

AUTO-ENXERTO PERCUTÂNEO DE MEDULA ÓSSEA. II. REPARAÇÃO DE FALHAS SEGMENTARES PRODUZIDAS NO RÁDIO DE COELHOS¹

PERCUTANEOUS BONE MARROW AUTOGRAFT. II. REPAIR OF SEGMENTAR DEFECTS PRODUCED IN THE RADII RABBIT

Séfora Vieira da Silva Gouvea de Barros² Ricardo Junqueira Del Carlo³ Marlene Isabel Vitoria⁴
Simone Rezende Galvão⁵ Alfredo Maia Filho⁵ Damaris Rizzo Oliveira⁵

RESUMO

Para determinar de que forma a medula óssea, integral e concentrada, enxertada percutaneamente comporta-se no processo de reparação óssea, foram utilizados 16 coelhos, da raça Nova Zelândia Branca, machos, com idade entre cinco e seis meses e peso corpóreo médio de 3,5kg, distribuídos em dois grupos experimentais iguais (grupos I e II). Nos dois grupos, foram realizadas falhas ósseas em ambos os rádios, pela remoção de um segmento osteoperiosteal, de 1cm de comprimento, localizado a 3cm da articulação rádio-carpo-ulnar. A enxertia percutânea foi feita cinco dias após a realização das falhas, sendo que no grupo I, cada animal recebeu 1,0ml de medula óssea integral, em um dos rádios (tratamento), imediatamente após a aspiração na crista ílica. No grupo II, após aspiração e centrifugação de 2,0ml de medula óssea, foi injetado 1,0ml do sedimento em um dos rádios (tratamento). Em ambos os grupos, foi injetado 1,0ml de solução salina fisiológica no rádio contralateral (controle). A avaliação radiográfica, realizada a cada sete dias durante cinco semanas, mostrou que a enxertia percutânea de medula óssea resultou em radiopacidade precoce na região da falha óssea nos dois grupos, quando comparada com o controle. Na fase inicial, foi caracterizada por áreas circunscritas e bem definidas, confirmando a competência osteogênica do enxerto de medula óssea, principalmente a partir da primeira e segunda semanas após a enxertia. Já nos rádios que receberam solução salina, a formação óssea se deu a partir das extremidades em direção ao centro. Histologicamente, os rádios enxertados estavam em um estágio diferente de reparação em relação ao controle, apesar de que às cinco semanas as semelhanças histológicas foram maiores que as diferenças.

Palavras-chave: cirurgia óssea, enxerto ósseo, reparação óssea.

SUMMARY

In order to study the whole and concentrated bone marrow grafted percutaneously in order to repair produced osseous defects, it was used 16 male White New Zealand rabbits, aged between 5 and 6 months, average body weight of 3.5kg, set apart in groups I and II. In both groups it was produced a radial bilateral defects by the removal of an 1-cm osteal-periosteal segment. Percutaneous grafting was performed 5 days after surgery. In group I, each animal received 1.0ml of whole bone marrow in one radius (treatment) immediately after iliac crest aspiration and in group II, after aspiration and centrifuging of 2.0ml of bone marrow, it was administrated 1.0ml of the sediment in one radius (treatment). In both groups it was administered 1.0ml of physiological saline solution in the contralateral radius (control). Radiographic evaluation, performed every 7 days for 5 weeks, showed that percutaneous bone marrow grafting resulted in precocious radiopacity of the region of the osseous defect in both groups when comparing to the control, being characterized by circumscribed and well defined areas in the middle of the defect. Bone formation of the control radii initiated from the extremities in direction to the middle of the defect. Concentration of medullary cells by centrifuging does not negatively interfere in the osteogenic potential of the sample. This osteogenic potential of the bone marrow graft occurs mostly after the first and second weeks post-grafting, which was evidenced by the difference of radiographic images in this period and tendency to uniformity. Microscopically, the grafted radii were in a different repair stage in relation to the control, but at 5 weeks there were more histological similarities than differences.

Key words: bone surgery, bone graft, bone repair

¹Apoio financeiro FAPEMIG.

²Médico Veterinário, Professora Assistente, Centro Superior de Vila Velha, UVV, ES.

³Médico Veterinário, Professor Titular, Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa (UFV), 36.570.000, Viçosa, MG.
E-mail: ricarlo@mail.ufv.br. Autor para correspondência.

⁴Médico Veterinário, Professor Adjunto, UFV.

⁵Médico Veterinário, UFV.

INTRODUÇÃO

Numerosos estudos de enxertia, em sítio aberto, de medula óssea (MO) autógena total em animais de laboratório e aquelas realizadas com aspirados de MO de cães e coelhos demonstraram que ela é um efetivo enxerto osteogênico por si só e em combinação com outros materiais (URIST *et al.*, 1979; TAKAGI & URIST, 1982; SALAMA, 1983; BURWELL, 1985; HEALEY *et al.*, 1990; CONNOLLY *et al.*, 1991).

A osteogenicidade da medula óssea se deve às células osteoprogenitoras do estroma (ASHTON *et al.*, 1980) que, segundo TAKAGI & URIST (1982), são de dois tipos: as que necessitam de um fator indutível (IOPC) antes de determinar atividade osteogênica e as células precursoras ósseas determinadas (DOPC).

CONNOLLY *et al.* (1991) trabalhando com 20 casos de não união de tíbia em humanos, tratados previamente por diversos métodos cirúrgicos, observaram que o auto-enxerto percutâneo de MO substituiu a técnica de enxertia cirúrgica e, quando foi associado a métodos de imobilização, estimulou a cicatrização óssea em 90% dos casos. Já GARG *et al.* (1993) estimularam a cicatrização óssea em 20 casos de não união, previamente tratados por métodos conservadores ou cirúrgicos, realizando duas aplicações com intervalo de 3 semanas, associadas à imobilização externa.

Em paciente humano, a MO, após aspiração, foi injetada por via percutânea em pseudoartrose congênita de tíbia, sendo o procedimento repetido ao final da terceira semana. O membro foi mantido com imobilização externa e, após 5 meses, foi observada união óssea clínica e radiograficamente (GARG & GAUR, 1995).

Em pacientes portadores de sarcomas ósseos e sob quimioterapia com potentes inibidores da reparação de fratura, injeções percutâneas de MO foram eficientes na reparação de não-união (HEALEY *et al.*, 1990). Em osteotomias, o enxerto acelerou a cicatrização óssea, sendo o volume do calo na segunda e terceira semanas, cerca de 50% maior em comparação com o controle (SHARMA *et al.*, 1992).

PALEY *et al.* (1986), trabalhando com medula óssea em osteotomias e ostectomias produzidas em rádio de coelhos, observaram precocidade de cicatrização, quando comparada ao rádio contralateral. O calo ósseo mais precoce e abundante nas primeiras três semanas promoveu estabilidade e reduziu o tempo de cicatrização.

Este trabalho teve por objetivo avaliar a participação da medula óssea no processo de reparação

de falhas osteoperiosteais induzidas no rádio de coelhos, determinando aspectos da formação óssea.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, sendo utilizados 16 coelhos da raça Nova Zelândia Branca, machos, com peso médio de 3,5kg e idade entre cinco e seis meses. O protocolo anestésico consistiu de medicação pré-anestésica com acepromazina^a (0,2mg/kg IV) e anestesia com tiletamina/zolazepam^b (15mg/kg IV). Cada coelho recebeu 40.000UI/kg IM de penicilina benzatina^c, no momento da medicação pré-anestésica. No período pós-operatório, os animais foram alojados em gaiolas individuais onde receberam ração comercial^d e água *ad libitum*.

Os coelhos foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos experimentais, com oito animais cada (grupos I e II). Uma falha óssea foi criada cirurgicamente nos dois rádios de cada animal, em ambos os grupos, pela remoção de um segmento osteoperiosteal em todo o seu diâmetro, com 1,0 cm de comprimento, localizado a três centímetros da articulação rádio-carpo-ulnar. Este procedimento foi realizado por intermédio de serra elétrica circular^e. A estabilização do rádio não foi necessária devido à sinostose com a ulna. As extremidades da falha foram lavadas com solução fisiológica para remover a medula dos fragmentos distal e proximal. Os tecidos muscular e subcutâneo foram aproximados com fio absorvível 3-0^f, e a síntese da pele foi feita com fio inabsorvível 3-0^g.

Cinco dias após a realização das falhas ósseas, todos os coelhos foram novamente anestesiados e preparados para a enxertia. Uma agulha para punção de medula óssea^h foi inserida na crista ilíaca e rotacionada cuidadosamente até a cavidade medular. O seu mandril foi removido, e a medula óssea foi aspirada com o auxílio de uma seringa de 20ml, contendo 150UI de heparinaⁱ.

A amostra obtida foi preparada de duas maneiras: 1) medula integral: imediatamente após a coleta de 1ml, a amostra foi cuidadosamente homogeneizada e, no caso de presença de coágulo, ela foi descartada; 2) medula centrifugada: imediatamente após a coleta de 2ml, a medula foi colocada em um tubo de centrifugação esterilizado e centrifugada a 1500 rotações por minuto (rpm), por 10 minutos, sendo removido o sobrenadante e homogeneizado 1ml do sedimento. As amostras após homogeneizadas, foram enxertadas por intermédio de uma agulha hipodérmica 25 X 7, da seguinte forma: no grupo I,

cada animal recebeu 1,0ml de medula integral, imediatamente após a coleta, em um dos raios (tratamento). No grupo II, cada animal recebeu 1,0ml de medula concentrada em um dos raios (tratamento). Em ambos grupos foi aplicado 1,0ml de solução salina fisiológica no rádio contralateral (controle).

A avaliação radiográfica foi realizada a partir de radiografias obtidas na incidência médio-lateral dos membros operados, realizadas no dia 1 (dia da enxertia) e semanalmente até o sacrifício dos coelhos. O preenchimento da falha óssea foi classificado em ausente, parcial e total e foi dependente da radiopacidade observada na falha óssea. Quaisquer alterações radiográficas foram documentadas.

Todos os coelhos foram sacrificados 35 dias após a enxertia. Neste período, os raios e ulnas foram dissecados, sendo avaliadas a presença ou ausência de preenchimento da falha, bem como a calcificação do tecido mole adjacente.

Foi realizado o exame histológico nos raios dos animais e os fragmentos ósseos avaliados envolveram a área de enxertia e tecido ósseo remanescente proximal e distal, que foram corados por HE. Foram avaliadas a presença e características do tecido que preenchia a falha.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação macroscópica, feita à época do sacrifício, o tipo de tecido que preenchia totalmente a falha, unindo as extremidades do rádio, demonstrava aspecto de osso, sendo similar nos grupos que receberam medula óssea centrifugada ou integral. Nenhum dos animais dos dois grupos experimentais apresentava calcificação do tecido mole adjacente à área de injeção. O tecido que preenchia a falha dos ossos controles demonstrava a mesma aparência, mas em sua maioria esse preenchimento era parcial.

Pela avaliação radiográfica pode-se observar a evolução da reparação das falhas ósseas em ambos os grupos (Figuras 1, 2 e 3). Entretanto, naqueles ossos que receberam enxertia percutânea de medula observou-se radiopacidade precoce, na região da falha, compatível com tecido ósseo, quando comparada com o controle. Essa radiopacidade, principalmente nas radiografias iniciais, primeira semana, foi caracterizada por áreas circunscritas dentro da região da falha

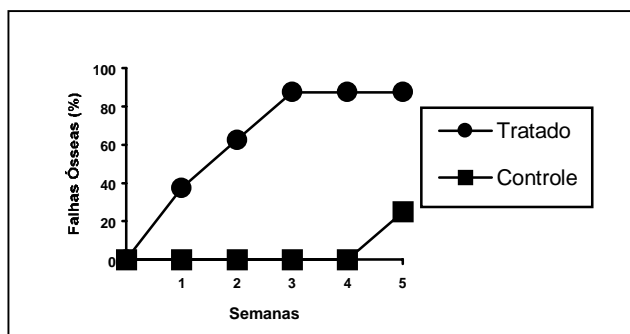


Figura 1 - Distribuição percentual das falhas ósseas com preenchimento total, após avaliação radiográfica, no dia da enxertia (0) e a cada semana nos raios tratado e controle dos coelhos do grupo I.

(Figura 3, b1). Porém, em um animal que recebeu medula centrifugada (grupo II), os pontos de calcificação extravasavam a região da falha e envolviam o tecido mole adjacente. Na quinta semana pós-enxertia, não mais havia essa evidência radiográfica. Já nos raios que receberam solução salina, a formação óssea se deu a partir das bordas da falha em direção ao centro e do periósteo da ulna (figura 3, a).

A formação de novo osso foi vista a partir de uma semana da enxertia, quando 37,5% dos raios tratados com medula óssea integral (grupo I) mostravam preenchimento total da falha, enquanto no grupo controle, esse preenchimento ocorreu a partir da quarta semana (Figura 1). Dos raios que receberam medula óssea concentrada (grupo II), 50% mostravam preenchimento total em uma semana, enquanto no controle nenhuma falha estava totalmente preenchida, neste período (figura 2).

Na quinta semana, a falha óssea estava totalmente preenchida por tecido ósseo em 87,5% dos raios que receberam medula óssea integral, e em 100% dos raios que receberam medula concentrada. Neste período, 25% dos raios controle apre-

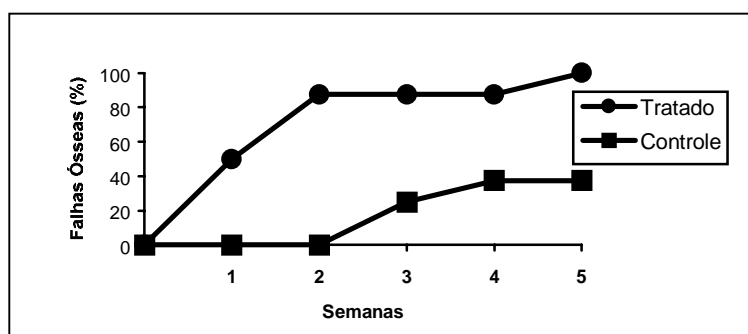


Figura 2 - Distribuição percentual das falhas ósseas com preenchimento total, após avaliação radiográfica, no dia da enxertia (0) e a cada semana, nos raios tratado e controle dos coelhos do grupo II.

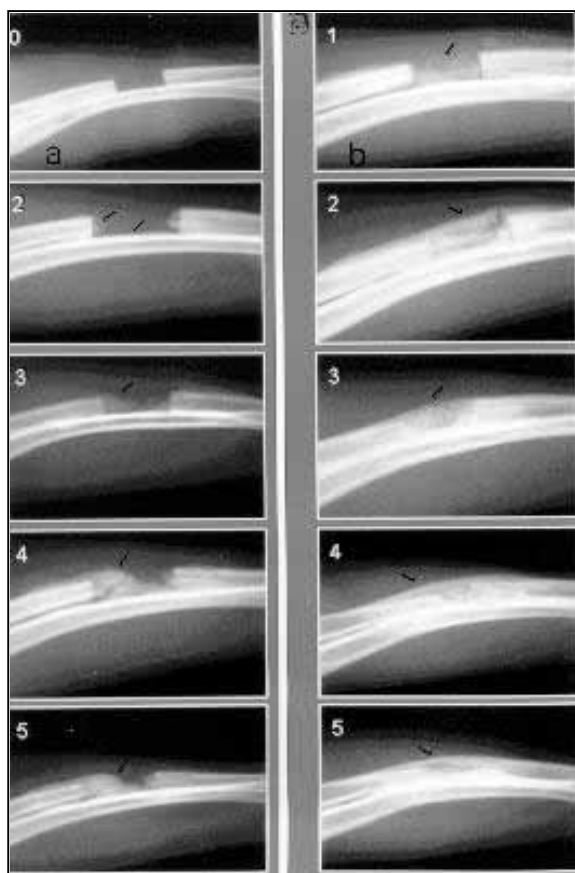


Figura 3 - a: Demonstração radiográfica da evolução do processo de reparação óssea no rádio controle de um animal do grupo I. O número representa o tempo em semanas após receber solução salina. Crescimento ósseo a partir das extremidades da falha, do perióstio da ulna e do perióstio do rádio (a de 2 a 4, setas). Preenchimento incompleto da falha (a5, seta). b: Demonstração radiográfica da evolução do processo de reparação óssea do rádio enxertado com medula óssea concentrada em um animal do Grupo II. O número representa o tempo em semanas desde à enxertia. Crescimento ósseo a partir do interior da falha (b1, seta) e do perióstio do rádio (b2, seta preta). Preenchimento completo da falha (b3, seta); remodelação óssea e definição de canal medular (b4 e b5, setas).

sentavam preenchimento total da falha no grupo I e 37,5% no grupo II (figuras 1 e 2).

A formação de novo osso, evidenciada pela radiopacidade, foi diferente entre os grupos tratado e controle, principalmente a partir da primeira e segunda semanas pós enxertia, sendo que a diferença não foi tão evidente na quarta e quinta semanas. O tipo de osso lamelar (figura 4) que constituiu o calo externo do rádio que recebeu medula óssea (integral ou centrifugada) e do que recebeu solução salina tiveram a mesma aparência microscópica. Já o tecido que constituiu a ponte de



Figura 4 - Corte longitudinal da região de falha óssea, às cinco semanas, em um rádio que recebeu enxertia de medula óssea integral. Perióstio da ulna com osteoblastos e células indiferenciadas (seta); ósteons em formação (círculos). HE, 40X.

ligação ou calo interno entre as extremidades do rádio apresentava, às cinco semanas, osso imaturo que mostravam áreas de basofilia, com corações condróides, mais abundantes em 25% dos rádios controle do grupo I e em 50% dos rádios controle do grupo II, caracterizando evolução mais lenta na formação óssea.

No rádio de coelhos dos grupos controles que não apresentaram reparação óssea às 5 semanas, a falha foi preenchida por tecido fibroblástico, fibras musculares esqueléticas e tecido ósseo imaturo (figura 5).

Os resultados da presente pesquisa suportam o conceito de que a osteogênese é estimulada pelo enxerto percutâneo de medula óssea e que este estímulo está relacionado à presença de células osteoprogenitoras, à semelhança do que foi descrito por URIST *et al.* (1979), TAKAGI & URIST (1982), SALAMA (1983), BURWELL (1985), HEALEY *et al.* (1990) e CONNOLLY *et al.* (1991).

Os dados obtidos demonstraram também a efetividade da aplicação percutânea de medula óssea, da mesma forma como observada em outros tipos de enxerto por CONNOLLY *et al.* (1989). Entretanto, é preciso concordar que esta técnica é uma alternativa dependente de imobilização (WERNITZ *et al.*, 1996), já que o processo de reparação que levou a formação de novo osso nas falhas produzidas seguiu os moldes da consolidação de fraturas.

A aplicação de medula resultou em preenchimento precoce, quando comparado com o controle, sugerindo que este procedimento pode ser utilizado também em situações crônicas para iniciar ou reiniciar o processo de reparação, como no caso de união tardia, não união, mal formação congênita e

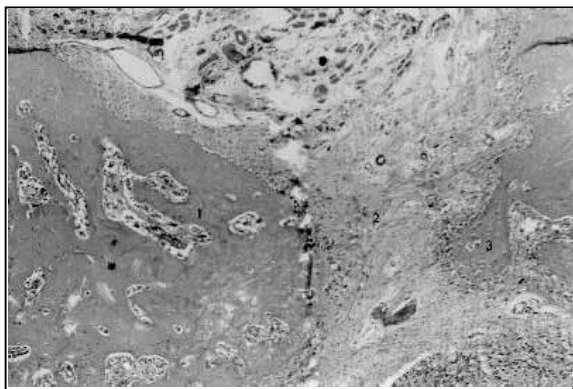


Figura 5 - Corte longitudinal da região de falha óssea, às cinco semanas, em um rádio, que recebeu aplicação de solução salina, e que não apresentou reparação óssea. Extremidade da falha (*); tecido ósseo imaturo (1). Aspecto do tecido de reparação: tecido fibroso e muscular (2); porção de tecido ósseo imaturo no interior da falha (3). HE, 25X.

ressecção de neoplasia, segundo recomendaram PALEY *et al.* (1986), HEALEY *et al.* (1990), GARG *et al.* (1993) e GARG & GAUR (1995).

Os resultados auferidos admitem que a medula possui suficiente capacidade osteogênica para formação óssea. Entretanto, é sabido que essa propriedade pode ter sido influenciada favoravelmente pela presença de fatores de crescimento, liberados durante a resposta inflamatória que, no quinto dia pós-cirúrgico, época da enxertia, permitiu a sobrevivência das células enxertadas. A existência desses fatores foi importante na reparação, como citado por REDDI (1995). Ainda, segundo WERNITZ *et al.* (1996), em situações crônicas, o potencial osteogênico da medula não é dependente de um agente osteoindutor, mas pode ser favorecido pela sua presença.

A avaliação radiográfica demonstrou que um maior número de animais apresentaram formação óssea precoce, nos rádios que receberam a medula centrifugada em relação aos que receberam a medula integral, à semelhança dos resultados obtidos por CONNOLLY *et al.* (1989) que não encontraram diferença significativa, neste aspecto, apesar de que as avaliações bioquímicas e biomecânicas realizadas mostraram melhores resultados para o grupo da medula concentrada. Estes autores concluíram que a falta de diferença estatística foi devido ao pequeno número de animais, à pequena quantidade de medula usada (2ml) ou ao tempo que foi escolhido para a análise (5 semanas). No presente estudo, pode-se afirmar que o volume enxertado foi o ideal, pois preencheu adequadamente a falha produzida. O período de avaliação foi o mesmo do trabalho citado e permitiu avaliar o início, o pico e a estabilização

da resposta ao enxerto de medula óssea (integral e concentrada) bem como o comportamento dos rádios controles. Também GEBHART & LANE (1991) já haviam confirmado que os efeitos osteogênicos da medula são imediatos e se restringem às três semanas subsequentes a enxertia.

A diferença observada na análise radiográfica entre os rádios que receberam medula centrifugada e aqueles que receberam medula integral demonstraram a eficácia da concentração celular, e confirmaram as informações de CONNOLLY *et al.* (1989) de que o estímulo osteogênico está relacionado à presença e concentração de células. Isso corrobora para que o volume do enxerto de MO a ser usado deve ser definido pela anatomia local, permitindo indicar a concentração da medula para injeção percutânea e tratamento de problemas localizados em espaço limitado, como algumas não-uniões e lesões articulares.

Pelas avaliações radiográficas, a formação óssea nos rádios enxertados aconteceu de forma intensa em uma a duas semanas após a enxertia, enquanto nos rádios controle foi mais tardia, em três a quatro semanas. Entretanto, a diferença na quantidade de novo osso não foi tão evidente à quinta semana, confirmando a informação de PALEY *et al.* (1986) de que a formação óssea induzida pela medula óssea é um fenômeno precoce.

Assumindo que a resistência tênsil é proporcional ao tempo de cura (CONNOLLY *et al.*, 1989), a possibilidade de precocidade de preenchimento da falha possibilita sustentação e estabilização ósseas, favorecendo a reparação e com isso diminuindo o tempo total de restabelecimento do paciente.

CONCLUSÕES

Com base nesses achados, pode-se concluir que o processo de reparação óssea em coelhos, induzido pela aplicação de medula óssea via percutânea, é um fenômeno precoce e seus benefícios são verificados com maior intensidade na primeira e segunda semanas após a enxertia. A enxertia de medula óssea em falhas ósseas segmentares de coelhos resulta, principalmente nas primeiras semanas, em formação direta de tecido ósseo.

FONTES DE AQUISIÇÃO

- a. Acepran, 1%, Univet, São Paulo.
- b. Zoletil 50, Virbac, São Paulo.
- c. Penicilina G benzatina, Eurofarma, São Paulo.
- d. Ração Coelhoil "R", Socil, Belo Horizonte.

- e. Regular double cutting (22,22mm X 0,6mm), Dentorium, New York.
f. Catgut cromado, Brasmédica, São Paulo.
g. Náilon cirúrgico, Farma Brasileira, São Paulo.
h. Agulha Komiyashiki, calibre 12.
i. Heparina. 5.000UI/ml, Ariston, São Paulo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASHTON, B.A., ALLEN, T.D., HOWLETT, C.R., *et al.* Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers *in vivo*. **Clin Orthop**, v.151, p.294-307, 1980.
- BURWELL, R.G. The function of bone marrow in the incorporation of a bone graft. **Clin Orthop**, v.200, p.125-141, 1985.
- CONNOLLY, J.F., GUSE, R., LIPPIELLO, L., *et al.* Development of an osteogenic bone-marrow preparation. **J Bone Joint Surg**, v.71A, n.5, p.684-691, 1989.
- CONNOLLY, J.F., GUSE, R., TIEDEMAN, J., *et al.* Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunions. **Clin Orthop**, v.266, p.259-270, 1991.
- GARG, N.K., GAUR, S. Percutaneous autogenous bone-marrow grafting in congenital tibial pseudarthrosis. **J Bone Joint Surg**, v.77B, n.5, p.830-831, 1995.
- GARG, N.K., GAUR, S., SHARMA, S. Percutaneous autogenous bone marrow grafting in 20 cases of ununited fracture. **Acta Orthop Scand**, v.64, n.6, p.671-672, 1993.
- GEBHART, M., LANE, J. A radiographical and biochemical study of demineralized bone matrix implanted into a bone marrow. **Acta Orthop Belg**, v.57, n.2, p.130-143, 1991.
- HEALEY, J.H., ZIMMERMAN, P.A., McDONNELL, J.M., *et al.* Percutaneous bone marrow grafting of delayed union and nonunion in cancer patients. **Clin Orthop**, v.256, p.280-285, 1990.
- PALEY, D., YOUNG, M.C., WILEY, A.M., *et al.* Percutaneous bone marrow grafting of fractures and bony defects. **Clin Orthop**, v.208, p.300-312, 1986.
- REDDI, A.H. Bone morphogenetic proteins, bone marrow stromal cells, and mesenchymal stem cells. **Clin Orthop**, v.313, p.115-119, 1995.
- SALAMA, R. Xenogeneic bone grafting in humans. **Clin Orthop**, v.174, p.113-121, 1983.
- SHARMA, S., GARG, N.K., VELIATH, A.J., *et al.* Percutaneous bone-marrow grafting of osteotomies and bony defects in rabbits. **Acta Orthop Scand**, v.63, n.2, p.166-169, 1992.
- TAKAGI, K., URIST, M.R. The role of bone marrow in bone morphogenetic protein-induced repair of femoral massive diaphyseal defects. **Clin Orthop**, v.171, p.224-231, 1982.
- URIST, M.R., MIKULSKI, A.J., LIETZE, A. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. **Proc Natl Acad Sci**, v.76, p.1828, 1979.
- WERTZ, J.R., LANE, J.M., BURSTEIN, A.H., *et al.* Qualitative and quantitative analysis of orthotopic bone regeneration by marrow. **J Orthop Res**, v.14, n.1, p.85-93, 1996.