexa lateral, estava viável.

Ozkan *et al*⁽¹⁵⁾, utilizando o modelo experimental do enxerto ósseo vascularizado baseado na artéria íliolombar em ratos, após uma semana, obtiveram viabilidade histológica em todos os enxertos examinados. O modelo experimental de Ozkan *et al*⁽¹⁵⁾, o qual foi escolhido para este trabalho, mostrou-se factível, apresentando poucas variações no trajeto dos vasos, na localização e no número de seus ramos. A anatomia constante trouxe confiabilidade e facilidade na execução do enxerto vascularizado. Pelo fato de o rato ser um animal de pequeno porte e, conseqüentemente, seus vasos serem diminutos, o uso do microscópio microcirúrgico acrescentou segurança na dissecação e na ligadura dos vasos. Citam-se, como principais vantagens deste modelo, a pequena perda funcional para o animal sem alterações na marcha, a obtenção de um fragmento ósseo com dimensões amplas (1x1cm), a possibilidade de proteger o fragmento ósseo na cavidade abdominal e a facilidade de execução.

Neste estudo experimental, foi verificado no transoperatório o sangramento ativo de todos os enxertos vascularizados, com pedículos vasculares funcionais.

No momento da reintervenção cirúrgica para coleta do material e análise dos resultados, os animais sacrificados na primeira semana detinham enxertos considerados vascularizados pela observação direta e pela histologia. Entretanto, dentre os animais da segunda semana, foi considerado vascularizado pela observação direta apenas um deles (25%) e, pela histologia, dois deles (50%). Tais resultados se repetiram nos animais sacrificados na terceira semana. Houve correlação entre o resultado da classificação ectoscópica e histológica.

CONCLUSÃO

Os enxertos vascularizados em sua concepção tornaram-se em algum momento desvascularizados e passaram a se comportar como enxertos não vascularizados sob análise ectoscópica e histológica. Outros trabalhos seriam necessários para se fazer inferências sobre as possíveis causas que determinam falhas na vascularização.

Apesar da possibilidade de falha, o emprego de enxertos ósseos vascularizados deve ser incentivado, pois a histologia descritiva demonstrou maior densidade celular na porção óssea medular, osteócitos com maior funcionalidade na deposição de matriz óssea, com rede vascular intraóssea preservada. Com isso, pode-se utilizar em procedimentos reconstrutivos uma porção óssea com características inerentes que promovam maiores chances de cura dos pacientes.

REFERÊNCIAS

1. Yajima H, Tamai S, Mizumoto S, Inada Y. Vascularized fibular grafts in the treatment of osteomyelitis and infected nonunion. *Clin Orthop Relat Res.* 1993;(293):256-64.
2. Weiland AJ, Moore JR, Daniel RK. Vascularized bone autografts. Experience with 41 cases. *Clin Orthop Relat Res.* 1983;(174):87-95.
3. Wood MB, Cooney WP 3rd. Vascularized bone segment transfers for management of chronic osteomyelitis. *Orthop Clin North Am.* 1984 Jul;15(3):461-72.
4. Wood MB, Bishop AT. Massive bone defects of the upper limb: reconstruction by vascularized bone transfer. *Hand Clin.* 2007;23(1):49-56.
5. Tamai S. Experimental vascularized bone transplantations. *Microsurgery.* 1995;16(4):179-85.
6. Haw CS, O'Brien BM, Kurata T. The microsurgical revascularisation of resected segments of tibia in the dog. *J Bone Joint Surg Br.* 1978;60(2):266-9.
7. Weiland AJ, Phillips TW, Randolph MA. Bone grafts: a radiologic, histologic, and biomechanical model comparing autografts, allografts, and free vascularized bone grafts. *Plast Reconstr Surg.* 1984;74(3):368-79.
8. Cutting CB, McCarthy JG. Comparison of residual osseous mass between vascularized and nonvascularized onlay bone transfers. *Plast Reconstr Surg.* 1983;72(5):672-5.
9. Antonyshyn O, Colcleugh RG, Anderson C. Growth potential in onlay bone grafts: a comparison of vascularized and free calvarial bone and suture bone grafts. *Plast Reconstr Surg.* 1987;79(1):12-23.
10. Cooney WP, Linscheid RL, Dobyns JH, Wood MB. Scaphoid nonunion: role of anterior interpositional bone grafts. *J Hand Surg Am.* 1988;13(5):635-50.
11. Green DP. The effect of avascular necrosis on Russe bone grafting for scaphoid nonunion. *J Hand Surg Am.* 1985;10(5):597-605.
12. Linsell M, Jablonski P, Howden B, Scott D, Marshall V. The thigh flap: an osteomyocutaneous free-flap model in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1988;81(2):240-5.
13. Sempuku T, Tamai S, Mizumoto S, Yajima H. Vascularized tail bone grafts in rats. *Plast Reconstr Surg.* 1993;91(3):502-10.
14. Nasir S, Aydin A, Kayikçioğlu A, Sökmensüer C, Cobaner A. New experimental composite flap model in rats: gluteus maximus-tensor fascia lata osteomuscle flap. *Microsurgery.* 2003;23(6):582-8.
15. Ozkan O, Akyürek M, Safak T, Kayikçioğlu A, Güler G, Erk Y. A new flap model in rats: iliac osteomusculocutaneous flap. *Ann Plast Surg.* 2001;47(2):161-7.