

DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE FALHA ÓSSEA INFECTADA NA ULNA DE COELHOS

EXPERIMENTAL PRODUCTION OF AN INFECTED BONE VOID IN THE RABBIT ULNA AS A MODEL OF INFECTED BONE DEFECT

Matheus Lemos Azi¹, Mauricio Kfuri Junior¹, Roberto Martinez², Luis Antonio Salata³, Cleber Antonio Jansen Paccola^{1*}

RESUMO

Objetivo: Desenvolver um modelo experimental que permita estudar a regeneração de grandes falhas ósseas em condições de infecção. **Método:** Falhas ósseas segmentares de 15mm foram criadas cirurgicamente na ulna de 12 coelhos e inoculadas com 5×10^8 unidades formadoras de colônia (UFC) de *S. aureus*. O desbridamento da infecção foi realizado duas semanas após, seguida da aplicação sistêmica de gentamicina por quatro semanas. Os animais foram acompanhados por um período de 12 semanas para avaliação do controle da infecção e da regeneração óssea. **Resultados:** A regeneração espontânea foi inferior a 25% do defeito na avaliação radiográfica e histológica. **Conclusão:** A falha óssea infectada de 15mm na ulna de coelhos é incapaz de alcançar a regeneração completa sem tratamentos adicionais. **Nível de Evidência V, Estudo experimental.**

Descritores: Doenças ósseas infecciosas. Regeneração óssea. Coelho.

ABSTRACT

Objective: Develop a model that allowed the study of bone regeneration in infection conditions. **Method:** A 15 mm defect was surgically created in the rabbit ulna and inoculated with 5×10^8 colony-forming units (CFU) of *S. aureus*. Surgical debridement was performed two weeks after and systemic gentamicin was administered for four weeks. Animals were followed up to 12 weeks to evaluate infection control and bone regeneration. **Result:** Bone regeneration was inferior to 25% of the defect in radiological and histological analysis. **Conclusion:** Infected bone defect of 15 mm in the rabbit ulna was unable to achieve full regeneration without further treatment. **Level of Evidence V, Experimental Study.**

Keywords: Bone diseases, infectious. Bone regeneration. Rabbits.

Citação: Azi ML, Kfuri Junior M, Martinez R, Salata LA, Paccola CAJ. Desenvolvimento de um modelo experimental de falha óssea infectada na ulna de coelhos. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2012; 20(3): 136-8. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

Citation: Azi ML, Kfuri Junior M, Martinez R, Salata LA, Paccola CAJ. Experimental production of an infected bone void in the rabbit ulna as a model of infected bone defect. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2012;20(3): 136-8. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

INTRODUÇÃO

A perda de grandes segmentos ósseos permanece como um dos mais desafiadores problemas na cirurgia ortopédica,^{1,2} sendo frequente sua associação à infecção.²⁻⁵ Modelos experimentais são úteis para avaliar a eficácia de novos tratamentos, e devem ser reprodutíveis, bem controlados e proporcionar a aplicação de métodos padronizados de análise.⁶

Evans, Nelson e Harrison⁷ descreveram um método para criar infecção experimental no antebraço de coelhos, que se tornou um dos mais importantes para o estudo da osteomielite. Entretanto, neste modelo a infecção provoca alterações na arquitetura óssea como osteólise, sequestro, esclerose e alargamento da diáfise^{7,8} que o tornam inadequado para analisar a regeneração. O objetivo deste estudo foi desenvolver um modelo de falha óssea infectada que permita avaliar adequadamente a regeneração óssea.

MATERIAL E MÉTODOS

Inóculo de *Staphylococcus aureus*

Amostras da cepa selecionada foram semeada em ágar-sangue e colocadas na estufa à temperatura de 35°C por 24 horas. Após este período o material foi diluído em salina estéril até alcançar a turbidância correspondente a 10^{10} UFC/ml. Uma amostra da solução foi então diluída até 10^4 e lida na Câmara de Neubauer (Herka intercolor), confirmando a concentração, e semeada em ágar-cled para testar a viabilidade do inóculo.

Modelo experimental

O estudo foi aprovado pela comissão de ética em experimentação animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e doze coelhas pesando entre 2,5 e 3,5kg foram utilizadas. Anestesia foi realizada com cloridrato de cetamina

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

1. Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

2. Departamento de Clínica Médica Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

3. Departamento de Cirurgia, Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

* – In memoriam.

Trabalho realizado no Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Correspondência: Av. Bandeirantes 1900, CEP 14048-900, Ribeirão Preto, SP, Brasil. E-mail: mlazi@hotmail.com.

Recebido em 29/05/2010, aprovado em 27/04/2011

(40mg/Kg) e xylazina (8mg/Kg) por via intramuscular, seguida da infusão venosa contínua de ketamina 1%. A ulna direita foi exposta cirurgicamente e um segmento ósseo de 15mm do terço distal, sem periosteio, foi ressecado utilizando uma serra óssea.

Em seguida o segmento foi recolocado na falha e 0,05 cc do inoculo (5×10^8 UFC) foi introduzido no canal medular com uma seringa de 0,3 cc. Periosteio e pele foram fechados com sutura e analgesia com cetoprofeno (2/mg/Kg IM) foi realizada durante três dias após cada procedimento cirúrgico.

Duas semanas depois foi realizado o desbridamento da ferida, sendo o fragmento ósseo coletado para cultura, todos os tecidos necróticos removidos e a ferida limpa com 40ml de S.F. 0,9%. Dois animais sofreram eutanásia logo após o desbridamento, e os demais receberam gentamicina 6mg/Kg/dia IM por quatro semanas. O fragmento ósseo coletado no desbridamento foi cultivado em ágar-sangue e testado para sensibilidade antimicrobiana (Walkaway-96, Baxter Diagnostics Inc.).

Administração de fluorocromos foi realizada em dois animais, alizarina (10mg/Kg) quatro semanas após o desbridamento, calceína (10mg/Kg) com oito semanas e oxitetraciclina (10mg/Kg) 48 horas antes da eutanásia.

Radiografias foram realizadas após o desbridamento e com 4 e 8 semanas. Os animais sofreram eutanásia após 12 semanas com tiopental sódico (50mg/Kg/IV) e a peça foi submetida a radiografia com filme de alta resolução (Kodak Insight®).

Análise radiográfica e histológica

A infecção foi avaliada radiograficamente de acordo com o grau de destruição da arquitetura óssea e do periosteio⁹ e a regeneração com base no tamanho do defeito ósseo e no percentual de preenchimento da falha.

Para histologia a região da falha óssea foi descalcificada com ácido nítrico 7,5%, embebida em parafina e seccionada longitudinalmente. A coloração foi feita com hematoxilina-eosina e Gram.^{10,11} As amostras com fluorocromos foram submetidas a desidratação em graduações crescentes de álcool seguida da inclusão em resina de acrílico. Os cortes foram corados com uma mistura de azul de metileno, Azul II e pararosanilina ou mantidas sem coloração para a fluorescência.¹² A análise histológica utilizou a escala descrita por Ambrose et al.¹¹

Estatística

Foi utilizado o software SPSS 15.0 para análise dos dados com nível de significância de $p = 0,05$.

RESULTADOS

Onze feridas (92%) tinham sinais clínicos de infecção no momento do desbridamento. O tamanho médio da falha óssea medida no intra-operatório, aumentou de 15mm antes do inóculo para 16 mm após o desbridamento ($p = 0,01$). Dois animais morreram durante o acompanhamento de causas não relacionadas ao estudo. Após 12 semanas todas as feridas estavam cicatrizadas e sem sinais de infecção. *S. aureus* foi o único agente isolado nas amostras analisadas. Nas radiografias iniciais foi observada reação periosteal nas margens da falha óssea em 58% dos animais, considerada como secundária à manipulação cirúrgica e não a infecção. Ao final do estudo não foram observadas alterações radiográficas relacionadas a infecção. O comprimento médio do defeito ósseo diminuiu de 16mm após o desbridamento para 11mm no fim do seguimento. Em apenas um quarto das falhas ósseas ocorreu união (definida como regeneração óssea superior a 25% do defeito). O percentual médio de preenchimento da falha passou de 3% na quarta semana após o desbridamento para 6% após 12 semanas. (Figura 1) Não foi observada presença de bactérias no controle histológico, porém foram identificados sinais de inflamação intraóssea conforme Tabela 1. Após 12 semanas o percentual

Tabela 1. Resultados da análise histológica.

Escala de graduação histológica		
Categorias	Desbridamento	12 semanas
Presença de bactérias intraósseas		
Sim	100%	0
Não	0	100%
Inflamação intraóssea		
Grave	100%	50%
Moderada		25%
Leve		25%
Nenhuma		0
Neoformação óssea		
Mínima < 25%	100%	38%
Leve 25-50%		38%
Moderada 50-75%		24%
Total 75-100%		0

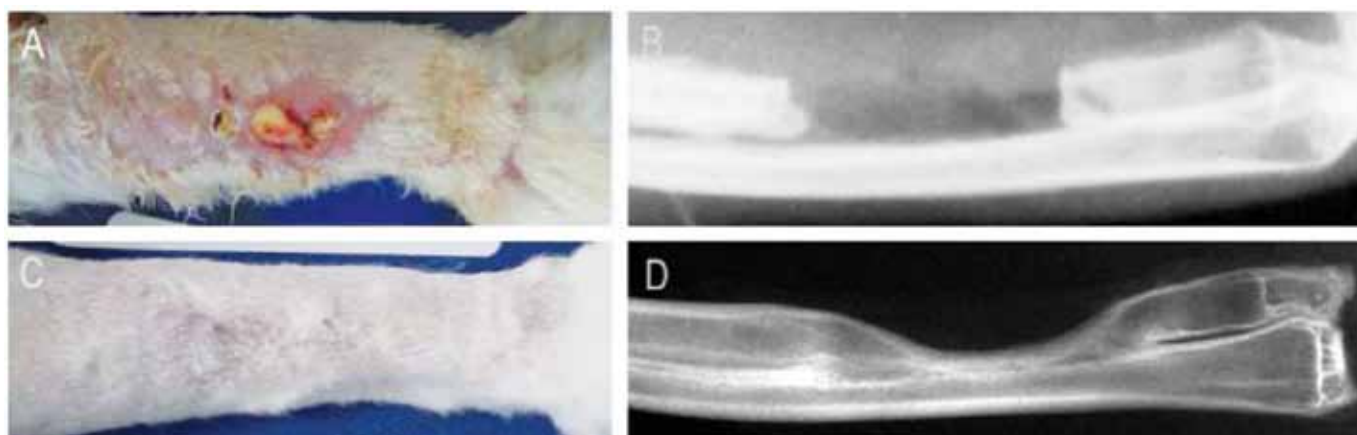


Figura 1. (A) – Ferida antes do desbridamento. (B) – Falha óssea após desbridamento. (C) – Ferida com 12 semanas (D) – Regeneração incompleta da falha óssea com 12 semanas.

de preenchimento da falha foi inferior a 25%, sendo a maior parte do regenerado proveniente do periósteo da membrana interóssea. A fluorescência mostrou que a deposição óssea ocorreu predominantemente durante as primeiras quatro semanas, sendo mínima com 12 semanas. (Figura 2)

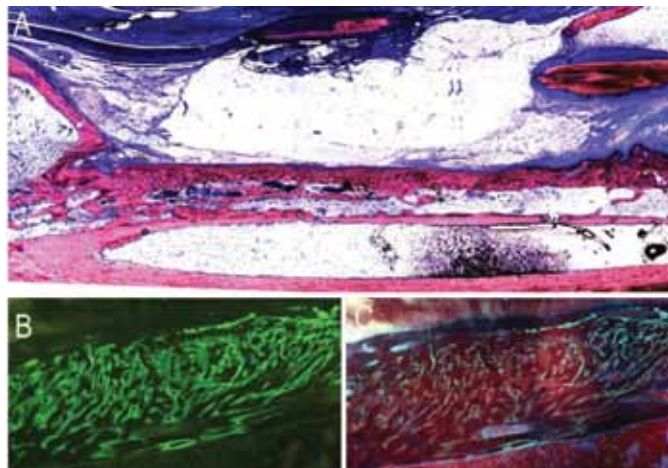


Figura 2. (A) – Secção longitudinal mostrando falha óssea não preenchida e deposição predominantemente pela borda radial (azul metileno, azul II, pararosanilina) óssea 2,5x. (B) – Regeneração óssea na 4ª semana (alazarina) 2,5 x. (C) - Regeneração óssea na 12ª (oxitetraciclina) 2,5 x.

DISCUSSÃO

O defeito ósseo segmentar na ulna de coelho é um modelo bem estabelecido no estudo da regeneração óssea.¹³⁻¹⁹ Inóculos variando entre 10^5 - 10^8 em um segmento de osso desvitalizado produzem taxas de infecção superiores a 90%, com o tempo para o desbridamento variando de duas a quatro semanas.^{7,8,11} Períodos mais longos estão associados a intensa destruição da arquitetura óssea e reação periosteal desorganizada, com a infecção se estendendo pelo osso,^{7,8,11,20,21} tornando difícil a avaliação radiográfica e histológica da regeneração. Neste estudo foi obtida infecção em 100% dos animais sem destruição importante da arquitetura óssea após duas semanas. Com o desbridamento ocorreu um aumento da falha óssea e quatro semanas de antibióticos sistêmicos foram suficientes para controlar a infecção, não havendo qualquer sinal de recidiva durante o seguimento. Após 12 semanas a regeneração óssea da falha foi inferior a 25% tanto na avaliação radiológica quanto na histológica.

CONCLUSÃO

Uma falha ossea infectada de 15 milímetros na ulna de coelhos pode ser considerada como uma “falha crítica”, uma vez que a regeneração espontânea não é alcançada. Este modelo se mostrou previsível e bem controlado, sendo adequado para o estudo da regeneração óssea sob condições de infecção.

REFERÊNCIAS

- Masquelet AC. Muscle reconstruction in reconstructive surgery: soft tissue repair and long bone reconstruction. *Langenbecks Arch Surg.* 2003;388(5):344-6.
- DeCoster TA, Gehlert RJ, Mikola EA, Pirela-Cruz MA. Management of post-traumatic segmental bone defects. *J Am Acad Orthop Surg.* 2004;12(1):28-38.
- Gustilo RB, Mendoza RM, Williams DN. Problems in the management of type III (severe) open fractures: a new classification of type III open fractures. *J Trauma.* 1984;24(8):742-6.
- Goldstohm GL, Mears DC, Swartz WM. The results of 39 fractures complicated by major segmental bone loss and/or leg length discrepancy. *J Trauma.* 1984;24(1):50-8.
- Ostermann PA, Henry SL, Seligson D. The role of local antibiotic therapy in the management of compound fractures. *Clin Orthop Relat Res.* 1993;(295):102-11.
- Lane JM, Sandhu HS. Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am.* 1987;18(2):213-25.
- Evans RP, Nelson CL, Harrison BH. The effect of wound environment on the incidence of acute osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res.* 1993;(286):289-97.
- Smeltzer MS, Thomas JR, Hickmon SG, Skinner RA, Nelson CL, Griffith D et al. Characterization of a rabbit model of staphylococcal osteomyelitis. *J Orthop Res.* 1997;15(3):414-21.
- Calhoun JH, Mader JT. Treatment of osteomyelitis with a biodegradable antibiotic implant. *Clin Orthop Relat Res.* 1997;(341):206-14.
- Skinner RA, Hickmon SG, Nelson CL, Germer RA. Modified stain for identification of *Staphylococcus aureus* in osteomyelitis. *J Histotech.* 1992;15:303-6.
- Ambrose CG, Clyburn TA, Loudon K, Joseph J, Wright J, Gulati P et al. Effective treatment of osteomyelitis with biodegradable microspheres in a rabbit model. *Clin Orthop Relat Res.* 2004;(421):293-9.
- Sverzut CE, Faria PE, Magdalena CM, Trivellato AE, Mello-Filho FV, Paccola CA et al. Reconstruction of mandibular segmental defects using the guided-bone regeneration technique with polylactide membranes and/or autogenous bone graft: a preliminary study on the influence of membrane permeability. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008;66(4):647-56.
- Cook SD, Baffes GC, Wolfe MW, Sampath TK, Rueger DC, Whitecloud TS 3rd. The effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of large segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am.* 1994;76(6):827-38.
- Bostrom M, Lane JM, Tomin E, Browne M, Berberian W, Turek T et al. Use of bone morphogenetic protein-2 in the rabbit ulnar nonunion model. *Clin Orthop Relat Res.* 1996;(327):272-82.
- Perka C, Schultz O, Spitzer RS, Lindenhayn K, Burmester GR, Sittlinger M. Segmental bone repair by tissue-engineered periosteal cell transplants with bioresorbable fleece and fibrin scaffolds in rabbits. *Biomaterials.* 2000;21(11):1145-53.
- Djapic T, Kusec V, Jelic M, Vukicevic S, Pecina M. Compressed homologous cancellous bone and bone morphogenetic protein (BMP)-7 or bone marrow accelerate healing of long-bone critical defects. *Int Orthop.* 2003;27(6):326-30.
- Kokubo S, Fujimoto R, Yokota S, Fukushima S, Nozaki K, Takahashi K et al. Bone regeneration by recombinant human bone morphogenetic protein-2 and a novel biodegradable carrier in a rabbit ulnar defect model. *Biomaterials.* 2003;24(9):1643-51.
- Sheller MR, Crowther RS, Kinney JH, Yang J, Di Jorio S, Breunig T et al. Repair of rabbit segmental defects with the thrombin peptide, TP508. *J Orthop Res.* 2004;22(5):1094-9.
- Seeherman HJ, Azari K, Bidic S, Rogers L, Li XJ, Hollinger JO et al. rhBMP-2 delivered in a calcium phosphate cement accelerates bridging of critical-sized defects in rabbit radii. *J Bone Joint Surg Am.* 2006;88(7):1553-65.
- Nelson CL, Hickmon SG, Skinner RA. Treatment of experimental osteomyelitis by surgical debridement and the implantation of bioerodable, polyanhydride-gentamicin beads. *J Orthop Res.* 1997;15(2):249-55.
- Joosten U, Joist A, Frebel T, Brandt B, Diederichs S, von Eiff C. Evaluation of an in situ setting injectable calcium phosphate as a new carrier material for gentamicin in the treatment of chronic osteomyelitis: studies in vitro and in vivo. *Biomaterials.* 2004;25(18):4287-95.