

# RESPOSTA OSTEOGÊNICA SISTÊMICA NO ESTÍMULO MEDULAR ÓSSEO

## OSTEOGENIC SYSTEMIC RESPONSE AT BONE MARROW STIMULATION

FABIANO REBOUÇAS RIBEIRO, FERNANDO GOMES TAVARES, CARLA KOMON DE SOUZA, MARCELLO MARTINS DE SOUZA, JAQUES WAISBERG

### RESUMO

**Objetivo:** Avaliar a influência da resposta osteogênica sistêmica, causada pelo estímulo da medula óssea à distância, na consolidação de falha óssea. **Método:** 36 coelhos adultos jovens foram divididos aleatoriamente em três grupos (A, B, C) e submetidos à ostectomia do rádio direito, com retirada de 4mm de fragmento ósseo. Os animais do grupo A foram submetidos ao estímulo da medula óssea pela sua ablação do fêmur esquerdo. Os animais do grupo B foram submetidos ao estímulo da medula óssea pela introdução de fio de Kirschner com 1,5mm de espessura, no interior do canal medular femoral esquerdo. Os animais do grupo C foram utilizados como grupo controle. Foram realizadas radiografias semanais até a 4ª semana pós-operatória, quando os animais foram sacrificados. Foi realizado estudo histomorfométrico do calo ósseo formado no local da ostectomia. As radiografias foram avaliadas para análise da evolução da consolidação óssea. **Resultados:** Os grupos que sofreram estímulo medular à distância tiveram menor número de células ósseas, comparativamente ao grupo controle. No estudo radiográfico não houve diferença na evolução da consolidação entre os grupos. **Conclusão:** O estímulo da medula óssea à distância influenciou desfavoravelmente a consolidação de falha óssea em coelhos.

**Descritores:** Coelhos/cirurgia. Medula óssea. Consolidação da fratura. Calo ósseo.

**Citação:** Ribeiro FR, Tavares FG, Souza CK, Souza MM, Waisberg J. Resposta osteogênica sistêmica no estímulo medular ósseo. *Acta Ortop Bras.* [periódico na Internet]. 2009;17(2):29-34. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

### INTRODUÇÃO

O processo de reparação da fratura envolve fatores locais e sistêmicos.<sup>1-3</sup> A resposta osteogênica sistêmica foi observada após estímulos distantes do foco de fratura, como na lesão da medula óssea<sup>4-8</sup> e/ou na perda sanguínea<sup>9,10</sup>. Tavares et al.<sup>4</sup> descreveram consolidação mais rápida em coelhos submetidos à ostectomia do rádio associado ao estímulo da medula óssea à distância, com a colocação de fio de Kirschner intramedular femoral. Uma das hipóteses que podem justificar este fenômeno é a ação dos fatores de crescimento, que são produzidos no local da regeneração medular e liberados na circulação.<sup>5,6</sup> Existem outros fatores que são liberados na circulação por intermédio da regeneração da medula óssea, como o 14 *amino acid peptide – osteogenic growth peptide* (OGP). O OGP sintético com estrutura idêntica a original

### ABSTRACT

**Objective:** To assess the influence of systemic osteogenic response caused by remote stimulation of bone marrow in a bone gap union. **Method:** 36 young adult rabbits were employed. The animals were randomly divided into 3 groups (A, B, C) and submitted to osteotomy of the right radius, removing 4mm of bone. The animals on Group A had their bone marrow stimulated by ablation on the left femur. Animals on Group B had their bone marrow stimulated by introducing a 1.5mm-thick Kirschner wire into the shaft of the left femur. The animals on Group C served as controls. X-ray images were taken on a weekly basis until the 4th post-surgical week, when the animals were sacrificed. Histomorphometric study of the bony callus formed at the osteotomy site was conducted. The x-ray images were evaluated in order to analyze the evolution of bone union at the osteotomy site. **Results:** The groups with remote bone marrow stimulation had a smaller number of bone cells as compared to the control group. On radiographic studies, no difference in terms of evolution of union was evident between the groups. **Conclusion:** Remote stimulation of bone marrow had an unfavorable influence on bone gap union in rabbits.

**Keywords:** Rabbits/surgery. Bone marrow. Fracture healing. Bony callus.

**Citation:** Ribeiro FR, Tavares FG, Souza CK, Souza MM, Waisberg J. Osteogenic systemic response at bone marrow stimulation. *Acta Ortop Bras.* [serial on the Internet]. 2009;17(2):29-34. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

estimulou a proliferação e ativação da fosfatase alcalina de células osteoblásticas *in vitro* e aumentou a massa óssea em ratos.<sup>11-14</sup> A perda sanguínea também está diretamente relacionada com a estimulação e ativação da medula óssea. A produção de células eritropoieticas pode estar associada à produção de células osteogênicas, pela correlação das suas *stem cells*, ou pela liberação de fatores que afetam a diferenciação e proliferação dos componentes celulares estromais da medula óssea.<sup>9</sup> Um exemplo é a perda óssea que ocorre a partir da menopausa onde embora geralmente seja atribuída sua causa às alterações hormonais da mulher, é possível que o sangramento menstrual repetitivo mantenha a atividade osteoblástica da medula óssea contribuindo na manutenção da massa esquelética.<sup>10,15</sup> Ilizarov et al.<sup>16</sup> concluiu que a perda sanguínea de 1% do peso corpóreo dos coelhos acelerava o processo de reparação óssea da osteotomia fibular.

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

**Serviço de Ortopedia e Traumatologia do Hospital do Servidor Público Estadual "Francisco Morato de Oliveira".**

**Endereço para Correspondência:** Rua Borges Lagoa, 1755, 1o andar - sala 180 - V.Clementino - São Paulo, SP, Brasil. CEP 04038-034. Email: [fabianoreboucas@globo.com](mailto:fabianoreboucas@globo.com)

Trabalho recebido em 21/02/08 aprovado em 05/08/08

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da resposta osteogênica sistêmica, causada pelo estímulo da medula óssea à distância, pela consolidação de falha óssea.

## MÉTODO

O experimento foi realizado no Setor de Cirurgia Experimental do Hospital do Servidor Público Estadual "Francisco Morato de Oliveira" de São Paulo, seguindo as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), filiado ao *International Council for Laboratory Animal Science* (ICLAS). Foram utilizados 36 coelhos adultos jovens, da raça Nova Zelândia Branca, machos, com média de peso de 2,9kg (2,5 a 3,3kg), distribuídos aleatoriamente em três grupos (A, B e C) com doze animais cada. O protocolo anestésico consistiu de injeção intramuscular de solução composta de: cloridrato de cetamina (40mg/kg) e cloridrato de xilazina (5mg/kg).<sup>17</sup> No momento da anestesia foram administradas 40.000 UI/kg intramuscular de penicilina benzatina. Os coelhos não apresentaram sinais clínicos de desconforto ou dor durante o procedimento cirúrgico.

Os animais foram posicionados na mesa cirúrgica em decúbito lateral esquerdo, e foi realizada a tricotomia parcial do antebraço direito. Realizou-se o esvaziamento venoso do membro com faixa elástica (Figura 1) e garroteamento na raiz do braço.



Figura 1 - Esvaziamento venoso do membro anterior direito com faixa elástica.

Após anti-sepsia e assepsia de todo o membro foram colocados panos estéreis e praticou-se incisão reta de 2,5cm de extensão na face dorso-radial do antebraço direito, a partir de 1,5cm de distância proximal à articulação rádio-cárpica. Realizou-se dissecação entre os músculos abductor longo do polegar e extensor radial do carpo até a exposição óssea do rádio. Com caneta de marcação cirúrgica criou-se duas marcações no rádio para delimitação do local correto para ostectomia (Figura 2).

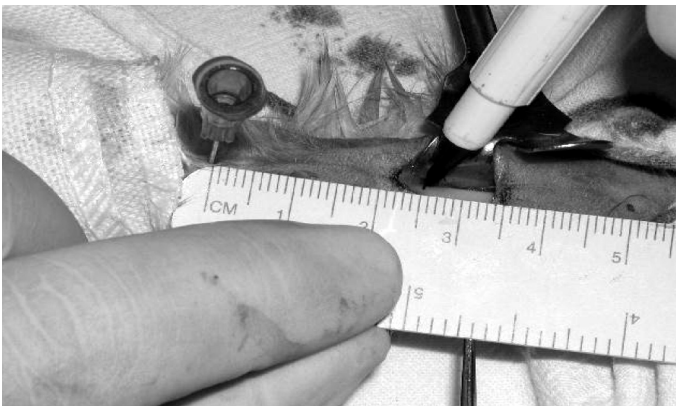


Figura 2 - Marcações do local da ostectomia no rádio do membro anterior direito do animal.

Com utilização de mini-serra de aço de 0,5mm de espessura, procedeu-se a ostectomia retirando-se cilindro de 4mm deste osso, à distância de 2,5cm proximalmente à articulação rádio-cárpica, protegendo-se as partes moles e a ulna, e irrigando-se o local com 5ml de soro fisiológico (Figura 3).

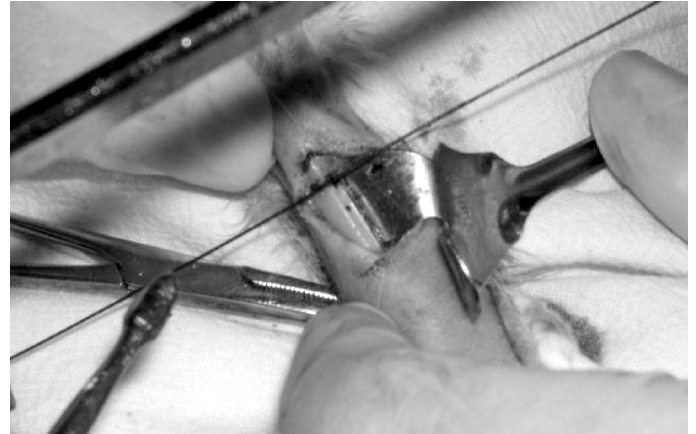


Figura 3 - Ostectomia do rádio com mini-serra de aço protegendo-se partes moles do membro anterior direito do animal.

Os músculos e a tela celular subcutânea foram aproximados com fio de sutura absorvível de ácido poliglicólico (Vicryl 3.0<sup>®</sup>), para minimizar sangramento pós-operatório e evitar interposição muscular na falha óssea criada. Suturou-se a pele com fio inabsorvível de náilon monofilamentar (Mononylon 4.0<sup>®</sup>). A estabilização do rádio não foi necessária, devida sua forte ligação à ulna pela membrana interóssea.

Nos animais do grupo A, aproveitando-se o mesmo ato anestésico, foi realizado estímulo da medula óssea pela sua ablação parcial do fêmur esquerdo com a aspiração de 3ml do conteúdo do canal medular, utilizando-se seringa de 20ml e agulha de punção para biópsia. A agulha foi posicionada dentro do canal medular femoral esquerdo através do trocânter maior até o fêmur distal, e a aspiração foi feita à medida que se retirava a agulha (Figura 4). O material coletado do canal medular femoral foi desprezado.



Figura 4 - Ablação da medula óssea por aspiração do fêmur do animal.

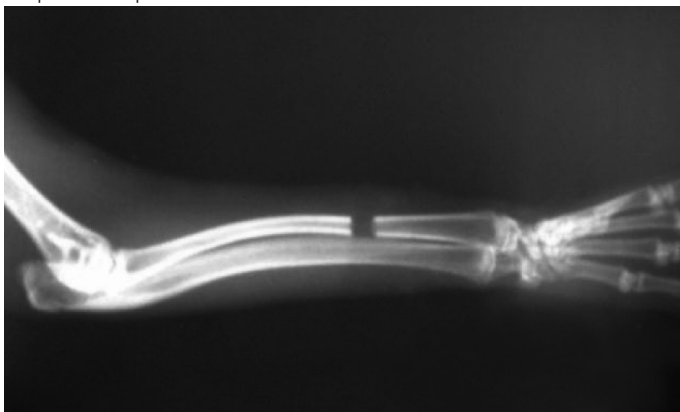
No grupo B, também se aproveitando do mesmo ato anestésico, foi realizado estímulo da medula óssea pela introdução de fio de Kirschner com 1,5mm de espessura colocado no interior do canal medular femoral esquerdo. O fio foi inserido percutaneamente pelo trocânter maior, em direção à diáfise, onde ficou sepultado (Figura 5). Confirmou-se o local de sepultamento do fio com radiografias ântero-posterior e lateral.



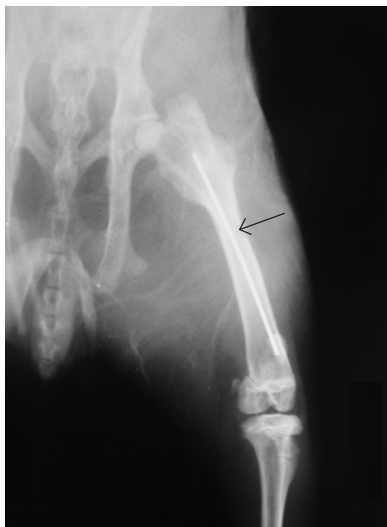
**Figura 5** - Inserção percutânea de fio de Kirschner no canal medular femoral do animal.

No grupo C, utilizado como grupo controle, não foi realizado estímulo à distância da medula óssea.

No pós-operatório imediato foram realizadas radiografias em posição ântero-posterior e lateral do antebraço direito (grupos A, B e C) (Figura 6) e fêmur esquerdo (grupo B) (Figura 7). As radiografias do antebraço foram repetidas, a cada sete dias até o 21º dia com aparelho de 36kV, 0,025mAs e 100mA. O filme (Kodak®), modelo T-MAT G/RA de 18x24cm foi posicionado a 30cm de distância da ampola do aparelho de raios X.



**Figura 6** - Radiografia lateral do antebraço operado mostrando a ostectomia realizada no rádio.

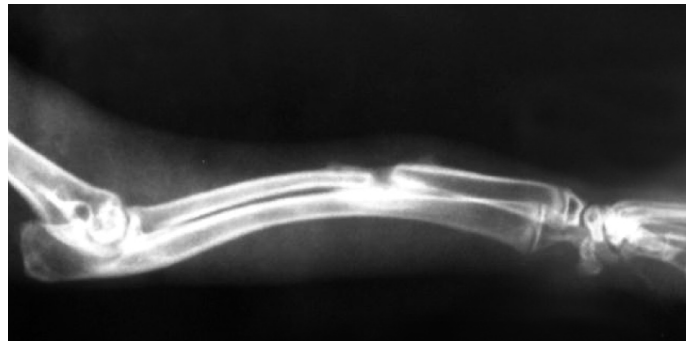


**Figura 7** - Radiografia ântero-posterior do fêmur operado mostrando fio de Kirschner intramedular (seta).

Foram excluídos do estudo os animais que tiveram complicações operatórias: um coelho do grupo A (fratura concomitante da ulna) e um coelho do grupo B (ostectomia incompleta do rádio).

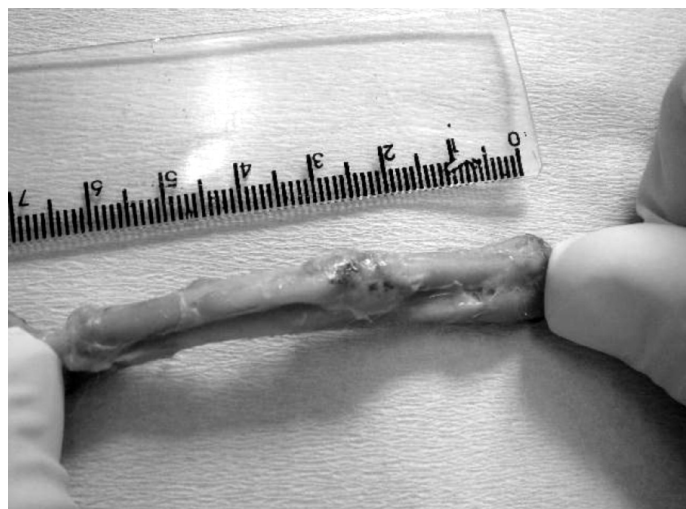
No pós-operatório, os animais foram alojados em gaiolas individuais, onde receberam ração comercial e água *ad libitum*.

Todos os coelhos foram sacrificados no final da 4ª semana de pós-operatório, com pentobarbital sódico intravenoso, na dose letal de 200mg/kg.<sup>18</sup> Em seguida o antebraço de cada animal foi radiografado nas posições de ântero-posterior e lateral (Figura 8).



**Figura 8** - Radiografia lateral após a quarta semana do antebraço operado do animal, notando-se calo ósseo no rádio.

Procedeu-se a dissecação do antebraço dos animais e a ressecção do rádio em conjunto com a ulna (Figura 9).



**Figura 9** - Antebraço do animal dissecado, com ressecção do rádio em conjunto com a ulna.

Após armazenamento em recipientes com formol a 10% tamponado adequadamente identificados, a região da ostectomia foi submetida à análise histomorfométrica.

### **ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO**

Realizou-se a descalcificação das peças em ácido nítrico a 7% e incluídas em parafina. Foram realizados cortes histológicos de 3µm de espessura em sentido coronal em micrótomo rotatório nos blocos de parafina contendo as amostras de calo ósseo, e que foram corados pela técnica de tricrômio de Masson para análise histomorfométrica. A qualificação dos diversos tipos de tecidos do calo ósseo foi realizada em sistema analisador de imagem (Kontron Electronic 300®).

Em cada animal foram somadas as áreas de tecido cartilágneo, ósseo e fibroso, obtendo-se a área total do calo ósseo. A fração de área de cada tipo de tecido foi obtida pela relação entre a fração de área do tecido em questão dividida pela área do calo ósseo (Figura 10).





**Figura 10** - Fotomicrografia do calo ósseo com delimitação dos tecidos de fibrose, cartilagem e ósseo.

## ESTUDO RADIOGRÁFICO

As radiografias semanais foram analisadas pelo sistema do escore radiográfico de Lane e Sandhu<sup>19</sup> para avaliação da evolução da consolidação óssea no local da osteotomia por médico ortopedista sem acesso aos dados do estudo (Tabela 1).

**Tabela 1** - Escore radiográfico de acordo com Lane e Sandhu<sup>19</sup>

| Formação óssea                     | Pontos |
|------------------------------------|--------|
| Sem evidência de formação óssea    | 0      |
| Formação de osso (25% do defeito)  | 1      |
| Formação de osso (50% do defeito)  | 2      |
| Formação de osso (75% do defeito)  | 3      |
| Formação de osso (100% do defeito) | 4      |
| <b>Consolidação</b>                |        |
| Com traço de fratura completo      | 0      |
| Com traço de fratura incompleto    | 2      |
| Ausência de traço de fratura       | 4      |
| <b>Remodelação</b>                 |        |
| Sem evidência de remodelação       | 0      |
| Remodelação intramedular           | 2      |
| Remodelação cortical               | 4      |

## Análise Estatística

Foram utilizadas como medidas resumos a média, a mediana e o desvio-padrão, mínimo e máximo para apontar a variabilidade.<sup>20</sup> No estudo histomorfométrico utilizou-se a análise de variância (ANOVA).<sup>21</sup> Na aplicação deste teste, a homogeneidade entre os grupos foi verificada pelo teste de Levene. Na presença de diferença significativa entre os grupos, foram realizadas comparações múltiplas (comparações entre grupos dois a dois) pelo teste de Bonferroni para identificação dos grupos com diferenças entre si. Para as notas do escore radiográfico de Lane e Sandhu<sup>19</sup> utilizou-se o teste não paramétrico de Medidas Repetidas para Dados Ordinais.<sup>20,21</sup> Por meio desta técnica foram avaliados os efeitos de grupo (comparação entre os três grupos), efeitos de momento (comparação entre as semanas) e efeitos de interação (comportamentos diferenciados em função de outra variável). Para todos os testes, o nível de rejeição da hipótese de nulidade foi 0,05 (nível de significância de 95%) de acordo com os padrões para os estudos biológicos.

## RESULTADOS

A porcentagem de células de fibrose, cartilagem e osso encontrada no estudo histomorfométrico do calo ósseo nos animais dos grupos A, B e C está relacionada nas Tabelas 2, 3 e 4.

**Tabela 2** - Porcentagem de células de fibrose, cartilagem e osso encontradas no estudo histomorfométrico do calo ósseo das amostras dos animais do grupo A

| Animal | Fibrose (%) | Cartilagem (%) | Osso (%) |
|--------|-------------|----------------|----------|
| 1      | 2,5         | 14,5           | 83       |
| 2      | 8           | 17             | 75       |
| 3      | 2           | 19             | 79       |
| 4      | 15          | 29             | 56       |
| 5      | 5           | 30             | 65       |
| 6      | 0           | 20             | 80       |
| 7      | 4           | 17             | 79       |
| 8      | 5           | 15             | 80       |
| 9      | 10          | 15             | 75       |
| 10     | 16          | 14             | 70       |
| 11     | 4           | 20             | 76       |

**Tabela 3** - Porcentagem de células de fibrose, cartilagem e osso encontradas no estudo histomorfométrico do calo ósseo das amostras dos animais do grupo B

| Animal | Fibrose (%) | Cartilagem (%) | Osso (%) |
|--------|-------------|----------------|----------|
| 1      | 0,5         | 2              | 97,5     |
| 2      | 0,6         | 9,2            | 90,2     |
| 3      | 8,5         | 17,5           | 74       |
| 4      | 3           | 14             | 83       |
| 5      | 2           | 26             | 72       |
| 6      | 8,5         | 4              | 87,5     |
| 7      | 3           | 10             | 87       |
| 8      | 3           | 26             | 71       |
| 9      | 16          | 15             | 69       |
| 10     | 5           | 25             | 70       |
| 11     | 1,4         | 22             | 76,6     |

**Tabela 4** - Porcentagem de células de fibrose, cartilagem e osso encontradas no estudo histomorfométrico do calo ósseo das amostras dos animais do grupo C

| Animal | Fibrose (%) | Cartilagem (%) | Osso (%) |
|--------|-------------|----------------|----------|
| 1      | 16,5        | 13,5           | 70       |
| 2      | 3           | 12             | 85       |
| 3      | 0           | 0              | 100      |
| 4      | 0,05        | 0,05           | 99,9     |
| 5      | 0           | 11             | 89       |
| 6      | 3           | 8              | 89       |
| 7      | 2           | 18,5           | 79,5     |
| 8      | 1,5         | 19,5           | 79       |
| 9      | 10          | 15             | 75       |
| 10     | 3           | 15             | 82       |
| 11     | 5           | 0,5            | 94,5     |
| 12     | 3,5         | 12,5           | 84       |

## Comparação do percentual de células de fibrose

Não houve diferença no percentual de células de fibrose entre os três grupos ( $p=0,455$ ) (Tabela 5).

**Tabela 5** - Medidas do percentual de células de fibrose nos grupos A, B e C

|           |               | Grupo |     |      |
|-----------|---------------|-------|-----|------|
|           |               | A     | B   | C    |
| % Fibrose | Média         | 6,5   | 4,7 | 4,0  |
|           | Mediana       | 5,0   | 3,0 | 3,0  |
|           | Desvio padrão | 5,2   | 4,7 | 4,8  |
|           | Mínimo        | 0     | 0,5 | 0    |
|           | Máximo        | 16    | 16  | 16,5 |

p-valor = 0,455

### Comparação do percentual de células de cartilagem

Observou-se diferença estatisticamente significativa das médias do percentual de células de cartilagem entre os diferentes grupos ( $p=0,022$ ) (Tabela 6).

**Tabela 6 - Medidas do percentual de células de cartilagem nos grupos A, B e C**

|              |               | Grupo |      |      |
|--------------|---------------|-------|------|------|
|              |               | A     | B    | C    |
| % Cartilagem | Média         | 19,1  | 15,5 | 10,5 |
|              | Mediana       | 17,0  | 15,0 | 12,3 |
|              | Desvio padrão | 5,6   | 8,6  | 6,9  |
|              | Mínimo        | 14    | 2    | 0    |
|              | Máximo        | 30    | 26   | 19,5 |

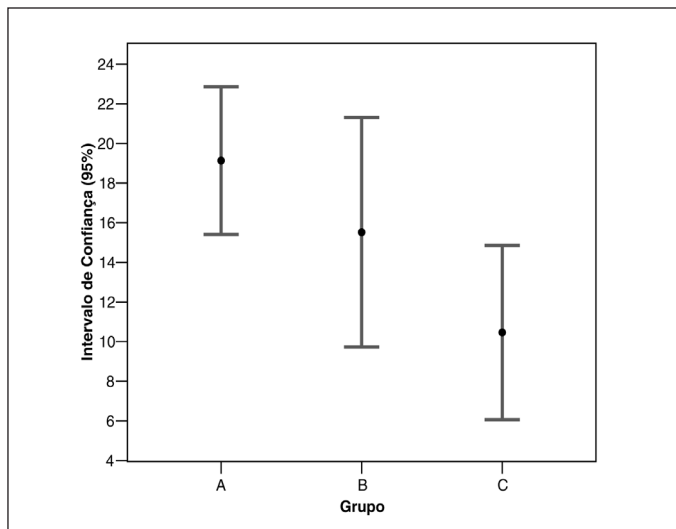
p-valor = 0,022

Na Tabela 7 são apresentadas comparações múltiplas, de grupos dois a dois, para identificar os grupos que apresentaram diferenças entre si. Os resultados revelaram que o grupo A apresentou percentual significativamente ( $p=0,02$ ) maior de células de cartilagem do que o grupo C (controle) (Tabela 7, Figura 11).

**Tabela 7 - Comparações múltiplas entre os grupos de animais A, B e C em relação à presença de células de cartilagem**

| Grupo | Grupo de comparação | Nível descritivo (p-valor) |
|-------|---------------------|----------------------------|
| A     | B                   | 0,730                      |
| A     | C                   | 0,020*                     |
| B     | C                   | 0,299                      |

\* = Significante



**Figura 11 - Percentual médio de células de cartilagem e intervalos de confiança para os diferentes grupos de animais.**

### Comparação do percentual de células ósseas

Observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p=0,02$ ) das médias do percentual de células ósseas entre os diferentes grupos (Tabela 8).

**Tabela 8 - Medidas do percentual de células ósseas nos grupos A, B e C.**

|        |               | Grupo |      |      |
|--------|---------------|-------|------|------|
|        |               | A     | B    | C    |
| % Osso | Média         | 74,4  | 79,8 | 85,6 |
|        | Mediana       | 76,0  | 76,6 | 84,5 |
|        | Desvio padrão | 7,9   | 9,7  | 9,4  |
|        | Mínimo        | 56    | 69   | 70   |
|        | Máximo        | 83    | 97,5 | 100  |

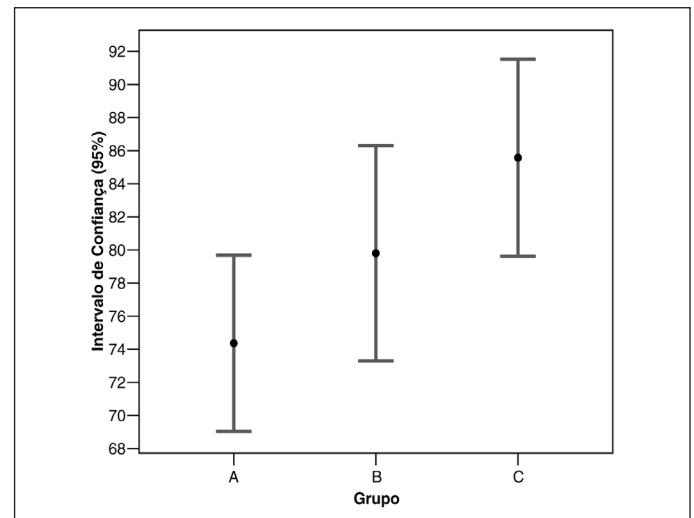
p-valor = 0,02

A tabela 9 mostra as comparações múltiplas dos grupos dois a dois. Os resultados revelaram que os animais do grupo A apresentaram percentual significativamente ( $p=0,017$ ) menor de células ósseas do que os animais do grupo C (controle) (Tabela 9, Figura 12).

**Tabela 9 - Comparações múltiplas entre os grupos de animais A, B e C em relação à presença de células ósseas.**

| Grupo | Grupo de comparação | Nível descritivo (p-valor) |
|-------|---------------------|----------------------------|
| A     | B                   | 0,505                      |
| A     | C                   | 0,017*                     |
| B     | C                   | 0,408                      |

\* = Significante



**Figura 12 - Percentual médio de células ósseas e intervalos de confiança para os diferentes grupos de animais.**

No estudo radiográfico observou-se diferença entre as semanas, independente dos grupos estudados, não se realizando comparação entre os grupos para cada semana, nem comparação entre as semanas para cada grupo, pois não houve efeito de interação ( $p=0,098$ ). Nesse teste não foi constatada diferença entre os grupos, independente da semana ( $p=0,359$ ) (Tabela 10)

**Tabela 10 - Medidas repetidas para dados ordinais para os grupos A, B e C nas semanas 1, 2, 3 e 4.**

|          | resultado | Grupo |       |    |       |    |       |
|----------|-----------|-------|-------|----|-------|----|-------|
|          |           | A     |       | B  |       | C  |       |
|          |           | N     | %     | N  | %     | N  | %     |
| Semana 1 | 0         | 9     | 81,8% | 10 | 90,9% | 10 | 83,3% |
|          | 1         | 2     | 18,2% | 1  | 9,1%  | 2  | 16,7% |
| Semana 2 | 0         |       |       | 2  | 18,2% |    |       |
|          | 1         | 9     | 81,8% | 4  | 36,4% | 5  | 41,7% |
|          | 2         | 2     | 18,2% | 3  | 27,3% | 5  | 41,7% |
|          | 3         |       |       | 2  | 18,2% | 2  | 16,7% |
| Semana 3 | 1         |       |       |    |       | 1  | 8,3%  |
|          | 2         | 5     | 45,5% | 3  | 27,3% | 4  | 33,3% |
|          | 3         | 6     | 55,5% | 4  | 36,4% | 4  | 33,3% |
|          | 4         |       |       | 4  | 36,4% | 3  | 25,0% |
| Semana 4 | 3         | 3     | 27,3% | 2  | 18,2% | 2  | 16,7% |
|          | 4         | 7     | 63,6% | 6  | 54,5% | 6  | 50,0% |
|          | 6         | 1     | 9,1%  | 3  | 27,3% | 4  | 33,3% |

Efeito de interação: p-valor= 0,098

Efeito de grupo (diferença entre os grupos): p-valor= 0,359

Efeito de momento (diferença entre as semanas): p-valor < 0,001

A Tabela 11 mostra os resultados das comparações múltiplas entre as semanas, e nota-se diferença significativa ( $p < 0,001$ ) entre todas as semanas.

**Tabela 11 - Comparações múltiplas entre as semanas.**

| Grupo    | Grupo de comparação | Nível descritivo (p-valor) |
|----------|---------------------|----------------------------|
| semana 1 | semana 2            | < 0,001*                   |
| semana 1 | semana 3            | < 0,001*                   |
| semana 1 | semana 4            | < 0,001*                   |
| semana 2 | semana 3            | < 0,001*                   |
| semana 2 | semana 4            | < 0,001*                   |
| semana 3 | semana 4            | < 0,001*                   |

\* = Significante

## DISCUSSÃO

O estudo da consolidação óssea e dos fatores de crescimento que a influenciam são crescentes na intenção de acelerar a recuperação dos pacientes com fraturas. Autores vêm realizando experimentos na tentativa de isolar substâncias produzidas nos organismos e que estariam relacionadas com a formação óssea.<sup>8-14,22</sup>

Neste experimento foram utilizados três grupos animais: grupo A, submetido à ostectomia e ao estímulo da medula óssea à distância por sua ablação, para avaliar a resposta osteogênica sistêmica após processo de regeneração medular intenso; grupo B, submetido à ostectomia e ao estímulo da medula óssea à distância pela colocação de um fio de Kirschner intramedular, para avaliar a resposta osteogênica sistêmica após processo de regeneração medular menor e grupo C, grupo controle, utilizado para comparação. Nos três grupos realizamos o esvaziamento sanguíneo e garroteamento do membro operado com faixa elástica para reduzir sangramento. O processo de regeneração da medula óssea pode causar a liberação de fatores osteogênicos na circulação<sup>4-8</sup>, porém julgamos não ser suficiente para influenciar na consolidação de falha óssea à distância. O estímulo indireto por sangramento isolado, independente de qualquer trauma esquelético ou da lesão da medula óssea, também pode estar associado com acentuada osteogênese. Mesmo pequena perda sanguínea pode induzir moderada estimulação da eritropoiese e conseqüente ativação da medula óssea.<sup>9,10</sup> Pode-se especular que a hematopoiese compensatória ocorre em resposta ao sangramento e, em certas condições, é mediada por aumentada osteogênese e possíveis atividades das células estromais da medula óssea. Lippiello et al.<sup>9</sup> afirmaram que a perda sanguínea está associada com a liberação de fator circulatório, osteopoiética de acordo com esse autor, que acionaria a diferenciação e proliferação dos componentes celulares estromais

## REFERÊNCIAS

- Rosen V, Scott Thies R. Adult skeletal repair. In: Rosen V, Scott Thies R. The cellular and molecular basis of bone formation and repair. Austin: R.G. Landes Company; 1995. p.97-123. [Serie Molecular Biology Intelligence Unit].
- Lane JM, Betts F, Posner AS, Yue DW. Mineral parameters in early fracture repair. J Bone Joint Surg Am. 1984;66:1289-93.
- Vaughan J. Osteogenesis and haematopoiesis. Lancet. 1981; 2(8238):133-6.
- Tavares FG, Cafalli FAS, Silva MM, Souza LF, Bellote MR, Scarpe RA. Resposta osteogênica por lesão esquelética à distância: estudo experimental em coelho. Rev Bras Ortop. 1994;29:416-20.
- Bab I, Gazit D, Massarawa A, Sela J. Removal of tibial marrow induces increased formation of bone and cartilage in rat mandibular condyle. Calcif Tissue Int. 1985;37:551-5.
- Gazit D, Karmish M, Holzman L, Bab I. Regenerating marrow induces systemic increase in osteo- and chondrogenesis. Endocrinology. 1990;126:2607-13.
- Einhorn TA, Simon G, Devlin VJ, Warman J, Sidhu SPS, Vigorita VJ. The osteogenic response to distant skeletal injury. J Bone Joint Surg Am. 1990;72:1374-78.
- Bab I, Gazit D, Muhirad A, Shteyer A. Regenerating bone marrow produces a potent growth-promoting activity to osteogenic cells. Endocrinology. 1988;123:345-52.
- Lippiello L, Chavda D, Connolly J. Colony-forming efficiency response of bone marrow stromal cells to acute blood loss. J Orthop Res. 1992;10:145-8.
- Lucas TS, Bab IA, Lian JB, Stein GS, Jazrawi L, Majeska RJ et al. Stimulation of systemic bone formation induced by experimental blood loss. Clin Orthop Relat Res. 1997;340:267-75.
- Bab I, Gazit D, Chorev M, Muhirad A, Shteyer A, Greenberg Z et al. Histone H4-related osteogenic growth peptide (OGP): a novel circulating stimulator of osteoblastic activity. EMBO J. 1992;11:1867-73.
- Robinson D, Bab I, Nevo Z. Osteogenic growth peptide regulates proliferation and osteogenic maturation of human and rabbit bone marrow stromal cells. J Bone Miner Res. 1995;10:690-6.

da medula óssea. Lucas et al.<sup>10</sup>, sustentaram que a perda sanguínea apresenta magnitude idêntica ao trauma ósseo medular, no que se refere ao ganho de formação óssea (número de osteoblastos, taxa mineral de aposição, fosfatase alcalina, peptídeo de crescimento e osteocalcina). Que seja do nosso conhecimento, não foram realizados experimentos semelhantes que utilizaram garroteamento do membro operado para minimizar a perda sanguínea. Utilizamos o esvaziamento sanguíneo e garroteamento na raiz do membro operado para homogenizar os grupos e avaliar isoladamente o estímulo da medula óssea à distância, sem a influência da perda sanguínea variável.

Os resultados do presente estudo encontraram maior número de células ósseas no final da consolidação dos animais do grupo C (controle) quando comparado aos demais. Quando foi realizada ostectomia associada com redução do sangramento no ato operatório, o estímulo da medula óssea à distância não gerou resposta osteogênica suficiente para estimular a consolidação da falha óssea, e ainda atrasou a maturação celular do calo ósseo revelada pelo maior número de células cartilaginárias nos animais do grupo A.

No experimento realizado por Gazit et al.<sup>6</sup>, a lesão da medula óssea não apresentou aumento da produção de fatores osteogênicos quando sua regeneração foi inibida pela colocação de silicone. Este aumento só foi verificado nos casos em que ocorria intensa regeneração medular. Verificamos que a colocação do fio de Kirschner à distância do foco da fratura (grupo B), também não gerou resposta osteogênica sistêmica a ponto de interferir no processo de consolidação, pois provavelmente a colocação do fio não solicitou regeneração medular intensa, diferindo dos resultados encontrados na literatura.<sup>4,7</sup> É possível que a redução do sangramento no ato operatório também possa ter influenciado estes resultados.

A diferença dos resultados do presente experimento comparados com os da literatura pode ser explicada pelos seguintes argumentos: a) a existência de poucos estudos com este tipo de experimento; b) número reduzido de experimentos utilizando coelho como animal de experimentação; c) a utilização de diferentes critérios metodológicos em cada estudo; d) a redução do sangramento no ato operatório pela utilização de garrote.

Estudos adicionais necessitam ser realizados para confirmar os achados obtidos no presente experimento, e assim melhor entendimento dos mecanismos sistêmicos que possam influenciar na consolidação de fraturas.

## CONCLUSÃO

Nas condições desse experimento e em função dos resultados obtidos concluiu-se que o estímulo da medula óssea à distância, associado à redução do sangramento intra-operatório, influenciou desfavoravelmente a consolidação de falha óssea em coelhos.

- 1995;10:690-6.
- Bab I, Einhorn TA. Polypeptide factors regulating osteogenesis and bone marrow repair. J Cell Biochem. 1994;55:358-65.
- Brager MA, Patterson MJ, Connolly JF, Nevo Z. Osteogenic growth peptide normally stimulated by blood loss and marrow ablation has local and systemic effects on fracture healing in rats. J Orthop Res. 2000;18:133-9.
- Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Passeri G, Williams DC, Abrams JS et al. Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. Science. 1992;257:88-91.
- Ilizarov GA, Chepelenko TA, Izotova SP, Kochetkov IS. Effect of acute blood loss on stromal regulation of hematopoietic stem cells and reparative bone regeneration. Patol Fiziol Eksp Ter. 1998;5:54-8.
- Wixson SK, White WJ, Highes HC, Lang CM, Marshall WK. The effects of pentobarbital, fentanyl-droperidol, ketamine-xylazine and ketamine-diazepam on core and surface body temperature regulation in adult male rats. Lab Anim Sci. 1987;37:743-9.
- Goss-Sampson MA, Kriss A. Effects of pentobarbital and ketamine-xylazine anaesthesia on somatosensory, brainstem auditory and peripheral sensory-motor responses in the rat. Lab Anim. 1991;25:360-6.
- Lane JM, Sandhu HS. Current approaches to experimental bone grafting. Orthop Clin North Am. 1987;18:213-25.
- Magalhães MN, Lima ACP. Noções de probabilidade e estatística. 2a ed. São Paulo: IIME-USP; 2000.
- Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. Applied linear statistical models. 4th ed. Chicago: Irwin; 1996. [The Irwin Series in Statistics].
- Volpon JB, Xavier CA, Conçalves RP. The use of granulated homologous cortical bone matrix in the correction of diaphyseal bone defect. An experimental study in rabbits. Orthop Trauma Surg. 1982; 99:199-207.