Carlos Eduardo Sanches Vaz

**Avaliação do efeito de centrifugado osteogênico de
medula óssea na consolidação de fratura:
estudo experimental em coelhos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Ortopedia e
Traumatologia

Orientador: Prof. Dr. Roberto Guarniero

São Paulo

2006

Carlos Eduardo Sanches Vaz

**Avaliação do efeito de centrifugado osteogênico de
medula óssea na consolidação de fratura:
estudo experimental em coelhos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Ortopedia e
Traumatologia

Orientador: Prof. Dr. Roberto Guarniero

São Paulo

2006

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro de Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos e dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

Lista de símbolos e abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO **1**

2. REVISÃO DA LITERATURA **3**

2.1 CONSOLIDAÇÃO ÓSSEA NORMAL**3**

2.2 CÉLULAS-TRONCO**7**

2.2.1 CONCEITO, DEFINIÇÕES E PROPRIEDADES7

2.2.2 PAPEL DAS CÉLULAS-TRONCO NA CONSOLIDAÇÃO ÓSSEA14

2.3 A MEDULA ÓSSEA E AS CÉLULAS-TRONCO.....**17**

2.4 APLICAÇÃO CLÍNICA DAS CÉLULAS-TRONCO DA MEDULA ÓSSEA.....**21**

3. MÉTODOS **34**

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO**34**

3.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO**38**

3.2.1 ANESTESIA38

3.2.2 ASPIRAÇÃO DA MEDULA ÓSSEA40

3.2.3 CENTRIFUGAÇÃO DOASPIRADO DE MEDULA ÓSSEA.....42

3.2.3.1 Processamento da amostra42

3.2.3.1 Contagem das células nucleadas e teste de viabilidade celular44

3.2.4 TÉCNICA CIRÚRGICA.....46

3.2.5 PÓS - OPERATÓRIO49

3.3 EUTANÁSIA**50**

3.4 CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO E MÉTODOS DE MENSURAÇÃO.....**51**

3.4.1 AVALIAÇÃO DA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA51

3.4.2 AVALIAÇÃO VOLUMÉTRICA DO CALO ÓSSEO54

3.4.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA57

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....**60**

4. RESULTADOS	62
4.1 DENSIDADE MINERAL DO CALO ÓSSEO.....	64
4.2 VOLUME DO CALO ÓSSEO.....	66
4.3 QUANTIDADE RELATIVA DE TECIDO ÓSSEO NO CALO ÓSSEO	68
4.4 QUANTIDADE RELATIVA DE CARTILAGEM NO CALO ÓSSEO.....	70
4.5 QUANTIDADE RELATIVA DE FIBROSE NO CALO ÓSSEO	72
5. DISCUSSÃO	74
6. CONCLUSÃO	83
7. REFERÊNCIAS	84

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

cm	centímetros
cm ²	centímetros quadrados
BMD	densidade mineral óssea
DEXA	dual energy x-ray absorptiometry
g/cm ²	gramas por centímetro quadrado
μ	micra
kg	quilograma
rhBMP-2	proteína óssea morfogenética
mg/kg	miligramas por quilo
ml	mililitro
mm ³	milímetros cúbicos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Divisão celular assimétrica das células-tronco.....	8
Figura 2. Divisão celular simétrica das células progenitoras.....	8
Figura 3. Anatomia esquelética do membro posterior do coelho.	36
Figura 4. Osteotomia da fíbula do coelho.	36
Figura 5. Delineamento experimental.	37
Figura 6. Tatuagem na orelha do coelho, para identificação do animal.	39
Figura 7. Coelho anestesiado com máscara de fluxo contínuo de oxigênio.	39
Figura 8. Aspiração da medula óssea a partir da crista ilíaca do animal.	41
Figura 9. Aspirado de medula óssea em recipiente para transporte.....	41
Figura 10. Separação do buff-coat com pipeta apropriada.	43
Figura 11. Esquema demonstrando o resultado da centrifugação do aspirado de medula óssea.....	43
Figura 12. Células nucleadas viáveis.....	45
Figura 13. Células nucleadas inviáveis.....	45
Figura 14. Momento da realização da osteotomia médio-diáfisaria da fíbula direita... ..	47
Figura 15. Osteotomia médio-diáfisaria da fíbula direita pronta.....	47
Figura 16. Colocação do centrifugado osteogênico no local da osteotomia da fíbula direita.	48
Figura 17. Colocação do Gelfoam [®] no local da osteotomia da fíbula esquerda, sem adição do centrifugado osteogênico.....	48
Figura 18. Densitometria óssea.	53

Figura 20. Cálculo do volume do calo ósseo.	56
Figura 21. Visualização do calo ósseo formado na região da osteotomia da fíbula com microscopia óptica comum.	59
Figura 22. Demarcação dos tipos de tecido formados no calo ósseo para análise quantitativa com histomorfometria.	59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - RESULTADO GERAL DAS CONTAGENS DE CÉLULAS NUCLEADAS POR MICROSCOPIA ÓTICA APÓS COLORAÇÃO COM AZUL DE TRIPANO PARA A DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR SEGUNDO O COELHO.....62

TABELA 2 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA ($10^{-3} \cdot \text{g/cm}^2$) DO CALO ÓSSEO FORMADO NA REGIÃO MÉDIO-DIAFISÁRIA DA FÍBULA SUBMETIDA À OSTEOTOMIA. COMPARAÇÃO DAS FÍBULAS COM PREPARADO OSTEOGÊNICO E CONTROLE PELO TESTE T PAREADO ($\alpha=0,05$)64

TABELA 3 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DO VOLUME (mm^3) DO CALO ÓSSEO FORMADO NA REGIÃO MÉDIO-DIAFISÁRIA DA FÍBULA SUBMETIDA À OSTEOTOMIA. COMPARAÇÃO DAS FÍBULAS COM PREPARADO OSTEOGÊNICO E CONTROLE PELO TESTE DE WILCOXON ($\alpha=0,05$)66

TABELA 4 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DA QUANTIDADE RELATIVA DE OSSO (%) NO CALO ÓSSEO FORMADO NA REGIÃO MÉDIO-DIAFISÁRIA DA FÍBULA SUBMETIDA À OSTEOTOMIA. COMPARAÇÃO DAS FÍBULAS COM PREPARADO OSTEOGÊNICO E CONTROLE PELO TESTE DE T PAREADO ($\alpha=0,05$)68

TABELA 5 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DA QUANTIDADE RELATIVA DE CARTILAGEM (%) NO CALO ÓSSEO FORMADO NA REGIÃO MÉDIO-DIAFISÁRIA DA FÍBULA. COMPARAÇÃO DAS FÍBULAS COM PREPARADO OSTEOGÊNICO E CONTROLE PELO TESTE DE WILCOXON ($\alpha=0,05$).....70

TABELA 6 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DA QUANTIDADE RELATIVA DE FIBROSE (%) NO CALO ÓSSEO FORMADO NA REGIÃO MÉDIO-DIAFISÁRIA DA FÍBULA. COMPARAÇÃO DAS FÍBULAS COM PREPARADO OSTEOGÊNICO E CONTROLE PELO TESTE DE WILCOXON ($\alpha=0,05$).....72

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Densidade mineral óssea ($10^{-3}.g/cm^2$) do calo ósseo das fíbulas tratadas com preparado osteogênico e controle 65

GRÁFICO 2 - Volume (mm^3) do calo ósseo das fíbulas tratadas com preparado osteogênico e controle..... 67

GRÁFICO 3 - Quantidade relativa (%) de osso no calo ósseo das fíbulas tratadas com preparado osteogênico e controle 69

GRÁFICO 4 - Quantidade relativa (%) de cartilagem no calo ósseo das fíbulas tratadas com preparado osteogênico e controle 71

GRÁFICO 5 - Quantidade relativa (%) de fibrose no calo ósseo das fíbulas tratadas com preparado osteogênico e controle 73

RESUMO

Vaz, CES. Avaliação do efeito de centrifugado osteogênico de medula óssea na consolidação de fratura: estudo experimental em coelhos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 110p.

INTRODUÇÃO: O objetivo deste estudo foi de avaliar a eficácia de um centrifugado osteogênico de medula óssea para estimular a consolidação de osteotomias da fíbula em coelhos. **MÉTODOS:** Este estudo experimental envolveu a utilização de dez coelhos machos adultos da raça Nova Zelândia albino. Realizou-se uma osteotomia transversa médio-diafisária da fíbula direita, seguida da adição local de uma esponja de colágeno absorvível embebida em um centrifugado osteogênico, obtido pela centrifugação de aspirado de medula óssea do osso ilíaco ipsilateral. A fíbula esquerda foi utilizada como controle, sendo feita a mesma osteotomia, porém neste caso adicionando-se somente a esponja de colágeno absorvível. O centrifugado de medula óssea elaborado em laboratório foi submetido à contagem do número de células nucleadas e a teste de viabilidade celular antes de ser administrada no local das osteotomias. Após quatro semanas os animais foram sacrificados para estudo dos calos ósseos formados. Os critérios de avaliação foram a mensuração da densidade mineral utilizando-se a densitometria óssea com DEXA, do volume do calo com tomografia computadorizada multi-slice e dos tecidos formados por meio de histomorfometria. **RESULTADOS:** O método utilizado para a centrifugação dos aspirados de medula óssea resultou em uma concentração média de células nucleadas três vezes maior que o número destas células nos aspirados originais, sem destruição celular significativa. A utilização deste centrifugado osteogênico resultou em um aumento médio na densidade mineral óssea dos calos de 40,3% e da quantidade relativa de tecido ósseo de 9,4%, sem aumento significativo nas quantidades relativas de cartilagem ou fibrose. Não houve aumento significativo no volume dos calos ósseos. **CONCLUSÃO:** A administração de centrifugado osteogênico de medula óssea utilizado neste estudo favoreceu a consolidação óssea de osteotomias experimentais em coelhos, observando-se uma melhora qualitativa do calo ósseo.

SUMMARY

Vaz, CES. Effect of centrifuged osteogenic bone-marrow aspirate on bone fracture healing: an experimental study in rabbits [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2006. 110p.

INTRODUCTION: The purpose of this study was to evaluate the efficacy of a centrifuged osteogenic bone-marrow aspirate to stimulate rabbit fibular osteotomies healing. **METHOD:** Ten white New Zealand rabbits were used. A transverse middle-diaphysis fibular osteotomy was performed at the right fibula, where a collagen absorbable sponge embedded in the osteogenic centrifuged bone marrow aspirate was inserted. The left fibula was used as the control group, where the collagen absorbable sponge was inserted without the osteogenic centrifuged aspirate. The centrifuged bone-marrow aspirate was arranged at the laboratory and submitted to nuclear cell count and cell viability test. The rabbits were killed at four weeks after surgery to evaluate bone callus formation. The results analysis was performed with DEXA bone densitometry to evaluate callus mineral mass, multislice computer tomography to evaluate callus volume and histomorphometry to evaluate the relative rate of tissue formation. **RESULTS:** The bone-marrow centrifugation technique increased the number of nucleated cells by three compared with the number of that cells in the original bone-marrow aspirates, without significant nucleated cell dead. The apply of centrifuged osteogenic bone-marrow aspirate resulted in an increased callus bone mineral mass by 40,3%, and increased relative rate of bone tissue formation by 9,4%, without increase the relative rate of cartilage or fibrous tissue. There was not increased callus volume. **CONCLUSION:** This study shows that the centrifuged osteogenic bone-marrow aspirate was able to improve the healing of experimental fibular osteotomies in rabbits by qualitative improve of bone callus.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, as lesões causadas por acidentes de trânsito tornaram-se líderes em número de mortes, perda de anos de atividade produtiva e custo para os sistemas de saúde, em todas as faixas etárias¹. Nos Estados Unidos, cerca de trinta e três milhões de pessoas sofrem lesões traumáticas do sistema músculo – esquelético anualmente, o que significa uma incidência de 13,8 lesões para cada mil indivíduos. Dentre estas, aproximadamente 6,2 milhões são fraturas².

Apesar do desenvolvimento da tecnologia médica e do melhor manejo ortopédico das fraturas nos últimos anos, algumas destas ainda consolidam irregularmente, outras demoram muito tempo para consolidar e algumas resultam em pseudoartroses³.

Embora atualmente o emprego de enxerto ósseo autólogo seja considerado a técnica padrão para se estimular a consolidação óssea, várias complicações estão associadas a este procedimento, incluindo danos ao sítio doador, cicatrizes dolorosas, hematomas, infecção, claudicação e suprimento limitado^{4,5,6}. Estes problemas deram origem a várias linhas de pesquisa buscando alternativas menos invasivas.

Recentemente técnicas de engenharia tecidual têm apresentando resultados promissores buscando reparar, substituir ou regenerar órgãos e tecidos específicos⁷.

No âmbito da ortopedia, as opções de engenharia tecidual incluem métodos para captura e transplante de células indiferenciadas precursoras de osteoblastos, uso de matrizes bioativas para suporte tecidual e introdução local ou sistêmica de hormônios peptídeos e fatores de crescimento⁸.

Freidenstein et al.⁹, em 1966, demonstraram a eficácia do transplante de uma cultura de células precursoras indiferenciadas, obtidas da medula óssea, para formação óssea heterotópica. A partir daí, vários estudos ratificaram este achado^{10,11,12}.

Apesar de eficaz, a cultura e o transplante de células indiferenciadas da medula óssea são procedimentos complexos, caros e que envolvem uma metodologia dividida em três etapas: obtenção das células, desenvolvimento da cultura e implantação¹³. Como alternativa, a administração direta de aspirados de medula óssea no local interessado tem sido pesquisada clínica e experimentalmente, buscando estimular a consolidação de fraturas, tratar pseudoartroses e preencher defeitos ósseos adquiridos por trauma ou ressecções ósseas cirúrgicas^{14,15,16,17}.

O objetivo deste estudo experimental foi avaliar a eficácia de um centrifugado osteogênico, obtido por meio de centrifugação de aspirados de medula óssea, para estimular a consolidação de osteotomias na fíbula de coelhos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CONSOLIDAÇÃO ÓSSEA NORMAL

Segundo Einhorn³, a consolidação de uma fratura compreende um complexo mecanismo reparador que resulta na restauração quase completa da arquitetura óssea normal, ao contrário de outros tecidos, que cicatrizam com a formação de tecidos reparadores pouco organizados.

Embora o processo cicatricial da fratura envolva respostas da medula óssea, córtex e partes moles adjacentes, MacKibbin¹⁸ chegou à conclusão de que a resposta mais importante é a do periósteo, onde as células precursoras indiferenciadas contribuem para o processo de cicatrização por meio de uma recapitulação da ossificação intramembranosa embrionária e da formação óssea endocondral.

A resposta do periósteo habitualmente é rápida e efetiva, podendo cobrir falhas até a metade do diâmetro do osso, e não depende das partes moles adjacentes¹⁸. O osso formado pela ossificação intramembranosa pode se estender além do local da fratura, resultando na formação de um calo duro, que é formado diretamente sem um estágio cartilaginoso prévio. Na ossificação endocondral, o osso forma-se adjacente ao foco de fratura e depende do desenvolvimento de um molde cartilaginoso prévio, que posteriormente se calcifica e é substituído por osso¹⁹.

Em termos histológicos clássicos, a cicatrização óssea pode ocorrer de duas maneiras: consolidação óssea primária ou direta e consolidação óssea secundária ou indireta²⁰.

Conforme descrito por Greenbaum e Kanat²¹, a consolidação óssea primária representa uma tentativa direta da cortical óssea em se reparar após uma fratura. A cortical óssea de um lado da fratura busca unir-se com a cortical do outro lado, procurando retomar a continuidade mecânica. Isto só é possível em condições de restauração anatômica dos fragmentos da fratura, como ocorre nos casos submetidos à cirurgia com fixação interna rígida, por meio de implantes metálicos. Nestas condições, os osteoclastos de um lado da fratura provocam uma reabsorção óssea, restabelecendo os sistemas de Havers e permitindo assim a passagem de vasos sanguíneos. Estes vasos neoformados são acompanhados por células endoteliais e células mesenquimais perivasculares, que são precursoras de células osteoprogenitoras que darão origem aos osteoblastos.

Por outro lado, a consolidação óssea secundária envolve inicialmente a formação de um calo ósseo precursor, constituído predominantemente por cartilagem, e que posteriormente se calcifica²². Neste caso, ocorre uma combinação de ossificação intramembranosa e endocondral. A seqüência da cicatrização óssea inclui um estágio inicial de inflamação com formação de um hematoma, seguido de um estágio de angiogênese e início da formação de cartilagem e então três estágios subseqüentes de calcificação da cartilagem, remoção da cartilagem e formação óssea, para finalmente terminar em um estágio mais longo de remodelação óssea³.

Einhorn³, em 1998, evidencia que o impacto causador da fratura provoca lesão da medula óssea, da cortical, do periósteo, das partes moles adjacentes e rompimento dos vasos sanguíneos locais. Segue-se a formação de hemorragia e do hematoma fraturário, com invasão de células inflamatórias e liberação local de mensageiros bioquímicos e biofísicos. Bolander²³ demonstra que estas substâncias contêm moléculas sinalizadoras com a capacidade de iniciar cascatas de eventos celulares críticos para a consolidação óssea, como a regulação da proliferação celular e a diferenciação das células precursoras indiferenciadas. Nas situações onde ocorre diminuição no número destas células, como traumas de repetição, infecções, irradiação prévia e defeitos cicatriciais, pode ocorrer deficiência de consolidação, resultando em retardo de consolidação e pseudoartrose⁸.

Brighton e Hunt¹⁹ comprovam que, poucas horas após ocorrer uma fratura, ocorre a perda da arquitetura normal dos elementos da medula óssea, trombose dos vasos sanguíneos na região próxima da fratura e reorganização das células da medula óssea em regiões de alta e baixa celularidades. Nas regiões de alta celularidade, ocorre uma transformação das células endoteliais indiferenciadas em células polimórficas e estas, após vinte e quatro horas, expressam um fenótipo osteoblástico e começam a produzir osso.

A resposta das partes moles adjacentes à fratura envolve rápida atividade celular e o desenvolvimento de um calo ósseo precoce que estabiliza os fragmentos da fratura. O tecido formado a partir das partes

moles evolui por um processo de ossificação endocondral onde células precursoras indiferenciadas são recrutadas, proliferam e em seguida diferenciam-se para formar células formadoras de cartilagem e osso¹⁸.

De acordo com Schenk²², a calcificação da cartilagem do calo da fratura ocorre por um mecanismo similar ao que ocorre na placa de crescimento. Em torno de nove dias após a fratura, há um predomínio de condrócitos proliferativos passando por mitoses e divisões sucessivas. Após duas semanas, a proliferação celular decai e os condrócitos tornam-se hipertróficos e começam a liberar vesículas para a matriz celular, contendo substâncias que participam na regulação da calcificação celular. A cartilagem calcificada começa então a ser invadida por vasos sanguíneos, que trazem consigo células perivasculares precursoras de osteoblastos. A cartilagem calcificada do calo de fratura é idêntica à esponjosa primária encontrada na placa de crescimento, e conforme ela vai sendo reabsorvida pelos condroclastos, o osso esponjoso que a substitui é idêntico à esponjosa secundária da placa de crescimento.

A ossificação intramembranosa a partir do periósteo inicia-se imediatamente após a fratura, mas as atividades proliferativas das células cessam antes de duas semanas. Quando a ossificação endocondral alcança o estágio de formação de cartilagem, já existe uma quantidade representativa de osso esponjoso adjacente ao sítio de fratura. Uma vez que a fratura esteja unida pela ponte óssea, o calo, agora completamente formado por osso esponjoso, inicia sua remodelação, resultando, finalmente, em uma estrutura óssea lamelar mecanicamente competente²⁴.

2.2 CÉLULAS-TRONCO

2.2.1 Conceito, definições e propriedades

De acordo com Beresford²⁵, a célula-tronco é um tipo especial de célula que tem a capacidade única de se auto-renovar e dar origem a células especializadas. Embora a maioria das células do corpo humano, como as células cardíacas e da pele, estejam destinadas a realizar funções específicas, a célula-tronco é indiferenciada e permanece neste estado até que receba um sinal para se transformar em uma célula especializada.

Muschler e Midura²⁶ destacam que as células-tronco são células em repouso que apresentam duas propriedades fundamentais: a capacidade de divisão celular assimétrica e a de auto-renovação. Nestes processos, uma célula-tronco é ativada por algum sinal ou evento para deixar seu estado de repouso e se dividir. No entanto, o resultado desta divisão celular resulta em duas células filhas que não são idênticas (Figura 1). Uma célula filha prolifera simetricamente, geralmente por muitas divisões, originando um grande número de células, cada uma denominada célula progenitora. Estas células progenitoras posteriormente se diferenciam para formar os tecidos maduros (Figura 2). Em contraste, a outra célula filha retorna ao estado original de repouso da célula mãe, até que um novo sinal ou evento ocorra, e possui o mesmo fenótipo e todas as propriedades da célula-tronco mãe original. Este processo é conhecido como auto-renovação.

Figura 1. Divisão celular assimétrica das células-tronco. A célula-tronco (azul) é ativada por algum sinal ou evento, sai de seu estado de repouso e se reproduz, originando duas células filhas diferentes. A primeira delas é idêntica à célula-mãe e permanece em estado de repouso até sofrer algum estímulo. A outra célula-filha (vermelha) é chamada célula progenitora, e pode se diferenciar em uma célula tecidual madura (com o núcleo em amarelo) ou se reproduzir simetricamente, produzindo um grande número de células progenitoras. A capacidade da célula-tronco em gerar células filhas com o mesmo fenótipo e todas as suas propriedades é denominada auto-renovação.

Figura 2. Divisão celular simétrica das células progenitoras. As células progenitoras derivam de uma célula-tronco e são parcialmente indiferenciadas. Elas podem passar por um processo de diferenciação celular e se transformar em células teciduais diferenciadas (células maduras) ou se reproduzir simetricamente, produzindo um grande número de células progenitoras que serão as responsáveis pela formação dos mais variados tipos celulares que compõem os tecidos do organismo.

Lin²⁷ concluiu que este processo de auto-renovação é de suma importância, uma vez que, se todas as células filhas se tornassem células progenitoras, a população de células-tronco diminuiria progressivamente a partir de cada evento de ativação. Isto resultaria em uma depleção rápida da população de células-tronco de todos os tecidos normais, resultando em um número insuficiente para suportar os processos de remodelação e reparo necessários para a manutenção a longo prazo da saúde do organismo.

As células-tronco e as células progenitoras estão presentes em praticamente todos os tecidos humanos normais e são fundamentais para sua saúde, manutenção e resposta a lesões ou doenças durante a vida. De acordo com Bianco et al.²⁸, estas células são a fonte de todos os tecidos novos formados pelos sistemas de reparo e remodelação e são moduladas por sinais químicos e físicos que controlam sua ativação, proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência.

Devido ao crescente interesse e às freqüentes citações das células-tronco no meio acadêmico e na mídia leiga, a terminologia pertinente tornou-se confusa e às vezes mal aplicada. Mesmo na literatura biomédica, há uma falta de consistência nos termos utilizados.

Frente ao potencial e relevantes fatores éticos e legais das células-tronco, a Secretaria de Saúde e Assuntos Humanos dos Estados Unidos da América solicitou ao Instituto Nacional de Saúde daquele país que preparasse um relatório descrevendo o estado atual das pesquisas sobre as células-tronco. Assim, no ano de 2001, foi publicado um documento visando descrever o estado da arte da pesquisa sobre células-tronco até aquele

momento²⁹, englobando mais de mil e duzentas publicações científicas sobre o assunto, definindo conceitos e propriedades das células-tronco, reproduzidos a seguir:

Células-tronco: São células de embrião, feto ou adulto que tem, sob certas condições, a habilidade única de se auto-renovarem constantemente e também de originarem as diferentes células especializadas que compõe os tecidos e órgãos do corpo.

Células-tronco pluripotentes: compreendem uma classe de célula-tronco capaz de originar todos os mais de 200 tipos de células conhecidas do corpo humano. Uma única célula-tronco pluripotente pode dar origem a células que se formam a partir das três camadas germinativas (mesoderma, endoderma e ectoderma) de onde os tecidos do corpo são originados. As únicas fontes conhecidas de células-tronco pluripotentes são aquelas isoladas e cultivadas de embriões humanos e do tecido fetal destinado a fazer parte das gônadas (crista gonadal).

Células-tronco embrionárias: São derivadas de um grupo de células presentes em um dos estágios mais precoces do desenvolvimento do embrião humano, chamado blastocisto. Especificamente, as células-tronco embrionárias se originam a partir da massa de células internas do blastocisto, na fase de pré-implantação na parede uterina. Dezoito a vinte e quatro horas após a fertilização do óvulo humano pelo espermatozóide, o ovo formado (zigoto) é considerado dia 1. No dia 2 (24 a 25 horas), o zigoto passa pela primeira clivagem, produzindo um embrião com duas células. No dia 3 (72 horas), o embrião alcança o estágio de oito células, conhecido

como mórula, e é neste momento que o genoma do embrião começa a controlar o seu desenvolvimento. No dia 4, as células embrionárias aderem firmemente uma às outras num processo conhecido como compactação e inicia-se a formação de uma cavidade interna chamada blastocelo. No dia 5, esta cavidade está completamente formada, e as células da massa interna se separam das células mais periféricas. Estas últimas formam uma camada celular externa chamada trofoectoderma, que envolve a blastocelo e a camada de células internas que agora fica em situação excêntrica, constituindo-se assim o blastocisto. O blastocisto (dia 5) é utilizado para a captação de células-tronco embrionárias, que são derivadas das células da massa interna. Deste modo, um embrião humano normal de 5 dias é formado de 200 a 250 células, das quais a maioria pertence ao trofoectoderma. Por meio de micro-cirurgia ou imuno-cirurgia, as células da massa interna são captadas (número médio de 30 a 34 células). Estas células são pluripotentes, capazes de auto-renovação contínua e podem se diferenciar em todas as células do organismo.

Células-tronco do germe embrionário: Uma célula do germe embrionário é originada do tecido fetal. Especificamente, elas são isoladas de uma parte específica do embrião ou feto de 5 a 10 semanas, chamada crista gonadal, que mais tarde dá origem aos óvulos ou espermatozóides. As células-tronco embrionárias e as células do germe embrionário são ambas pluripotentes, mas diferem não só na fonte onde são encontradas, mas também em várias características. Culturas derivadas das células-tronco do germe embrionário têm uma capacidade de proliferação mais restrita. As

células-tronco embrionárias proliferam in vitro por cerca de dois anos seguidos, formando populações de centenas de células filhas, enquanto as células-tronco do germe embrionário formam apenas 70 a 80 populações de células filhas.

Diferenciação: é o processo pelo qual uma célula não especializada (indiferenciada) se torna uma ou mais células especializadas (diferenciadas) do organismo. Durante a diferenciação, alguns genes se tornam ativos e outros inativos. Como resultado, uma célula diferenciada desenvolve estruturas específicas e realiza funções próprias, inerentes a este tipo de célula.

Células-tronco adultas: São células indiferenciadas que estão presentes em tecidos diferenciados, capazes de se auto-reproduzirem por toda vida do organismo e gerar todas as células especializadas do tecido de onde se originaram. Estas células foram encontradas na medula óssea, no sangue, na córnea e na retina do olho, no cérebro, músculo esquelético, polpa dental, fígado, pele e pâncreas. Ao contrário das células-tronco embrionárias, até hoje não foram isoladas células tronco-adultas pluripotentes. Apesar disto, recentemente observou-se que células-tronco adultas de um tecido foram capazes de originar células diferenciadas com características de outros tecidos. Assim, embora as células-tronco adultas hematopoiéticas da medula óssea sejam capazes de originar células sanguíneas e do sistema imune, estudos recentes demonstraram que sob certas condições estas mesmas células-tronco podem se diferenciar em células com características próprias dos neurônios. Esta capacidade foi

chamada de plasticidade da célula-tronco adulta. Há evidências que dependendo de um meio adequado, algumas células-tronco adultas podem ser "geneticamente reprogramadas" para originar células especializadas características de outros tecidos. A maioria do conhecimento atual sobre células-tronco adultas foi adquirida dos estudos envolvendo as células-tronco do sistema hematopoiético, isoladas do sangue e da medula óssea.

Células progenitoras ou precursoras: Ocorrem tanto no tecido fetal quanto no adulto e são parcialmente especializadas. As células progenitoras diferem das células-tronco adultas, pois estas, quando se dividem, geram duas células, uma das quais é uma célula-tronco capaz de se auto-replicar novamente (divisão assimétrica). Em contraste, as células progenitoras, quando se dividem, podem formar novas células progenitoras ou duas células especializadas, nenhuma das quais é capaz de se auto-replicar (divisão simétrica). Sua função é de substituir células lesadas ou mortas, mantendo a integridade e as funções teciduais.

2.2.2 Papel das células-tronco na consolidação óssea

Conforme Eriksen et al.³⁰, quatro tipos de células compõem o tecido ósseo: osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e células de revestimento ósseo ("bone-lining cells"). Os osteoblastos, osteoclastos, e as células de revestimento ósseo estão presentes nas superfícies ósseas, enquanto os osteócitos encontram-se no interior mineralizado. Os osteoblastos são células completamente diferenciadas cuja função é produzir a matriz óssea. Os osteócitos, por sua vez, são osteoblastos maduros situados no interior da matriz óssea e que são responsáveis pela sua manutenção. As células de revestimento são células inativas que recobrem a superfície óssea e não participam nem da formação e nem da reabsorção óssea. Finalmente, os osteoclastos são células multinucleadas responsáveis pela reabsorção óssea.

Os osteoblastos representam uma população celular em constante movimento, que dá origem tanto à matriz óssea quanto às suas células derradeiras, os osteócitos e as células de revestimento ósseo. No entanto, Parfitt³¹ refere que estas células têm uma sobrevida média de apenas quarenta dias, e, quando atingem sua idade limite, têm três possíveis finais: podem se tornar osteócitos, podem se tornar células de revestimento na superfície do osso maduro, ou podem morrer por apoptose.

Como a vida funcional dos osteoblastos é curta, a capacidade do osso responder apropriadamente a lesões e prevenir o acúmulo de micro-traumatismos de repetição durante a vida dependerá da existência de

células precursoras com atividade proliferativa freqüente e que mantenham a habilidade de se auto-renovar por toda a vida²⁵.

Yoo e Johnstone³² comentam que o reparo e a regeneração de qualquer tecido requerem proliferação celular e produção de nova matriz, para que se restabeleça a ligação entre os segmentos de tecido sadios. As células que participam do reparo costumam estar totalmente diferenciadas e presentes no local, porém, com relação à cicatrização óssea, o reparo da maioria das fraturas e a regeneração de segmentos ósseos mais extensos muitas vezes ultrapassam a capacidade funcional dos osteoblastos existentes no sítio da fratura. Estes autores concluem que, como os osteoblastos locais participam em uma extensão limitada, a presença de células-tronco osteoprogenitoras provedoras de novos osteoblastos é determinante para o sucesso do processo cicatricial ósseo. A falência na mobilização, proliferação e diferenciação destas células levam a um colapso na formação de osso novo e a uma eventual pseudoartrose.

Apesar do grande potencial formador de órgãos e tecidos das células-tronco embrionárias, a alta demanda técnica para sua obtenção e cultura, o difícil controle da sua proliferação (podendo resultar em neoplasias), os problemas de histocompatibilidade e os aspectos éticos e religiosos de sua utilização fizeram o interesse dos pesquisadores recair sobre as células-tronco pluripotentes adultas⁷.

As células-tronco adultas atualmente podem ser encontradas em virtualmente todos os tecidos, mas as fontes mais conhecidas são as reservas endógenas teciduais, o sangue periférico, a placenta e sangue do

cordão umbilical, as células perivasculares e a medula óssea. Dentre estas, a medula óssea tornou-se a mais pesquisada e utilizada, devido a sua disponibilidade imediata e reserva praticamente ilimitada⁸.

2.3 A MEDULA ÓSSEA E AS CÉLULAS-TRONCO

A medula óssea pode ser vista como um órgão composto por dois sistemas principais que originam linhagens celulares distintas: o sistema hematopoiético propriamente dito e o seu estroma de suporte²⁸. Durante o desenvolvimento embrionário, as células da camada mesodérmica no embrião trilaminar originam vários tipos de tecidos mesenquimais, incluindo osso, cartilagem, tendões, músculos e gordura. Conforme demonstraram Bruder e Fox³³, estas células, conhecidas como células-tronco mesenquimais, também estão presentes no organismo adulto, sendo recentemente encontradas no periósteo e no estroma da medula óssea.

Segundo Owen³⁴, as evidências de que existe no estroma um sistema de células-tronco capaz de originar diversas linhagens e fenótipos celulares fazem da medula óssea o único órgão conhecido onde dois sistemas distintos de células-tronco e tecido interligados não só coexistam, mas também cooperem funcionalmente. Assim, foram definidos dois grupos de células-tronco na medula óssea: células-tronco hematopoiéticas, que dão origem às células sanguíneas e às do sistema imune, e as células-tronco do estroma (mesenquimais), que podem formar osso, cartilagem, gordura, músculo cardíaco e músculo esquelético.

Burwell et al.³⁵, já em 1964, relatam que células osteogênicas primitivas da medula óssea respondiam pela maior parte da eficácia biológica dos enxertos de osso esponjoso autólogo.

Em 1966, Friedenstein et al.⁹ observaram, em transplantes heterotópicos de medula óssea, que osso novo era formado a partir de células proliferativas da medula óssea, que persistiam e proliferavam mesmo após a morte das células hematopoiéticas. Estudos subseqüentes^{11,12,13,25} demonstraram que pelo menos algumas destas células eram pluripotentes e poderiam diferenciar-se em osso, cartilagem, tecido fibroso, gordura ou músculo.

Na tentativa de caracterizar as células que compunham o estroma da medula óssea, Friedenstein et al.¹⁰ desenvolveram uma cultura de células mesenquimais da medula óssea em laboratório e posteriormente a transplantaram em animais de experimentação, tanto em sistemas fechados (câmaras de difusão) quanto em sistemas abertos (embaixo da cápsula renal ou do tecido subcutâneo). Em ambos os grupos observou-se a formação de tecido osteogênico, constituído por cartilagem e osso.

Bab et al.³⁶ relataram que na avaliação histológica do tecido formado no interior das câmaras de difusão ficou comprovado que a maioria das células hematopoiéticas morre, e que a formação do tecido osteogênico é consequência da proliferação e diferenciação de um pequeno número de células estromais sobreviventes.

Seguindo esta mesma linha, outros pesquisadores demonstraram que fragmentos de medula óssea ou suspensão de células da medula óssea também possuem potencial osteogênico quando transplantados heterotopicamente em receptores imunologicamente compatíveis^{10,37}. Estudos experimentais subseqüentes concluíram que os tecidos

hematopoiéticos formados nos locais de implantação heterotópica da medula óssea originam-se do receptor, enquanto que os tecidos estromais formados nestes locais originam-se do doador^{38,39}.

Friedenstein et al.⁹ e Friedenstein et al.³⁸ demonstraram que o potencial osteogênico do estroma da medula óssea fica mantido mesmo após a desagregação mecânica ou enzimática, formando suspensões de células semelhantes isoladas. Este estudo confirma a existência de células precursoras no estroma medular com capacidade de diferenciação osteogênica, independente de interações obrigatórias entre os tipos diferentes de células ou entre as células e a matriz óssea existentes no local.

Ashton et al.⁴⁰ e Bab et al.⁴¹ observaram, tanto na microscopia óptica comum quanto na microscopia eletrônica, que os tecidos osteogênicos formados por fragmentos ou suspensão de células de medula óssea no interior de câmaras de difusão são indistinguíveis do tecido esquelético normal. Mais importante foi a constatação de que a expressão seqüencial dos componentes da matriz óssea, durante a formação do tecido osteogênico nessas câmaras, recapitulou os eventos vistos durante o desenvolvimento ósseo embrionário e durante a cicatrização óssea no adulto.

As células-tronco mesenquimais diferem com relação ao seu potencial biológico, de acordo com a fonte de onde se originam. Quando derivadas da medula óssea, elas podem se diferenciar em fenótipos bem variados, incluindo osso, tecido fibroso, gordura, músculo, cartilagem e, como demonstrado mais recentemente, em tecido neural, fígado e músculo

cardíaco^{11,12,26,33,42,43}. Em contraste, quando derivadas da cartilagem adulta, são capazes de formar somente cartilagem^{11,12,26}.

De acordo com Muschler e Midura⁴², o reconhecimento desta ampla distribuição de células-tronco adultas pluripotentes na medula óssea e virtualmente em todos os outros tecidos conectivos representa um avanço significativo no campo da engenharia tecidual voltada para a ortopedia. Esta descoberta oferece varias fontes potenciais de células-tronco que podem ser retiradas, manipuladas e projetadas para aprimorar o tratamento de fraturas, falhas ósseas e pseudoartroses.

2.4 APLICAÇÃO CLÍNICA DAS CÉLULAS-TRONCO DA MEDULA ÓSSEA

Apesar da rápida evolução dos métodos de fixação de fraturas permitirem uma recuperação funcional mais precoce do doente, ainda não existe um meio eficaz e livre de complicações para melhorar ou acelerar a consolidação de uma fratura.

Embora o enxerto ósseo autólogo ainda seja o método de escolha para o preenchimento de falhas ósseas e estimulação da consolidação de fraturas e pseudoartroses, vários problemas foram relatados com a sua utilização^{4,5,6}. Dor importante no local de retirada, hematomas, perda de função, infecção, formação de fistulas e suprimento limitado são algumas das complicações possíveis^{45,46}. Esses problemas levaram muitos pesquisadores a procurarem tratamentos alternativos.

Bruder et al.⁴⁷ demonstraram que a formação e o reparo ósseo adequados ocorrem na presença de:

1. Uma fonte de células-tronco capazes de se diferenciar em osteoblastos.
2. Fatores de crescimento ósseo que estimulem a migração, proliferação e diferenciação das células-tronco.
3. Uma matriz bioabsorvível ou suportes teciduais acelulares, que servem de suporte para as células osteoprogenitoras no local do defeito ósseo.
4. Angiogênese e formação de uma rede vascular satisfatória por meio de do osso novo recém-formado.

As estratégias terapêuticas empregadas visando complementar ou substituir a necessidade de enxerto ósseo autólogo procuram agir diretamente sobre estes alvos, e compreendem implantação de suportes teciduais (matrizes bioativas), administração local de fatores de crescimento e transplante de células-tronco mesenquimais.

Burkus⁴⁸ relata que os vários tipos de enxerto ósseo podem apresentar três propriedades distintas, cada qual com uma função específica na consolidação óssea. A primeira é a osteogenicidade, que ocorre somente na presença de osteoblastos, pela deposição direta de osso. Apenas o enxerto ósseo autólogo e os aspirados de medula óssea possuem esta propriedade. A segunda é a osteocondutividade, que é a habilidade de um material agir passivamente como uma ponte, suportando a formação do osso novo e o seu crescimento. Os enxertos cerâmicos e o aloenxerto ósseo são exemplos de materiais inertes com osteocondutividade. Por fim, a terceira propriedade é chamada osteoindução, que revela a presença de fatores de crescimento facilitando o recrutamento e a diferenciação das células-tronco mesenquimais, induzindo especificamente a formação de osteoblastos que produzem osso novo.

A implantação terapêutica de matrizes bioativas fornece uma superfície para a migração e aderência das células locais e células osteoprogenitoras, além de funcionar como um local protegido onde o tecido novo pode se formar e se distribuir pela região necessária⁴⁹. No entanto, o sucesso deste procedimento depende da presença de uma quantidade suficiente de células-tronco mesenquimais no local. Os materiais mais

utilizados são aloenxertos ósseos, compostos cerâmicos, ácido hialurônico e polímeros sintéticos.

Marshall R. Urist⁵⁰ foi o primeiro a identificar, em 1965, uma substância que podia induzir a formação óssea em um tecido mole (extra-ósseo), a qual denominou “princípio de indução óssea”. Pesquisas subseqüentes identificaram a natureza protéica dessas substâncias, que passaram então a ser chamadas proteínas ósseas morfogenéticas⁵¹ ou fatores de crescimento ósseo.

O sucesso de estudos que caracterizaram, clonaram, expressaram e implantaram proteínas morfogenéticas purificadas ou recombinadas em locais ortotópicos para o reparo de defeitos ósseos extensos^{52,53,54}, permitiu a descoberta do seu mecanismo de ação. Estes fatores de crescimento atuam induzindo as células-tronco mesenquimais endógenas a uma diferenciação osteogênica e à produção de matriz óssea no local da fratura⁵⁵. Mais uma vez, portanto, o sucesso desta terapia depende da presença das células-tronco mesenquimais em número suficiente para promover a formação dos osteoblastos que irão produzir osso novo.

O transplante de células-tronco mesenquimais tem como o objetivo compensar uma deficiência no número e/ou atividade destas células no local interessado, que pode ocorrer por traumatismos prévios, infecção, irradiação prévia, defeitos teciduais, cicatrizes ou deficiência vascular²⁶. Conforme demonstraram Muschler et al.⁵⁶, este transplante pode melhorar a evolução dos enxertos osteocondutivos e osteoindutores, mesmo nos locais envolvidos por tecidos sãos. Isto sugere que mesmo a cicatrização de

tecidos normais pode ser limitada pela deficiência das células-tronco mesenquimais.

A importância do provimento adicional de células-tronco no local de desprovido de formação óssea foi comprovada por muitos estudos, na maioria dos quais estas células foram obtidas da medula óssea^{57,58,59,60,61,62}.

A partir destas considerações biológicas, vários estudos buscaram desenvolver técnicas para implantação direta de células-tronco mesenquimais no local necessitado de formação óssea, trazendo benefícios tanto para fraturas com dificuldade para consolidação quanto nos pacientes experimentando um declínio na quantidade de células osteoprogenitoras disponíveis, como nos idosos, na osteoporose e em outros distúrbios metabólicos^{63,64}.

Apesar das pesquisas iniciais utilizarem culturas de células-tronco mesenquimais obtidas da medula óssea, este processo é complexo, caro e envolve um procedimento realizado em três etapas: obtenção das células, desenvolvimento da cultura e implantação²¹. Frente a este problema, vários pesquisadores passaram a empregar aspirados de medula óssea administrados diretamente no local pretendido. Como as técnicas para contagem e separação de cada tipo celular isolado demandam procedimentos muito complexos, o termo células progenitoras do tecido conectivo foi adotado para descrever a população heterogênea de células-tronco mesenquimais e células progenitoras existentes nos aspirados de medula óssea, capazes de proliferação (formação de colônias) e diferenciação em um ou mais fenótipos do tecido conectivo^{26,44}.

De acordo com Muschler et al.⁴⁴, o aspirado de medula óssea é a fonte mais acessível de células-tronco mesenquimais pluripotentes adultas, contendo uma média de quarenta milhões de células nucleadas por mililitro. Dentre estas, aproximadamente duas mil são células progenitoras conectivas, ou uma célula progenitora de tecido conectivo para cada vinte mil células nucleadas.

Na década passada, vários estudos pré-clínicos foram realizados em animais de experimentação, administrando-se aspirados de medula óssea isolados ou em associação com osso autólogo, osso heterólogo, matriz óssea desmineralizada e carreadores osteocondutivos como a cerâmica, obtendo-se resultados promissores. Connolly et al.¹⁵ consideram estes estudos, apesar das controvérsias causadas, precursores da aplicação clínica dos aspirados de medula óssea para consolidação óssea, pois contribuíram para um melhor conhecimento da fisiologia, propriedades e necessidades deste novo procedimento.

Lindholm et al.^{59,60}, utilizando um modelo de artrodese de processo espinhoso em coelhos, observam que a combinação de matriz óssea desmineralizada com aspirado de células da medula óssea resultou em uma fusão vertebral mais rápida e estável do que enxerto autólogo ou matriz óssea isolada.

Curylo et al.⁵⁷ relatam maiores taxas de consolidação e formação óssea em artrodeses vertebrais quando o enxerto ósseo autólogo foi associado à medula óssea em um modelo de artrodese vertebral pósterolateral em coelhos.

Grundel et al.⁵⁸ referem união completa em modelos caninos de falha óssea na ulna, após a administração local de um composto de aspirado de medula óssea com fosfato de cálcio bifásico cerâmico.

A razão para o sucesso destes estudos foi atribuída por seus autores, mais uma vez, à presença de células-tronco mesenquimais presentes nos aspirados de medula óssea.

Paley⁶⁵ administrou percutaneamente um aspirado de medula óssea em osteotomias na ulna de coelhos, observando uma formação de calo ósseo mais precoce e exuberante que nos animais do grupo controle, onde a osteotomia foi realizada sem adição de aspirado de medula óssea.

Sharma et al.⁶⁶ realizaram osteotomias e defeitos ósseos na diáfise do rádio de coelhos, e injetaram aspirados de medula óssea nestes locais, percutaneamente. Após duas a três semanas, o volume do calo ósseo formado foi maior nos rádios enxertados do que nos controles, e os estudos radiológicos e histológicos confirmaram que o aspirado de medula óssea foi capaz de estimular a consolidação óssea.

Analisando a capacidade da medula óssea em cicatrizar um defeito ósseo segmentar em ratos, Werntz et al.⁶⁷ relatam regeneração óssea estrutural completa com a adição de aspirado de medula óssea, comparável com a obtida com o uso de enxerto ósseo autólogo. Estes autores ressaltam que com a utilização de medula óssea viva, ocorria a formação óssea esponjosa em três semanas, progressão para osso lamelar em seis semanas e remodelação óssea em 12 semanas. Quando a medula óssea foi

implantada morta, porém, o resultado foi uma rara infiltração celular e mínima formação óssea.

Em 1986, Connolly et al.⁶⁸ relataram a primeira experiência clínica com injeção percutânea de aspirado de medula óssea para se estimular a consolidação de fraturas. Eles administraram um aspirado de medula óssea do osso ilíaco em um paciente de 31 anos, com uma pseudoartrose infectada da tíbia, que estava relutante em ser submetido a uma cirurgia aberta para retirada de enxerto autólogo do osso ilíaco. O aspirado foi injetado diretamente na região pósterio-lateral da fratura. A pseudoartrose consolidou-se clínica e radiograficamente após seis meses.

Seguindo essa linha de pesquisa, Connolly et al.⁶⁹, utilizando a injeção percutânea de aspirado de medula óssea, observaram a consolidação óssea completa em dezoito dentre vinte pseudoartroses de tíbia, concluindo que este tratamento tem a mesma eficácia que o enxerto autólogo.

Em 1995, Connolly⁷⁰ relatou os resultados do uso de aspirado de medula óssea para estimulação osteogênica no tratamento de 100 pacientes, com sucesso em 80% dos casos.

Estudando métodos de consolidação de pseudoartroses, Garg et al.⁷¹ injetam um aspirado de medula óssea em 20 pseudoartroses de ossos longos, observando consolidação total em 17 casos, com média de 5 meses.

Muschler et al.²⁶ relataram experiência clínica com aspirado de medula óssea em procedimentos cirúrgicos ortopédicos eletivos em mais de novecentos pacientes num período de quinze anos, com baixo risco de

complicações. Não ocorreram infecções, hematomas ou dor crônica no local da punção, e apenas dois pacientes apresentaram uma ferida local dolorosa.

Friedenstein⁷², em 1976, relata uma possível associação entre a concentração de células e o potencial osteogênico dos aspirados de medula óssea.

Connolly et al.¹⁴, por meio de diferentes técnicas de centrifugação, conseguiram aumentar o número total de células osteoprogenitoras em aspirados de medula óssea de coelhos. A administração dessas soluções em câmaras de infusão intra-peritoneal demonstrou um aumento na formação óssea proporcional ao número de células presentes nas preparações obtidas.

Muschler et al.⁴⁴ demonstraram que a técnica de aspiração é importante, e observaram que a realização de múltiplas punções, limitando o volume do aspirado a dois mililitros, foi mais efetiva que uma única punção com volume maior de aspirado.

Tiedeman et al.⁷³, interessados em estudar métodos para se facilitar a consolidação de pseudoartroses, injetaram, em modelos caninos de pseudoartrose, soro fisiológico, aspirado de medula óssea isolado, matriz óssea desmineralizada e uma combinação de medula óssea com matriz óssea desmineralizada. Obtiveram estímulo para a consolidação nos animais onde foi adicionada medula óssea e naqueles onde foi administrada matriz óssea desmineralizada, porém o resultado foi superior nos casos

onde foi utilizada a combinação de medula óssea e matriz óssea desmineralizada.

De forma semelhante, Bruder et al.⁴⁷ obtiveram consolidação óssea em defeitos ósseos segmentares no fêmur de cães com a utilização de aspirado de medula óssea associado à cerâmica porosa, sendo observado pseudoartrose do lado controle.

Pesquisando materiais cerâmicos porosos biodegradáveis utilizados como substitutos ósseos e que pudessem ser lentamente repostos por osso, Nade et al.⁷⁴ utilizaram quatro compostos cerâmicos derivados de cálcio, compactos e especialmente moldados, impregnados com aspirado de medula óssea, que foram colocados em espaços intermusculares de coelhos. Eles observaram crescimento de osso neoformado em todos, e que o osso frequentemente estava aderido à cerâmica e penetrava no interior dos poros maiores de 100 μ . Segundo estes autores, a comprovação de que os materiais cerâmicos porosos permitem o crescimento de osso novo de forma mais efetiva a partir da adição de células da medula óssea estimula a continuação de pesquisas de materiais sintéticos para reposição óssea.

Kadiyala et al.⁷⁵ observam regeneração óssea completa em um defeito ósseo segmentar no fêmur de ratos, com a utilização de células-tronco osteoprogenitoras administradas em cilindros porosos de hidroxiapatita e fosfato-tricálcico.

Tiedeman et al.⁷⁶ utilizaram matriz óssea desmineralizada associada à aspirado de medula óssea para tratamento de falhas ósseas em quarenta

e oito pacientes, alcançando uma taxa de sucesso semelhante a do enxerto autólogo de crista ilíaca. Concluem que este tratamento pode ser uma boa alternativa ao enxerto autólogo em situações clínicas como defeitos ósseos em crianças, fraturas cominutivas com perda óssea, pseudoartroses e para estimular a consolidação de artrodeses.

Tiedeman et al.⁷⁷ descrevem o uso de matriz óssea desmineralizada, associada a aspirado de medula óssea, em um paciente de 12 anos de idade com um fibroma não ossificante da tíbia extenso. O preenchimento da falha óssea resultante da ressecção tumoral com este composto permitiu a sua completa cicatrização, sem os riscos e a morbidade potenciais associados à retirada de grandes quantidades de enxerto ósseo autólogo em crianças.

Garg et al.⁷⁸ descrevem o caso de um paciente com pseudoartrose congênita da tíbia tratado com sucesso por meio de administração percutânea de aspirado de medula óssea do ilíaco.

Healey et al.⁷⁹ utilizaram aspirado de medula óssea para estimular a consolidação de retardos de consolidação e pseudoartroses, em pacientes submetidos a ressecções ósseas em bloco extensas e reconstrução com fixação interna, para tratamento de sarcomas ósseos primários. Observam formação óssea em 7 dentre 8 pacientes, e consolidação completa em 5 destes. Chegam à conclusão que estes resultados, obtidos em circunstâncias clínicas difíceis, são encorajadores e sugerem que a utilização de aspirado de medula óssea é eficaz no tratamento de retardos de consolidação e pseudoartroses.

Mankani et al.⁸⁰ utilizaram aspirados de medula óssea embebidos em uma esponja de colágeno, que foram implantadas nas imediações de vasos sanguíneos de ratos. Os autores observaram que estes transplantes induziram a formação de enxertos ósseos vascularizados nos locais de implantação. Além disso, os enxertos apresentavam osso córtico-esponjoso bem desenvolvido, com osteoblastos derivados das células-tronco mesenquimais do doador e tecido hematopoiético derivado dos ratos receptores.

Ohgushi et al.⁸¹, em 2005, aplicaram células-tronco mesenquimais da medula óssea em artroplastias de tornozelo cerâmicas em três pacientes. Com técnicas de engenharia tecidual, estimularam estas células a produzir osteoblastos/matriz óssea na superfície das próteses. Após cerca de dois meses da cirurgia, observou-se formação óssea precoce ao redor das áreas onde foram aplicadas as células. Todos os pacientes apresentavam próteses estáveis, sem sinais de soltura, após 2 anos de acompanhamento. Concluíram que este estudo preliminar indica que o uso de células-tronco mesenquimais da medula óssea pode ser benéfico para evitar a soltura asséptica das artroplastias de tornozelo.

Os estudos pré-clínicos realizados em animais de experimentação, utilizando modelos de fraturas e pseudoartrose de ossos longos, forneceram uma base para que as pesquisas de artrodese vertebral, utilizando aspirados de medula óssea, fossem conduzidas.

O modelo de artrodese vertebral póstero-lateral em coelho branco da raça Nova Zelândia habitualmente empregado para se estudar preparações

que ajam como enxertos ósseos na coluna vertebral. Utilizando este modelo, Curylo et al.⁸² compararam o sucesso da artrodese com enxertos ósseos de crista ilíaca, misturados com sangue ou com aspirados de medula óssea. A taxa de consolidação óssea foi de 25% nos casos onde se adicionou sangue e de 61% onde foi adicionado aspirado de medula óssea.

Utilizando o mesmo modelo, Tay et al.⁸³ avaliaram a eficácia do aspirado de medula óssea embebido em uma esponja colágena e associada à hidroxiapatita (Healos Bone Graft Replacement, DePuy Spine, Raynham, Mass). O uso do enxerto autólogo de crista ilíaca isolado resultou em 75% de fusão vertebral, a hidroxiapatita (Healos Bone) isolada em 20% e a associação do aspirado de medula óssea de ossos longos com hidroxiapatita em 100% dos casos.

Kai et al.⁸⁴, empregando este mesmo modelo animal, compararam cerâmica porosa combinada com enxerto autólogo de crista ilíaca, aspirado de medula óssea e aspirado de medula óssea associado com proteína morfogenética óssea (rhBMP-2). Obtiveram fusão óssea em 100% dos casos onde se utilizou aspirado de medula óssea isolado e associado à rhBMP-2. Apenas 50% dos casos onde se utilizou cerâmica e 66% dos casos onde se utilizou enxerto ósseo autólogo consolidaram. Os autores concluíram que o aspirado de medula óssea pode ser um substituto adequado ao enxerto autólogo de crista ilíaca. Além disso, como a taxa de fusão com aspirado de medula óssea isolado e associado à rhBMP-2 foram similares, o tratamento com o primeiro pode ser uma alternativa viável e mais econômica.

Clinicamente, Welch et al.⁸⁵, compararam a utilização de um composto de hidroxiapatita (Healos Bone) e aspirado de medula óssea com enxerto ósseo autólogo nas artrodeses lombares intervertebrais anteriores. Observaram, após um ano, taxas de fusão para um ou dois níveis de 96% e 91%, respectivamente.

Price et al.⁸⁶, estudaram a consolidação óssea em artrodeses com instrumentação posterior em escolioses da adolescência. Utilizaram três tipos de enxertos: enxerto ósseo autólogo, aloenxerto criopreservado córtico-esponjoso e um composto de aspirado de medula óssea com matriz óssea desmineralizada. As taxas de insucesso, definidas como pseudoartrose ou perda da correção obtida, foram de 12,5% quando se utilizou o enxerto autólogo, 28% com aloenxerto e 11.1% com a associação de aspirado de medula óssea com matriz óssea desmineralizada. Concluíram que esta última opção seria mais adequada como adjunto no tratamento de pacientes com escoliose do adolescente, uma vez que as taxas de fusão vertebral se equivaleram às com uso de enxerto ósseo autólogo, mas com mínima morbidade nos locais de aspiração da medula óssea.

3. MÉTODOS

Os procedimentos descritos a seguir estão em conformidade com o Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of Internacional Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (1996) e com a Lei Nº. 6.638 de 08 de maio de 1979, que estabelece as normas para a prática didático-científica da vivisseção de animais. O estudo foi submetido e aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa Médica da Universidade Estadual de Londrina e Universidade de São Paulo.

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Foram utilizados 10 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia Albino, machos, adultos, com peso médio de 3 kg, que foram criados no Biotério do Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná – Universidade Estadual de Londrina. Os animais foram previamente examinados por médico veterinário para confirmar as suas perfeitas condições de saúde e ficaram acondicionados em gaiolas metálicas individuais. A alimentação constou de ração industrial, balanceada e peletizada, e água “ad libidum”. O ambiente de experimentação permaneceu iluminado com luz artificial por doze horas contínuas diárias. A temperatura, umidade e nível de ruído foram mantidos estáveis.

O membro posterior direito de cada animal foi selecionado para a realização do procedimento cirúrgico. Realizou-se uma osteotomia transversa médio-diafisária da fíbula direita (Figuras 3 e 4), onde foi adicionada esponja de colágeno absorvível (Gelfoam®), embebida em um centrifugado osteogênico obtido por meio da centrifugação de aspirado de medula óssea do osso ilíaco ipsilateral. A fíbula esquerda foi utilizada como controle, sendo osteotomizada da mesma maneira, porém apenas a esponja de colágeno foi colocada neste local. A figura 5 resume a seqüência do procedimento.

Figura 3. Anatomia esquelética do membro posterior do coelho. A seta vermelha indica o local onde foi realizada a osteotomia da fíbula.

Figura 4. Osteotomia da fíbula do coelho. Radiografia na incidência de perfil da região proximal da perna do coelho com seta vermelha indicando o local onde foi realizada a osteotomia da fíbula.

Figura 5. Delineamento experimental. O coelho selecionado no biotério (azul) é encaminhado ao laboratório de cirurgia experimental (vermelho). Após a anestesia, o aspirado de medula óssea é coletado da crista ilíaca e encaminhado ao laboratório de análises clínicas (verde), onde a amostra é processada, as células nucleadas são contadas e o teste de viabilidade celular é realizado. Ao mesmo tempo, as osteotomias da fíbula do animal são realizadas. No lado esquerdo, somente o Gelfoam[®] é colocado no local da osteotomia. O tempo de preparo do centrifugado osteogênico leva em média 20 minutos. O material retorna ao laboratório de cirurgia experimental onde é embebido no Gelfoam[®] e colocado sobre a osteotomia da fíbula direita. O procedimento cirúrgico total leva em média 30 a 40 minutos. Após o término do experimento, o animal aguarda a recuperação anestésica completa em recipiente aquecido, quando então retorna para sua gaiola no biotério.

3.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

3.2.1 Anestesia

Utilizou-se o protocolo de anestesia preconizado pelo Canadian Concil of American Care. Cada animal recebeu 1 mg/kg de sulfato de atropina por via intramuscular, dez minutos antes do início da anestesia, para diminuição do tônus vagal. A anestesia envolveu a aplicação intramuscular de uma solução contendo 40 mg/kg de quetamina a 10%, associada a 5 mg/kg de cloridrato de xilazina, na região proximal do membro pélvico. O tempo médio de indução anestésica com esta técnica foi de 5 a 10 minutos, proporcionando uma duração de aproximadamente 50 minutos. Quando necessário, a anestesia foi prolongada com a administração fracionada de 1 mg/kg de cloridrato de xilazina, a cada 30 minutos. Os coelhos foram identificados com numeração tatuada na orelha (Figura 6), logo após a indução anestésica. Uma máscara com fluxo de oxigênio contínuo foi mantida durante todo o procedimento (Figura 7).

Figura 6. Tatuagem na orelha do coelho, para identificação do animal.

Figura 7. Coelho anestesiado com máscara de fluxo contínuo de oxigênio.

3.2.2 Aspiração da medula óssea

Realizou-se a tricotomia da região da crista ilíaca esquerda. Após assepsia e anti-sepsia adequadas, uma agulha apropriada para realização de punção de medula óssea de calibre 16 G, com trocater, foi introduzida na crista ilíaca posterior do animal e, com movimentos de rotação delicados, atingiu-se a cavidade medular (Figura 8). O trocater foi então retirado e uma seringa plástica descartável de 20 ml, cuja parte interna foi previamente embebida em uma solução de heparina a 1:1000, foi conectada à agulha. Por meio de sucção por tração firme do êmbolo da seringa, aspirou-se 5 ml de medula óssea. O material obtido foi enviado imediatamente ao laboratório de análises clínicas do departamento de pós-graduação do Hospital Universitário de Londrina, transportado em banho de gelo (Figura 9).

Figura 8. Aspiração da medula óssea a partir da crista ilíaca do animal.

Figura 9. Aspirado de medula óssea em recipiente para transporte.

3.2.3 Centrifugação do aspirado da medula óssea

3.2.3.1 Processamento da amostra

O material recebido no laboratório foi processado em condições estéreis em câmara com fluxo laminar, preparada 30 minutos antes do início do procedimento. A amostra de 5 ml da seringa plástica foi transferida para um tubo graduado estéril, inicialmente por meio de agulha calibre 19 G, e a seguir com agulha 22 G, para dispersar os agregados celulares. Este material foi levado a uma centrífuga da marca Excelsa[®], modelo 4, sendo centrifugado a 400xg e a 20 graus centígrados, durante 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante, de aproximadamente 2 ml, foi descartado com pipeta Pasteur estéril. Do material sedimentado no tubo, foram coletados 0,5 ml do “buffy-coat” (Figura 10), que é formado pela camada intermediária entre o plasma descartado e as células sedimentadas no fundo do tubo e onde se espera encontrar uma maior quantidade de células nucleadas, cuja densidade é maior (Figura 11). Fazem parte destas células os precursores hematopoiéticos e células do estroma da medula óssea, local onde se encontram células-tronco mesenquimais e progenitoras.

O material foi homogeneizado no vórtex (misturador), e então uma amostra de 50 microlitros foi coletada em um tubo Eppendorf para posterior contagem das células e realização do teste de viabilidade celular. O material restante (aproximadamente 0,5 ml) retornou ao laboratório de técnica cirúrgica e cirurgia experimental.

Figura 10. Separação do “buff-coat” com pipeta apropriada.

Figura 11. Esquema demonstrando o resultado da centrifugação do aspirado de medula óssea. O aspirado coletado (tubo 1), após a centrifugação, forma três níveis diferentes (tubo 2). As hemácias, em vermelho, no fundo do tubo. A camada superior, que corresponde ao sobrenadante (plasma), em carmim, e a camada intermediária, o “buffy-coat”, em laranja, onde está a maioria das células nucleadas.

3.2.3.1 Contagem das células nucleadas e teste de viabilidade celular

O teste com azul de tripano é utilizado para a avaliação da viabilidade celular. Este teste baseia-se no fato de que nas células viáveis a membrana celular íntegra impede a entrada do corante azul. Nas células mortas o corante penetra através da membrana celular, conferindo-lhes uma coloração azul escura (Figuras 12 e 13).

A amostra de 50 microlitros do concentrado de células tronco foi previamente diluída na proporção de 1:20, contendo 10 microlitros da amostra de células e 190 microlitros de diluente PBS 0,1 molar, pH 7.4. A diluição com o azul de tripano foi então realizada na proporção de 1:20, contendo 380 microlitros de azul de tripano a 0,1% e de 20 microlitros das células diluídas a 1:20. Este preparado foi colocado na câmara de Neubauer (hemocitometro), preenchendo-a completamente e deixando-a em repouso por 5 minutos em câmara úmida. O número de células nucleadas foi então contado nos quatro quadrados laterais, separando-se a contagem em um grupo de células viáveis e outro de células mortas.

O cálculo do número de células e da viabilidade celular foi realizado de acordo com seguintes fórmulas:

$$\text{Nº de células por ml} = (\text{nº de células viáveis} + \text{nº de células mortas}) \times 10^6$$

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{células viáveis} \times 100}{(\text{células viáveis} + \text{células mortas})}$$

Figura 12. Células nucleadas viáveis. Imagem de microscopia óptica demonstrando hemácias (He) e células nucleadas viáveis (CV), após a coloração com azul de tripano. Neste caso, não ocorreu penetração do corante no interior das células nucleadas, o que atesta a integridade da membrana celular e, portanto, a viabilidade celular.

Figura 13. Células nucleadas inviáveis. Imagem de microscopia óptica demonstrando uma célula nucleada inviável (CI), após a coloração com azul de tripano. Observa-se uma tonalidade azulada no interior da célula, característica da penetração do corante no interior da célula devido à incompetência da membrana celular e confirmando a inviabilidade celular.

3.2.4 Técnica cirúrgica

O animal permaneceu em decúbito dorsal em mesa operatória apropriada. Foi realizada tricotomia da região lateral do membro pélvico bilateralmente. A seguir, foi realizada a assepsia e anti-sepsia adequadas com sabão degermante e álcool iodado a 5%. O campo cirúrgico foi montado com campos fenestrados estéreis, ficando somente a região a ser operada exposta, bilateralmente. Realizou-se uma via de acesso lateral no membro pélvico, com aproximadamente 2 cm de extensão, na região da pele suprajacente ao terço médio da fíbula direita. Procedeu-se então a dissecação por planos, abordando-se a pele, tecido celular subcutâneo e a fascia dos músculos fibulares, os quais foram afastados, dissecando-se no plano intermuscular entre os compartimentos lateral e posterior da perna. A fíbula foi então exposta, evitando-se desnudar seu periósteo. Com o uso de um fio-serra de Gigli (Figura 14), foi realizada uma osteotomia transversa médio-diafisária completa da fíbula (Figura 15). A seguir, uma amostra de gelatina colágena absorvível (Gelfoam[®]) de 0.5 cm² foi embebida com o centrifugado osteogênico preparada no laboratório, e colocada sobre a região da osteotomia (Figura 16). Procedeu-se então o fechamento por planos da ferida operatória, utilizando-se fio de sutura mononylon 4-0. A ferida operatória foi coberta com curativo estéril impermeável. O mesmo procedimento foi realizado na fíbula esquerda, porém apenas o Gelfoam[®] foi aplicado no local (Figura 17).

Figura 14. Momento da realização da osteotomia médio-diáfisaria da fíbula direita. Visualização do campo cirúrgico onde nota-se o fio-serra de Gigli, utilizado para a realização da osteotomia.

Figura 15. Osteotomia médio-diáfisaria da fíbula direita pronta.

Figura 16. Colocação do centrifugado osteogênico no local da osteotomia da fíbula direita. Imagem do campo cirúrgico demonstrando o Gelfoam® embebido com o centrifugado osteogênico e colocado sobre o local da osteotomia da fíbula direita do animal.

Figura 17. Colocação do Gelfoam® no local da osteotomia da fíbula esquerda, sem adição do centrifugado osteogênico.

3.2.5 Pós - operatório

Imediatamente após o término do procedimento cirúrgico, o animal foi acondicionado em caixa apropriada, aquecido e isolado dos demais. Foi administrada uma dose intramuscular de pencivet[®] ppu, antibacteriano e antiinflamatório, contendo as benzilpenicilinas G benzatina e procaína, diidroestreptomicina e piroxicam. Após a recuperação anestésica total, o coelho foi devolvido a sua gaiola no biotério, recebendo água e ração à vontade. A carga total nos membros operados foi permitida imediatamente, sem qualquer tipo de restrição ou imobilização. Ao final de uma semana, o curativo e os pontos cirúrgicos foram removidos.

3.3 EUTANÁSIA

A eutanásia foi realizada seguindo-se a resolução de número 714 do Conselho Federal de Medicina Veterinária de 2002, que estabelece as normas sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, sendo conduzida por médico veterinário habilitado. Os animais foram sacrificados trinta dias após a data da cirurgia. A eutanásia foi realizada em sala separada, longe dos outros animais. Optou-se pela eutanásia por agentes químicos, por ser menos traumática e indolor. Realizou-se a anestesia com a aplicação intramuscular, na região proximal do membro pélvico, de uma solução contendo 120 mg/Kg de quetamina a 10%, associada a 10 mg/Kg de cloridrato de xilazina, seguida da administração intra-cardíaca de solução de cloreto de potássio a 20%. Após a retirada das peças anatômicas para o estudo histológico, o descarte das carcaças dos animais foi realizado em local apropriado, conforme as normas de biossegurança expressas na Resolução nº 5, de agosto de 1993, do Conselho Nacional do Meio Ambiente. As pernas dos animais foram desarticuladas a nível do joelho e tornozelo. A seguir, foi realizada a dissecação cuidadosa da peça retirando-se todas as partes moles, com o cuidado de não se lesar o calo ósseo. As peças foram colocadas em recipientes adequados com solução fixadora e identificados com o número do coelho e lado do membro posterior (direito ou esquerdo) correspondente.

3.4 CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO E MÉTODOS DE MENSURAÇÃO

Realizou-se a avaliação dos resultados por meio da mensuração densitométrica, volumétrica e histológica (qualitativa e quantitativa) do calo ósseo formado no local da osteotomia da fíbula, comparando-se o lado direito com o esquerdo (controle).

3.4.1 Avaliação da densidade mineral óssea

Avaliou-se a densidade mineral dos calos ósseos formados nos locais das osteotomias com densitometria óssea por DEXA (dual energy x-ray absorptiometry). Este tipo de densitometria é considerado o método padrão para avaliação quantitativa da densidade mineral óssea, e tem uma relação exponencial com a fragilidade óssea e risco de fraturas. A técnica baseia-se na atenuação, pelo organismo estudado, de um feixe de radiação gerado por uma fonte de raio X com dois níveis de energia. Este feixe atravessa o organismo no sentido pósterio-anterior e é captado por um detector. O programa calcula a densidade de cada amostra a partir da radiação que alcança o detector em cada pico de energia. O tecido mole (gordura, água, músculos, órgãos viscerais) atenua a energia de forma diferente do tecido ósseo, permitindo a construção de uma imagem da área de interesse. O exame fornece o valor absoluto da densidade mineral óssea da área estudada, em g/cm². Embora densidade seja uma medida volumétrica e a densidade mineral óssea em posição antero-posterior, que é a mais

comumente utilizada, seja o resultado do conteúdo mineral ósseo dividido pela "área" e não por "volume" de osso, existe uma grande correlação entre a densidade por "área" e a densidade real, volumétrica, medida por tomografia computadorizada.

A densidade mineral dos calos ósseos em g/cm^2 foi medida com densitômetro Lunar DPX-A com software específico para pequenos animais (Figura 18).

Figura 18. Densitometria óssea. Imagem de laudo de densitometria óssea da área do calo formado na osteotomia da fíbula de coelho, relatando o resultado da densidade mineral óssea (BMD).

3.4.2 Avaliação volumétrica do calo ósseo

O volume do calo ósseo formado foi mensurado com tomografia computadorizada helicoidal multi-slice. Esta nova tecnologia foi introduzida na década de noventa, e tem como vantagens sobre a tomografia helicoidal convencional um tempo de aquisição de imagens mais rápido, melhor resolução espacial, criação retrospectiva de secções mais finas ou espessas a partir da mesma imagem adquirida e o fato de permitir uma excelente reconstrução tridimensional com alta resolução.

O ponto chave da tomografia computadorizada helicoidal multi-slice é a possibilidade de um maior volume estudado por unidade de tempo com alta resolução espacial e uma melhor resolução temporal. Em termos gerais, pode-se estudar determinado volume de imagem em espaço de tempo bastante reduzido ou analisar certo volume com alta resolução espacial, utilizando-se finas colimações, ou mesmo avaliar grandes volumes de imagem previamente inacessíveis. Para que isto seja possível, foram desenvolvidas importantes modificações na elaboração destes tomógrafos, principalmente no que diz respeito aos detectores. Os aparelhos helicoidais convencionais possuem de um tubo de raios-x e uma única fileira de detectores, que contem de 500 a 900 elementos detectores, proporcionando um canal de dados espaciais. Os aparelhos multi-slice apresentam um tubo de raios-x e múltiplas fileiras de detectores ao longo do eixo longitudinal do paciente, cada fila contendo de 500 a 900 elementos detectores que são

conectados a quatro sistemas de aquisição de dados que geram quatro canais de dados espaciais.

Utilizou-se um tomógrafo helicoidal multi-slice com oito filas de detectores, modelo light speed ultra (General Electric Medical Systems – Milwaukee, WIS, USA). O protocolo utilizado foi aquisição volumétrica dos dados a partir da peça óssea, com campo de visão (FOV) de 13 cm, colimação e reconstrução de 1,25 mm, velocidade de mesa de 1,25 mm/s, filtro ósseo, matiz 512 X 512, pitch 1: 1, voltagem de pico de 80 kvp e amperagem de 60mA, com rotação do tubo de 0,5 segundos. O processamento da imagem foi realizado em uma estação de trabalho comercialmente disponível, modelo Advantage (General Electric Medical Systems – Milwaukee, WIS, USA), versão 4.1 – 06.3 com software Advanced Lung Analysis, para cálculo de volume de nódulos pulmonares, com capacidade para detectar nódulos a partir de 2 mm³. Realizou-se a reconstrução tridimensional da peça óssea estudada e, após a seleção da área do calo (Figura 19), foi cálculo o seu volume em mm³ (Figura 20).

Figura 19. Reconstrução tridimensional comparativa das peças anatômicas dos membros posteriores do coelho. No quadrado destacado em vermelho, observa-se o calo ósseo formado na área da osteotomia da fíbula direita.

Figura 20. Cálculo do volume do calo ósseo. Reconstrução tridimensional do calo ósseo formado na área da osteotomia. O resultado do cálculo do volume do calo pode ser observado canto superior esquerdo da figura.

3.4.3 Avaliação histológica

As peças anatômicas das fíbulas foram submetidas à limpeza cuidadosa, retirando-se o excesso de partes moles, com o cuidado de não lesar o calo ósseo formado. A seguir, cada peça foi acondicionada em um tubo plástico apropriado, contendo uma solução de formalina neutra estabilizada a 10%, durante cinco dias, para fixação. Realizou-se então a descalcificação das peças com solução diária de ácido clorídrico/ácido fórmico e por fim a sua inclusão em parafina. Os blocos de parafina contendo as amostras de calo ósseo foram submetidos a cortes histológicos de 3µm de espessura, em sentido coronal, com micrótomo rotatório.

Os cortes histológicos foram corados pela técnica do Tricrômico de Mason (Figura 21), para avaliação qualitativa dos tecidos formados na área da osteotomia.

A avaliação quantitativa dos tecidos formados foi realizada comparando-se os cortes histológicos realizados a partir da fíbula direita e esquerda de cada coelho. A figura 22 ilustra a delimitação dos tecidos formados.

As lâminas assim preparadas foram submetidas à imuno-histoquímica e analisadas com microscópio de luz ZEISS®. A avaliação quantitativa foi realizada com auxílio de Sistema Analisador de Imagem (Kontron Eletronic 300, ZEISS®).

A estação de trabalho consiste de microscópio ZEISS® trinocular, uma vídeo-câmera colorida (SONY CCD - Íris®), com placa digitalizadora de imagens, um microcomputador com processador Pentium 133MHz, IBM-PC compatível, operando em ambiente Windows 95® de 32 bits. As imagens obtidas em campos microscópicos foram digitalizadas com auxílio do software, proporcionando a possibilidade de compartilhamento de dados com o processador de textos (Microsoft Word®) e planilha eletrônica (Microsoft Excel®). A utilização deste programa proporcionou à análise, o tratamento, a interpretação e a obtenção de valores de mensuração das estruturas com todas as variáveis e a distribuição automática dos dados. A transmissão óptica foi quantificada a fim de se processar e analisar a imagem e para que esta fosse quantificada em suas medidas originais, optou-se por transformar a medida da imagem digitalizada, o pixel, em medida micrometrada. Para tal utilizamos à calibração de pixel em micrômetros. Após aquisição da imagem por meio de uma câmera CCD, a área dos diferentes tecidos analisados (osso, cartilagem e fibrose) foi obtida pela delimitação do campo por meio de ferramenta de traço livre do Programa Analisador de Imagem Kontron. Esta rotina semi-automatizada foi realizada em cada campo com objetiva de 4 aumentos e ocular de 10 aumentos. Os resultados obtidos em cada campo correspondente a área dos diferentes tecidos analisados (osso, cartilagem e fibrose) foram arquivados em planilha Excel para posterior análise estatística.

Figura 21. Visualização do calo ósseo formado na região da osteotomia da fíbula com microscopia óptica comum. Coloração com Tricrômio de Mason. Aumento de 4x.

Figura 22. Demarcação dos tipos de tecido formados no calo ósseo para análise quantitativa com histomorfometria. O tecido ósseo está delimitado pela linha amarela, a cartilagem pela linha azul e o tecido fibroso pela linha verde.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Apresentaram-se os resultados gerais das contagens de células e dos exames anatomopatológicos em tabela sumário (Tabela 1).

Para a análise das grandezas específicas (variáveis), realizou-se a estatística descritiva das amostras ordinais (quantitativas): média (M), desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM).

A normalidade das distribuições foi testada pela prova de Kolmogorov-Smirnov (K-S) para variáveis contínuas e pelo Coeficiente de Variação de Pearson (CVP). A distribuição de uma amostra foi considerada normal quando a prova de Kolmogorov-Smirnov apresentou $p \geq 0,05$ e o Coeficiente de Variação de Pearson, igual ou inferior a 30% ($CVP \leq 30\%$).

A estatística descritiva das grandezas (amostras) foi apresentada em tabelas estatísticas e representada na forma de gráficos de coluna (média $\pm$ erro padrão de média): densidade mineral óssea do calo ósseo (Tabela 2 e Gráfico 1), volume do calo ósseo (Tabelas 3 e Gráfico 2), quantidade relativa de osso (Tabela 4 e Gráfico 3), de cartilagem (Tabela 5 e Gráfico 4) e de fibrose (Tabela 6 e Gráfico 5) no calo ósseo.

Nas comparações entre as fíbulas tratadas com preparado osteogênico e controle, utilizaram-se o teste t pareado para a inferência sobre a diferença das médias de amostras relacionadas (pareadas) e paramétricas (Tabelas 2 e 4) e, a prova de Wilcoxon para as amostras relacionadas (pareadas) e não paramétricas (Tabelas 3, 5 e 6).

Utilizou-se o arredondamento científico. Nas tabelas, os valores das estatísticas descritivas, os resultados dos testes estatísticos e a probabilidade (p) foram apresentados com duas casas após a vírgula ou até o primeiro número significativo.

As diferenças comprovadas estatisticamente foram evidenciadas por asteriscos (*) nas tabelas.

Adotou-se o nível de confiança de 5% ($\alpha = 0,05$).

Adotaram-se testes bilaterais ou bicaudais ($H_0 = \mu_1 - \mu_2 = 0$).

Utilizou-se o programa estatístico GraphPad Software, Inc.® (1996) Graphpad Prism, versão 2.01.

4. RESULTADOS

Os resultados da contagem de células e do teste de viabilidade celular, obtidos após a centrifugação do aspirado de medula óssea, estão expostos na tabela 1.

TABELA 1 RESULTADO GERAL DAS CONTAGENS DE CÉLULAS NUCLEADAS POR MICROSCOPIA ÓTICA APÓS COLORAÇÃO COM AZUL DE TRIPANO PARA A DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR SEGUNDO O COELHO

COELHO	VOLUME DE "BUFFY-COAT" (ml)	CONTAGEM MÉDIA (10 ⁷ .células/ml)	CÉLULA NUCLEADA						Viabilidade Celular (%)
			Viável			Inviável			
			1 ^a	2 ^a	M	1 ^a	2 ^a	M	
1	1,0	7,6	16	20	18	1	1	1	94,7
2	0,5	10,0	105	85	95	5	6	5	95,0
3	0,5	3,5	29	36	34	1	1	1	97,1
4	0,5	16,4	144	171	158	4	8	6	96,3
5	0,5	5,1	50	48	49	2	2	2	96,1
6	0,5	6,9	75	52	64	7	2	5	92,7
7	0,5	9,9	113	76	95	3	5	4	95,6
8	0,5	2,8	28	25	27	1	1	1	96,4
9	0,5	9,6	98	92	95	0	1	1	99,0
10	0,5	8,2	83	79	81	1	1	1	98,8

onde:

1^a = Primeira contagem

2^a = Segunda contagem

M = Contagem média

Relatamos a análise estatística descritiva das grandezas estudadas em tabelas estatísticas e na forma de gráficos de coluna.

4.1 Densidade mineral do calo ósseo (Tabela 2 e Gráfico 1).

4.2 Volume do calo ósseo (Tabela 3 e Gráfico 2).

4.3 Quantidade relativa de osso (Tabela 4 e Gráfico 3).

4.4 Quantidade relativa de cartilagem (Tabela 5 e Gráfico 4).

4.5 Quantidade relativa de fibrose (Tabela 6 e Gráfico 5).

4.1 DENSIDADE MINERAL DO CALO ÓSSEO

TABELA 2 ESTATÍSTICA DESCRITIVA DA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA ($10^{-3}.g/cm^2$) DO CALO ÓSSEO FORMADO NA REGIÃO MÉDIO-DIAFISÁRIA DA FÍBULA SUBMETIDA À OSTEOTOMIA. COMPARAÇÃO DAS FÍBULAS COM PREPARADO OSTEOGÊNICO E CONTROLE PELO TESTE T PAREADO ($\alpha=0,05$)

COELHO	DENSIDADE MINERAL ÓSSEA DO CALO ÓSSEO ($10^{-3}.g/cm^2$)	
	Preparado Osteogênico	Controle
1	72	82
2	79	68
3	80	40
4	87	62
5	56	37
6	70	54
7	93	55
8	85	50
9	85	72
10	99	76
M	80,60	59,60
DP	12,32	15,06
EPM	3,90	4,76
CVP (%)	15,29	25,26
K-S	$p > 0,10$	$p > 0,10$
t pareado	$t=4,43$	$p=0,002^*$

GRÁFICO 1 Densidade mineral óssea (10^{-3} .g/cm^2) do calo ósseo das fíbulas tratadas com preparado osteogênico e controle

4.2 VOLUME DO CALO ÓSSEO

TABELA 3 ESTATÍSTICA DESCRITIVA DO VOLUME (mm³) DO CALO ÓSSEO FORMADO NA REGIÃO MÉDIO-DIAFISÁRIA DA FÍBULA SUBMETIDA À OSTEOTOMIA. COMPARAÇÃO DAS FÍBULAS COM PREPARADO OSTEOGÊNICO E CONTROLE PELO TESTE DE WILCOXON ($\alpha=0,05$)

COELHO	VOLUME DO CALO ÓSSEO (mm ³)	
	Preparado Osteogênico	Controle
1	144	248
2	314	268
3	282	227
4	203	102
5	230	163
6	137	50
7	108	94
8	180	131
9	165	102
10	161	109
M	192,40	149,40
DP	65,63	74,09
EPM	20,75	23,43
CVP(%)	34,11	49,59
K-S	p > 0,10	p > 0,10
Wilcoxon	W=35	p=0,08

GRÁFICO 2 Volume (mm³) do calo ósseo das fíbulas tratadas com preparado osteogênico e controle

4.3 QUANTIDADE RELATIVA DE TECIDO ÓSSEO NO CALO ÓSSEO

TABELA 4 ESTATÍSTICA DESCRITIVA DA QUANTIDADE RELATIVA DE OSSO (%) NO CALO ÓSSEO FORMADO NA REGIÃO MÉDIO-DIAFISÁRIA DA FÍBULA SUBMETIDA À OSTEOTOMIA. COMPARAÇÃO DAS FÍBULAS COM PREPARADO OSTEOGÊNICO E CONTROLE PELO TESTE DE T PAREADO ($\alpha=0,05$)

COELHO	QUANTIDADE RELATIVA DE OSSO (%)	
	Preparado Osteogênico	Controle
1	88,90	81,82
2	63,83	43,25
3	97,93	89,13
4	59,63	52,88
5	83,88	96,25
6	100,00	95,85
7	88,17	85,43
8	80,66	70,27
9	85,27	74,26
10	72,85	61,68
M	82,11	75,08
DP	13,31	18,07
EPM	4,21	5,71
CVP(%)	16,21	24,07
K-S	p > 0,10	p > 0,10
t pareado	t=2,65	p=0,03*

GRÁFICO 3 Quantidade relativa (%) de osso no calo ósseo das fíbulas tratadas com preparado osteogênico e controle

4.4 QUANTIDADE RELATIVA DE CARTILAGEM NO CALO ÓSSEO

TABELA 5 ESTATÍSTICA DESCRITIVA DA QUANTIDADE RELATIVA DE CARTILAGEM (%) NO CALO ÓSSEO FORMADO NA REGIÃO MÉDIO-DIAFISÁRIA DA FÍBULA. COMPARAÇÃO DAS FÍBULAS COM PREPARADO OSTEOGÊNICO E CONTROLE PELO TESTE DE WILCOXON ($\alpha=0,05$)

COELHO	QUANTIDADE RELATIVA DE CARTILAGEM (%)	
	Preparado Osteogênico	Controle
1	6,15	18,80
2	10,83	4,18
3	0,00	8,17
4	30,01	3,40
5	10,01	0,00
6	0,00	0,00
7	5,82	5,65
8	2,93	6,42
9	77,87	8,47
10	0,66	10,76
M	7,83	6,58
DP	8,99	5,54
EPM	2,84	1,75
CVP(%)	114,81	84,14
K-S	$p > 0,10$	$p > 0,10$
Wilcoxon	$W = -1$	$p = 1,00$

GRÁFICO 4 Quantidade relativa (%) de cartilagem no calo ósseo das fíbulas tratadas com preparado osteogênico e controle

4.5 QUANTIDADE RELATIVA DE FIBROSE NO CALO ÓSSEO

TABELA 6 ESTATÍSTICA DESCRITIVA DA QUANTIDADE RELATIVA DE FIBROSE (%) NO CALO ÓSSEO FORMADO NA REGIÃO MÉDIO-DIAFISÁRIA DA FÍBULA. COMPARAÇÃO DAS FÍBULAS COM PREPARADO OSTEOGÊNICO E CONTROLE PELO TESTE DE WILCOXON ($\alpha=0,05$)

COELHO	QUANTIDADE RELATIVA DE FIBROSE (%)	
	Preparado Osteogênico	Controle
1	4,95	0,00
2	25,34	52,57
3	2,07	2,70
4	10,36	43,72
5	6,11	3,75
6	0,00	4,15
7	6,01	8,92
8	16,41	23,31
9	2,86	17,27
10	26,49	27,56
M	10,06	18,40
DP	9,54	18,29
EPM	3,02	5,78
CVP(%)	94,82	99,43
K-S	$p > 0,10$	$p > 0,10$
Wilcoxon	$W = -37$	$p = 0,06$

GRÁFICO 5 Quantidade relativa (%) de fibrose no calo ósseo das fíbulas tratadas com preparado osteogênico e controle

5. DISCUSSÃO

Acreditamos que alguns aspectos técnicos devam ser enfatizados em nosso estudo.

A escolha do coelho como modelo experimental para avaliação da consolidação óssea ocorreu devido ao fato do osso cortical destes animais apresentarem, ao contrário de roedores como camundongos e ratos, um completo sistema de Havers, semelhante ao humano. Segundo Nunamaker⁸⁷, os pequenos roedores apresentam uma estrutura óssea primitiva, sem sistemas Haversianos, sendo inadequados para pesquisas que envolvam o estudo da forma, função ou propriedades materiais dos esqueletos com sistemas Haversianos.

Optamos pela utilização da fíbula do coelho devido à sua própria configuração anatômica, articulando-se distalmente no terço médio da tíbia. Conforme demonstraram Seeherman et al.⁸⁸, a realização de osteotomias ou fraturas experimentais na fíbula desde animal tem a vantagem de descartar a necessidade de imobilização pós-operatória, pois a tíbia age como um tutor, permitindo o apoio imediato, inclusive nos casos onde as osteotomias ou fraturas são realizadas bilateralmente.

Discordamos da opinião de Park et al.⁸⁹, que desaprovam a realização de osteotomias em modelos experimentais no estudo da consolidação óssea, nas suas fases iniciais. Segundo estes autores, a utilização de serras motorizadas na confecção das osteotomias causa atraso no processo de consolidação óssea, devido à conseqüente lesão de partes

moles e descolamento do periósteo. No entanto, em nosso estudo realizamos as osteotomias mediante afastamento delicado das partes moles e utilizando um fio-serra de Gigli. Como a fíbula do coelho tem um diâmetro muito pequeno, a aplicação de uma força de baixa intensidade foi suficiente para romper o osso, sem aquecimento local ou lesões importantes nas partes moles. Estas considerações são ratificadas pelo estudo de Iwabu et al.⁹⁰, que sugere que, embora os modelos de osteotomia possam não refletir fielmente todas as condições específicas da consolidação de uma fratura no humano, o tempo de consolidação geralmente é mais prolongado e os locais de reparo são mais uniformes. Além disso, a considerável variação nas configurações dos modelos de fraturas fechadas obriga a um maior número de animais para gerar grupos comparativos. Assim, embora os modelos de fraturas sejam mais adequados para as pesquisas de ciência básica da consolidação óssea, os modelos de osteotomia são mais apropriados para otimizar o tempo de ação de fatores osteogênicos e matrizes bioativas, e para determinar as concentrações e doses mais adequadas aos ensaios clínicos em humanos.

O estudo bilateral tem a vantagem de permitir a utilização de um menor número de animais e ainda permitir uma comparação direta entre os tratamentos aplicados. Nos estudos unilaterais, o animal pode utilizar preferencialmente o membro não operado, causando alterações na composição mineral óssea devido ao desuso e, desta forma, comprometendo os resultados da pesquisa.

Com relação aos métodos de avaliação empregados, levamos em conta a opinião de Mosekilde⁹¹, onde a avaliação adequada da qualidade óssea não deve restringir-se unicamente à medição da densidade mineral óssea. Segundo este autor, a avaliação completa do calo de fratura compreende a avaliação da massa óssea, análise estrutural, análise histológica com histomorfometria e testes biomecânicos.

Utilizamos nesta investigação a densitometria óssea por DEXA para avaliar a densidade mineral óssea, a histomorfometria para a quantificação dos tecidos componentes do calo ósseo e a tomografia computadorizada multi-slice para a sua avaliação volumétrica. Os dois primeiros métodos são considerados “padrão-ouro” nas suas respectivas avaliações, porém, no que diz respeito à avaliação volumétrica, achamos que os métodos encontrados na literatura são imprecisos e pouco reprodutíveis.

A maioria dos estudos experimentais para se avaliar a consolidação óssea utiliza métodos radiográficos distintos para a mensuração do calo ósseo formado, sem uma padronização adequada^{16,92,93}. Variáveis como tempo de exposição ao raio-x, distância do tubo, filme utilizado, quantidade de raio-x aplicado, entre outras, não são uniformes. Uma simples exposição mais prolongada ou uma carga maior dos raios-x pode mascarar o verdadeiro volume do calo ósseo formado. Estes fatos nos levaram a buscar métodos mais precisos e reprodutíveis para a avaliação volumétrica do calo ósseo.

A tomografia helicoidal multi-slice é uma tecnologia relativamente recente que tem a vantagem de permitir uma avaliação em três dimensões

da estrutura estudada. Os cortes das imagens adquiridas pelo tomógrafo são processados em uma estação de trabalho computadorizada que reconstrói a imagem e permite sua visualização em movimento em tempo real. Em nossa pesquisa, após a reconstrução da imagem, utilizamos um recurso originalmente descrito para a medição de nódulos pulmonares (software Advanced Lung Analysis), para a mensuração volumétrica do calo ósseo formado no local das osteotomias das fíbulas. Este procedimento tem a capacidade de detectar nódulos tão pequenos quanto 2 mm^3 . Ao final do estudo verificamos que, além de conseguirmos uma medição volumétrica mais rigorosa do calo ósseo, comparando-se visualmente o volume do calo nas radiografias normais com o obtido com a tomografia multi-slice, verificamos que nas radiografias este volume aparenta sempre ser menor, pois nas fases iniciais da consolidação os calos ainda não estão totalmente calcificados. Com isso, eles não são visualizados em sua totalidade nas radiografias comuns.

Com relação à utilização do aspirado de medula óssea como fonte de células precursoras osteogênicas, fatores como técnica de aspiração, concentração das células disponíveis e uso de carreadores podem influenciar a sua eficácia na reparação óssea. Para contornar estes problemas, procuramos adotar algumas estratégias.

Com a intenção de aumentar o número de células precursoras osteogênicas a serem adicionadas nas osteotomias, realizamos a centrifugação do aspirado da medula óssea, conforme método descrito por Connolly et al.¹⁴. Com esta técnica, obtivemos uma concentração de células

nucleadas em média três vezes maior no centrifugado osteogênico do que no aspirado na sua forma original. Ainda, por meio do teste de viabilidade celular, confirmamos que estas células permaneceram viáveis após a centrifugação, excluindo a possibilidade de lesão ou morte celular causada pelo método utilizado. Em seu estudo, Connolly et al.¹⁴ compararam o número de células nucleadas presentes em aspirados de medula óssea com o obtido após vários métodos de centrifugação. O número médio de células nucleadas nos aspirados de medula óssea foi de 2×10^6 células por mililitro, enquanto que este mesmo número após a centrifugação simples foi de $3,6 \times 10^6$ células por mililitro. Estes autores implantaram as diferentes preparações osteogênicas obtidas após centrifugação em câmeras de difusão colocadas na cavidade peritoneal de coelhos. Os resultados obtidos comprovaram que a osteogênese no interior das câmeras é diretamente proporcional à concentração celular da solução osteogênica. Recentemente, Hernigou et al.⁹⁴ confirmam clinicamente a importância do emprego de técnicas para aumento da concentração das células osteoprogenitoras a serem administradas localmente, no tratamento de pseudoartroses de tíbia.

Outra dificuldade na administração local de aspirados de medula óssea é a tendência do material se difundir amplamente, às vezes até mesmo para pontos distantes do local da fratura ou osteotomia. Buscando evitar este problema, administramos uma esponja de colágeno absorvível, comercialmente disponível (Gelfoam[®] - Pharmacia & Upjohn Co., USA), embebida no centrifugado osteogênico. O intervalo médio para a absorção completa da esponja é de 14 dias, permitindo uma presença prolongada do

centrifugado de medula óssea no local da osteotomia. Embora esta técnica seja eficaz para impedir a dispersão das células, a esponja de colágeno não pode ser considerada um material osteocondutivo. Conforme Muschler et al.⁸, esta propriedade de materiais porosos conhecidos como matrizes bioativas, como o trifosfato de cálcio, têm como vantagem fornecer uma superfície onde as células osteoprogenitoras podem migrar, aderir e proliferar. Os materiais osteocondutivos atuam como um espaço protetor onde o tecido ósseo novo pode se formar e se distribuir pela região onde é necessário.

Bruder e Fox.³³ comentam que a matriz ideal para o crescimento e diferenciação das células-tronco mesenquimais deveria permitir distribuição e retenção celular uniformes, suportar crescimento vascular e ser composta de material que fosse incorporado facilmente durante o ciclo de remodelação óssea.

Optamos pela aspiração de 5ml de medula óssea em cada coelho devido a esta quantidade permitir facilidade de manuseio e processamento da amostra. No entanto, apesar do número de células nucleadas obtidas após a centrifugação poder ser considerado satisfatório, Muschler et al.⁴⁴ demonstram que limitar a quantidade de aspirado a 2 ml ou menos reduz a diluição com sangue periférico que pode ocorrer no momento da aspiração e aumenta proporcionalmente a concentração de células tronco-mesenquimais obtidas no aspirado. Assim, segundo sua avaliação, o ideal seria a realização de múltiplas punções em locais diferentes do osso ilíaco, limitados a 2 ml ou menos em cada um.

Os resultados da análise comparativa com densitometria óssea com DEXA revelaram uma maior densidade mineral óssea nos calos das osteotomias onde foi administrado o centrifugado osteogênico. Como não houve diferença significativa na mensuração volumétrica do calo ósseo, podemos inferir que a adição do centrifugado osteogênico resultou numa melhora qualitativa do calo ósseo. Confirmando este fato, a histomorfometria demonstrou uma porcentagem maior de tecido ósseo no calo das osteotomias onde foi adicionado o centrifugado osteogênico.

A falta de análise biomecânica em nosso estudo compromete a completa avaliação da resistência biomecânica do calo formado nas osteotomias, fator importante para considerar a qualidade da consolidação óssea. Esta falha deveu-se à pequena amostra empregada, pois a realização dos testes biomecânicos danifica a peça anatômica e impede assim a realização da histomorfometria posteriormente. Apesar disto, podemos considerar o estudo de Blokhuis et al.⁹⁵ que, comparando os resultados da densitometria óssea com DEXA com testes biomecânicos, observaram uma correlação positiva entre o aumento dos valores daquela com o aumento da resistência mecânica do calo ósseo. Estes autores concluem que o aumento da mineralização do calo durante o processo de consolidação óssea pode ser acompanhado pela densitometria óssea com DEXA, e resulta em maior rigidez biomecânica do calo ósseo.

Boer et al.⁹⁶ chegam à conclusão que a relação do volume do calo ósseo com suas propriedades mecânicas seria mais importante nas fases iniciais da consolidação óssea, quando o calo ainda está aumentando de

volume. Nas fases tardias, o curso natural da cicatrização leva a uma diminuição do volume total, caracterizada pela reabsorção do calo periosteal. Estes autores destacam que foi antecipado que o produto do volume do calo por sua densidade representaria apropriadamente a resistência deste às forças torcionais, devido à associação dos parâmetros geometria local e mineralização. No entanto, observou-se que este produto permaneceu constante com o passar do tempo, enquanto a rigidez e resistência torcional aumentaram. Comparado com a densidade do calo isolada, o produto do volume do calo por sua densidade não melhoraram a correlação com as propriedades biomecânicas, indicando que o volume do calo não foi uma variável importante na determinação da resistência do osso em consolidação.

Embora estudos tenham confirmado a superioridade da terapia com células-tronco mesenquimais expandidas em culturas em relação à utilização dos aspirados de medula óssea⁷⁵, estas culturas aumentam substancialmente custos e riscos. Complicações como contaminação com bactérias e vírus e depleção da capacidade proliferativa das células-tronco mesenquimais antes da sua implantação têm sido relatadas. Além disso, a preferência pela seleção in vitro das células com maior potencial proliferativo pode causar a escolha de células com mutações e capazes de dar origem a tumores, como teratomas.

Procuramos, com este estudo, contribuir para estudos futuros buscando alternativas ao emprego do enxerto ósseo autólogo, bem como encontrar caminhos diversos ao da utilização de culturas de células-tronco

mesenquimais, cuja complexidade e custo praticamente inviabilizam sua utilização em larga escala e na prática diária do ortopedista. A preparação osteogênica obtida por centrifugação simples de aspirados de medula óssea é um método de fácil reprodução, rápido e que não demanda equipamentos caros nem mão de obra especializada. O sucesso de seu uso experimental, em nosso estudo, poderá servir de ponto de partida para ensaios clínicos randomizados em humanos com objetivo de comprovar sua eficácia e incorporá-lo definitivamente no arsenal terapêutico do ortopedista.

6. CONCLUSÃO

1- A utilização de centrifugado osteogênico de medula óssea favoreceu a consolidação de osteotomias experimentais na fíbula de coelhos.

2 – O uso do centrifugado osteogênico resultou em melhora qualitativa do calo ósseo.

7. REFERÊNCIAS

1. Alonso JE, Lee J, Burgess AR, Browner BD. The management of complex orthopedic injuries. *Surg Clin North Am.* 1996; 76: 879-903.
2. Praemer A, Furner S, Price OP. Musculoskeletal conditions in the United States, Rosemont, IL. *Am Acad Orthop Surg.* 1992; 85-91.
3. Einhorn T. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1998; 355(Supl): 7-21.
4. Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma.* 1989; 3: 192.
5. Gersumi DH, Pinsker R: Bone grafting for nonunion of fractures of the tibia: A critical review. *J Trauma* 1982; 22:43.
6. Lane JM: Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am.* 1987; 18:213.
7. Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering – current challenges and expanding opportunities. *Science.* 2002; 295: 1009-14.
8. Muschler G, Nakamoto C, Griffith, LG. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am.* 2004; 86(7): 1541-57.
9. Freidenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol.* 1966; 16: 381.

10. Freidenstein AJ, Petrokova KV, Kuralesova AI, Frolova GP: Heterotopic transplantation of bone marrow. Transplantation 1968; 6: 230.
11. Owen ME, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: Marrow derived osteogenic precursors. Ciba Found. Symp. 136: 42, 1988.
12. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999; 284: 143-147.
13. Gurevitch O, Kurkalli BGS, Prigozhina T, Kasir J, Gaft A, Slavin S. Reconstruction of cartilage, bone, and hematopoietic microenvironment with demineralized bone matrix and bone marrow cells. Stem Cells 2003; 21: 588-97.
14. Connolly, JF. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. Clin Orthop Relat Res. 1995; 313: 8-18.
15. Connolly J. Clinical use of marrow osteoprogenitor cells to stimulate osteogenesis. Clin Orthop Relat Res. 1998; 355(Supl.): 257-66.
16. Paley D. Percutaneous bone marrow grafting on fractures and bone defects and experimental study in rabbits. Clin Orthop Rel Res. 1988; 208: 300-12.
17. Sharma S, Garg NK, Veliath AJ, Subramanian S, Srivastava KK. Percutaneous bone marrow grafting of osteotomies and bony defects in rabbits. Acta Orthop Scand. 1992; 63(2): 166-9.
18. McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. J Bone Joint Surg. 1978; 60B:150-162.

19. Brighon CT, Hunt RM. Early histological and ultra-structural changes in medullary fracture callus. *J Bone Joint Surg.* 1991; 73A: 832-47.
20. Weinstein S, Buckwalter JA. Musculoskeletal tissue healing. In: Turek. *Orthopaedics: principles and their application.* 6a ed. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins; 2003. p. 31-112.
21. Greenbaum MA, Kanat, IO. Current concepts in bone healing: Review of the literature. *J Am. Podiatr. Med. Assoc.* 1993; 1: 123-9.
22. Schenk, RK. Biology of fracture repair. In: Browner, BD. *Skeletal Trauma: Basic science, management, and reconstruction.* 3.ed. Elsevier; 2003. v.2, p. 29-73.
23. Bolander ME. Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1992; 200: 165-170.
24. Perren, SM, Boitzky A. Cellular differentiation and bone biomechanics during the consolidation of a fracture. *Anat. Clin.* 1978; 1:13.
25. Beresford JN. Osteogenic stem cells and the stromal system of bone marrow. *Clin Orthop Relat Res.* 1989; 240: 270-18.
26. Muschler GF, Midura RJ. Connective tissue progenitors: Practical concepts for clinical applications. *Clin Orthop Relat Res.* 2002; 395: 66-80.
27. Lin H. The self-renewing mechanism of stem cells in the germline. *Curr Opin Cell Biol.* 1998; 10: 687-93.

28. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stem cells: Nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001; 19: 180-92.
29. United States of America. National Institutes of Health. Stem Cells: Scientific progress and future research directions. 2001. Available from: <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/>
30. Eriksen EF, Axelrod DW, Melsen F. Bone histomorphometry. New York: Raven Press Ltd; 1994.
31. Parfitt, AM. The cellular basis of bone remodeling. *Calcif. Tissue Int.* 1985; 36: 537.
32. Yoo JU, Johnstone B. The role of osteochondral progenitor cells in fracture repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1998; 355(Supl):73-81.
33. Bruder SP, Fox BS: Tissue engineering of bone: Cell based strategies. *Clin Orthop.* 1999; 367(Supl): 68-83.
34. Owen M. Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. *Bone Miner Res.* 1985; 3: 1-25.
35. Burwell RG. Studies in the transplantation of bone: The composite homograft-autograft of cancellous bone: An analysis of factors leading to osteogenesis in marrow transplants and marrow containing bone graft. *J Bone Joint Surg.* 1964; 46B: 110-140.

36. Bab I, Ashton BA, Gazit D, Marx G, Williamson MC, Owen ME. Kinetics and differentiation of marrow stromal cells in diffusion chambers *in vivo*. J Cell Sci. 1986; 84:139.
37. Tavassoli M, Crosby WH. Transplantation of marrow to extramedullary sites. Science 1968; 54:1968.
38. Friedenstein AJ, Latzinik NW, Grosheva AG, Gorkaya UF. Marrow microenvironment transfer by heterotopic transplantation of freshly isolated and cultured cells in porous sponges. Exp Hematol. 1982; 10: 217.
39. Hotta T, Murate T, Utsumi M, Hirabayashi N, Yamada H: Origins of haematopoietic and stromal cells in sub-cutaneous femur implants. Exp Hematol. 1983; 11:107.
40. Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A, Owen M: Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers *in vivo*. Clin Orthop 1980; 151: 294.
41. Bab I, Ashton BA, Syftestad GT, Owen ME: Assessment of an *in vivo* diffusion chamber method as a quantitative assay for osteogenesis. Calcif Tissue Int. 1984; 36:77.
42. Muschler GF, Midura RJ, Nakamoto C. Practical modeling concepts for connective tissue stem cell and progenitor compartment kinetics. J Biomed Biotechnol. 2003; 2003: 170-93.
43. Caplan AL. Mesenchymal stem cells. J Orthop Res. 1991; 9: 641-50.

44. Muschler GF, Boehm C, Easley K. Aspiration to obtain osteoblast progenitors cells from human bone marrow: The influence of aspiration volume. *J Bone Joint Surg.* 1997; 79A: 1699-709.
45. Summers BN, Eisenstein SM: Donor site pain from the ilium. *J Bone Joint Surg.* 1989; 71B: 677.
46. MacGraw J, Lim EVAL. Treatment of open tibial fractures. *J Bone Joint Surg* 1988; 70A: 900.
47. Bruder SP, Kraus K, Goldberg VM, Kadiayla S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J bone Joint Surg.* 1998; 80A: 985-96.
48. Burkus JK. New bone graft techniques and applications in the spine. *Medscape Orthopaedics* 2002. Available from <http://www.medscape.com/viewprogram/2073>
49. Bruder SP, Jaiswal N, Nancy SMS, Mosca JD, Kraus K, Kadiyala S. Mesenquimal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin Orthop Relat Res.* 1998; 355(Supl): 247-56.
50. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965; 150:893-899.
51. Wosney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, et al. Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science* 1988; 242: 1528-34.

52. Cook SD, Wolfe MW, Salked SL, Rueger DC. Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of segmental defects in nonhuman primates. *J Bone Joint Surg.* 1995; 77A: 734-50.
53. Gerhart TN, Kirker-Head CA, Kriz MJ, Holtrop ME, Hennig GE, Hip J, et al. Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein. *Clin Orthop.* 1993. 293: 317-26.
54. Heckman JD, Boyan BD, Aufdemorte TB, Abbott JT: The use of bone morphogenetic protein in the treatment of nonunion in a canine model. *J Bone Joint Surg.* 1991; 73A: 750-64.
55. Lane JM, Yasko A, Tomin E, Bostrom M, Rosen V, Wozney J. Orthopedic application of BMP-2 in fracture healing. Paper presented at: First International Conference on Bone Morphogenetic Proteins; June 8, 1994; Baltimore, Md.
56. Muschler GF, Nitto H, Matsukura Y, Boehm C, Valdevit A, Kambic H, Davros W, Powell K, Easley K. Spine fusion using cell matrix composites enriched in bone marrow-derived cells. *Clin Orthop.* 2003; 407: 102-18.
57. Curylo LJ, Johnstone B, Petersilge CA, Janick JA, Yoo JU. Autogenous bone marrow augmentation of spinal fusion in a rabbit posterolateral fusion model. *Trans Orthop Res Soc.* 1997; 22:356.
58. Grundel RE, Chapman MW, Yee T, Moore DC. Autogenic bone marrow and porous biphasic calcium phosphate ceramic for

- segmental bone defects in the canine ulna. Clin Orthop. 1991; 266: 244-58.
59. Lindholm TS, Nilson OS, Lindholm TC. Extraskkeletal and intraskkeletal new bone formation induced by demineralized bone matrix combined with bone marrow cells. Clin Orthop. 1982; 171: 251-255.
60. Lindholm TS, Ragni P, Lindholm TC. Response of bone marrow stroma cells to demineralized cortical bone matrix in experimental spinal fusion in rabbits. Clin Orthop. 1988; 230:296-302.
61. Takagi K, Urist MR. The role of bone marrow in bone morphogenetic protein-induced repair of femoral massive diaphysal defects. Clin Orthop 1982; 171:224-31.
62. Werntz JR, Lane JM, Burstein AH, Justin R, Klein R, Tomin E. Qualitative and quantitative analysis of orthotopic bone regeneration by marrow. J Orthop Res. 1996; 14: 85-93.
63. Quarto R, Thomas D, Liang T: Bone progenitor cell deficits and the age-associated decline in bone repair capacity. Calcif Tissue Int. 1995; 56: 123-29.
64. Tsuji T, Hughes FJ, McCulloch CA, Melcher AH. Effect of donor age on osteogenic cells of rat bone marrow in vitro. Mech Ageing Dev. 1990; 51: 121-32.
65. Paley D. Percutaneous bone marrow grafting on fractures and bone defects and experimental study in rabbits. Clin Orthop Rel Res. 1988; 208: 300-12.

66. Sharma S, Garg NK, Veliath AJ, Subramanian S, Srivastava KK. Percutaneous bone marrow grafting of osteotomies and bony defects in rabbits. *Acta Orthop Scand*. 1992; 63(2): 166-9.
67. Werntz JR, Lane JM, Burstein AH, Justin R, Klein R, Tomin E. Qualitative e quantitative analysis of orthotopic bone regeneration by marrow. *J Orthop Res*. 1996; 14: 85-93.
68. Connolly JF, Shindell R. Percutaneous marrow injection for an ununited tibia. *Nebr Med J*. 1986; 71: 105-7.
69. Connolly JF, Guse R, Tiedeman J, Dehne R. Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibia nonunions. *Clin Orthop*. 1991; 266: 259-70.
70. Connolly JF: Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clin Orthop*. 1995; 313: 8-18.
71. Garg N, Gaur S, Sharma S: Percutaneous autogenous bone marrow grafting in 20 cases of ununited fracture. *Acta Orthop Scand*. 1993; 64: 671-2.
72. Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol*. 1976; 47: 327.
73. Tiedman J, Connolly J, Strates B, Lippiello L. Treatment of nonunion by percutaneous injection of bone marrow and desmineralized bone matrix: An experimental study in canines. *Clin Orthop*. 1991; 268: 294-302.

74. Nade S, Armstrong L, McCartney E, Baggaley B. Osteogenesis after bone marrow transplantation: The ability of ceramic materials to sustain osteogenesis from transplanted bone marrow cells: Preliminary studies. *Clin Orthop* 1983; 181: 255-63.
75. Kadiyala S, Jaiswal N, Bruder SP. Culture-expanded, bone marrow-derived mesenchymal stem cells can regenerate a critical-sized segmental bone defect. *Tissue Eng.* 1997; 3: 173-85.
76. Tiedeman JJ, Garvin KL, Kile TA, Connolly JF. The role of a composite, demineralized bone matrix and bone marrow in the treatment of osseous defects. *Orthopedics* 1995; 18(12): 1153-8.
77. Tiedeman JJ, Huurman WW, Connolly JF, Strates BS. Healing of a large nonossifying fibroma after grafting with bone matrix and marrow. *Clin Orthop Rel Res.* 1991; 265: 302-5.
78. Garg NK, Gaur S. Percutaneous Autogenous Bone-Marrow Grafting in Congenital Tibial Pseudarthrosis. *J Bone Joint Surg.* 1995; 77B: 830-831.
79. Healey H, Zimmerman PA, MacDonnell JM, Lane JM. Percutaneous bone marrow grafting of delayed union and nonunion in cancer patients. *Clin Orthop.* 1990; 256: 280-5.
80. Mankani MH, Krebsbach PH, Satomura K, Kuznetsov SA, Hoyt R, Robey PG. Pedicled bone flap formation using transplanted bone marrow stromal cells. *Arch Surg.* 2001; 136:263-70.

81. Ohgushi H, Kotobuki N, Funaoka H, Machida H, Hirose H, Tanaka Y, Takakura Y. Tissue engineered ceramic artificial joint - ex vivo osteogenic differentiation of patient mesenchymal cells on total ankle joints for treatment of osteoarthritis. *Biomaterials* 2005; 26(22): 4654-61.
82. Curylo LJ, Johnstone B, Petersilge CA, Janick JA, Yoo JU. Augmentation of spinal arthrodesis with autogenous bone marrow in a rabbit posterolateral spine fusion model. *Spine* 1999; 24: 434-8.
83. Tay BK, Le AX, Heilman M, Lotz J, Bradford DS. Use of collagen-hydroxyapatite matrix in spinal fusion. A rabbit model. *Spine* 1998; 23: 2276-81.
84. Kai T, Shao-qing G, Geng-ting D. In vivo evaluation of bone marrow stromal-derived osteoblasts-porous calcium phosphate ceramic composites as bone graft substitute for lumbar intervertebral spinal fusion. *Spine* 2003; 28: 1653-8.
85. Welch W, Gerszten P, Sherman J, Ullrich P, Latus G, Macenski MM. A prospective randomized study of interbody fusion: Bone substitute or autograft. Paper presented at: BioTechnologies for Spinal Surgery; 2002; Halle, Germany.
86. Price CT, Connolly JF, Carantzas AC, Ilyas I. Comparison of bone grafts for posterior spinal fusion in adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 2003; 28: 793-8.

87. Nunamaker, DM. Experimental models of fracture repair. Clin Orthop. 1998; 355 (Supl): 56-65.
88. Seeherman H, Wozney J, Li R. Bone morphogenetic protein delivery systems. Spine 2002; 19:255-65.
89. Park SH, O' Connor K, Sung R, McKellop H, Sarmiento A. Comparison of healing process in open osteotomy model and closed fracture model. J Orthop Trauma. 1999; 13:114-20.
90. Iwabu S, Augat P, Claes L. The revascularization and bone healing following fracture with severe soft tissue injury: a new closed fracture model in the rat. Read at the International Society for Fracture Repair, Hong Kong; 2000; Hong Kong, China.
91. Mosekilde L. Assessing bone quality – animal models in preclinical osteoporosis research. Bone. 1995; 17 (supl): 343-52.
92. Aronson J, Shen XC, Skinner RA, Hogue WR, Badger TM, Lumpkin CKJ. J Orthop Res. 1997; 15: 221-6.
93. Kossmann T, Giebel G, Glombitza A: Rat model for limb lengthening by callus distraction. Res Exp Med (Berl). 1993; 193: 13-20.
94. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. J Bone Joint Am. 2005; 87: 1430-7.

95. Blokhuis TJ, Boer FC, Bramer JAM, Lingen A, Roos JC, Bakker FC, et al. Evaluation of strength of healing fractures with dual energy xray absorptiometry. Clin Orthop. 2000; 380: 260-8.
96. Boer FC, Bramer JAM, Patka P, Bakker FC, Barentsen RH, Feilzer AJ, Lange ESM, et al. Quantification of fracture healing with three-dimensional computed tomography.