

AVALIAÇÃO DE CENTRIFUGADO OSTEOGÊNICO DE MEDULA ÓSSEA NA CONSOLIDAÇÃO DE FRATURA EM COELHOS

EVALUATION OF CENTRIFUGED OSTEOGENIC BONE MARROW IN FRACTURE CONSOLIDATION IN RABBITS

CARLOS EDUARDO SANCHES VAZ¹, ROBERTO GUARNIERO², PAULO JOSÉ DE SANTANA¹

RESUMO

Objetivo: Avaliar a eficácia de um centrifugado osteogênico de medula óssea em estimular a consolidação de osteotomias da fíbula em coelhos. **Métodos:** Foram utilizados 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 íliaco ipsilateral. A fíbula esquerda foi utilizada como controle, sendo feita a mesma osteotomia, porém neste caso adicionando-se somente a esponja de colágeno absorvível. 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:** A utilização do 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 nem no volume do calo ósseo. **Conclusão:** A administração do centrifugado osteogênico de medula óssea utilizado neste estudo favoreceu a consolidação óssea de osteotomias experimentais em coelhos.

Descritores: Células da medula óssea. Transplante Ósseo. Consolidação da fratura. Osteotomia. Coelhos.

ABSTRACT

Objective: The purpose of this study was to evaluate the efficacy of a centrifuged osteogenic bone marrow aspirate to stimulate healing in rabbit fibular osteotomies. **Methods:** Ten white New Zealand rabbits were used. A transverse medial diaphyseal fibular osteotomy was performed on the right fibula, where an absorbable collagen sponge embedded in osteogenic centrifuged bone marrow aspirate, obtained from the ipsilateral iliac bone, was inserted. The left fibula was used as the control group, where the collagen absorbable sponge was inserted without the osteogenic centrifuged aspirate. The rabbits were sacrificed four weeks after surgery to evaluate bone callus formation. Analyses of results were performed with DEXA bone densitometry to evaluate callus mineral mass, multislice computed tomography to evaluate callus volume and histomorphometry to evaluate the relative rate of tissue formation. **Results:** The employment of centrifuged osteogenic bone-marrow aspirate resulted in a 40.3% increase of callus bone mineral mass and increased relative quantity of bone tissue formation by 9.4%, without a significant increase in the relative quantities of cartilage, fibrous tissue, or in callus volume. **Conclusions:** This study shows that the centrifuged osteogenic bone marrow aspirate was able to improve the healing of experimental fibular osteotomies in rabbits.

Keywords: Bone marrow cells. Bone transplantation. Fracture healing. Osteotomy. Rabbits.

Citação: Vaz CE, Guarniero R, Santana PJ. Avaliação de centrifugado osteogênico de medula óssea na consolidação de fratura em coelhos. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2010;18(6):321-6. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>

Citation: Vaz CE, Guarniero R, Santana PJ. Evaluation of centrifuged osteogenic bone marrow in fracture consolidation in rabbits. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2010;18(6):321-6 Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

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 etárias.¹ 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 fraturas.²

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 pseudoartroses.³

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

1 – Disciplina de Ortopedia e Traumatologia da Universidade Estadual de Londrina

2 – Laboratório de Investigação Médica do Sistema Músculo-esquelético – LIM 41 do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Trabalho realizado no Instituto de Ortopedia e Traumatologia do HC/FMUSP e na Disciplina de Ortopedia e Traumatologia da Universidade Estadual de Londrina
Endereço para correspondência: Rua Borba Gato, 1078 apto 1202, Jardim das Américas, Londrina, Paraná, Brasil. CEP: 86010-630. E-mail: carlos.vaz@sercomtel.com.br

Trabalho recebido em 14/06/07, aprovado em 03/09/07

Acta Ortop Bras. 2010;18(6):321-6

Embora 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

Recentemente técnicas de engenharia tecidual têm apresentando resultados promissores buscando reparar, substituir ou regenerar órgãos e tecidos específicos.^{5,6} No domínio da ortopedia, 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 crescimento estão em desenvolvimento.⁷

Friedenstein et al.^{8,9,10} demonstraram a eficácia do transplante de uma cultura de células precursoras indiferenciadas, obtidas da medula óssea, na neoformação óssea.

No entanto, a cultura e o transplante de células indiferenciadas da medula óssea são procedimentos complexos, dispendiosos e que envolvem uma metodologia restrita a grandes centros de pesquisa.¹¹

Como alternativa, a administração direta de aspirados de medula óssea tem sido pesquisada clínica e experimentalmente, buscando estimular a consolidação de fraturas, tratar pseudartroses e preencher defeitos ósseos adquiridos por trauma ou ressecções ósseas cirúrgicas.¹²⁻¹⁵

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

MÉTODOS

Este estudo foi submetido e aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa Médica da Universidade Estadual de Londrina e Universidade de São Paulo.

Foram utilizados 10 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia Albino, machos, adultos, com peso médio de 3 kg. 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, 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 íliaco ipsilateral. A fíbula esquerda foi utilizada como controle, sendo osteotomizada da mesma maneira, porém apenas a esponja de colágeno foi colocada neste local.

Técnica anestésica

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. Em seguida foi feita 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, logo após a indução anestésica. Uma máscara com fluxo de oxigênio contínuo foi mantida durante todo o procedimento.

Preparo do centrifugado de medula óssea

Cada animal foi submetido a tricotomia da região da crista íliaca 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 íliaca posterior, com

movimentos de rotação delicados, atingindo-se a cavidade medular. 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 foi então 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", 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. Fazem parte destas células os precursores hematopoiéticos e células do estroma da medula óssea, local onde se encontram as células mesenquimais e progenitoras.

O material foi homogeneizado, e uma amostra de 50 microlitros foi separada para a contagem das células e realização de teste de viabilidade celular, com o objetivo de evitar a administração de células mortas que pudessem resultar do processo de centrifugação.

Técnica cirúrgica

O animal permaneceu em decúbito dorsal em mesa operatória apropriada. Foi realizada tricotomia da região lateral do membro pélvico bilateralmente. 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 periosteio. Com o uso de um fio-serra de Gigli, foi realizada uma osteotomia transversa médio-diafisária completa da fíbula. (Figura 1) A seguir, uma amostra de gelatina colágena absorvível (Gelfoam®) de 0,5 cm² foi embebida com o centrifugado osteogênico preparada no laboratório (aproximadamente 0,5 ml), e colocada sobre a região da osteotomia. (Figura 2) A ferida operatória foi fechada por planos com fio de sutura mononylon 4-0, e coberta com curativo estéril impermeável. O mesmo procedimento foi realizado na fíbula esquerda, porém apenas o Gelfoam® foi aplicado no local.

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 anti-inflamatório, contendo as benzilpenicilinas G benzatina e procaína, dihidroestreptomicina 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. Os animais foram sacrificados trinta dias após a data da cirurgia. Realizou-se a anestesia com a aplicação intramuscular, na região proximal do membro pélvico, de uma solução contendo 120 mg/Kg de quetamina a

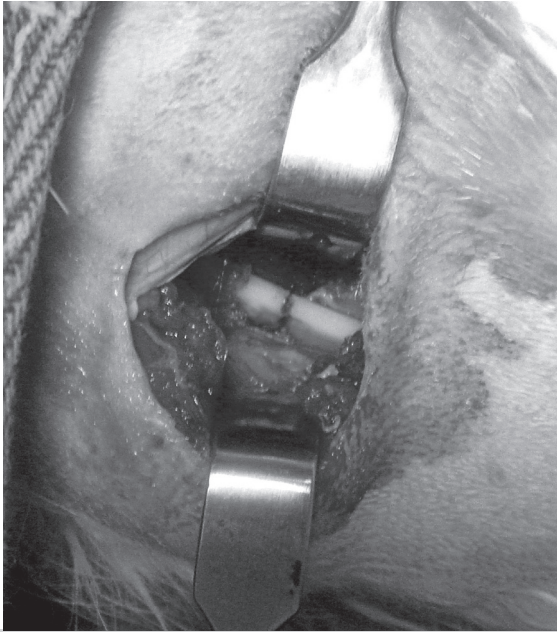


Figura 1 – Imagem da osteotomia médio-diafisária na fibula.

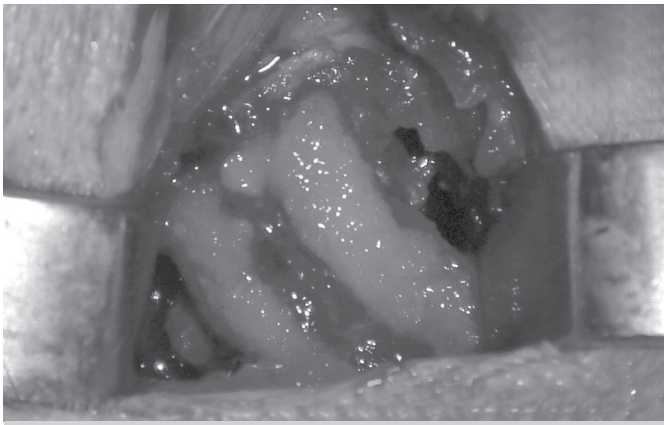


Figura 2 – Imagem da esponja de colágeno embebida no centrifugado osteogênico e aplicada no local da osteotomia da fibula.

10%, associada a 10 mg/Kg de cloridrato de xilazina, seguida da administração intra-cardíaca de solução de cloreto de potássio a 20%. As pernas dos animais foram desarticuladas a nível do joelho e tornozelo, sendo 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 identificadas adequadamente.

Crítérios de avaliação e métodos de mensuração

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

A densidade mineral dos calos ósseos em g/cm² foi medida com densitômetro Lunar DPX-A com software específico para pequenos animais.

O volume do calo ósseo formado foi mensurado com tomografia computadorizada helicoidal multi-slice utilizando-se um tomógrafo multi-slice com oito filas de detectores, modelo light speed ultra (General Electric Medical Systems – Milwaukee, WIS, USA). Realizou-se a

reconstrução tridimensional da peça óssea estudada e, após a seleção da área do calo (Figura 3), foi calculado o seu volume em mm³. Realizou-se a descalcificação das peças e sua inclusão em parafina. Os blocos de parafina contendo as amostras de calo ósseo



Figura 3 – Reconstrução tridimensional comparativa das peças anatômicas dos membros posteriores do coelho.

foram submetidos a cortes histológicos de 3µm de espessura, em sentido coronal, com micrótomo rotatório e corados pela técnica do Tricrômico de Mason. A avaliação qualitativa comparativa dos tecidos formados na área da osteotomia foi realizada com auxílio de Sistema Analisador de Imagem (Kontron Eletronik 300, ZEISS®). Os resultados obtidos em cada campo correspondente à área dos diferentes tecidos analisados (osso, cartilagem e fibrose) foram submetidos a análise estatística.

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 ± erro padrão de média): densidade mineral óssea do calo ósseo, volume do calo ósseo, quantidade relativa de osso, de cartilagem e de fibrose 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 E a prova de Wilcoxon para as amostras relacionadas (pareadas) e não paramétricas.

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.

RESULTADOS

O resultado da contagem das células nucleadas e do teste de viabilidade celular empregados após o processo de centrifugação dos aspirados de medula óssea estão representados na Tabela 1.

A análise comparativa por meio da densitometria óssea revelou uma maior densidade mineral óssea nos calos das osteotomias onde foi administrado o centrifugado osteogênico. (Tabela 2 e Figura 4) Não houve diferença significativa na mensuração volumétrica do calo ósseo. (Tabela 3 e Figura 5) A análise histológica quantitativa dos tecidos formados demonstrou uma porcentagem significativamente maior de tecido ósseo no calo das osteotomias onde foi adicionado o centrifugado osteogênico. (Tabela 4 e Figura 6)

DISCUSSÃO

A demanda cada vez maior por métodos capazes de garantir a consolidação de fraturas, preencher falhas ósseas e curar pseudartroses tem estimulado um significativo número de pesquisas tendo em vista o isolamento e desenvolvimento de suplementos e alternativas ao enxerto ósseo autógeno.¹⁶

Apesar da eficácia demonstrada pela terapia de adição de culturas de células progenitoras mesenquimais de medula óssea, este tratamento ainda representa um grande desafio técnico e logístico, não reprodutível na maioria dos centros de tratamento comuns.¹⁷ Neste âmbito, o emprego do aspirado de medula óssea tem sido utilizado. Esta técnica tem a vantagem de apresentar morbidade bastante inferior à da retirada de enxerto ósseo autógeno, podendo ser adicionado junto a uma matriz osteocondutiva e formando assim um enxerto composto que venha a ser um substituto efetivo àquele. No entanto, o aspirado não fracionado de medula óssea tem apenas um moderado potencial osteogênico. Mesmo em adultos saudáveis, estima-se que aproximadamente uma em 50.000 células nucleadas da medula óssea seja capaz de se diferenciar em um osteoblasto.

Devido a estes fatores buscamos, neste estudo, realizar um processo de centrifugação do aspirado de medula óssea¹⁴, visando

Tabela 2 – Estatística comparativa da densidade mineral óssea dos calos ósseos formados nas osteotomias da fíbula nos coelhos.

COELHO	DENSIDADE MINERAL ÓSSEA DO CALO ÓSSEO ($10^3 \cdot g/cm^2$)	
	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	$t=4,43$	$p=0,002^*$

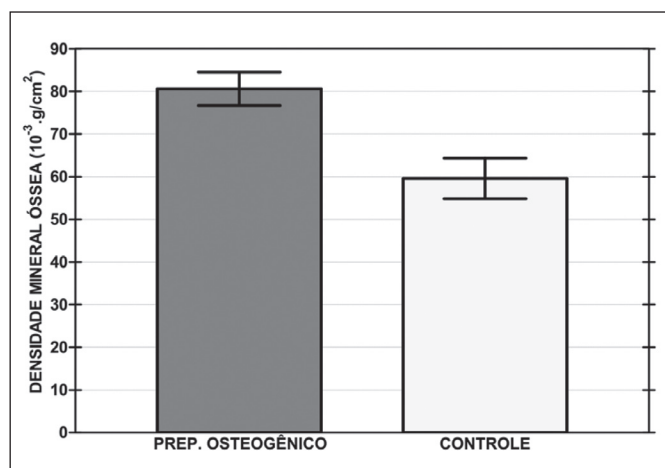


Figura 4 – Comparação da densidade mineral óssea dos calos ósseos formados nas osteotomias da fíbula nos coelhos.

Tabela 1 – Resultados da contagem das células nucleadas e do teste de viabilidade celular do centrifugado de medula óssea.

COELHO	VOLUME DE "BUFFY-COAT" (ml)	CONTAGEM MÉDIA ($10^7 \cdot células/ml$)	CÉLULA NUCLEADA						Viabilidade celular (%)
			Viável			Inviável			
			1ª	2ª	M	1ª	2ª	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: 1ª = Primeira contagem
 2ª = Segunda contagem
 M = Contagem média

Tabela 3 – Estatística comparativa do volume dos calos ósseos formados nas osteotomias da fíbula nos coelhos.

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

Tabela 4 – Estatística comparativa da quantidade relativa de osso(%) nos calos ósseos formados nas osteotomias da fíbula nos coelhos.

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*

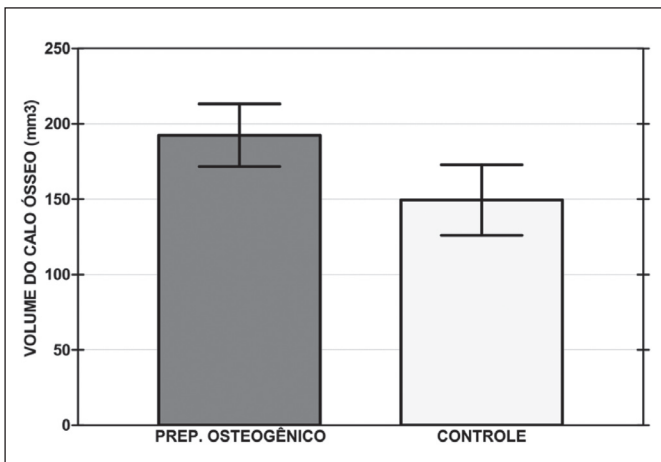


Figura 5 – Comparação do volume dos calos ósseos das fíbulas tratadas com preparado osteogênico e controle.

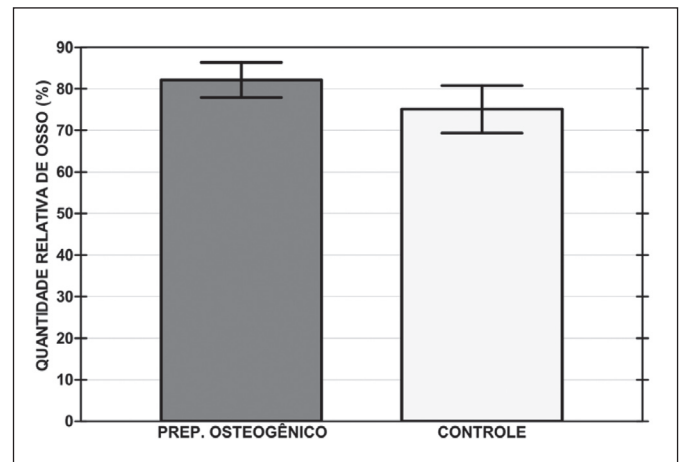


Figura 6 – Quantidade relativa (%) de osso no calo ósseo das fíbulas tratadas com preparado osteogênico e controle.

incrementar a concentração efetiva de células mesenquimais progenitoras. Nossos resultados demonstraram, através da contagem direta das células e realização do teste de viabilidade celular, que conseguimos, em média, triplicar o número de células nucleadas presentes no “buff-coat”, sem causar uma mortalidade significativa dessas células. Connolly et al.^{12,13} 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. Implantando as diferentes preparações osteogênicas obtidas após centrifugação em câmaras de difusão colocadas na cavidade peritoneal de coelhos, comprovaram que a osteogênese no interior das câmaras é diretamente proporcional à concentração celular da solução osteogênica.

Nossos resultados demonstraram que o emprego do centrifugado osteogênico induziu a uma maior densidade mineral óssea nos calos das osteotomias, mas não levou à formação de um calo de maior volume. 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, fato este corroborado pela histomorfometria, que demonstrou uma porcentagem maior de tecido ósseo nestes calos.

Em sua maioria, os estudos experimentais que avaliam consolidação óssea utilizam métodos radiográficos distintos para a mensuração do calo ósseo formado, sem um padronização aceitável.^{14,18,19} 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. Por isso optamos pela tomografia helicoidal multi-slice, que tem a vantagem de permitir uma avaliação tridimensional 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. 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.

Apesar de estudos prévios valorizarem o volume do calo ósseo como fator relacionado à qualidade da consolidação óssea, Boer et al.²⁰ demonstraram que a relação do volume do calo ósseo com suas propriedades mecânicas é 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. Levando-se em conta a densidade do calo isolada, o produto do volume do calo por sua densidade não melhorou 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.

Apesar dos resultados positivos obtidos neste estudo, a amostra utilizada pode ser considerada insuficiente para a transposição dos resultados para a prática clínica. No entanto, isto se deveu as novas determinações dos Comitês de Pesquisa em Experimentação Animal, que enfatizam a necessidade de se utilizar o menor número possível de animais que traga um resultado estatístico aceitável. Embora nossa amostra individual seja pequena (10 coelhos), em realidade, a utilização de ambos os membros posteriores dos animais de forma comparativa funciona como se fossem 2 grupos separados de 10 animais, um "controle" e outro

"tratamento", totalizando-se assim 20 animais.

Outro fator negativo deste estudo foi a falta de análise da resistência biomecânica do calo formado nas osteotomias, fator importante para considerar a qualidade da consolidação óssea.²¹ Esta falha mais uma vez 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.²² 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, e resulta em maior rigidez biomecânica do calo ósseo.

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. 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. Conforme as novas técnicas de reparação óssea continuem a evoluir, novos estudos são necessários para se definir sua eficácia, indicações e sua transposição para a prática clínica diária.

CONCLUSÃO

Neste estudo, a utilização de centrifugado osteogênico de medula óssea favoreceu a consolidação de osteotomias experimentais na fíbula de coelhos, resultando em uma melhora qualitativa do calo ósseo.

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: American Academy of Orthopedic Surgeons; 1992. p.85-91.
3. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1998;(355 Suppl):S7-21.
4. Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma.* 1989;3:192-5.
5. Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. *Science.* 2002;295:1009-14.
6. Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am.* 2004;86:1541-58.
7. Gurevitch O, Kurkalli BG, 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.
8. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol.* 1966;16:381-90.
9. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 1968;6:230-47.
10. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp.* 1988;136:42-60.
11. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284:143-7.
12. Connolly JF. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1995;(313):8-18.
13. Connolly JF. Clinical use of marrow osteoprogenitor cells to stimulate osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res.* 1998;(355 Suppl):S257-66.
14. Paley D, Young MC, Wiley AM, Fornasier VL, Jackson RW. Percutaneous bone marrow grafting of fractures and bony defects. An experimental study in rabbits. *Clin Orthop Relat Res.* 1986;(208):300-12.
15. 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.
16. Simpson KA, Whang PG, Grauer JN. Biological approaches to spine fusion. In: Pietrzak WS. editor. *Musculoskeletal tissue regeneration: biological materials and methods.* Chicago: Humana Press; 2008. p.247-56.
17. 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.
18. Aronson J, Shen XC, Skinner RA, Hogue WR, Badger TM, Lumpkin CK Jr. Rat model of distraction osteogenesis. *J Orthop Res.* 1997;15:221-6.
19. Kossman T, Giebel G, Glombitza A. Rat model for limb lengthening by callus distraction. *Res Exp Med (Berl).* 1993;193:13-20.
20. den Boer FC, Bramer JA, Patka P, Bakker FC, Barentsen RH, Feilzer AJ et al. Quantification of fracture healing with three-dimensional computed tomography. *Arch Orthop Trauma Surg.* 1998;117:345-50.
21. Mosekilde L. Assessing bone quality--animal models in preclinical osteoporosis research. *Bone.* 1995;17(4 Suppl):343S-352S.
22. Blokhuis TJ, den Boer FC, Bramer JA, van Lingén A, Roos JC, Bakker FC et al. Evaluation of strength of healing fractures with dual energy X-ray absorptiometry. *Clin Orthop Relat Res.* 2000;(380):260-8.