



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PROGRAMA DE CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS

RECONSTRUÇÃO DE GRANDES DEFEITOS ÓSSEOS COM  
ENXERTO HOMÓLOGO E CÉLULAS  
OSTEOPROGENITORAS AUTÓLOGAS

Marco Bernardo Cury Fernandes

Orientadores: Maria Eugenia L Duarte e Radovan Borojevic

Outubro / 2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Marco Bernardo Cury Fernandes

RECONSTRUÇÃO DE GRANDES DEFEITOS ÓSSEOS COM  
ENXERTO HOMÓLOGO E CÉLULAS  
OSTEOPROGENITORAS AUTÓLOGAS

Tese apresentada ao Programa de  
Ciências Morfológicas da Universidade  
Federal do Rio de Janeiro como  
requisito para obtenção do grau de  
Doutor.

Orientadores: Maria Eugenia L Duarte e Radovan Borojevic

Outubro / 2007

## **BANCA EXAMINADORA**

### **MEMBROS TITULARES**

Profa. Dra. Maria Angélica Miglino  
Universidade São Paulo

Profa. Dra. Maria Isabel Doria Rossi  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Alex Balduino  
Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia  
Universidade Veiga de Almeida

Profa. Dra. Christina Maeda Takiya  
Revisora e Suplente  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Profa. Dra. Fátima Maria Namen  
Suplente  
Universidade Veiga de Almeida

### **ORIENTADORES**

Profa. Dra. Maria Eugenia Duarte  
Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia e  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Radovan Borojevic  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
Prof. Dr. Vivaldo Moura Neto**

*Dedico esta tese a José Fernandes Neto  
e Sandra Cury Fernandes, meus pais, pelo  
carinho que criaram a mim e meus irmãos e  
pelos sacrifícios feitos por nós.*

## Agradecimentos

A Deus por cada dia de vida que ele me presenteia/concede.

A Profa. Dra. Maria Eugênia Leite Duarte, orientadora e amiga, por me ensinar a transformar as inquietudes do desconhecimento humano em projeto de pesquisa e acima de tudo, fazer isso com honestidade e respeito ao paciente.

Ao Prof. Radovan Borojevic pelo incentivo para o meu ingresso na pós-graduação.

A Profa. Dra. Maria Angélica Miglino quem me abriu as portas do renomado departamento de Anatomia da Faculdade de Medicina Veterinária da USP para que a realização desta tese fosse possível. A produção científica do Brasil é feita por pessoas como ela.

A Priscila Moreno, João Reis e Humberto Martins pessoas extremamente competentes responsáveis pela desafiadora tarefa de manipulação e expansão das células.

A Carlos Eduardo Ambrósio (USP) e Marília Aceto (USP) amigos veterinários que me mostraram o quanto a medicina veterinária é importante para a evolução da medicina humana.

Ao Prof. Edgar de Jesus (COPPE/UFRJ) pela gentileza em permitir a utilização do seu laboratório para irradiação dos enxertos.

Ao Dr. Sérgio Vianna, médico exemplar, que desde o início de minha vida profissional me serviu de exemplo.

A Sergio Côrtes e Verônica Vianna por terem me apresentado à ortopedia e por estarem sempre me incentivando.

A Paulinho e Diogo que com enorme hospitalidade me recebiam em sua casa mesmo sendo para "alugar" sua esposa e mãe, respectivamente, para resolver "problemas da tese".

*Introdução:* O tratamento dos defeitos ósseos segmentares é considerado um grande desafio ortopédico por necessitar de grande quantidade de enxerto autólogo, nem sempre disponível em volumes suficientes e pelo alto índice de morbidade no sítio doador. As células estromais da medula óssea, consideradas precursores mesenquimais, são responsáveis pela manutenção do *turnover* ósseo durante toda a vida. Este estudo teve como objetivo avaliar se células osteoprogenitoras autólogas expandidas *in vitro* e associadas a enxertos ósseos homólogos, tornam o processo de reparo de defeitos diafisários mais rápido e mais eficaz. *Métodos:* Foram realizados defeitos segmentares com 30mm de comprimento, na porção medial da diáfise tibial direita de oito ovelhas adultas. O defeito foi preenchido com um enxerto cortical cilíndrico contendo fragmentos de osso esponjoso celularizado com células osteoprogenitoras autólogas isoladas a partir de aspirado de medula óssea obtido na crista ilíaca das ovelhas (n=4). Os resultados foram comparados com quatro animais controles tratados com enxertos não celularizados. Os enxertos homólogos foram obtidos de animais doadores da mesma raça dos animais receptores. O processo de consolidação foi monitorado mensalmente por radiografias simples e avaliado por tomografia e histologicamente 6, 10, 14 e 18 semanas após o procedimento cirúrgico.

*Resultados:* Em todos os tempos de observação, nos animais tratados com enxertos celularizados, o processo de consolidação ocorreu de forma mais rápida e mais evidente do que nos animais controle. Após 18 semanas, o animal tratado com o enxerto associado com as células apresentou integração completa com o osso hospedeiro. A análise histológica do enxerto evidenciou neste animal a recomposição da medula óssea, com restabelecimento do espaço inter-trabecular, da medula óssea adiposa e hematopoética. *Conclusões:* Nossos resultados comprovaram que células osteoprogenitoras autólogas, quando associadas com enxertos de osso homólogo resultam no reparo mais rápido e de melhor qualidade de defeitos ósseos segmentares. *Relevância clínica:* A associação de células osteoprogenitoras autólogas com enxertos ósseos homólogos pode ser considerada como uma boa alternativa para a enxertia autóloga ou transporte ósseo no tratamento de grandes defeitos ósseos.

Palavras chave: Células osteoprogenitoras. Defeito ósseo segmentar. Enxerto ósseo homólogo. Reparo ósseo. Bioengenharia ortopédica.

*Background:* Repair of large bone defects is a major orthopedic problem since autologous bone grafts are not available in large amounts and harvest is often associated with donor-site morbidity. Bone marrow stromal cells are responsible for the maintenance of bone turnover through life and can be considered a mesenchymal progenitors. The purpose of the current study was to evaluate the ability of cultured autologous osteoprogenitor cells, seeded into bone allografts, elicit a faster and a more effective repair at the site of a critical-sized segmental defect in the sheep tibia. *Methods:* A thirty-millimeter-long segmental bone defect was created in the mid-portion of the right tibial diaphysis of eight adult sheep. The critical-sized bone defect was treated with a cylindrical cortical allograft filled with particulate morselized cancellous bone loaded with cultured autologous osteoprogenitor cells obtained from marrow aspirates harvest from the sheep iliac crest (n=4) and compared with control animals treated with cell-free allograft (n=4). Bone allografts were obtained from donors of the same breed as the receptor sheep. The healing response was monitored monthly by radiographs and by compute tomography and histology at six, ten, fourteen, and eighteen weeks after surgery. *Results:* At all time points, union was established in cell-loaded allografts more rapidly at the interface between the host bone and allograft and the healing process was more conspicuous. Integration of the allograft was complete at 18 weeks in the cell-treated animal. Histological examination revealed that the marrow cavity was reestablished with intertrabecular spaces filled with adipose marrow and focal hematopoiesis. *Conclusions:* Our results demonstrated that autologous osteoprogenitor cells, loaded on bone allograft provide a faster and more effective healing response of a segmental bone defect in the sheep tibia compared to allograft alone. *Clinical Relevance:* The combination of autologous osteoprogenitor cells and bone allografts can be considered as an attractive alternative to the use of autografts or bone transport in the treatment of extensive bone defects. Key Words: Osteoprogenitor cell. Segmental bone defects. Bone allografts. Bone repair. Orthopedic bioengineering.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	<b>8</b>
1.1 O tecido ósseo	8
1.2 Reparo do osso cortical	9
1.3 Transplante ósseo	12
1.4 Enxerto ósseo autólogo	15
1.5 Enxerto ósseo homólogo	18
1.6 Sistema tronco mesenquimal	24
1.7 Bioengenharia ortopédica	28
1.8 Justificativa	31
2. OBJETIVOS	<b>34</b>
2.1 Objetivos gerais	34
2.2 Objetivos específicos	34
3. MATERIAL E MÉTODOS	<b>35</b>
3.1. Modelo experimental	35
3.2. Isolamento e expansão celular	37
3.3. Caracterização fenotípica das células	39
3.4. Obtenção e processamento dos enxertos	40
3.5. Procedimento cirúrgico	42
3.6. Análise radiográfica e tomográfica	47
3.7. Processamento e análise histológica	49
4. RESULTADOS	<b>51</b>
4.1 Recuperação cirúrgica e pós-operatória	51
4.2 Expansão <i>in vitro</i> das células osteoprogenitoras autólogas (COA)	51
4.3 Análise radiográfica	54
4.4 Análise tomográfica	66
4.5 Análise histopatológica	69
5. DISCUSSÃO	<b>107</b>
5.1 Considerações sobre o modelo	107
5.2 Considerações sobre a consolidação radiográfica	115
5.3 Considerações sobre o reparo histológico	118
6. CONCLUSÕES	<b>123</b>
USÕES	
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	<b>126</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 - O TECIDO ÓSSEO

O esqueleto humano é um sistema orgânico que desempenha diversas funções no organismo, como promover a sustentação do aparelho locomotor, a proteção do sistema nervoso central e ainda abrigar as células do sistema hematopoético na região medular. A estrutura óssea que compõe as diversas partes do esqueleto humano é constituído por dois tipos de tecido ósseo: o osso trabecular e o osso compacto. O osso trabecular, também denominado de osso esponjoso, é encontrado próximo das extremidades dos ossos longos, nos corpos vertebrais e no interior dos ossos chatos. Ele é formado por lâminas e canalículos de tecido ósseo que se interconectam formando uma estrutura porosa que mantêm contato direto com as células da medula óssea. O osso compacto, também denominado de osso cortical, é encontrado na diáfise dos ossos longos, nos pedículos vertebrais e na porção mais externa dos ossos planos. Ele consiste de estruturas cilíndricas paralelas intimamente agrupadas. Cada segmento ósseo do esqueleto é constituído por proporções diferentes destes dois tipos

de tecido ósseo. As metáfises dos ossos longos e os ossos chatos (planos) e curtos são constituídos por uma camada externa relativamente fina de osso cortical e uma porção interna de osso esponjoso, enquanto que os segmentos diafisários são constituídos quase que exclusivamente por osso cortical. Esta diferença na distribuição de osso cortical e esponjoso faz com que cada área tenha características biológicas e mecânicas distintas. O osso trabecular tem a função mecânica de absorver e distribuir forças de compressão e a função biológica de abrigar a medula hematopoética. O osso compacto tem a função mecânica de sustentar tanto forças de compressão como de tensão e torção. A função biológica do osso cortical é limitada, uma vez que sua vascularização e atividade celular são pouco expressivas (BUCKWALTER e COOPER, 1987). Assim, quanto maior a quantidade de osso cortical em um segmento ósseo, maior é sua capacidade para resistir à ação de forças externas. Entretanto, em virtude da baixa atividade celular o processo de regeneração e reparo do osso cortical é mais lento do que no osso esponjoso (UHFHOFF e RAHN, 1981; FINNEGAN e UHFHOFF, 1987; SCHATZKEN et al., 1989).

## 1.2 - REPARO DO OSSO CORTICAL

Em virtude das características do osso compacto da cortical, as lesões segmentares diafisárias são de difícil tratamento.

Estas lesões se caracterizam por extensa perda óssea, sendo na maioria das vezes decorrentes de traumas de alta energia associados à importante cominuição ou são secundárias a ressecção de lesões tumorais extensas. As perdas segmentares diafisárias podem também estar presentes em alguns casos de afrouxamento de artroplastias de joelho e quadril, onde há grande osteólise periprotética, comprometendo a região diafisária por continuidade. Como citado anteriormente, sendo as diáfises compostas basicamente por tecido ósseo do tipo compacto, a regeneração de perdas extensas neste segmento ósseo é complexa e os defeitos tendem a consolidar lentamente ou até mesmo não consolidar. Como resultado, o tratamento das lesões diafisárias ainda constitui um problema de difícil solução para a ortopedia moderna (HADDAD et al., 2000; BUSH et al., 2006; BACKSTEIN et al., 2006).

Atualmente existem diversas técnicas descritas para a correção de grandes perdas ósseas diafisárias, embora todas elas ainda apresentem níveis de complicações muito altos. Na prática ortopédica são utilizadas para a reconstrução desses defeitos as endopróteses intercalares, as terapias de alongamento através de osteogênese por calotagem e os transplantes ósseos (SPRINGFIELD, 1992; PIRELA-CRUZ e DeCOSTER, 1994; TOH e JUPITER, 1995; COBOS et al., 2000; ATTIAS et al., 2005).

As endopróteses intercalares constituem uma opção de tratamento descrita para pacientes com baixa demanda. Este

tratamento se caracteriza pela reconstrução do defeito ósseo com material metálico sem a preocupação com a recomposição do tecido ósseo perdido. Apresenta alto índice de complicações em longo prazo, não sendo, por isso, indicadas para pacientes jovens com grande expectativa de vida (UNWIN et al., 1996; WIRGANOWICZ et al., 1999; JESUS-GARCIA, 2006).

Os defeitos ósseos diafisários extensos podem ser tratados através de osteogênese por calotagem ou distração. A osteogênese por calotagem é um processo no qual se induz a formação óssea no foco de uma osteotomia através de distração do fragmento ósseo com a utilização de um aparelho de fixação externa (ILIZAROV e LEDYAEV, 1992; ABDEL-AAL, 2006).

A osteogênese por calotagem foi descrita por ILIZAROV em 1986. Nesta técnica cirúrgica é feita uma osteotomia no segmento de osso saudável, distante da área lesada. Este fragmento intercalar, entre a osteotomia e o defeito ósseo, é transportado longitudinalmente com um fixador externo e à medida que o segmento é tracionado, ocorre formação óssea no trajeto do osso transportado, preenchendo assim o defeito pré-existente. Quando o segmento intercalar alcança a extremidade óssea, todo o defeito estará preenchido. A progressão do transporte do segmento ósseo é de aproximadamente 1mm/dia, sendo necessário aproximadamente 40 dias para que 1cm de defeito ósseo seja preenchido e para que

ocorra a consolidação (ALDEGHERI, 1999). Complicações freqüentes da osteogênese por calotagem incluem infecção no trajeto dos pinos do fixador externo, celulite, perda de alinhamento e do movimento das articulações adjacentes devido ao longo período de tratamento que varia de 9 a 17 meses nos defeitos diafisários maiores do que 6 cm (NAGGER et al., 1993; CIERNY e ZORN, 1994; PROKUSKI e MARSH, 1994; GEORGIADIS e DESILVA, 1995; ABDEL-AAL, 2006). Apesar da alta incidência de complicações e do longo tempo de tratamento, o transporte ósseo ou osteogênese por calotagem é considerado uma boa opção terapêutica, e atualmente é a principal forma de tratamento de grandes defeitos ósseos diafisários (GREEN, 1994; CIERNY e ZORN, 1994; DIPASQUALE et al., 1994; MARSH et al., 1994; FINKEMEIER, 2002).

### 1.3 - TRANSPLANTE ÓSSEO

A terminologia do transplante ósseo é determinada pela existência de vários tipos de enxertos. O enxerto retirado de um local no esqueleto, para outro local, no mesmo indivíduo é denominado enxerto autólogo que pode ser ainda vascularizado ou não vascularizado (CHANG e WEBER, 2005; ROSE et al., 2005). Quando vascularizado, o fragmento ósseo é retirado da área doadora do próprio paciente juntamente com seu pedículo vascular, que é anastomosado na área receptora. Alguns estudos comprovam que a utilização do enxerto autólogo vascularizado leva a resultados

superiores do que os enxertos não vascularizados uma vez que a circulação sanguínea do enxerto não é interrompida, fazendo com que o número de células viáveis no local seja maior e a consolidação óssea mais rápida (WEILAND, 1981; PIRELA-CRUZ e DeCOSTER, 1994; FINKEMEIER, 2002).

O enxerto homólogo é o tecido transferido entre indivíduos da mesma espécie, mas geneticamente diferentes por doação inter-vivo ou *post-mortem* (MAKLEY, 1985; BRIEN et al, 1994; DONATI et al, 2000; MUSCULO et al, 2004; HORNICEK et al, 2001).

O enxerto músculo-esquelético pode ainda ser classificado, de acordo com sua forma de armazenamento, entre fresco ou preservado. O enxerto fresco é aquele transferido para a área doadora logo após sua retirada (enxerto autólogo) ou após um curto período de tempo de armazenamento em meio de cultura. A preservação dos enxertos pode ser feita por congelação ou através liofilização. A congelação pode ser feita a  $-70^{\circ}\text{C}$  sem crioproteção ou criopreservado e congelado em temperaturas muito baixas, próximas de  $-190^{\circ}\text{C}$ . Além destas características, o enxerto músculo-esquelético também é classificado de acordo com suas funções biológicas e mecânicas. Em alguns casos uma função predomina sobre a outra. O enxerto cortical tem funções mecânicas de sustentação, enquanto o enxerto esponjoso autólogo tem ótima função biológica. Na maior parte do tempo as duas funções estão intimamente ligadas. A escolha do enxerto mais adequado deve

levar em consideração as diversas funções dos tecidos transplantados e as características do local onde serão implantados (STEVENSON, 1999).

A capacidade biológica do enxerto é composta pelo somatório de três funções biológicas básicas: osteogênese, osteoindução e osteocondução. A osteogênese é a capacidade que as células vivas, presentes no enxerto, têm de produzir tecido ósseo. A osteogênese proveniente das células viáveis presentes no enxerto é a principal responsável pela formação do calo ósseo nas primeiras 4-8 semanas após a reconstrução cirúrgica do defeito ósseo (FRIEDLAENDER, 1987). O enxerto autólogo, por conter um grande número de células viáveis, possui um alto potencial osteogênico (BONFIGLIO 1958; BASSET, 1972; GRAY e ELVES, 1979). Já o enxerto homólogo, pela ausência de células viáveis após o processamento e armazenamento, não é dotado de osteogênese (FINKEMEIER, 2002).

Osteoindução é a capacidade que o tecido ósseo transplantado tem de ativar o tecido hospedeiro adjacente no recrutamento de células pluripotentes, que se diferenciarão em células osteoprogenitoras. A matriz óssea contém diversas proteínas tais como proteínas morfogênicas, fator de crescimento transformante- $\beta$ , fator de crescimento insulínico I e II, fator de crescimento fibroblástico, fator de crescimento derivado de plaquetas, e interleucinas que induzem a diferenciação e o comprometimento de

células mesenquimais em células osteoprogenitoras (MOHAN e BAYLINK, 1991; KALE e DiCESARE, 1995).

O processo de crescimento tridimensional, no interior do enxerto, de capilares sanguíneos, tecidos perivasculares e de células osteoprogenitoras, a partir do tecido hospedeiro, é possível devido à capacidade de osteocondução do enxerto. Desta forma, quanto melhor a osteocondução do enxerto maior é a sua capacidade de servir como suporte para o crescimento de osso neoformado (BURNELL, 1969). A osteocondução é um processo ordenado que segue um padrão espacial previsível determinado pela estrutura e pelas características biomecânicas do enxerto e das estruturas adjacentes (STEVENSON et al., 1996).

#### 1.4 - ENXERTO ÓSSEO AUTÓLOGO

Os enxertos autólogos são obtidos do próprio paciente, sendo a tíbia, fíbula e a crista ilíaca as principais áreas doadoras. São enxertos considerados biologicamente ideais, pois possuem matriz osteocondutora, proteínas osteoindutoras e células osteogênicas que fazem com que a osteointegração seja rápida e eficaz. Outras vantagens são a sua completa histocompatibilidade e a ausência de possibilidade de infecção cruzada (KHAN et al., 2005).

Entretanto, a enxertia autóloga apresenta importantes limitações. A primeira delas é o fato de haver poucos locais de onde grandes quantidades de osso autólogo possam ser retiradas sem trazer prejuízo à função biomecânica do esqueleto. Invariavelmente, a quantidade de osso disponível em qualquer uma das áreas doadoras é limitada e muitas vezes insuficiente para correção de grandes perdas ósseas. O procedimento de retirada do enxerto autólogo é uma cirurgia adicional ao procedimento principal, que aumenta a morbidade do tratamento por possuir índice de complicação que varia de 8,6% a 20,6% (YOUNGER e CHAPMAN, 1989; SHPITZER et al., 1997; FINKEMEIER, 2002). BABHULKAR et al. (1995) mostraram numa casuística de 104 pacientes que cerca de 60% dos pacientes apresentaram sintomas relacionados com a área doadora.

Como citado anteriormente, existem características particulares a cada tipo de tecido ósseo. O enxerto autólogo esponjoso é composto por osso trabecular e possui pouca capacidade de suportar forças biomecânicas. Enquanto, o enxerto cortical é composto por osso compacto e possui grande capacidade estrutural para suportar forças biomecânicas, sendo este o enxerto indicado para a correção dos defeitos ósseos diafisários (ALHO et al., 1995).

Para a maioria dos procedimentos ortopédicos reconstrutivos, a fíbula é o principal osso doador uma vez que é um osso retilíneo, de dissecção superficial e por possuir um pedículo vascular longo que facilita a anastomose na área receptora. Para enxertia, até dois terços da região proximal da fíbula podem ser retirados, mantendo-se o terço distal para evitar instabilidade da articulação do tornozelo. Apesar das vantagens na utilização do enxerto autólogo, a fibulectomia parcial, seja ela para enxertia vascularizada ou não, é susceptível de um amplo espectro de complicações (VAIL e URBANIAK, 1996; TANG et al, 1998). O procedimento cirúrgico para obtenção do enxerto fibular vascularizado é normalmente longo e tecnicamente complexo, sendo necessário o sacrifício de vasos importantes tanto na área doadora como receptora. Por isso alguns autores limitam sua utilização a pacientes jovens (TAYLOR, 1977). Outro fator complicante em pacientes submetidos à enxertia autóloga com a fíbula é a alta frequência de fratura do enxerto, falta de consolidação e fraqueza muscular no membro doador (GORE et al., 1987).

MINAMI et al. (2000) descreveram os resultados da utilização de enxerto vascularizado de fíbula em 102 pacientes sendo que em 84% a consolidação ocorreu através de um único procedimento cirúrgico. Nesta mesma série de pacientes a ocorrência de fratura do enxerto foi de 15%. O alto risco de fratura já foi também

comprovado em outros estudos, com incidências que variam entre 20% a 40% (DE BOER e WOOD, 1989; MINAMI et al., 1993).

Além disso, como os resultados do enxerto fibular vascularizado são variáveis e pouco previsíveis, muitas vezes os pacientes necessitam ser submetidos a novos procedimentos para se atingir um resultado satisfatório (GOODACRE et al., 1990; MINAMI et al., 1993; BISHOP et al., 1995; CHMELL et al., 1995; JUPITER et al., 1997; KASASHIMA et al., 1998; MINAMI et al., 2000; HEITMANN et al., 2002; ATTIAS et al., 2005).

#### 1.5 - ENXERTO ÓSSEO HOMÓLOGO

Os enxertos ósseos homólogos foram introduzidos no início do século passado para a reconstrução de falhas ósseas provenientes de ressecção de tumores, geralmente em pacientes pouco ativos e com pequena expectativa de vida (LEXER, 1925). Recentemente, a sua utilização se expandiu para o tratamento de perdas ósseas decorrentes de traumas extensos, de anomalias congênitas e, mais freqüentemente, osteólise secundária ao afrouxamento asséptico de componentes de artroplastias (MUSCOLO e AYERZA, 1998).

Atualmente, em cirurgias de reconstrução óssea, onde a quantidade de enxerto autólogo não é suficiente, grandes enxertos homólogos podem ser utilizados como substituto ósseo (DONATI et al., 2000; FINKEMEIER, 2002). A utilização de enxerto ósseo

homólogo para o tratamento de perdas ósseas extensas está cada vez mais difundida no meio ortopédico. Anualmente são realizados nos Estados Unidos mais de 200.000 procedimentos com enxertos de ossos homólogos (TOMFORD e MANKIN, 1999). Este avanço se deve, em grande parte, ao controle rígido das técnicas de processamento e armazenamento de tecidos, que praticamente eliminaram o risco de transmissão de doenças (CROSSETT et al, 2002). Desde 1980, existe o relato de apenas dois casos de transmissão do vírus HIV em pacientes tratados com enxerto ósseo homólogo (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 1988). Além do maior controle das condições de armazenamento e preparo dos enxertos, a adoção de protocolos para investigação sorológica da maior parte das doenças transmissíveis são utilizados na rotina dos bancos de tecidos, que reduziram substancialmente o risco de transmissão de infecções (TOMFORD, 1995).

Ao contrário dos enxertos autólogos, o processo de incorporação de enxertos ósseos homólogos é complexo, depende tanto do hospedeiro como do enxerto e culmina com a remodelação do tecido transplantado em resposta à aplicação de cargas biomecânicas. A velocidade de incorporação deste tipo de enxerto depende do tipo, tamanho, estrutura, forma de fixação, suprimento vascular do hospedeiro e compatibilidade genética com o receptor. Alguns eventos fisiológicos como osteogênese, resposta inflamatória e hemorragia, reabsorção, osteocondução e remodelação regulam a

resposta biológica aos enxertos homólogos (MUSCOLO e AYERZA, 1998).

A incorporação do enxerto ósseo vai além da consolidação das suas extremidades. Ela resulta da substituição gradual do osso transplantado por osso neoformado a partir das células do próprio hospedeiro. O processo de incorporação é inicialmente mediado pela produção local de fatores de crescimento e citocinas, especialmente o fator de crescimento derivado de plaquetas (STEVENSON e HOROWITZ, 1992). Tanto os enxertos autólogos como homólogos, entre a segunda e terceira semanas, produzem uma resposta inflamatória local no hospedeiro. A resposta inflamatória se associa à neoformação fibro-vascular e à reabsorção osteoclástica. Através da ação dos osteoclastos, o osso desvitalizado é progressivamente reabsorvido e gradativamente substituído por osso neoformado (PADGETT et al., 1995). Devido ao potencial osteocondutor do osso homólogo, ocorre simultaneamente brotamento capilar e maior acesso de células osteoprogenitoras do hospedeiro para o enxerto (RODRIGO e PROLO, 1988). O potencial osteocondutor do enxerto ósseo fornece também a superfície adequada para sustentar a vascularização, crescimento e remodelação óssea. Durante o período de incorporação o enxerto homólogo mantém o potencial de osteocondução, mas, por não possuir células capazes de prover osteogenicidade e pelo seu potencial de osteoindução ser mínimo, a

evolução do processo dependerá do microambiente do hospedeiro (DAMIEN e PARSON, 1991; EINHORN, 1995).

Como os enxertos autólogos, os enxertos homólogos também apresentam limitações ao seu uso. As principais causas de complicações e falhas nos procedimentos utilizando enxertos homólogos são infecção, reabsorção, fraturas e falha de consolidação. Os índices de infecção se correlacionam com a magnitude da enxertia e com a eventual associação com esquemas terapêuticos de imunossupressão, sendo particularmente altos (13-14%) em pacientes submetidos a quimioterapia e/ou radioterapia (HERNIGOU et al., 1993; DICK e STRAUCH, 1994).

A reabsorção acelerada do enxerto freqüentemente se associa ou pode ser um fator desencadeante de pseudoartrose (MUSCOLO et al., 1995), fraturas (BERRY et al., 1990), ou infecção (MUSCOLO et al., 1987; LORD et al., 1988; TOMFORD et al., 1990; DICK e STRAUCH, 1994). Os índices de pseudoartrose na interface entre o enxerto e o osso hospedeiro variam de 9 (MANKIN et al., 1983) a 23% (GITELIS e PIASECKI, 1991) com incidência média de 10-15% (ALLAN et al., 1991). As fraturas dos enxertos homólogos geralmente é um evento tardio, ocorrendo em média 24 meses após o procedimento (BERRY et al., 1990). Para alguns autores a fratura do enxerto estaria relacionada com a fragilidade mecânica resultante da reabsorção secundária à rápida formação e atividade

vascular (BERRY et al., 1990; MNAYMNEH et al., 1994). Entretanto THOMPSON et al. (1993) demonstraram, através de observações intra-operatórias, que os focos de fratura de enxertos homólogos estão associados com menor vascularização e necrose isquêmica do osso no local da fratura.

Outro fator que influencia a resposta clínica da reconstrução óssea com enxertos homólogos é o tempo de consolidação e da osteointegração do enxerto. Quanto maior o volume de tecido ósseo a ser reconstituído, maior é a quantidade de enxerto utilizado e conseqüentemente maior será o tempo para osteointegração. Outros fatores que podem influenciar na velocidade de incorporação do enxerto são os tipos de fixação (VANDER GRIEND, 1994), a qualidade do osso homólogo e do osso hospedeiro, presença de infecção e se o enxerto está posicionado num local sujeito a carga e a diferentes tipos de forças biomecânicas (DONATI et al., 2000; HAZAN et al., 2001).

Apesar da resposta em longo prazo da utilização de enxerto homólogo ser favorável, como 25% das reconstruções falham, devido a infecção, fraturas ou não união do enxerto, um grande número de pacientes necessita de uma segunda intervenção cirúrgica (ENNEKING e MINDELL, 1991; ENNEKING e CAMPANACCI, 2001) O processo de união do enxerto com o osso hospedeiro que normalmente é lento, pode se estender ainda mais e ficar restrito a

apenas parte do trajeto da superfície de contato, como demonstrado em estudos realizados até 5 anos após o procedimento (STREET et al., 2000; ENNEKING e CAMPANACCI, 2001).

MANKIN et al. (1996) avaliaram o resultado tardio de 870 casos com utilização de enxerto homólogo no tratamento de tumores ósseos. Os autores constataram índices de 75% de sucesso, 10% de infecção, 19% de fratura do enxerto e 17% de falta de consolidação.

A incidência de complicações ao enxerto homólogo é ainda mais alta quando a perda óssea é localizada na diáfise dos ossos longos. Isto ocorre pelo fato desta região ser submetida a intenso estresse biomecânico e por ser composta por tecido ósseo compacto cuja incorporação e remodelação são extremamente mais lentas quando comparado ao osso esponjoso (ENNEKING, e MINDELL, 1991; VIROLAINEN et al., 1993 e 1995; STEVENSON et al., 1996; ENNEKING e CAMPANACCI, 2001).

Outra constatação que explica o surgimento de complicações em procedimentos cirúrgicos que utilizam grandes enxertos homólogos no tratamento de perdas diafisárias extensas é o fato de células osteoprogenitoras, provenientes do osso hospedeiro, migrar para o enxerto homólogo de forma muito lenta favorecendo o desenvolvimento de microfraturas. Estas, por sua vez, não

permitem que a consolidação ocorra de forma adequada resultando no enfraquecimento gradual do enxerto (STEVENSON et al., 1996; DELLOYE et al., 2002).

#### 1.6 SISTEMA TRONCO MESENQUIMAL

As células-tronco adultas são tipos celulares não especializados, presentes nos tecidos diferenciados e responsáveis pela manutenção e reparo contínuo destes tecidos. As células tronco adultas se caracterizam pelo poder de auto-renovação e pela capacidade de se especializar para produzir todos os tipos celulares do tecido no qual se originou. A sua prole é constituída por novas células-tronco e por progenitores comprometidos, com potencial de diferenciação mais restrito. Estes progenitores, por sua vez, originam os tipos celulares diferenciados (van DER KOOY e WEISS, 2000).

No complexo microambiente da medula óssea pós-natal coabitam dois sistemas de células tronco funcionalmente interdependentes: o sistema hematopoético e o sistema estromal. O sistema hematopoético engloba predominantemente as células-tronco CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> e uma população de progenitores capazes de se diferenciar em todas as células sanguíneas encontradas no organismo adulto (MORRISON et al., 1995). O sistema estromal é formado durante o desenvolvimento da cavidade medular, quase simultaneamente com a colonização pelas células hematopoéticas, e

seu principal componente são as células mesenquimais (CHARBORD et al., 1996). O sistema estromal sustenta tanto estruturalmente como funcionalmente as células hematopoéticas e participa diretamente dos mecanismos que regulam a liberação de fatores de crescimento e de interações célula-célula e célula-matriz extracelular, necessárias para o desenvolvimento dos precursores hematopoéticos (KINCADE et al., 1988; EZOE et al., 2004)

O sistema estromal é formado a partir de um progenitor adulto comum que origina o osso, cartilagem, adipócitos, fibroblastos e o estroma de sustentação da medula hematopoética (BIANCO et al., 2006). Originalmente FRIEDENSTEIN et al. (1976) denominaram estas células de “precursores de mecanócitos” na tentativa de associá-las com funções mecânicas em resposta a ação da gravidade e movimento. A origem dos “mecanócitos” a partir de células estromais da medula óssea e a sua suposta natureza “tronco” gerou a designação dada por OWEN e FRIEDENSTEIN (1988) de “célula-tronco estromal da medula óssea”.

A diferenciação das células mesenquimais pela via considerada canônica, origina os tecidos – cartilagem, osso, adipócitos, tecido fibroso, músculo liso e estroma de sustentação da mielopoiese – tanto do esqueleto em desenvolvimento como no organismo pós-natal (BIANCO et al., 2006). A multipotencialidade dos progenitores mesenquimais é confirmada através dos

resultados de estudos experimentais que demonstraram que, quando implantadas em animais hospedeiros, os progenitores mesenquimais induzem a formação de ossículos ectópicos contendo osteoblastos, células adipocíticas, condrócitos e célula reticular com capacidade de sustentar a hematopoese (FRIEDENSTEIN et al., 1982; PROCKOP, 1997; PITTENGER et al., 1999; LIECHTY et al., 2000; BIANCO et al., 2001).

Os primeiros relatos que permitiram a caracterização das células-tronco e dos progenitores mesenquimais *in vitro* e *in vivo*, decorreram de estudos realizados em suspensão de células de medula óssea de roedores, da qual foram isoladas células com aspecto fibroblastóide que se diferenciavam das demais pela sua capacidade de aderir ao plástico das garrafas e placas de cultura (FRIEDENSTEIN et al., 1966 e 1970; OWEN e FRIEDENSTEIN 1988).

As células mesenquimais possuem alto índice proliferativo *in vitro* e tem a capacidade de originar colônias celulares - CFU-F ou *Colony Forming Units – Fibroblast* - a partir de um único precursor. Entretanto, colônias isoladas de uma mesma medula óssea podem diferir substancialmente em tamanho e morfologia. O tamanho de uma CFU-F é dado pelo índice proliferativo das células que a compõem que, por sua vez, têm características morfológicas e multipotencialidade distintas (MURAGLIA et al., 2000; SATOMURA et al., 2000). Este conjunto de características e, pelo fato das

células que compõem as colônias estarem em diferentes estágios de diferenciação hierarquizada, permite conferir às CFU-F o status de células-tronco (MURAGLIA et al., 2000; DENNIS e CHARBORD, 2002).

Ao contrário de outros tecidos adultos, onde células em diferentes estágios de diferenciação têm características funcionais e fenotípicas definidas, as células-tronco e os progenitores mesenquimais não têm estes padrões totalmente estabelecidos. A expressão de marcadores celulares como STRO-1 e CD146 são uma das poucas formas de identificar as células mesenquimais multipotentes e com potencial de auto-renovação. O SSEA-4 (*stage specific embryonic antigen 4*), um marcador que originalmente se acreditava ser expresso apenas por células-tronco embrionárias humanas, foi recentemente descrito como um possível marcador da população de células-tronco mesenquimais isoladas de aspirados de medula óssea (GANG et al., 2007). Outro aspecto ainda não totalmente esclarecido da cascata de diferenciação das células-tronco mesenquimais é o fato de células em estágio terminal de diferenciação possuírem ampla flexibilidade entre outros fenótipos mesenquimais, conferindo plasticidade ao sistema estromal (BIANCO e ROBNEY, 2000).

## 1.7 BIOENGENHARIA ORTOPÉDICA

O conjunto das características das células mesenquimais pluripotentes, em especial a facilidade com que podem ser isoladas da medula óssea (PITTINGER et al., 1999), a possibilidade de se obter, por expansão *ex-vivo*, um número elevado de células a partir de volumes relativamente pequenos de medula óssea, a sua versatilidade para a diferenciação em tecidos mesenquimais (SESHI et al., 2000), a possibilidade de expansão por um número significativo de vezes sem apresentar sinais de senescência (JIANG et al., 2002) e, ainda, pelo fato de que, em condições normais de cultura, a via osteogênica ser a linhagem *default* desta população celular (BANFI et al., 2002) a tornam uma ferramenta bastante atraente para aplicações em bioengenharia ortopédica.

O potencial biológico das células mesenquimais vem sendo explorado no reparo ou na regeneração de tecidos mesenquimais lesados como na consolidação de fraturas (MOUTSATSOS et al., 2001), lesões tendinosas (AWAD et al., 1999) e cartilaginosas (KADIYALA et al., 1997; QUINTAVALLA et al., 2002). Outra forma de explorar o potencial biológico destas células é através da associação com biomateriais reabsorvíveis de origem sintética ou de origem biológica. Utilizando-se esta estratégia, que constitui a base da bioengenharia, virtualmente qualquer lesão tecidual, mesmo

aquelas consideradas intratáveis, podem ser reparadas (CANCEDDA et al., 2003).

A primeira proposta de tratamento de defeitos segmentares ósseos, utilizando a associação de células tronco mesenquimais com biomateriais sintéticos foi feita por BRUDER et al. (1998) no final da década passada. Neste modelo em cães, os autores demonstraram que a neoformação óssea homogênea através de todo o enxerto acarretou em boa integração do enxerto com o osso hospedeiro, sem ocorrência de complicações relacionadas diretamente com os implantes ou com os componentes celulares.

Outro estudo desenvolvido a seguir (KON et al., 2000) mostrou que em ovelhas, o tratamento de falhas ósseas extensas com biomaterial sintético a base de hidróxiapatita celularizado com células mesenquimais autólogas também resultava, como no estudo de BRUDER et al., (1998), em melhor resposta reparadora. Enquanto que nos implantes não celularizados a neoformação óssea se limitava apenas à superfície externa, nos enxertos celularizados a neoformação óssea estava presente também nos poros internos do composto de hidróxiapatita, resultando principalmente na redução significativa do tempo de reparo do defeito.

Em outro modelo experimental, ARINZEH et al. (2003) propuseram a associação de um substituto sintético com células tronco mesenquimais alogeneicas para tratar falhas ósseas diafisárias em cães. Os resultados do estudo mostraram que, apesar

de nenhum esquema coadjuvante de imunossupressão ter sido utilizado, não houve qualquer resposta imune adversa ao uso das células tronco mesenquimais de origem alogeneica. Outro resultado relevante do estudo foi a observação de que o reparo do defeito ósseo dos animais tratados com implantes celularizados foi mais evidente e mais precoce do que nos animais controle.

Mais recentemente, LUCARELLI et al. (2005) desenvolveram um modelo experimental no qual utilizaram enxerto ósseo homólogo associado com células tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas (PRP) para tratar defeito diafisário no metatarso de ovelhas. Os autores observaram que tanto a neoformação / remodelação ósseas como a invasão vascular do enxerto foi maior nos animais experimentais tratados com enxertos celularizados.

Os resultados positivos destes estudos experimentais estimularam a utilização clínica desta mesma estratégia para tratar perdas ósseas de grande extensão (QUARTO et al., 2001). Quatro pacientes com perdas ósseas diafisárias extensas e alternativas terapêuticas limitadas foram tratados com células mesenquimais autólogas expandidas *in vitro* associadas a um implante sintético de hidróxiapatita do tamanho e da forma do defeito ósseo. Tanto no pós-operatório imediato quanto no tardio não houve relato de queixas tais como dor, aumento de partes moles ou infecção. A fusão completa do implante com o osso hospedeiro ocorreu entre 5-7 meses após a cirurgia. Numa avaliação recente, os autores

(MARCACCI et al., 2007) observaram que cerca de 6-7 anos após o procedimento cirúrgico os implantes mantiveram boa integração com o osso hospedeiro e que nenhum dos quatro pacientes apresentou fratura na região do implante que caracteriza boa durabilidade do procedimento. Embora o procedimento tenha sido realizado num número restrito de pacientes os resultados foram considerados promissores podendo significar um avanço para o tratamento das perdas ósseas segmentares.

Por todas estas razões as células tronco mesenquimais compõem, até o momento, o sistema celular mais interessante e com maior aceitação para ser utilizado tanto em protocolos pré-clínicos como clínicos de tratamento de lesões ósteo-cartilaginosas (DAGA et al., 2002).

## 1.8 JUSTIFICATIVA

Neste modelo experimental foi utilizado um substituto ósseo osteocondutor associado com células osteoprogenitoras autólogas, na tentativa de prover capacidade osteogênica e osteoindutora ao material. O defeito diafisário segmentar na tíbia de ovelhas foi utilizado para avaliar a eficácia biológica e funcional deste substituto. O tipo de perda óssea e a localização diafisária foram escolhidos uma vez as características biomecânicas e biológicas desta localização torna qualquer método de reconstrução desafiador. Atualmente as propostas de tratamento para este tipo

de defeito ósseo envolvem um longo período de tempo e se associam com altos índices de complicações. O método ideal de tratamento para este tipo de lesão deve ser capaz de recompor a estrutura óssea de forma duradoura através de um procedimento cirúrgico simples, com baixos índices de complicações e que não acarrete em longos períodos de incapacidade física e funcional. As terapias baseadas em alongamento ósseo, além de apresentarem diversas complicações necessitam de longo período de tratamento.

Dentre os substitutos ósseos disponíveis atualmente, o enxerto ósseo autólogo é biologicamente ideal, mas é disponível em quantidades limitadas e sua retirada acarreta morbidade à área doadora. O enxerto homólogo possui capacidade osteocondutora semelhante a do enxerto autólogo, mas carece de capacidade biológica de osteoindução e de osteogênese. Devido à ausência destas características, o índice de complicações como fratura, não consolidação e reabsorção é alto.

O modelo experimental desenvolvido neste estudo é pioneiro na avaliação da utilização isolada de células osteoprogenitoras autólogas, obtidas de aspirados de medula óssea e expandidas *ex vivo*, associadas com enxerto ósseo homólogo, para utilização na correção de defeitos segmentares diafisários. A utilização desta combinação tem duas grandes vantagens. O enxerto ósseo homólogo apresenta composição química e porosidade tanto em

tamanho como em volume semelhante a do osso nativo, já que têm a mesma estrutura. Desta forma, o potencial osteocondutor do enxerto homólogo se iguala ao do enxerto autólogo, considerado biologicamente ideal como substituto ósseo. Além disso, a adição de células osteoprogenitoras autólogas a este substituto ósseo provê potencial osteogênico a um tecido acelular, diminuindo o risco de complicações relacionadas ao seu uso isolado. A análise dos resultados deste estudo permitirá avaliar os benefícios, vantagens e desvantagens da aplicação desta associação de tratamento na prática clínica.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 – OBJETIVO GERAL

Este estudo teve como objetivo avaliar se células osteoprogenitoras autólogas, isoladas da medula óssea, quando associadas com enxertos ósseos homólogos, promovem reparo mais eficaz e mais rápido em relação ao enxerto não celularizado. Para testar esta hipótese foram realizados defeitos segmentares na diáfise tibial de ovelhas adultas, utilizando-se na reconstrução dos defeitos os enxertos homólogos irradiados com e sem células.

### 2.2 – Objetivos específicos

- Estabelecer protocolo de isolamento e expansão de células estromais de medula óssea de ovelhas.
- Avaliar o processo de consolidação dos enxertos através de análise radiográfica sistematizada.
- Avaliar por tomografia computadorizada o reparo dos enxertos após 6, 10, 14 e 18 semanas.
- Correlacionar os eventos biológicos relacionados com o reparo dos enxertos e detectados na análise histológica, com o tempo de evolução e com a associação com células osteoprogenitoras.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 – MODELO EXPERIMENTAL

Foram utilizadas no presente estudo oito ovelhas fêmeas adultas, com idade aproximada de dois anos. Antes do início dos experimentos, o projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo tendo sido aprovado (aprovação 317/2003) na íntegra e sem restrições (anexo). Em todos os animais foi realizado cirurgicamente um defeito ósseo na porção medial da diáfise tibial posterior direita. No mesmo tempo cirúrgico, os defeitos foram preenchidos com um enxerto cilíndrico de osso cortical homólogo, contendo internamente fragmentos de osso esponjoso. Em quatro animais foi adicionado ao enxerto ósseo células osteoprogenitoras autólogas (COA), expandidas *in vitro*. Exceto pela celularização do enxerto com as COA, os animais do grupo controle (n=4) foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, isto é, correção do defeito diafisário segmentar com enxerto cilíndrico cortical homólogo preenchido por osso esponjoso. Antes do início dos procedimentos, duas ovelhas da mesma idade e raça dos animais experimentais foram sacrificadas com uma dose letal de tiopentano. Logo após o óbito e em ambiente estéril,

segmentos de osso cortical e de osso esponjoso foram retirados para posterior utilização como enxertos.

Todos os animais foram monitorizados com radiografias no pós-operatório imediato e a seguir mensalmente. Seis, dez, quatorze e dezoito semanas após o procedimento cirúrgico os animais foram sacrificados e, após a remoção do fixador externo, o membro posterior direito foi avaliado por tomografia computadorizada. Após a realização da tomografia e de radiografias simples, a tíbia direita, contendo o enxerto ósseo, foi ressecada e processada subsequentemente para análise histológica. Todos os procedimentos cirúrgicos, radiografias e tomografias foram realizados no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (HOVET/FMVZ-USP) onde os animais permaneceram, sob observação, durante todo o período experimental. Para a estabilização dos enxertos foi utilizada montagem com fixador externo monoplanar bilateral (Baumer, São Paulo, Brasil). Os procedimentos laboratoriais de expansão *ex-vivo* das células, o processamento e a análise histológica do tecido ósseo foram realizados no Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

### 3.2 - ISOLAMENTO E EXPANSÃO CELULAR

Cerca de três semanas antes do procedimento cirúrgico, as ovelhas tratadas com enxertos celularizados foram submetidas à punção da crista ilíaca para a obtenção do aspirado de medula óssea. A aspiração da medula foi realizada com os animais sedados e em ambiente estéril. Após a introdução da agulha (Jamishidi, gauge 15) o aspirado era retirado lentamente, em pequenas porções de 5mL, em seringas de 10mL tratadas com solução de heparina na concentração de 1000 UI/mL (Figura 1).



Figura 1 – Ilustração do procedimento de punção da crista ilíaca esquerda para obtenção do aspirado de medula óssea. Após tricotomia, assepsia e antisepsia e com a ovelha posicionada em decúbito lateral direito, era realizada a punção da crista ilíaca esquerda na porção mais proeminente com agulha do tipo "Jamishid" com 3,5 mm diâmetro. A agulha era reangulada a cada aspiração de 5ml de medula óssea.

As amostras de 5mL foram coletadas em tubos de 50mL até totalizar um volume final de 20-30mL de aspirado de medula. Do momento da obtenção do aspirado, até o momento do processamento no laboratório (em média 12-15 horas), as amostras eram mantidas a 4° C.

Após uma lavagem em Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM), o aspirado era filtrado em malha de nylon com poros de 150µm. Após lise das hemácias com ácido acético a 2% em cristal violeta a 0,01%, as células nucleadas eram quantificadas em câmara de Neubauer. Após a contagem, as células eram ressuspensas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 IU/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As células ( $6 \times 10^7$ ) eram então plaqueadas em garrafas de cultura com 150cm<sup>2</sup> e incubadas em estufa com atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37° C. Vinte e quatro horas após o plaqueamento, as células não aderentes eram descartadas juntamente com o meio de cultura. A partir do 4º dia, até o final do experimento, o meio era trocado a cada 48h. Cerca de 12-19 dias após o plaqueamento, quando as culturas estavam semi-confluentes, as células eram tripsinizadas (0,05% tripsina / 0,01% EDTA), contadas e replaqueadas na densidade inicial ( $6 \times 10^7$ ), em garrafas de 150cm<sup>2</sup>. As culturas foram expandidas até a 2ª passagem, quando a suspensão celular final era obtida (2-3mL em DMEM suplementado com 10% SFB). Até o momento da utilização (máximo de 4-5 horas após a obtenção), a suspensão celular era mantida a 4° C.

No centro cirúrgico, imediatamente antes da utilização, a suspensão celular era homogenizada por meio de delicada agitação mecânica e aspirada em seringas de 5mL. Com o enxerto já posicionado no local do defeito, a suspensão celular era introduzida

entre os fragmentos de osso esponjoso, através das perfurações feitas no osso cortical.

### 3.3 - CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS CÉLULAS

A avaliação da expressão de fosfatase alcalina foi realizada por ensaio colorimétrico medindo-se a liberação de p-nitro fenol após incubação das células em p-nitro fenil-fosfatase (Sigma, St. Louis, MO). Para o ensaio bioquímico foram utilizadas  $5 \times 10^4$  células obtidas de uma alíquota da suspensão celular final de CMA e plaqueadas respectivamente por 7, 14 e 21 dias em placas de 6 poços. Após uma lavagem com PBS, as células eram lisadas com Triton X-100 a 0,5% em Tris-HCl 0,5M (pH 8.0), homogenizadas mecanicamente e centrifugadas por 5 minutos a 4°C (13.000 g). Em placas de 96 poços, era adicionado à alíquotas de 5, 10 e 15 µL do sobrenadante, 200 µL do substrato (Biobrás, São Paulo, SP). A atividade da fosfatase alcalina era então determinada por espectrofotometria (Biorad, Model 450) a partir da quantificação de p-nitro fenol liberado do substrato p-nitro fenil fosfatase (absorbância 405nm) nos tempos 0, 2, 5 e 10 minutos e expressa por minuto/mg de proteína. Os valores da concentração de proteína nas amostras foi obtido por micro dosagem (BCA, Pierce Chemical, Rockford, IL), após correção dos valores numa curva de concentrações conhecidas de albumina bovina (BSA) variando numa faixa de 25-2000 mg/mL.

### 3.4 - OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DOS ENXERTOS

Os enxertos (osso cortical e esponjoso) foram obtidos de duas ovelhas (doadoras) da mesma raça, sexo e idade dos animais experimentais (receptores), sacrificadas antes do início do experimento. As cristas ilíacas e os ossos longos retirados dos quatro membros dos animais doadores foram acondicionados em embalagens plásticas individuais e mantidos a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o momento do processamento e preparo dos enxertos.

Após descongelamento, à temperatura ambiente e em ambiente estéril, as diáfises dos ossos longos dos animais doadores foram seccionadas em segmentos cilíndricos com 3,5cm de comprimento. Após a retirada dos tecidos aderidos, a cavidade medular foi submetida à lavagem e seu diâmetro interno foi padronizado fresando-se em baixa rotação a cavidade medular com uma broca de 8 mm de diâmetro. Após a padronização do diâmetro interno do canal medular, foram realizados orifícios com 3,2mm de diâmetro no enxerto cortical. Em cada enxerto foram feitas em média 14-17 perfurações, procurando-se manter equidistância de 4 mm entre os orifícios (Figura 2).



Figura 2 – Segmento cilíndrico de enxerto homólogo cortical após processamento mecânico e químico seguido de irradiação gama. O diâmetro interno do canal medular foi fresado com broca de 8 mm. Os orifícios correspondem a perfurações com 3,2mm de diâmetro (14-17 por enxerto) realizadas em intervalos equidistantes.

Os enxertos de osso esponjoso foram obtidos de regiões metafisárias dos ossos longos e das cristas íliacas. Com auxílio de pinça goiva os segmentos de osso esponjoso foram cortados em fragmentos com cerca de 1 x0,5cm.

Na primeira etapa do preparo dos enxertos, os cilindros de osso cortical e os fragmentos de osso esponjoso eram lavados exaustivamente com solução salina fisiológica, até não ser mais observada a presença de gotículas de gordura ou hemácias no líquido de lavagem e amostras para exames microbiológicos. Numa segunda etapa, os enxertos permaneciam por 10 minutos imersos em solução de antibióticos (cefalotina a 0,02% em soro fisiológico). A seguir eram acondicionados individualmente em embalagens plásticas e mantidos congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Na última etapa de processamento, os enxertos foram radio esterilizados com dose de 25 Kgray em irradiador modelo Gammacell 220 Excel utilizando unidade  $\text{Co}^{60}$  (MDS Nordion, Ottawa, ON, Canadá)

para verificar a frequência de fratura devido ao enfraquecimento causado por este tipo de esterilização terminal.

Durante o processo de irradiação, as amostras eram mantidas acondicionadas em gelo seco para evitar o descongelamento. A seguir eram novamente mantidas a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o momento do procedimento cirúrgico, quando eram descongeladas em solução fisiológica de NaCl a 0.9% a temperatura ambiente.

### 3.5 - PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Antes do procedimento os animais foram sedados por via intramuscular com 2mg/kg de hidrocloreto de tramadol (Tramal, Pfizer, Karlsruhe, Alemanha) e 0,05mg/kg de acepromazina (Acepran, Univet S.A., São Paulo, Brazil). Vinte minutos após a administração da medicação pré-anestésica, os animais foram anestesiados com 0,6mg/kg de propofol (Diprivan, Biosintética, São Paulo, Brazil) e 0,5mg/kg de diazepam (Valium, Roche Brasil, Rio de Janeiro, Brazil) e mantidos durante toda a cirurgia com intubação endotraqueal e ventilação assistida.

Após tricotomia do membro posterior direito, foi realizado preparo com técnicas de assepsia e antissepsia da área a ser submetida à intervenção cirúrgica. Antes da criação do defeito diafisário, foi realizada montagem monoplanar bilateral com fixador

externo (Baumer, São Paulo, Brazil) utilizando-se três pinos proximais e três pinos distais (Figura 3).



Figura 3 – Montagem monoplanar bilateral com fixador externo posicionado com a ovelha em decúbito dorsal.

Em seguida, através de acesso antero-medial de 4,5cm ao terço médio da diáfise tibial direita e dissecação por planos, um segmento diafisário de 3,5 cm era retirado criando-se assim o defeito ósseo (Figura 4). Enquanto o procedimento cirúrgico era realizado, o enxerto homólogo gradualmente descongelava a temperatura ambiente. Uma vez descongelado, o enxerto ósseo esponjoso era colocado no interior da cavidade medular do enxerto cilíndrico cortical preenchendo por completo esta cavidade (Figura 5).

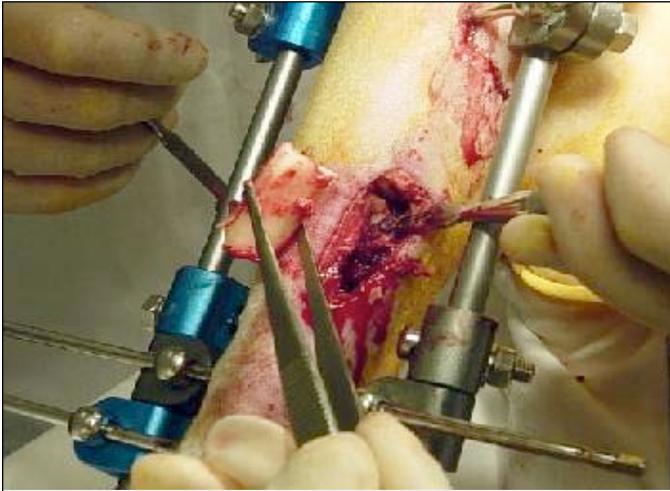


Figura 4 – Criação do defeito segmentar com 3,5 cm no terço médio da diáfise tibial direita, através de acesso de aproximadamente 4,0 cm na face anterior e medial do membro posterior direito da ovelha.

Figura 5 - Preparo do enxerto para ser implantado no defeito diafisário pouco antes do início do procedimento cirúrgico. O tecido esponjoso e cortical foram processados e armazenados em embalagens individuais. A mesma quantidade de osso esponjoso foi colocada delicadamente, por impactação, no interior da cavidade medular de cada cilindro cortical.



O enxerto ósseo assim preparado era colocado no defeito ósseo e submetido à compressão através da montagem com fixador externo (Figura 6).



Figura 6 - Preenchimento do defeito segmentar no 1/3 médio da tíbia direita com o enxerto homólogo, após estabilização com fixador externo. As células foram injetadas através dos orifícios da cortical do enxerto

Com o enxerto posicionado no local do defeito ósseo, a solução contendo as células osteoprogenitoras autólogas (COA) expandidas *ex vivo* era injetada entre os fragmentos de osso esponjoso através dos orifícios do enxerto cortical (Figura 7).

A seguir o periósteo sobre o enxerto era suturado e a incisão cirúrgica fechada por planos com fio de sutura reabsorvível (Figura 8).

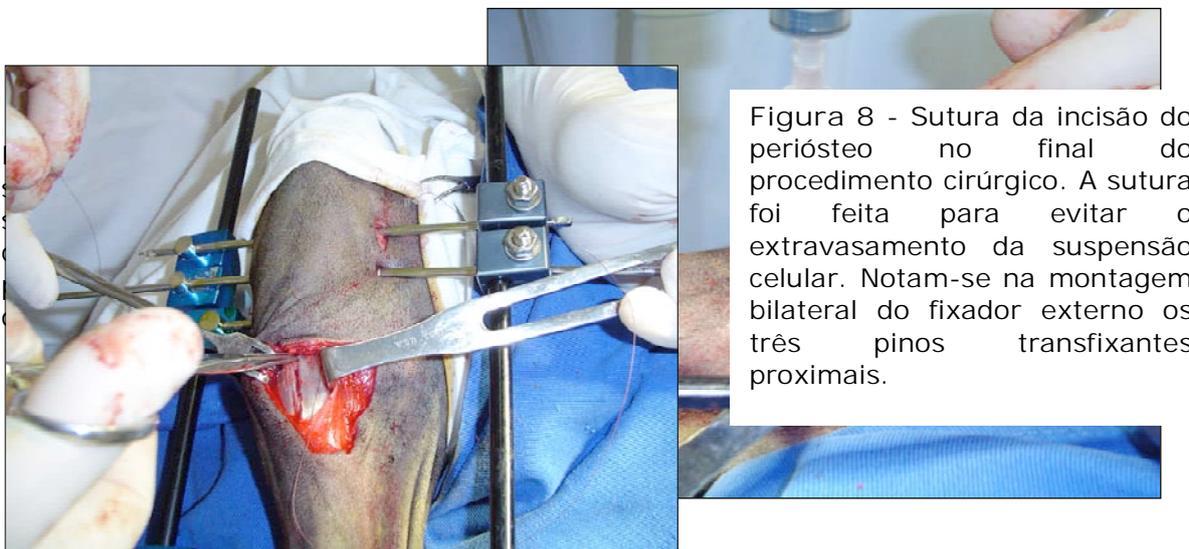


Figura 8 - Sutura da incisão do periósteo no final do procedimento cirúrgico. A sutura foi feita para evitar o extravasamento da suspensão celular. Notam-se na montagem bilateral do fixador externo os três pinos transfixantes proximais.

Excetuando o procedimento de injeção da suspensão de COA, os animais do grupo controle (COA-) foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico dos animais experimentais (COA+).

Os curativos sobre a ferida cirúrgica eram trocados diariamente e, no pós-operatório imediato foi permitido aos animais sustentar carga sobre o membro operado conforme a tolerância individual. Nas primeiras 48 horas e durante a primeira semana, os animais foram medicados respectivamente com anti-inflamatório não-esteróide (Banamine, Schering-Plough Coopers, São Paulo, Brasil) e enrofloxacina (Flotril, Schering-Plough Coopers, São Paulo, Brasil). Após um período de 7-10 dias, no qual foram mantidos em baias individuais, os animais retornaram ao convívio do rebanho e retornaram as suas atividades normais. As ovelhas dos grupos controle e experimental foram

submetidas à eutanásia 6, 10, 14 e 18 semanas após a cirurgia com injeção endovenosa de cloreto de potássio, sob efeito de anestesia geral com pentobarbital de sódio.

### 3.6 - ANÁLISES RADIOGRÁFICA E TOMOGRÁFICA

Todos os animais foram monitorizados radiograficamente através de incidência antero-posterior e perfil imediatamente após a cirurgia e a seguir mensalmente.

A análise radiográfica foi padronizada através da utilização do sistema de pontuação de parâmetros radiográficos descrito por TAIRA et al. (2004) para a quantificação da evolução do processo de consolidação de enxertos ósseos. Nesta classificação são atribuídos pontos aos eventos radiográficos representativos do processo de reparo e consolidação do enxerto tais como intensidade da reação periosteal, da consolidação e aspecto geral do enxerto e da presença de complicações. O quadro I ilustra os critérios utilizados na pontuação dos parâmetros.

Quadro I – Critérios radiográficos para avaliação da consolidação de enxertos ósseos segundo TAIRA et. al, 2004.

	Pontos	
	Anterior	Posterior
<b>A. Reação Periosteal</b>		
Ausente	0	0
Mínima	1	1
Média (<50%)	2	2
Moderada (50-75%)	3	3
Completa (>75%)	4	4
<b>B. União Enxerto-Osso Hospedeiro</b>		
	Proximal	Distal
Linha radiotransparente (total)	0	0
Linha radiotransparente (parcial)	2	2
Ausência de linha radiotransparente	4	4
<b>C. Alterações no Enxerto</b>		
Ausência de reação	0	
Absorção parcial	1	
Remodelação moderada	2	
Remodelação completa	3	
Organização total	4	
<b>D. Complicações (Fratura ou reabsorção do enxerto)</b>		
Pontuação total	0	

A avaliação radiográfica e a pontuação dos parâmetros foi feita em radiografias realizadas no dia da cirurgia, a cada 30 dias e no dia do sacrifício em cada tempo de observação e individualmente em cada animal, sem o conhecimento prévio do grupo que o animal pertencia. Devido ao tamanho da amostra, os valores numéricos relativos à

pontuação dos parâmetros foram representados graficamente, mas não foram submetidos a tratamento estatístico.

Após a retirada *post-mortem* do fixador externo, a região da tíbia contendo o enxerto foi submetida à tomografia computadorizada. O grau de obliteração dos orifícios do osso cortical foi utilizado como medida da neoformação óssea nesta região do enxerto. Este parâmetro foi estimado considerando-se o percentual global de orifícios obliterados por osso neoformado, em três cortes tomográficos realizados nos planos proximal, medial e distal respectivamente. Por problemas técnicos, a análise tomográfica não foi realizada em um dos animais (COA 18-).

### 3.7 - PROCESSAMENTO E ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS ENXERTOS

As tíbias contendo o enxerto e as interfaces com o osso hospedeiro foram excisadas e, após a remoção das partes moles circunjacentes, o segmento ósseo foi seccionado longitudinalmente no plano frontal, preservando-se a relação anatômica entre o enxerto e o osso hospedeiro da região das osteotomias. A partir de uma amostra com 2mm de espessura, compreendendo toda a extensão da peça cirúrgica, foram obtidos fragmentos com 1,5x2,0cm das porções centrais e periféricas do enxerto e das regiões correspondentes as osteotomias. Após fixação em álcool a 70% a 4<sup>o</sup> C por 48 horas os fragmentos ósseos foram desidratados em concentrações ascendentes de álcool, desidratados em

xilol, infiltrados e incluídos em solução de metil metacrilato e dibutil-ftalato (3: 1) com peróxido de benzoíla a 1% e 2.5% respectivamente.

Os cortes histológicos foram obtidos com 5 micra de espessura em micrótomo ultra pesado RM 2155 (Leica, Nussloch, Alemanha) utilizando-se navalhas descartáveis de tungstênio. Cerca de 15-20 amostras de cada animal foram coradas pelas técnicas do Tricrômico de Goldner e PAS/Alcian Blue modificadas para tecidos rígidos incluídos em resina. A análise histológica teve como objetivo avaliar a biologia e cronologia do processo de reparo dos enxertos e sua correlação com os achados radiográficos e tomográficos. Para tal, foi feita uma análise sistematizada dos achados histológicos em três regiões do enxerto:

1. Superfícies de contato com o osso hospedeiro – características e composição do tecido que constitui o preenchimento das regiões proximal e distal, entre o enxerto e o osso hospedeiro;
2. Osso cortical – características da reação periosteal e do revestimento / calo cortico-endosteal, composição do tecido do preenchimento dos orifícios.
3. Espaço medular – características e composição do tecido do preenchimento medular.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 – RECUPERAÇÃO CIRÚRGICA E PÓS-OPERATÓRIA

Todos os animais apresentaram boa recuperação pós-operatória e, embora tenham apresentado algum grau de claudicação, deambularam normalmente logo após o procedimento. Um animal apresentou parada cardio-respiratória durante a cirurgia, foi recuperado com manobras de ressuscitação e evoluiu sem complicações no pós-operatório. Após uma semana, quando foram reintegrados ao rebanho, os animais apresentavam-se ativos, aparentemente sem demonstrar limitação das suas atividades habituais. As feridas cirúrgicas cicatrizaram sem infecção, exceto em um animal que apresentou secreção no trajeto de dois pinos do fixador externo. Este animal respondeu ao tratamento diário, por uma semana, com antibióticos e assepsia no local do orifício do pino.

Apesar dos exames microbiológicos não evidenciarem contaminação dos enxertos, todos os implantes foram irradiados não apresentando fratura em decorrência deste tipo de esterilização terminal.

### 4.2 - EXPANSÃO IN VITRO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS AUTÓLOGAS (COA)

O volume do aspirado de medula óssea, o tempo de expansão das culturas, o número inicial e final de células e o volume de suspensão celular adicionada ao enxerto ósseo está discriminado na Tabela 1.

Tabela 1 – Características da suspensão celular adicionada aos enxertos ósseos.

	COA 6+	COA 10+	COA 14+	COA 18+
<i>Aspirado de medula óssea (mL)</i>	20	30	35	25
<i>Nº de células isoladas</i>	$1.4 \times 10^8$	$2.25 \times 10^8$	$2.6 \times 10^8$	$5 \times 10^7$
<i>Tempo de expansão (dias)</i>	27	23	21	27
<i>Nº de células/mL de solução</i>	$7 \times 10^6$	$7.5 \times 10^6$	$3.3 \times 10^7$	$10^7$
<i>Volume injetado (mL)</i>	2	3	2.8	2
<i>Viabilidade celular (%)</i>	>95%	>95%	>95%	>95%

Animais sacrificados após 6 (COA 6+), 10 (COA 10+), 14 (COA 14+) e 18 (COA 18+) semanas respectivamente.

Todos os aspirados de medula foram obtidos em amostras de 5mL, totalizando de 20-35mL. Nos animais COA 10+ e 14+ as células foram obtidas na primeira passagem e, nos animais COA 6+ e 18+, na segunda passagem. Em todas as culturas e, independente do tempo de expansão, as células apresentavam morfologia fusiforme, característica de células miofibroblásticas (Figura 9). Em nenhuma das culturas foi observado o crescimento de outros tipos celulares, além das células mesenquimais.

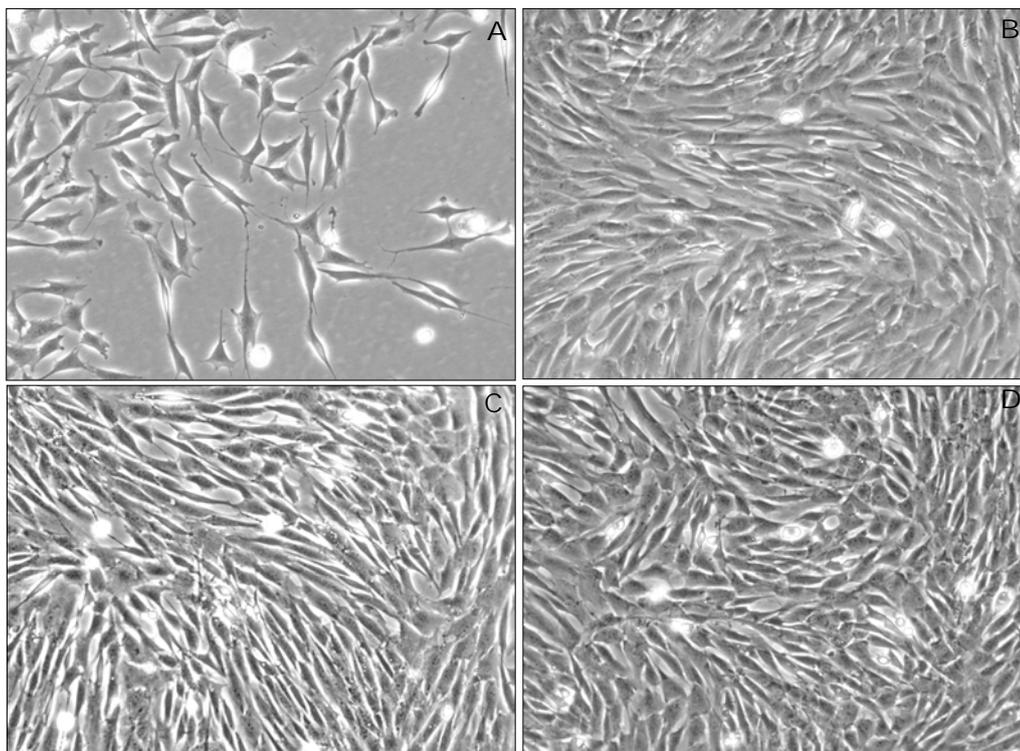


Figura 9 - Aspecto da expansão ex-vivo das COA em diferentes tempos de cultura. (A) Células em estado de semi-confluência, exibindo aspecto fusiforme, alongado confirmando o fenótipo mesenquimal das células (Passagem 0). (B) – Células confluentes, antes da 1ª tripsinização. Observar o aspecto de “vales e montanhas” (*hills and valleys*), característico de miofibroblastos (Passagem 0). (C) – Aspecto da expansão celular na passagem 1, no dia do procedimento de celularização dos enxertos. Observar que as células mantiveram o mesmo aspecto morfológico das células expandidas na cultura primária. (D) – Aspecto da expansão celular na passagem 2, no dia do procedimento de celularização dos enxertos. Observar que as células mantiveram o mesmo aspecto morfológico das células expandidas na cultura primária e na primeira passagem. Aumento 20x.

Os ensaios bioquímicos para detecção da atividade da fosfatase alcalina (ALP) nas células que foram injetadas na lesão, foram realizados repetidas vezes, em diferentes amostras nos dois tempos de expansão. Em todas as medições os valores de leitura foram negativos, permanecendo sempre abaixo dos níveis de detecção pelo aparelho.

#### 4.3 – ANÁLISE RADIOGRÁFICA

A evolução radiográfica do processo de consolidação dos enxertos nos animais COA 6+ e COA 6- está ilustrada na Figura 10. Em ambas as ovelhas, imediatamente após o procedimento cirúrgico, os enxertos encontravam-se alinhados com os fragmentos distal e proximal. A *gap*, representada pelo espaço entre os enxertos e o osso hospedeiro, nos dois animais tinha menos de 2 mm tanto no foco proximal como no foco distal (Figs. 10 A e 10D).

Após 4 semanas, as linhas de radiotransparência, correspondentes às osteotomias proximal e distal, por estarem parcialmente preenchidas por osso neoformado, eram menos nítidas no animal COA 6+ (Fig. 10B) mas permaneceram evidentes no animal COA 6- (Fig. 10E). No animal COA 6+ a neoformação óssea relacionada com o enxerto era marcante tanto nos focos das osteotomias como em toda extensão da cortical lateral (Fig. 10B). A formação óssea nesta região do enxerto era significativamente maior do que no animal COA 6-.

Após 6 semanas, ambos os enxertos mantiveram o alinhamento com o eixo longitudinal da tíbia e o contato das extremidades proximais e distais com mais de 50% das superfícies do osso hospedeiro. A formação óssea relacionada com o enxerto celularizado era maior e o processo de consolidação encontrava-se num estágio mais adiantado (Fig. 10C) do que no animal tratado com o enxerto não celularizado (Fig. 10F).

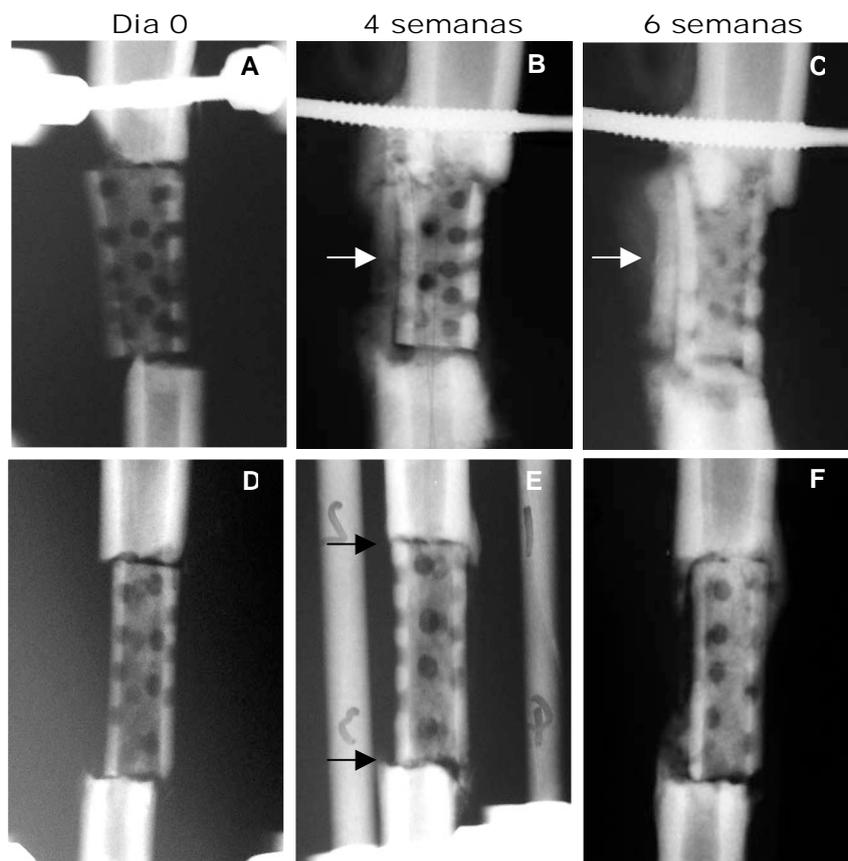


Figura 10 - Radiografias comparativas entre as ovelhas COA 6+ (A-C) e COA 6- (D-F). As figuras A e D ilustram o defeito ósseo preenchido pelo enxerto homólogo, imediatamente após a cirurgia. Os enxertos encontram-se alinhados com os fragmentos proximais e distais da tibia em ambos os animais. Após 4 semanas, na ovelha COA 6+ (B), nota-se perda do detalhe da linha de osteotomia tanto no foco proximal como distal. A neoformação óssea ao redor do enxerto, tanto nas osteotomias como em toda a extensão da cortical lateral é exuberante (seta). Na ovelha COA 6- (E), além dos focos de osteotomia permanecem visíveis após 4 semanas (setas), a neoformação óssea relacionada com o enxerto é significativamente menor do que no animal COA 6+. Ao final da sexta semana, a formação óssea relacionada com o enxerto celularizado é maior e o processo de consolidação está num estágio mais avançado (C) do que no animal tratado com o enxerto não celularizado (F). Ambos os enxertos mantiveram o alinhamento com o eixo longitudinal da tibia.

A pontuação dos parâmetros radiográficos dos dois animais sacrificados nos tempos 0, quatro e seis semanas após o procedimento cirúrgico, está ilustrada na Figura 11.

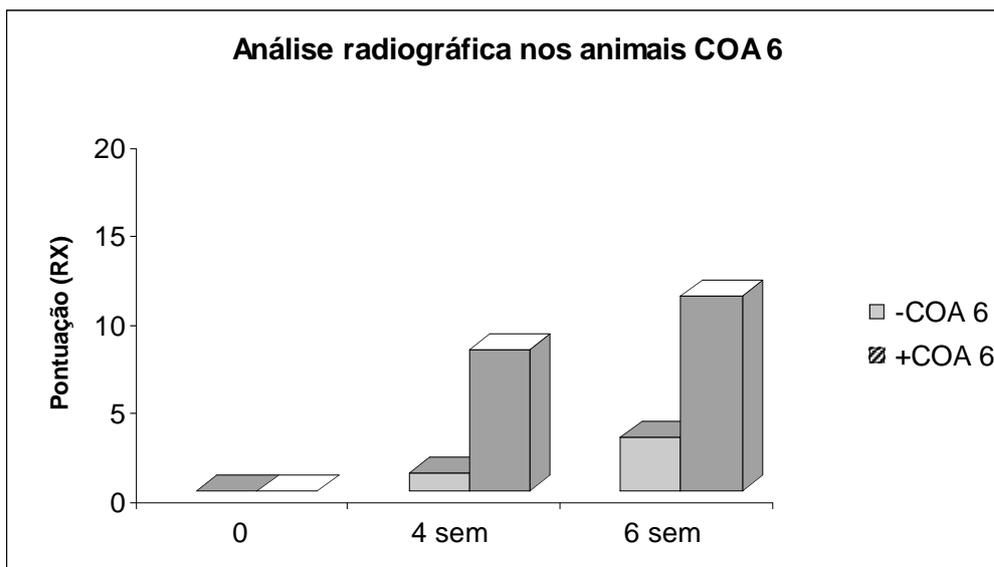


Figura 11 – Representação gráfica da pontuação obtida para os parâmetros radiográficos nos animais COA 6 nos pontos de avaliação 0, 4, 6 semanas (sem).

Nas avaliações realizadas com quatro e seis semanas, a reação periosteal mais exuberante, principalmente em relação com a cortical lateral, a redução da linha de osteotomia proximal indicando o início do processo de união com o osso hospedeiro e a absorção parcial do enxerto conferiu maior pontuação ao animal COA 6+.

A evolução radiográfica do processo de consolidação dos enxertos nos animais COA 10+ e COA 10- está ilustrada na Figura 12. Em ambas as ovelhas, imediatamente após o procedimento cirúrgico, os enxertos encontravam-se alinhados com os fragmentos distal e proximal, com a *gap* entre os dois focos de osteotomia, medindo menos de 2mm de espessura (Figs. 12 A e 12E).

Após 4 semanas, apesar da neoformação óssea ser mais evidente na ovelha tratada com enxerto celularizado (Fig. 12B), a perda do

detalhe da linha de osteotomia nos focos proximal e distal era igualmente observada nos dois animais (Figs. 12B e 12F).

Dois meses decorridos da cirurgia, no animal COA 10+ (Fig. 12C) além de ter ocorrido formação de ponte óssea transpassando o foco de osteotomia em ambas as extremidades, o enxerto encontrava-se completamente recoberto por osso neoformado em toda extensão da face lateral. A linha de osteotomia estava praticamente imperceptível em grande parte das junções do enxerto com o osso hospedeiro, configurando consolidação óssea nesta incidência radiográfica. As perfurações da cortical do enxerto estavam parcialmente preenchidas por osso neoformado, restando poucos orifícios não ocluídos. No mesmo período, na ovelha COA 10- (Fig. 12G), os orifícios na cortical do enxerto permaneceram patentes e a formação óssea ao redor do enxerto, apesar de presente nos focos de osteotomia, era pouco expressiva e o calo ósseo não formava ponte óssea entre o enxerto e o osso hospedeiro. A linha radiotransparente permaneceu visível em ambos os focos de osteotomia.

Ao final do período experimental, apesar dos enxertos estarem consolidados nos dois animais, na ovelha COA 10+ (Fig. 12D) os orifícios do osso cortical e os focos de osteotomia não eram mais identificáveis por estarem completamente preenchidos por osso neoformado e encobertos pelo calo ósseo. Na ovelha COA 10- (Fig. 12H) tanto os orifícios da cortical como as linhas de osteotomia ainda eram visíveis.

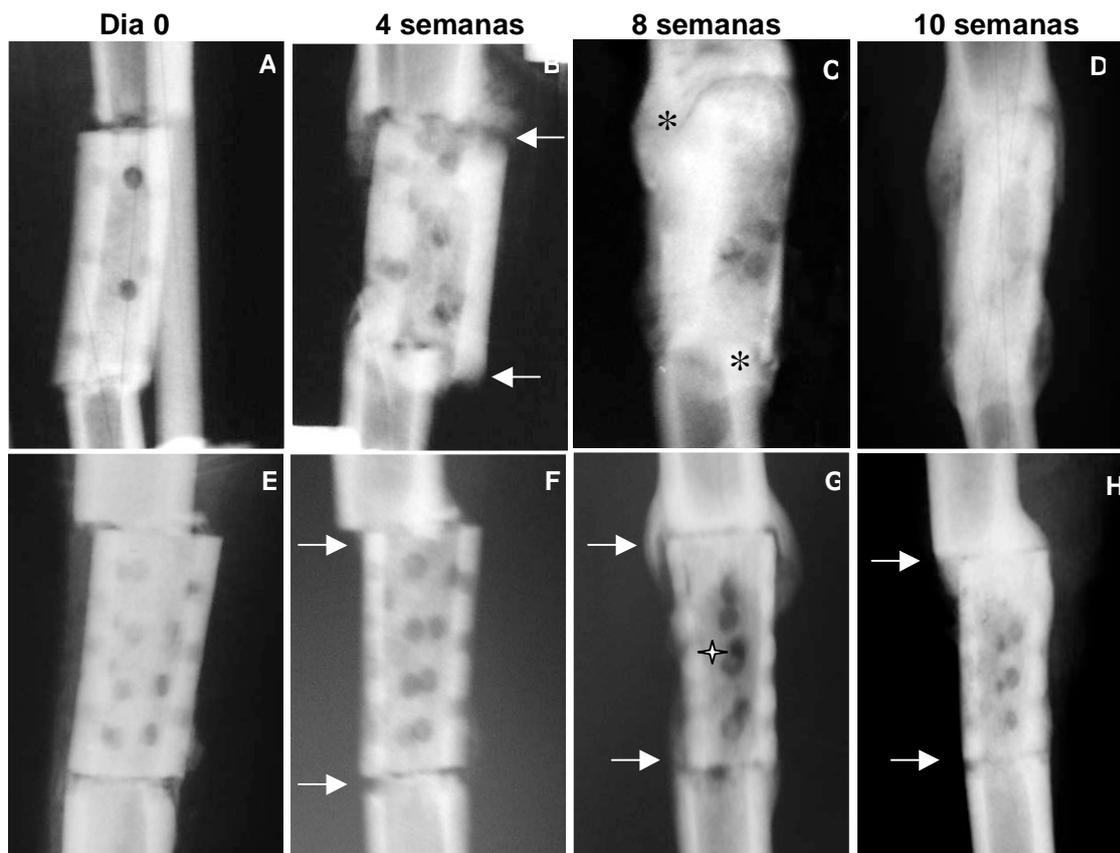


Figura 12 - Radiografias comparativas entre as ovelhas COA 10+ (A-D) e COA 10- (E-H). As figuras A e E ilustram o defeito ósseo preenchido pelo enxerto homogêneo, no pós-operatório imediato. Os dois enxertos estão em contato com o osso hospedeiro sendo que no animal COA 10+ o enxerto apresenta 10° de obliquidade em relação ao fragmento tibial proximal e distal. Após 4 semanas embora a neoformação óssea seja mais evidente no animal COA 10+ (B) há perda do detalhe da linha de osteotomia (setas) nos focos proximais e distais nos dois animais (B e F). Após oito semanas, no animal COA 10+ (C) exuberante neoformação óssea pode ser observada recobrendo toda a face lateral do enxerto, unindo-o por ponte óssea (\*) ao osso hospedeiro nos dois focos de osteotomia. Tanto as perfurações como as linhas de osteotomia são pouco evidentes. No mesmo período, no animal tratado com enxerto não celularizado (G), os orifícios da cortical permanecem visíveis (☆) e há ponte óssea em formação entre o enxerto e o osso hospedeiro mas a linha de osteotomia ainda é visível em ambos os focos (setas). Ao final da 10ª semana, o enxerto está consolidado nos dois animais, sendo que na ovelha COA 10+ (D) os focos de osteotomia estão completamente encobertos pelo calo ósseo e os orifícios do osso compacto não são mais evidenciados. Apesar da consolidação, na ovelha COA 10- (H) a linha de osteotomia e alguns orifícios da cortical ainda podem ser visualizados.

A pontuação dos parâmetros radiográficos dos dois animais sacrificados nos tempos 0, quatro, seis e dez semanas após o procedimento cirúrgico, está ilustrada na Figura 13.

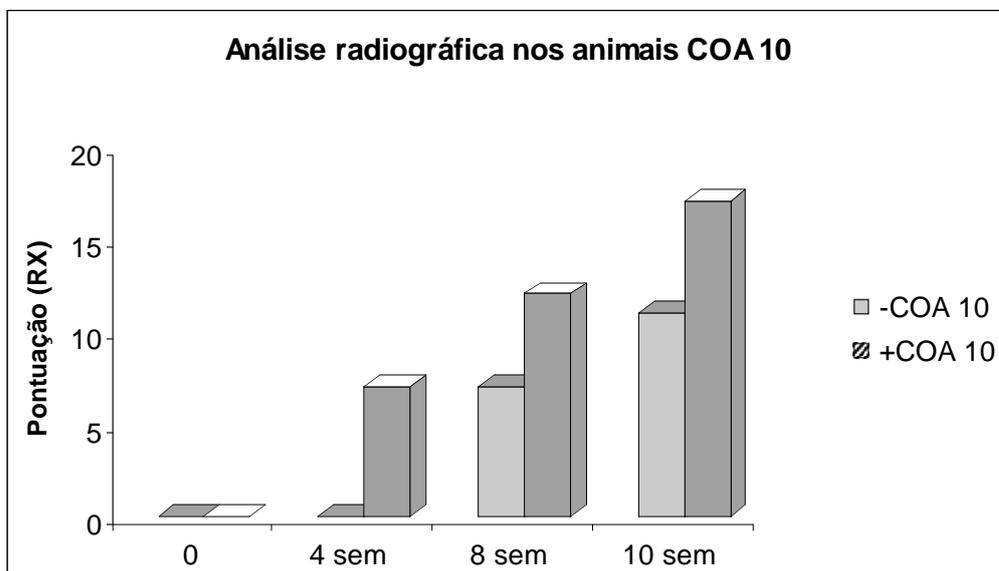


Figura 13 – Representação gráfica da pontuação obtida para os parâmetros radiográficos nos animais COA 10 nos pontos de avaliação 0, 4, 6 e 10 semanas (sem).

Em todos os tempos analisados (4, 6 e 10 semanas) a pontuação do animal COA 10+ foi superior a do animal COA 10-. A reação periosteal, tanto na face medial como lateral foi progressivamente maior no animal tratado com enxerto celularizado, bem como a perda de nitidez (avaliada pela redução da linha de radiotransparência) dos focos de osteotomia proximal e distal (Figura 12). Ao término do período experimental, a principal diferença observada entre os dois animais foi na intensidade da reação periosteal, que recobria mais de 75% das superfícies corticais no animal COA 10+ e estava presente em grau mínimo no animal COA 10-.

A evolução radiográfica do processo de consolidação dos enxertos nos animais COA 14+ e COA 14- está ilustrada na Figura 14. Em ambas as ovelhas, imediatamente após o procedimento cirúrgico, os enxertos encontravam-se alinhados com os fragmentos distal e proximal (Figs. 14A e 14E).

Após 4 semanas, notava-se que na face medial do foco proximal do animal COA 14+ a distância entre o enxerto e o osso hospedeiro era de aproximadamente 3mm tornando, neste animal, a *gap* mais visível neste ponto de observação (Fig. 14B e 14F). Na ovelha COA 14+ (Fig. 14B) o calo ósseo, que se originava tanto do enxerto quanto do osso hospedeiro no foco proximal, deu origem a ponte óssea entre os fragmentos. Na ovelha COA 14- (Fig. 14F) não se observou evidências de formação de calo ósseo nos focos de osteotomia.

Dois meses decorridos da cirurgia, a ovelha tratada com enxerto celularizado (Fig. 14C) apresentava grande formação óssea envolvendo a face lateral e nos focos das osteotomias na face medial do enxerto. Apesar das linhas de osteotomia serem ainda evidentes, havia formação de pontes ósseas unindo os fragmentos no foco proximal e distal. Na ovelha COA 14- (Fig. 14G) a neoformação óssea era pequena e limitada a face lateral do foco proximal do enxerto, mas a linha de osteotomia era de difícil visualização devido ao preenchimento por osso neoformado. Após 3 meses de evolução, ambos os enxertos encontravam-se consolidados sendo a formação óssea ao redor do enxerto no animal COA 14+ (Fig. 14D) mais exuberante do que no animal controle (Fig.

14H). Os orifícios estavam igualmente ocluídos. A linha de osteotomia era menos visível na ovelha COA 14-, possivelmente devido ao maior espaço existente entre o enxerto e o osso hospedeiro no foco proximal da osteotomia no animal COA 14+.



Figura 14 - Radiografias comparativas entre as ovelhas COA 14+ (A-D) e COA 14- (E-H). As figuras A e E ilustram o defeito ósseo preenchido pelo enxerto homólogo, logo após a cirurgia. Os enxertos estão em contato com os fragmentos proximais e distais da tíbia em ambos os animais. Após 4 semanas, na face medial do foco proximal do animal COA 14+ a distância entre o enxerto e o osso hospedeiro é de aproximadamente 3mm tornando a gap mais visível neste ponto de observação. A formação óssea neste animal está mais adiantada do que no animal COA 14-, havendo maior formação de ponte óssea (seta) entre o enxerto e o osso hospedeiro na face medial do foco proximal (B). Na ovelha COA 14- (F) não há formação de calo ósseo nos focos de osteotomia. Após 8 semanas, a ovelha COA 14+ (C) apresenta formação óssea expressiva relacionada principalmente com a face lateral do enxerto. Apesar das linhas de osteotomia serem ainda evidentes há formação de pontes ósseas unindo os fragmentos no foco proximal e distal (setas). Na ovelha COA 14- (G) a neoformação óssea é pequena e limitada a face lateral do foco proximal do enxerto, mas a linha de osteotomia é de difícil visualização devido ao preenchimento por osso neoformado. Ao final do período experimental, ambos os enxertos estão consolidados, sendo a formação óssea em torno do enxerto celularizado (D) mais exuberante do que no animal COA 14- (H). Os orifícios estão igualmente ocluídos. A linha de osteotomia é menos visível na ovelha COA 14-, possivelmente devido ao maior espaço existente entre o enxerto e o osso hospedeiro no foco proximal da osteotomia no animal COA 14+.

A pontuação dos parâmetros radiográficos dos dois animais sacrificados nos tempos 0, quatro, oito e quatorze semanas após o procedimento cirúrgico, está ilustrada na Figura 15.

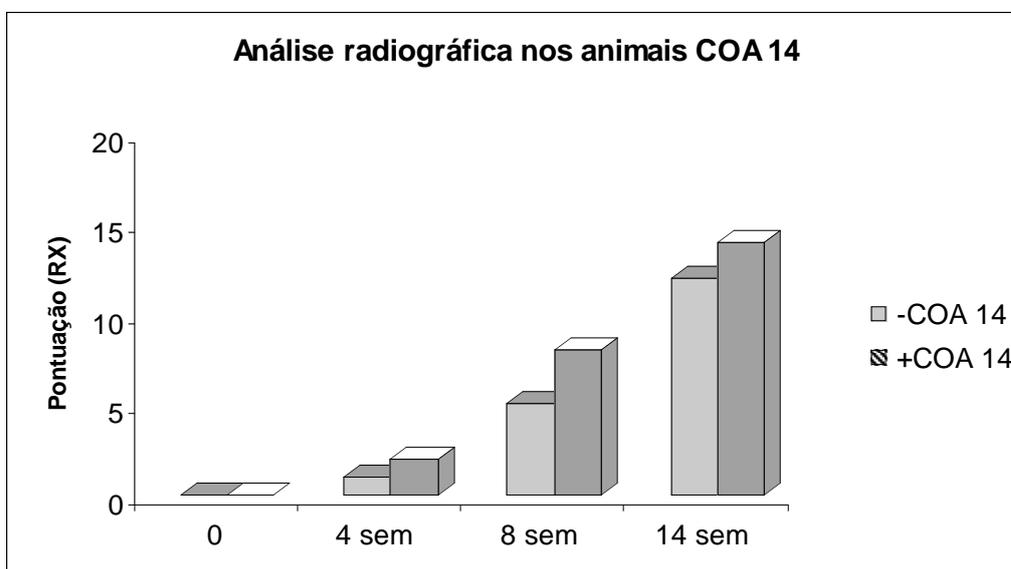


Figura 15 – Representação gráfica da pontuação obtida para os parâmetros radiográficos nos animais COA 14 nos pontos de avaliação 0, 4, 8 e 14 semanas (sem).

Embora em ambos os animais tenha havido progressão na intensidade dos parâmetros avaliados nos tempos 4, 8 e 14 semanas o animal COA 14+ se manteve sempre com maior pontuação, apesar de no primeiro ponto de observação (4 semanas) a diferença não ter sido substancial. A partir da 8<sup>a</sup> semana, a principal diferença observada entre os animais COA 14+ e COA 14- foi na intensidade da reação periosteal, que era maior no animal tratado com enxerto celularizado, se mantendo até o final do período experimental.

A evolução radiográfica do processo de consolidação dos enxertos nos animais COA 18+ e COA 18- está ilustrada na Figura 16.

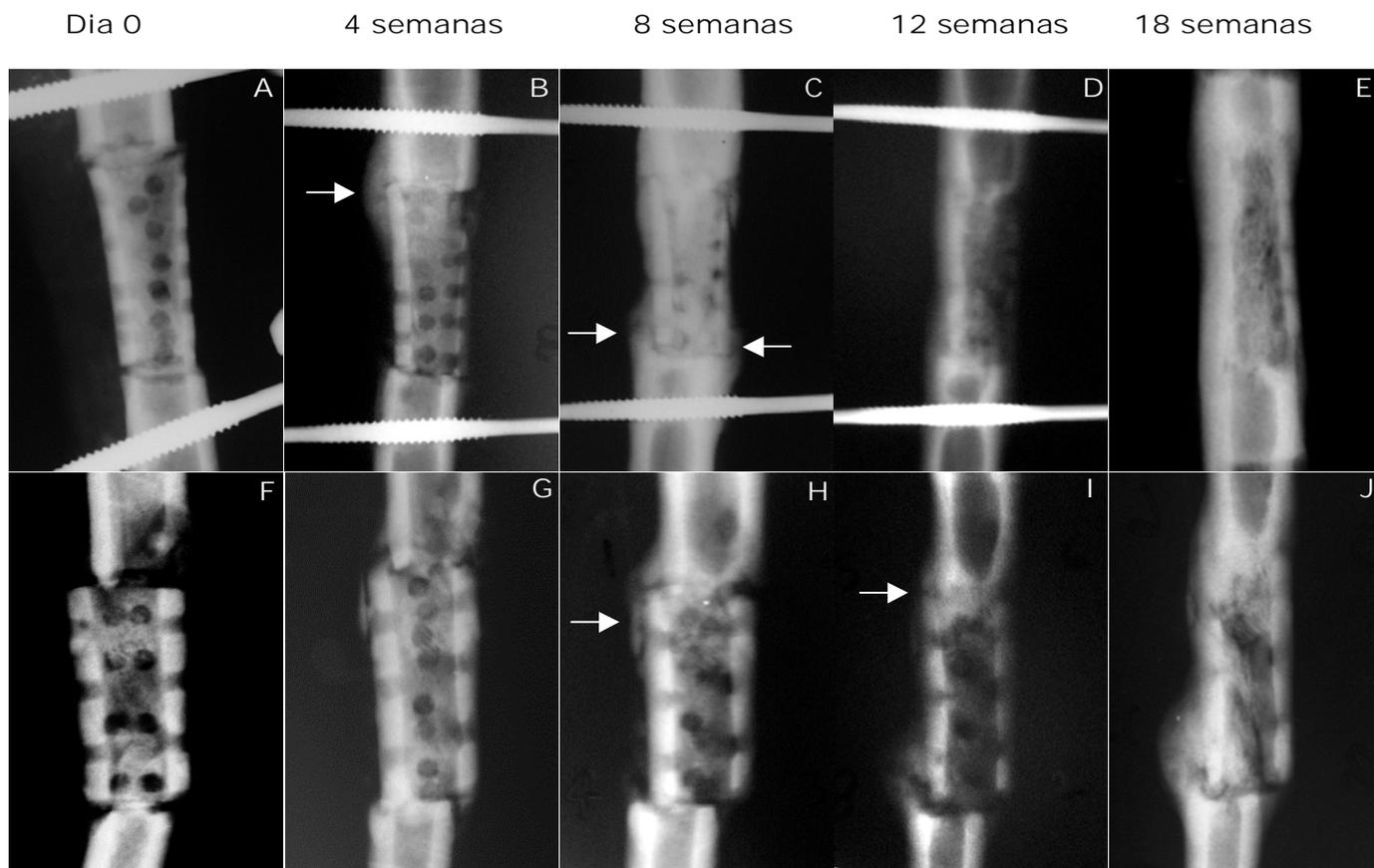


Figura 16 - Radiografias comparativas entre as ovelhas COA 18+ (A-E) e COA 18- (F-J). As figuras A e F ilustram o defeito ósseo preenchido pelo enxerto homólogo, logo após a cirurgia. Os enxertos estão alinhados com os fragmentos proximais e distais da tíbia em ambas as ovelhas. Após 4 semanas, nos dois animais (B e G) nota-se perda do detalhe das linhas de osteotomia, com evidente formação de calo e ponte óssea (seta) na ovelha COA 18+, ao contrário da ovelha COA 18- onde a neoformação óssea não é tão evidente (G). Os orifícios estão patentes nos dois animais. Dois meses após a cirurgia, a ovelha COA 18+ (C) apresenta formação de pontes ósseas unindo o enxerto ao osso hospedeiro em ambas as extremidades (setas) e há neoformação óssea principalmente na face lateral do enxerto. As linhas das osteotomias quase não são mais percebidas. As perfurações do enxerto cortical estão parcialmente preenchidas por osso, ao contrário do animal COA 18- (H) onde os orifícios estão integralmente visíveis. Neste animal a formação óssea é pequena, presente apenas no foco proximal (seta). Com 12 semanas, o enxerto encontrava-se completamente consolidado no animal COA 18+, não sendo mais possível identificar os focos de osteotomia (D). O calo ósseo está em processo de remodelação. Na ovelha COA 18- (I), apenas o foco proximal está consolidado (seta). Com 18 semanas, o enxerto celularizado (E) apresenta-se em avançado processo de remodelação, com espessamento das corticais, diminuição parcial da espessura do calo ósseo formado no foco de osteotomia, restabelecimento da cavidade medular e obliteração completa dos orifícios do osso cortical. Na ovelha COA 18- (J), embora o enxerto esteja consolidado em ambas as interfaces, a linha de osteotomia ainda pode ser observada no foco distal.

Como nos demais animais, imediatamente após o procedimento cirúrgico, os enxertos encontravam-se alinhados com os fragmentos distal e proximal e a *gap*, nos dois focos de osteotomia, tinha menos de 2mm de espessura (Figs. 16A e 16F).

Após 4 semanas, nos dois animais, houve perda do detalhe da linha de osteotomia tanto no foco proximal como no foco distal. Entretanto, no animal COA 18+ (Fig. 16B) era evidente a formação de calo e de ponte óssea unindo o enxerto ao osso hospedeiro no foco proximal de osteotomia. Na ovelha COA 18- (Fig. 16G) não havia evidências de formação óssea. Neste ponto de observação os orifícios da cortical estavam completamente patentes em ambas as ovelhas.

Decorridos dois meses da cirurgia, na ovelha COA 18+ (Fig. 16C) houve formação de ponte óssea transpassando o foco de osteotomia em ambas as extremidades, sendo que a neoformação óssea era mais marcante na face lateral do enxerto. No foco proximal a linha de osteotomia era mal definida ou imperceptível em grande parte da junção do enxerto com o osso hospedeiro, configurando consolidação óssea. As perfurações do osso cortical estavam parcialmente preenchidas por osso, ao contrário da ovelha COA 18- (Fig. 16H) onde os orifícios estavam integralmente visíveis. A formação óssea neste animal era pequena, restrita ao foco proximal.

Com 3 meses, na ovelha COA 18+ (Fig. 16D), o enxerto estava completamente consolidado e em remodelação, não sendo mais possível identificar os focos de osteotomia. Na ovelha COA 18- (Fig. 16 I), o foco proximal estava consolidado e o foco de osteotomia distal permanecia totalmente visível configurando retardo de consolidação. Com 18 semanas, o enxerto celularizado (Fig. 16E) apresentava-se em avançado processo de remodelação, com espessamento das corticais e diminuição parcial da espessura do calo ósseo formado nos focos de osteotomia. Na ovelha do grupo controle (Fig. 16J), embora o enxerto estivesse consolidado em ambos os focos da osteotomia, ainda era possível visualizar linha radiotransparente no foco distal.

A pontuação dos parâmetros radiográficos dos dois animais sacrificados nos tempos 0, quatro, oito, doze e dezoito semanas após o procedimento cirúrgico, está ilustrada na Figura 17.

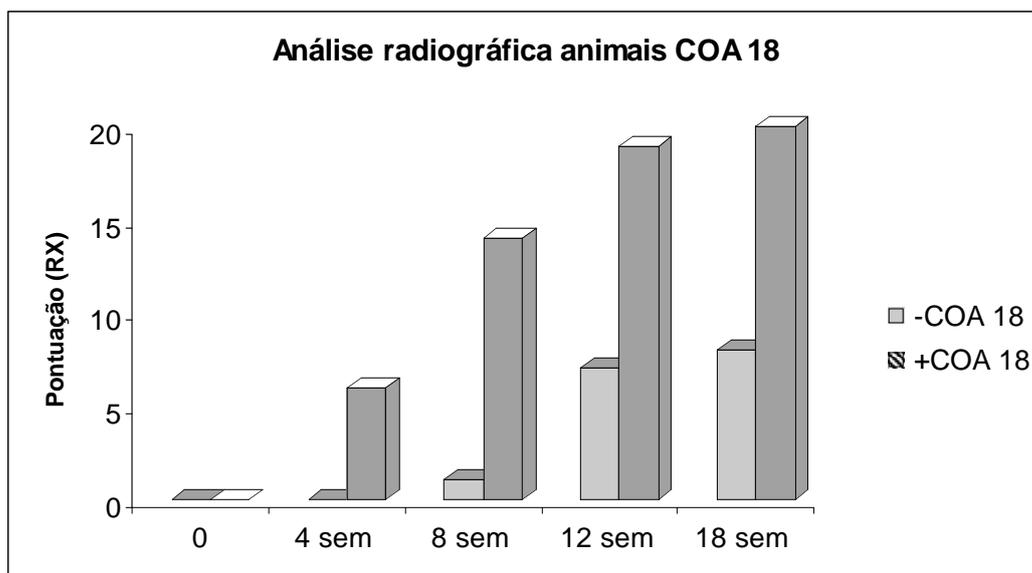


Figura 17 – Representação gráfica da pontuação obtida para os parâmetros radiográficos nos animais COA 18 nos pontos de avaliação 0, 4, 8, 12 e 18 semanas (sem).

Como nos demais animais a maior pontuação dos parâmetros radiográficos foi observada no animal tratado com enxerto celularizado. Esta diferença já era bastante evidente no primeiro ponto de observação (4 semanas) e se ampliou progressivamente no decorrer do período de observação. A maior pontuação dos animais COA 18+ deu-se em decorrência da reação periosteal mais exuberante nas superfícies medial e lateral, da consolidação e da remodelação do enxerto ao final da 18<sup>a</sup> semana.

#### 4.4 – ANÁLISE TOMOGRÁFICA

No primeiro ponto de análise (6 semanas), as perfurações eram claramente identificadas na cortical dos enxertos, não sendo observada diferença entre os dois animais quanto ao preenchimento dos orifícios por osso neoformado. No entanto, como na avaliação

radiográfica, a formação de calo ósseo e a reação periosteal eram mais evidentes no enxerto celularizado (Figura 18).

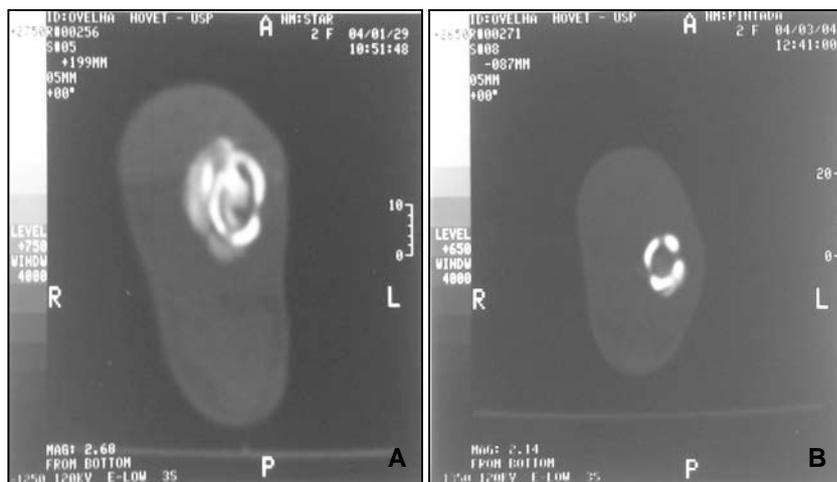


Figura 18 - Cortes tomográficos realizados no plano medial dos enxertos dos animais sacrificados 06 semanas após a correção do defeito segmentar diafisário com enxerto homólogo celularizado (A) e não celularizado (B). Os orifícios correspondentes às perfurações do osso compacto da cortical estão patentes em ambos os animais. A reação periosteal, como já observada na radiografia simples, é maior no animal COA 6+ tratado com enxerto celularizado (A).

Com 10 e 14 semanas, nos animais tratados com enxertos celularizados (COA 10 + e COA 14+), os orifícios estavam menos patentes do que nos animais controles (COA 10- e COA 14-) devido a maior neoformação óssea e, conseqüentemente, maior obliteração das perfurações (Figura 19).

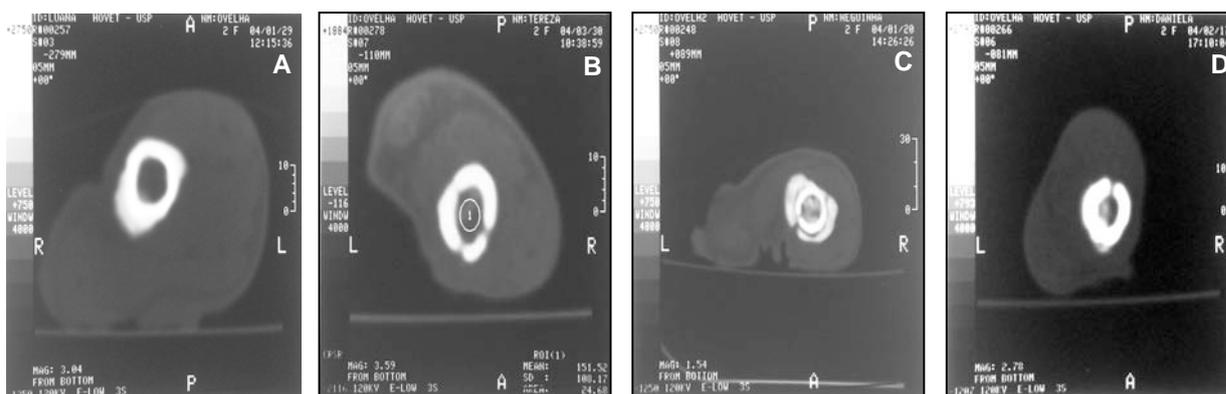


Figura 19 – Cortes tomográficos realizados no plano medial dos enxertos dos animais sacrificados 10 (A e B) e 14 semanas (C e D) após a correção do defeito segmentar diafisário com enxerto homogêneo celularizado (A e C) e não celularizado (B e D). A partir da 10<sup>a</sup> semana, e de forma mais evidente na 14<sup>a</sup> semana após a correção do defeito diafisário, a obliteração dos orifícios por osso neoformado é mais evidente nos dois animais COA 10+ e COA 14+ tratados com enxertos celularizados (A e C) quando comparados com os animais COA 10- e COA 14- do grupo controle (B e D). A reação periosteal, como já evidenciado na radiografia simples, é maior nos animais tratados com células (A e C).

Após 18 semanas, as perfurações do osso cortical do animal tratado com enxerto celularizado (COA 18+), estavam totalmente preenchidas por osso neoformado e não eram mais visualizadas nos cortes tomográficos (Figura 20).



Figura 20 – Corte tomográfico da porção central do enxerto celularizado, 18 semanas após a correção do defeito diafisário (A) e peça macroscópica correspondente ao enxerto do animal COA 18+ (B). Na tomografia não se identificam mais os orifícios que correspondem às perfurações do osso compacto. Ausência de reação periosteal devido à remodelação completa do calo ósseo. A trama tri-dimensional de osso esponjoso na cavidade medular foi reconstituída na porção central do enxerto (B).

#### 4.5 – ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

A avaliação histopatológica foi realizada em toda a extensão do enxerto incluindo a interface com o osso hospedeiro. Com o objetivo de padronizar os resultados, facilitando a análise comparativa do processo de reparo ósseo, na presença e na ausência de COA, os achados histológicos foram correlacionados entre os dois animais sacrificados em cada um dos quatro pontos de observação.

Os principais achados considerados na análise histopatológica comparativa entre os animais COA 6+ e COA6- estão ilustrados nas figuras 21-24 e resumidos na Tabela 2.

Após 6 semanas, no animal COA 6+, o preenchimento da interface do enxerto com o osso hospedeiro era representado predominantemente por tecido conjuntivo denso vascularizado contendo ilhas de cartilagem hialina (Fig. 21A). Nesta topografia, a neoformação óssea já estabelecida, se originava quase exclusivamente do osso hospedeiro. Externamente as interfaces encontravam-se recobertas por neoformação óssea periosteal exuberante.

O preenchimento dos orifícios do osso compacto do enxerto era constituído em grande parte por osso neoformado bem estruturado em traves espessas interconectadas, com acentuada atividade osteoblástica (Fig. 21B). Na porção periférica do orifício predominava a neoformação de osso imaturo relacionado com tecido conjuntivo, com elevada atividade celular osteogênica, demonstrando que o preenchimento ocorreu provavelmente da periferia para a porção central dos orifícios. Simultaneamente, o tecido do preenchimento dos orifícios penetrava para o interior do espaço medular (Fig. 21C). A alta celularidade deste tecido era devida a células com características morfológicas de osteoblastos maduros e a elementos celulares que, por mostrar relação direta com deposição de matriz colágena densa e/ou matriz osteóide, permitiu supor que se tratava de células osteoprogenitoras (Fig. 21D).

A reação periosteal na topografia da região central do enxerto, como observado no RX (Figura 10), era exuberante e

continha pequenos focos de cartilagem hialina. No osso compacto do enxerto eram freqüentes os focos de reabsorção osteoclástica tanto haversiana como na superfície cortico-endosteal. A reabsorção haversiana ocorreu de forma organizada e apresentava características de remodelação óssea pela presença de *cutting-cones* (Fig. 22A).

Os principais componentes do preenchimento medular neste ponto de observação, em proporções semelhantes, eram tecido conjuntivo e traves ósseas neoformadas. Grande parte da formação do componente ósseo na cavidade medular se originava de tecido conjuntivo denso pouco vascularizado com características de tecido osteogênico (Fig. 22B). O tecido conjuntivo peri-trabecular em geral tinha aspecto frouxo, muito vascularizado com semelhanças morfológicas com o estroma medular (Fig. 22C). Numa proporção também significativa, a neoformação óssea ocorreu sobre restos de osso esponjoso correspondentes ao enxerto homólogo. O osso lamelar, depositado sobre traves de osso desvitalizado, estava sendo ativamente reabsorvido por osteoclastos multinucleados (Fig. 22D). Em uma outra situação, restos de enxerto esponjoso, já totalmente reabsorvidos, eram representados por cavidades contendo osteoclastos. O tecido conjuntivo próximo a estes focos de reabsorção mostrava grande condensação de células volumosas com características morfológicas de progenitores osteoblásticos. Em alguns focos isolados, a superfície cortico-endosteal contribuía com uma pequena parcela da neoformação óssea do espaço medular.

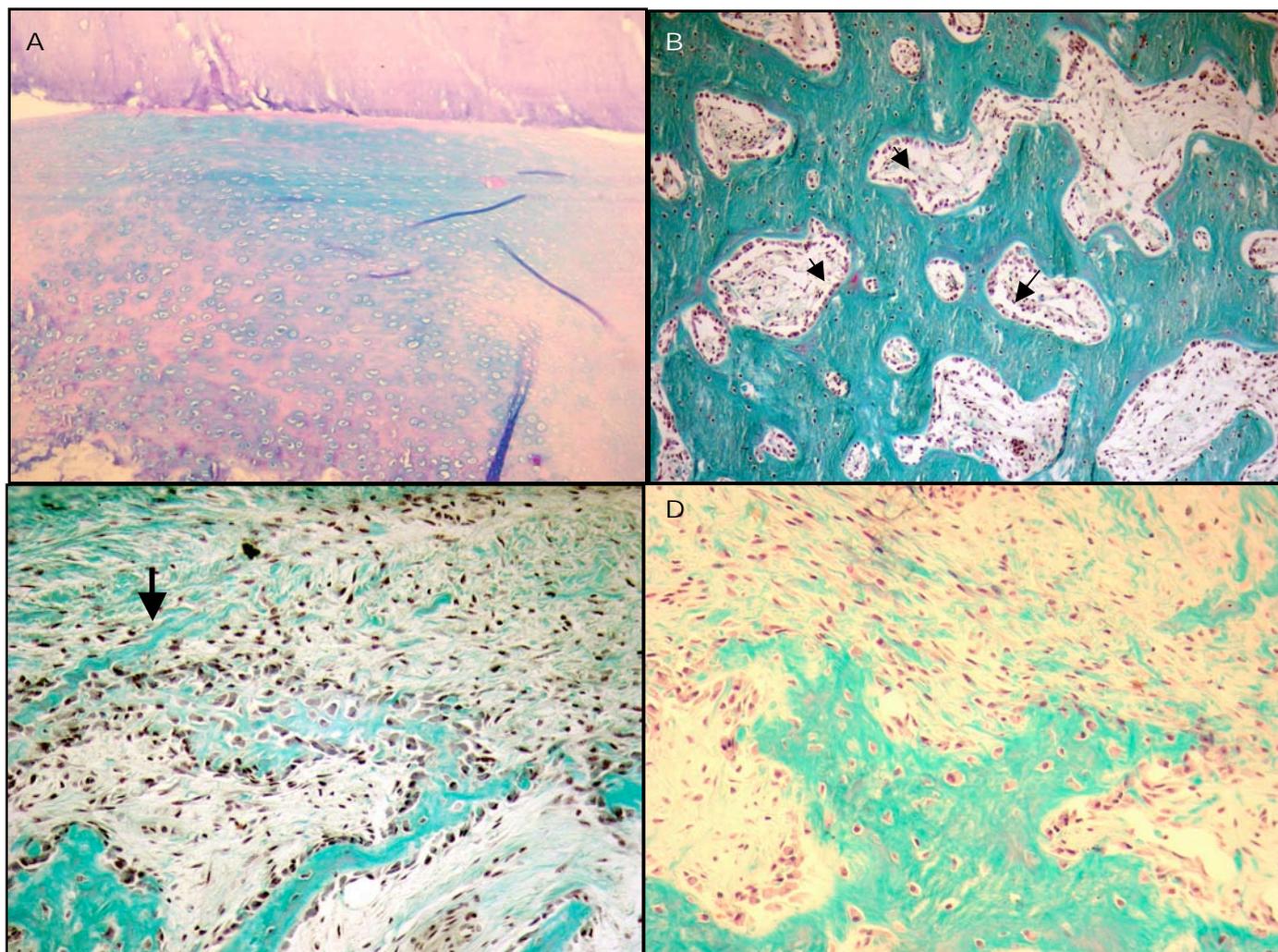


Figura 21 - Aspecto histológico do enxerto e da região de contato com o osso hospedeiro no animal COA 6+. (A)- Preenchimento da interface entre o osso hospedeiro e o enxerto constituído por tecido conjuntivo denso e cartilagem hialina (ch). (B)- Orifício do osso compacto do enxerto totalmente preenchido por traves ósseas espessas bem estruturadas com bom grau de conectividade e atividade osteoblástica (setas). (C) – Região periférica do orifício do enxerto cortical com traves recém formadas a partir de tecido conjuntivo osteogênico (seta) penetrando no sentido do canal medular. (D) - Tecido ósseo jovem, formado no interior dos orifícios, rico em osteoblastos e osteoprogenitores avança para o interior da cavidade medular.

(A) 4x, (B) 10x, (C) 10x, (D) 10x. Tricrômico de Goldner e Alcian Blue/PAS (A) para inclusão em resina.

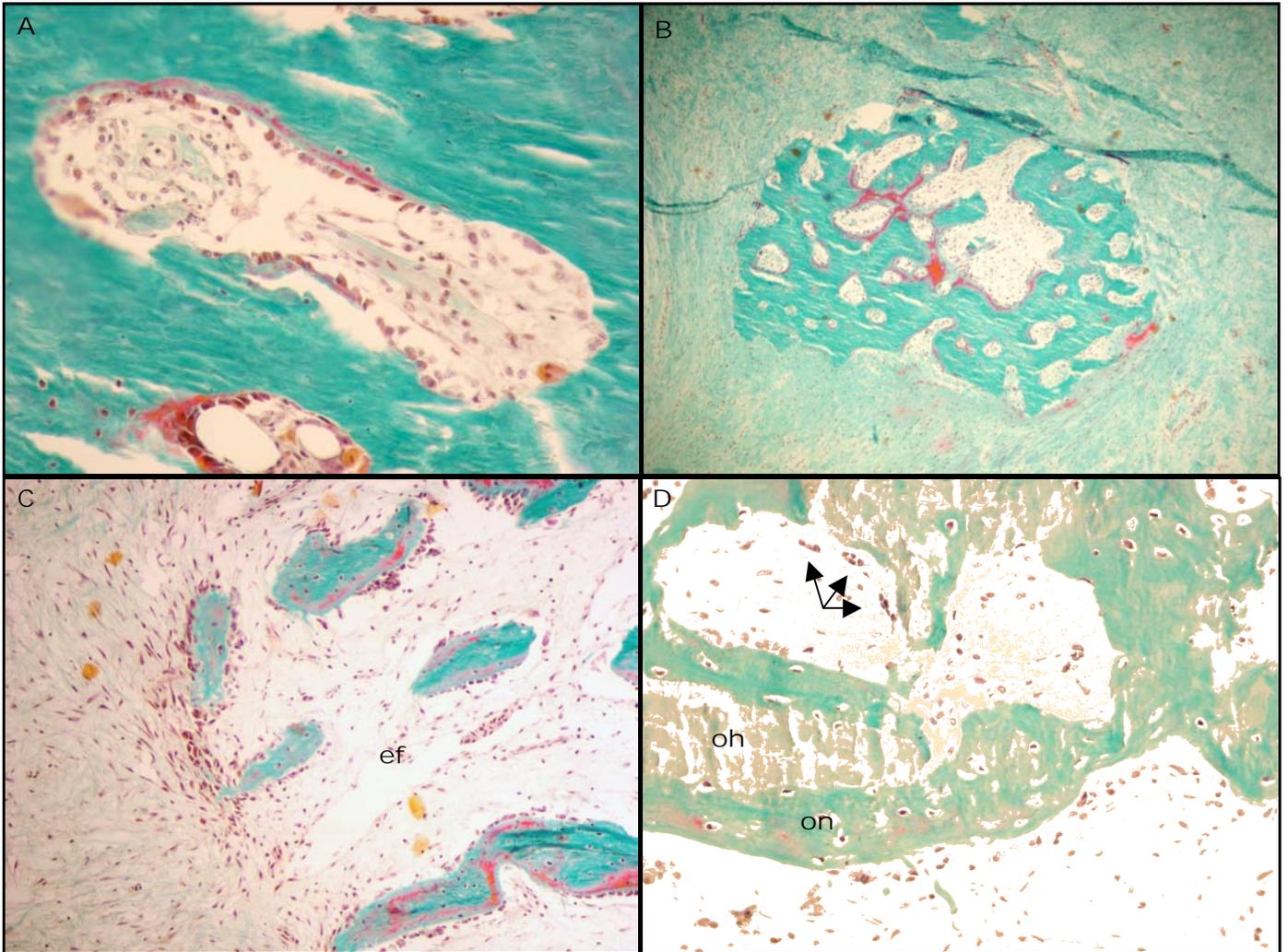


Figura 22 - Aspecto histológico do enxerto e da região de contato com o osso hospedeiro no animal COA 6+. (A)- Remodelação (*cutting-cone*) do osso compacto enxertado. (B) - Foco de osteogênese no interior do espaço medular. (C) - Relação entre formação das traves de osso esponjoso e estroma frouxo (ef) característico do espaço medular. (D)- na Cavidade medular com restos de osso esponjoso homólogo (oh) desvitalizado sendo reabsorvido por osteoclastos (seta) e recoberto externamente por osso neoformado (on). (A) 20x, (B) 4x, (C) 4x, (D) 20x. Tricrômico de Goldner para inclusão em resina.

As principais características histológicas do enxerto retirado do animal COA 6- estão resumidas nas figuras 23 e 24. As interfaces do enxerto com o osso hospedeiro estavam preenchidas por tecido conjuntivo denso (Fig. 23A) contendo traves ósseas e ilhas de cartilagem hialina (Fig. 23B). O osso hospedeiro contribuía com uma pequena quantidade de osso neoformado na região das interfaces com o enxerto. Como no animal COA6+, a maior parte dos orifícios do enxerto de osso compacto estava parcialmente preenchido por osso neoformado estruturado em traves interconectadas, com atividade osteogênica um pouco maior na região periférica (Fig. 23C). Como no animal tratado com enxerto celularizado, o osso neoformado no interior do orifício penetrava para o interior da cavidade medular. Entretanto, a principal diferença observada na comparação com o animal COA 6+ era na composição do tecido de preenchimento do espaço medular.

No tecido conjuntivo do preenchimento da porção central do espaço medular no animal COA 6- não havia evidências de osteogênese. Nesta localização eram freqüentes restos de medula óssea e do osso esponjoso homólogo (Fig. 23D). Nas demais regiões do enxerto o preenchimento era constituído quase que exclusivamente por tecido conjuntivo com pouca ou nenhuma relação com neoformação óssea (Fig. 24A). A principal fonte de formação óssea era diretamente, a partir da superfície cortico-endosteal, que em geral mostrava alta atividade celular e traves circundadas por tecido conjuntivo com características de estroma medular (Fig. 24B). Em outras

regiões, também relacionadas com a superfície interna da cortical do enxerto,

a formação óssea não era tão exuberante, sendo representada por traves isoladas de osso imaturo (Fig. 24C). As traves ósseas desvitalizadas, que correspondiam ao osso enxertado, encontravam-se em diferentes estágios de reabsorção. Eram também freqüentes cavidades de reabsorção, circundadas por tecido conjuntivo denso sem atividade osteogênica e relacionadas com um grande número de osteoclastos (Fig. 24D). Ao contrário do animal COA 6+, a formação óssea periosteal era pouco expressiva.

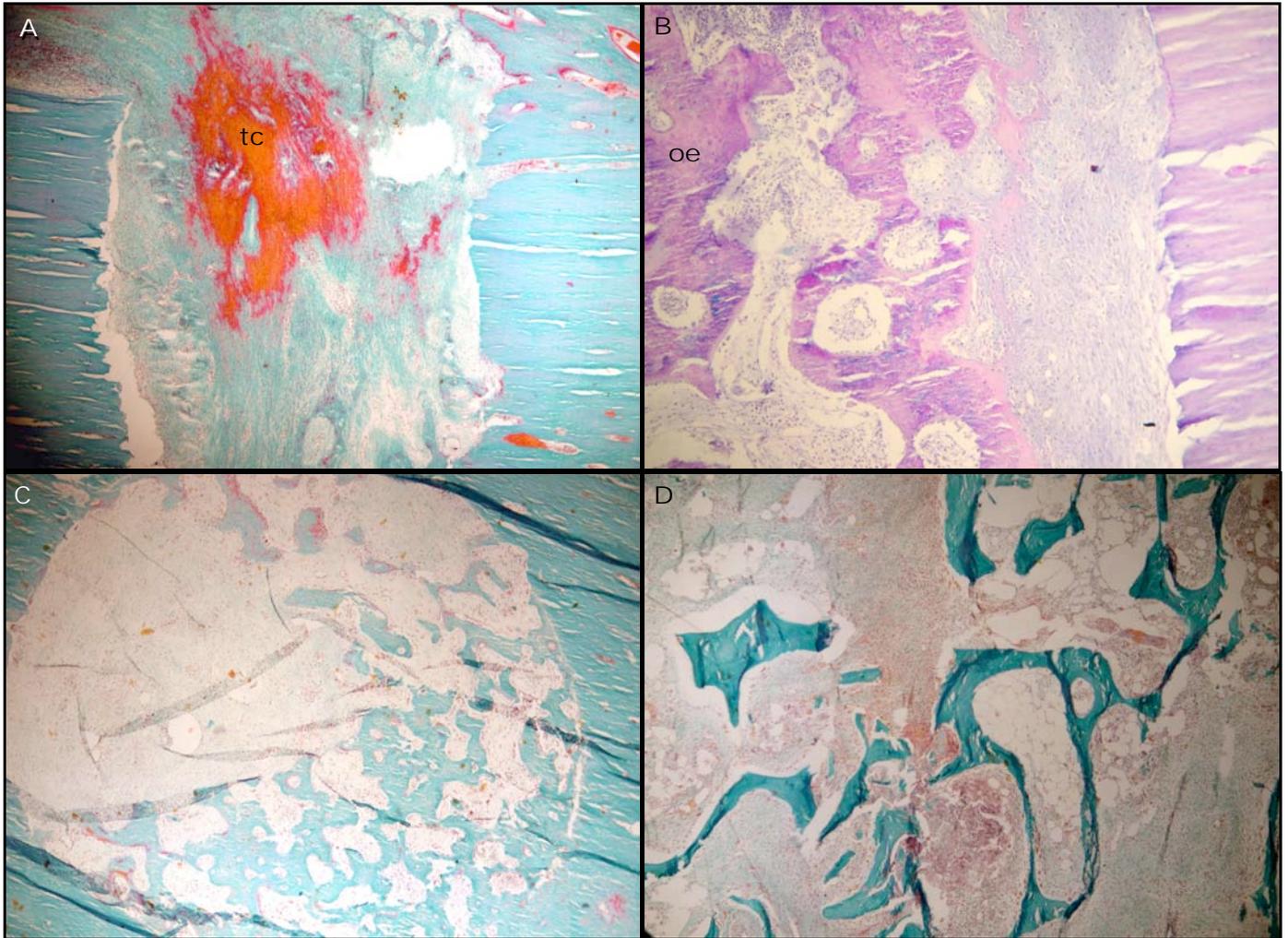


Figura 23 - Aspecto histológico do enxerto e da região de contato com o osso hospedeiro no animal COA 6-. (A)- Parte do preenchimento da interface entre o osso hospedeiro e enxerto constituída predominantemente por tecido conjuntivo (tc) sem relação com neoformação óssea. (B)- Preenchimento parcial da outra interface com o enxerto por osso formado principalmente por ossificação endocondral (oe). (C)- Orifício correspondente a perfuração do osso compacto do enxerto preenchido por mistura de tecido conjuntivo e osso neoformado. (D)- Restos intactos de enxerto homólogo (traves de osso esponjoso e medula óssea) no interior do espaço medular. (A) 4x, (B) 4x, (c) 4x, (D) 4x. Tricrômico de Goldner e Alcian Blue/PAS (B) para inclusão em resina.

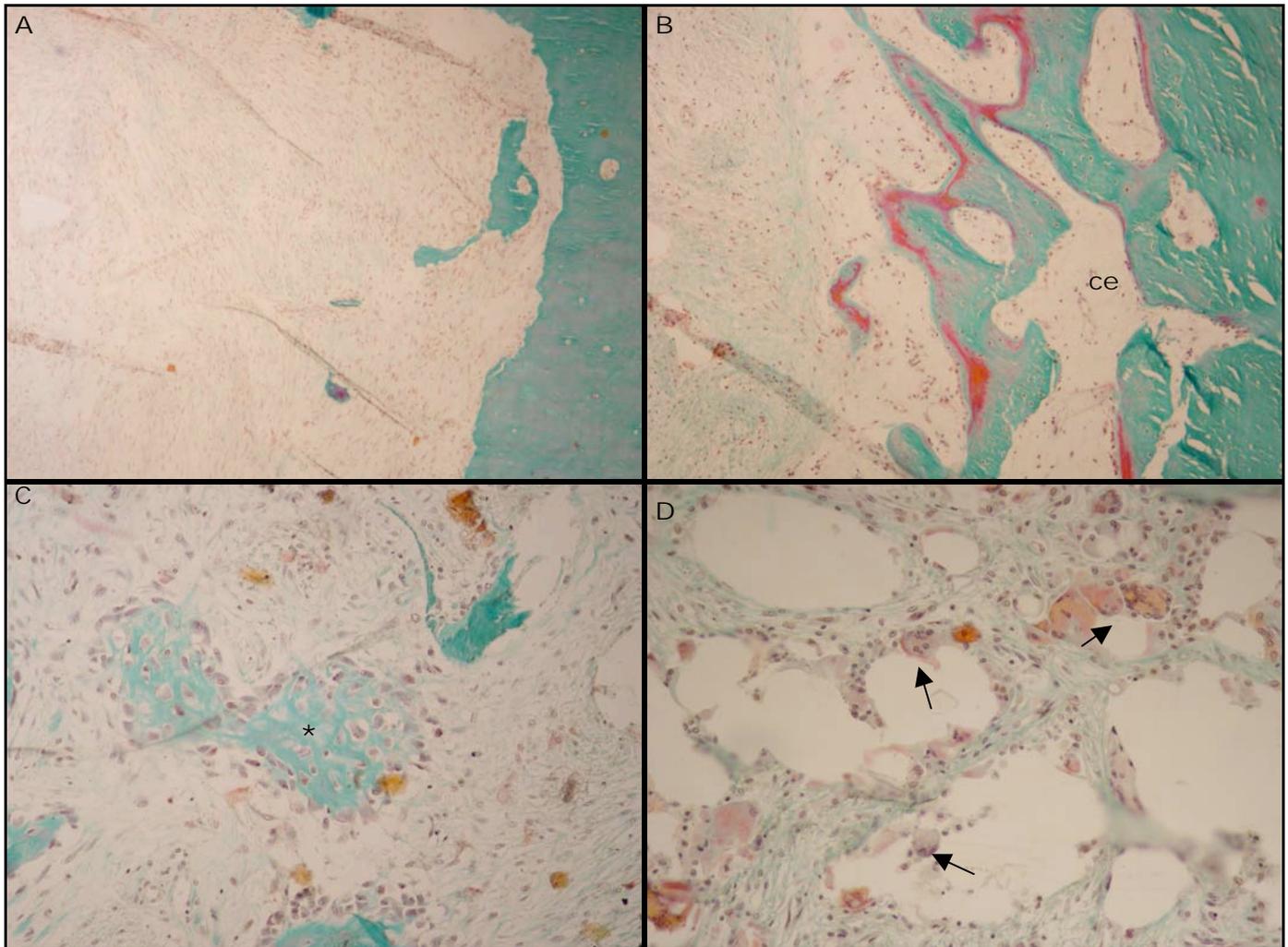


Figura 24 - Aspecto histológico do enxerto e da região de contato com o osso hospedeiro no animal COA 6-. (A)- Preenchimento do canal medular predominantemente por tecido conjuntivo sem atividade osteogênica. (B)- Neoformação óssea ativa a partir da superfície cortico-endosteal (ce). (C)- Foco isolado de osteogênese (\*) no tecido conjuntivo do preenchimento do espaço medular. (D)- Restos de osso esponjoso homólogo sendo ativamente reabsorvido por osteoclastos multinucleados (setas). (A) 4x, (B) 10x, (C) 20x, (D) 20x. Tricrômico de Goldner para inclusão em resina.

Tabela 2 – Principais achados histológicos do enxerto e das extremidades proximal e distal do osso hospedeiro nos animais sacrificados 6 semanas após a criação do defeito segmentar e enxertia com osso homólogo (Figuras 21-24).

	<i>COA 6+</i>	<i>COA 6-</i>
<i>Contato enxerto osso hospedeiro</i>	- Tecido conjuntivo denso, cartilagem hialina e pequena quantidade de osso neoformado (Fig. 21A).	- Mistura de tecido conjuntivo denso, osso neoformado e cartilagem hialina (Fig. 23A e 23B).
<i>Osso Cortical</i>	- Orifícios preenchidos por osso neoformado (Fig. 21B) com grande atividade celular (Fig. 21C) e que avança para o espaço medular.  - Remodelação do osso compacto (Fig. 22A).	- Orifícios preenchidos por osso neoformado e por tecido conjuntivo (Fig. 23C).  - Neoformação óssea focal a partir da superfície cortico-endosteal (Fig. 24B).
<i>E N X E R T O</i>		
<i>Espaço Medular</i>	- Tecido conjuntivo denso com atividade osteogênica (Fig. 21D, 22B e 22C).  - Restos de enxerto esponjoso homólogo desvitalizado, sendo ativamente reabsorvidos e recobertos por osso neoformado (Fig. 22D).	- Tecido conjuntivo sem evidências de osteogênese (Fig. 24A).  - Medula óssea e osso esponjoso homólogos intactos (Fig. 23D) ou sendo ativamente reabsorvido (Fig. 24D).  - Foco isolado de osteogênese no espaço medular (Fig. 24C).

Os principais achados histológicos considerados na análise comparativa entre os animais COA 10+ e COA 10- estão ilustrados nas figuras 25-28 e resumidos na Tabela 3.

Após 10 semanas de observação, o animal tratado com enxerto celularizado (COA10+) apresentava continuidade óssea na região da osteotomia distal (Fig. 25A). A linha de fusão entre as duas extremidades dos segmentos ósseos era evidente, sendo possível identificar o diferente sentido e direção das fibras de colágeno do osso hospedeiro e do osso enxertado. Na extremidade proximal do enxerto, o preenchimento da interface era composto por tecido conjuntivo fibro-vascular (Fig. 25B) e em menor proporção por osso imaturo. Dentre os elementos celulares presentes no tecido conjuntivo do preenchimento, estavam presentes células com características morfológicas e funcionais - pela sua relação com traves ósseas neoformadas - de osteoblastos ou de pré-osteoblastos, sugerindo que embora não tivesse havido consolidação na zona da osteotomia, o processo de osteogênese estava em curso.

osso compacto do enxerto estava em processo de remodelação, sendo frequentemente identificadas estruturas com características morfológicas de osteons (Fig. 25C). Os orifícios do enxerto cortical, em geral estavam totalmente preenchidos por osso com características histológicas de osso compacto (Fig. 25D). Em alguns segmentos da superfície interna da cortical eram observadas ilhas de tecido

cartilaginosa interpostas entre a superfície endosteal e o tecido de preenchimento medular (Fig. 26A). O processo de neoformação óssea a partir da superfície córtico-endosteal era exuberante, em geral relacionado com alta atividade celular (Fig. 26B) e com a formação de cartilagem hialina. Embora grande parte do preenchimento da cavidade medular do enxerto fosse constituída por osso neoformado, este preenchimento não era uniforme e as traves não estavam estruturadas sob a forma de trama interconectada. Entretanto, o estroma relacionado com as traves ósseas era constituído por tecido conjuntivo frouxo vascularizado (Fig. 26C) contendo focos de adipogênese ou adipócitos maduros além de focos isolados de hematopoese (Fig. 26D). Este tipo de estroma, com características de estroma medular estabelecido, era observado apenas em relação com as traves ósseas neoformadas.

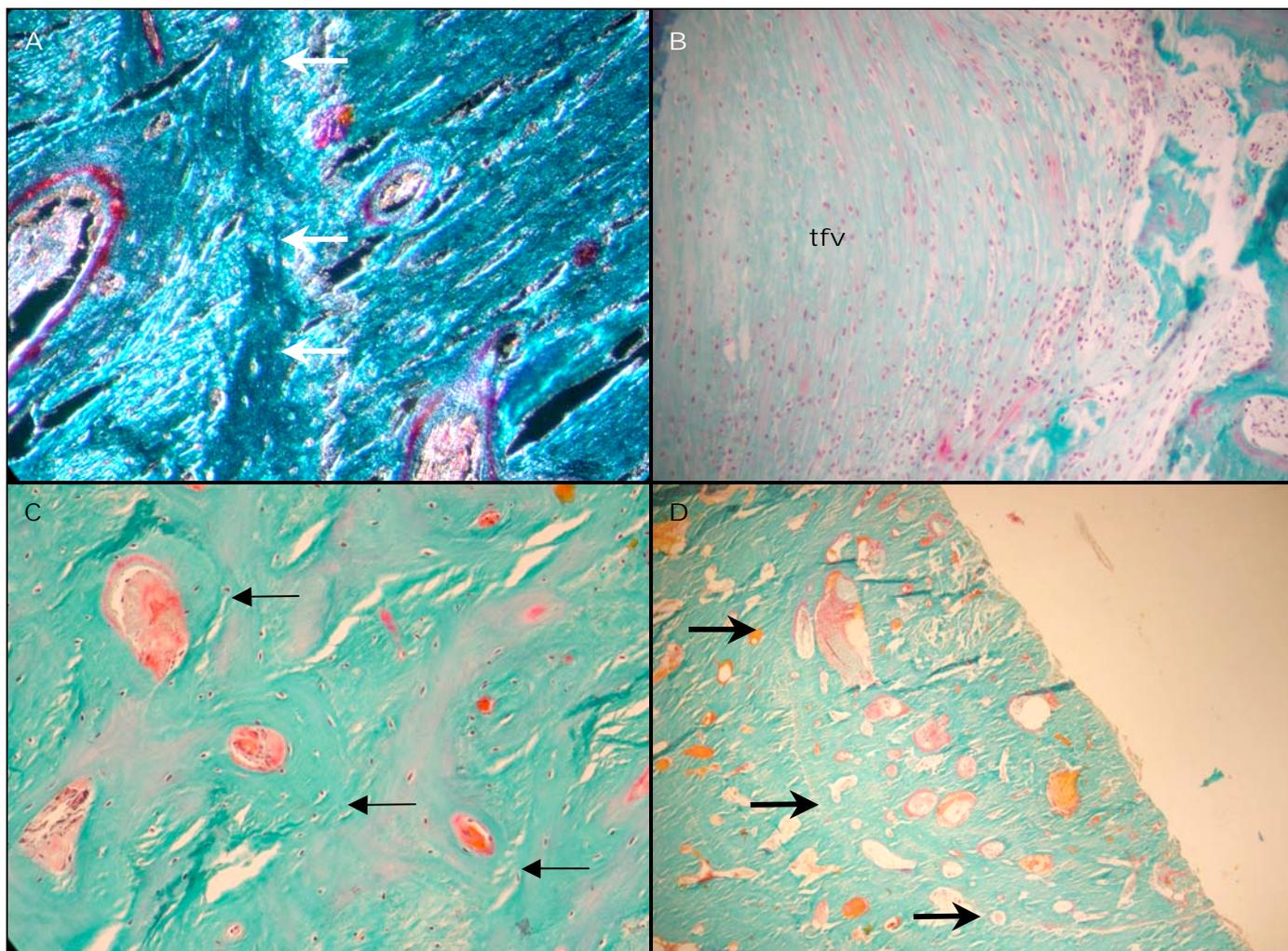


Figura 25 - Aspecto histológico do enxerto e da região de contato com o osso hospedeiro no animal COA 10+. (A) – Linha de fusão (setas) na interface distal entre o enxerto (direita) e o osso hospedeiro (esquerda). (B) – Interface proximal entre o enxerto e o osso hospedeiro preenchida por tecido conjuntivo fibro-vascular (tfv). (C) – Osso compacto do enxerto apresentando estruturas com morfologia de osteons. (setas). (D) – Perfuração do osso compacto da cortical preenchida por osso neoformado (setas na parede interna do orifício).

(A) 10x luz polarizada, (B) 4x, (C) 10x, (D) 4x. Tricrômico de Goldner para inclusão em resina.

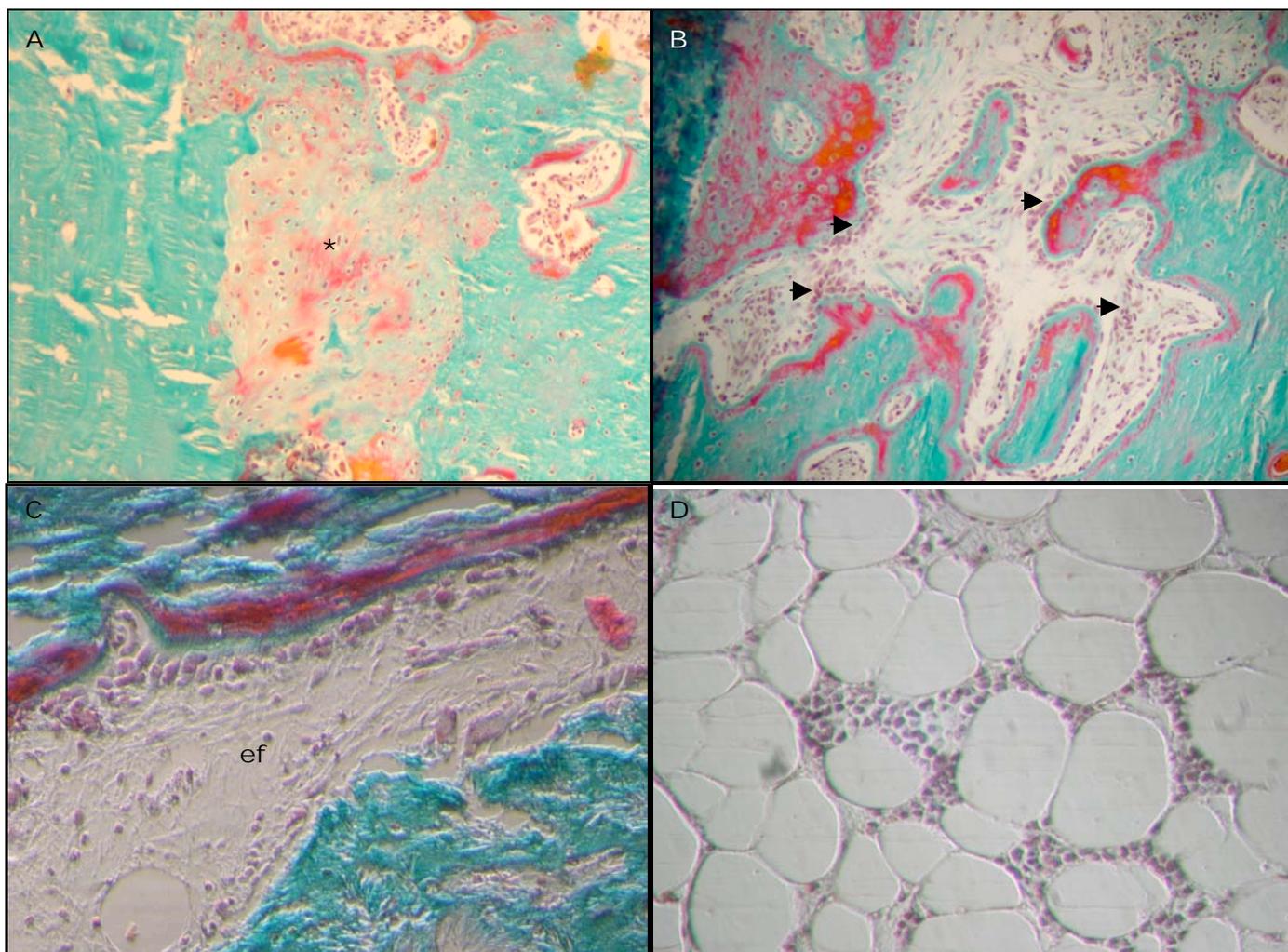


Figura 26 - Aspecto histológico do enxerto e da região de contato com o osso hospedeiro no animal COA 10+. (A) - Ilha de tecido cartilaginoso (\*) interposta entre a superfície do enxerto (esquerda) e a cavidade medular (direita). (B) – Formação óssea exuberante no interior do canal medular relacionada com grande número de osteoblastos ativos (setas). (C) - Estroma conjuntivo frouxo (ef) vascularizado, com características de estroma medular, relacionado com as traves ósseas neoformadas. (D) – Recomposição da medula óssea gordurosa e hematopoética no tecido de preenchimento da cavidade medular (A) 10x, (B) 10X, (C) 40x, (D) 20x. Tricrômico de Goldner para inclusão em resina.

As principais características histológicas do enxerto retirado do animal COA 10- estão resumidas nas figuras 27 e 28.

Como no animal COA 10+, o enxerto e o bordo distal do osso hospedeiro estavam unidos. A união entre os dois segmentos era representada por osso trabecular bem estruturado com maior atividade celular de formação a partir do bordo do osso hospedeiro (Fig. 27A). No bordo proximal do enxerto, como no animal COA 10+, o preenchimento em grande parte era constituído por tecido conjuntivo fibro-vascular, com pouca ou nenhuma relação com formação óssea (Fig. 27B).

Da mesma forma como nos animais do grupo anterior (COA 6), a principal diferença observada entre os dois animais deste ponto de observação (10 semanas) foi no tecido do preenchimento do enxerto. Enquanto no animal COA 10+ a maior parte do tecido presente na cavidade medular do enxerto era representado por osso neoformado, no animal não celularizado (COA 10-) observavam-se extensas áreas de tecido conjuntivo fibrovascular, relacionado com cavidades vazias que correspondiam ao espaço ocupado pelo osso esponjoso enxertado, já reabsorvido, ou que estava sendo ativamente reabsorvido por osteoclastos (Fig. 27C). O estroma circunjacente era representado por tecido conjuntivo fibro-vascular com pouca ou nenhuma atividade osteogênica.

O componente ósseo do preenchimento do espaço medular era representado por poucas traves ósseas formadas a partir do bordo do osso hospedeiro na região da osteotomia (Fig. 27D), a partir da superfície cortico-endosteal (Fig. 28A) ou ainda por ossificação intramembranosa

(Fig. 28B). A recomposição do estroma e do tecido medular acompanhou a formação das traves ósseas (Fig. 28B).

Embora não tenha sido observado, como no animal COA 10+, a reestruturação completa do tecido medular, com a presença de adipócitos adultos, elementos celulares da linhagem hematopoética e rede vascular/sinusoidal bem desenvolvida, os focos de adipogênese eram freqüentes (Fig. 28C). Nestes focos, os adipócitos eram pouco numerosos, não preenchendo o espaço entre as traves ósseas e apresentavam características de células jovens com núcleos vesiculosos e citoplasma pouco desenvolvido (Fig. 28D).

O osso compacto do enxerto apresentava neoformação óssea periosteal e endosteal pouco exuberante e descontínua. O preenchimento dos orifícios era constituído por quantidades variáveis de osso neoformado e tecido conjuntivo fibro-vascular que penetrava para a região juxta-cortical, sem extensão para as regiões centrais do canal medular.

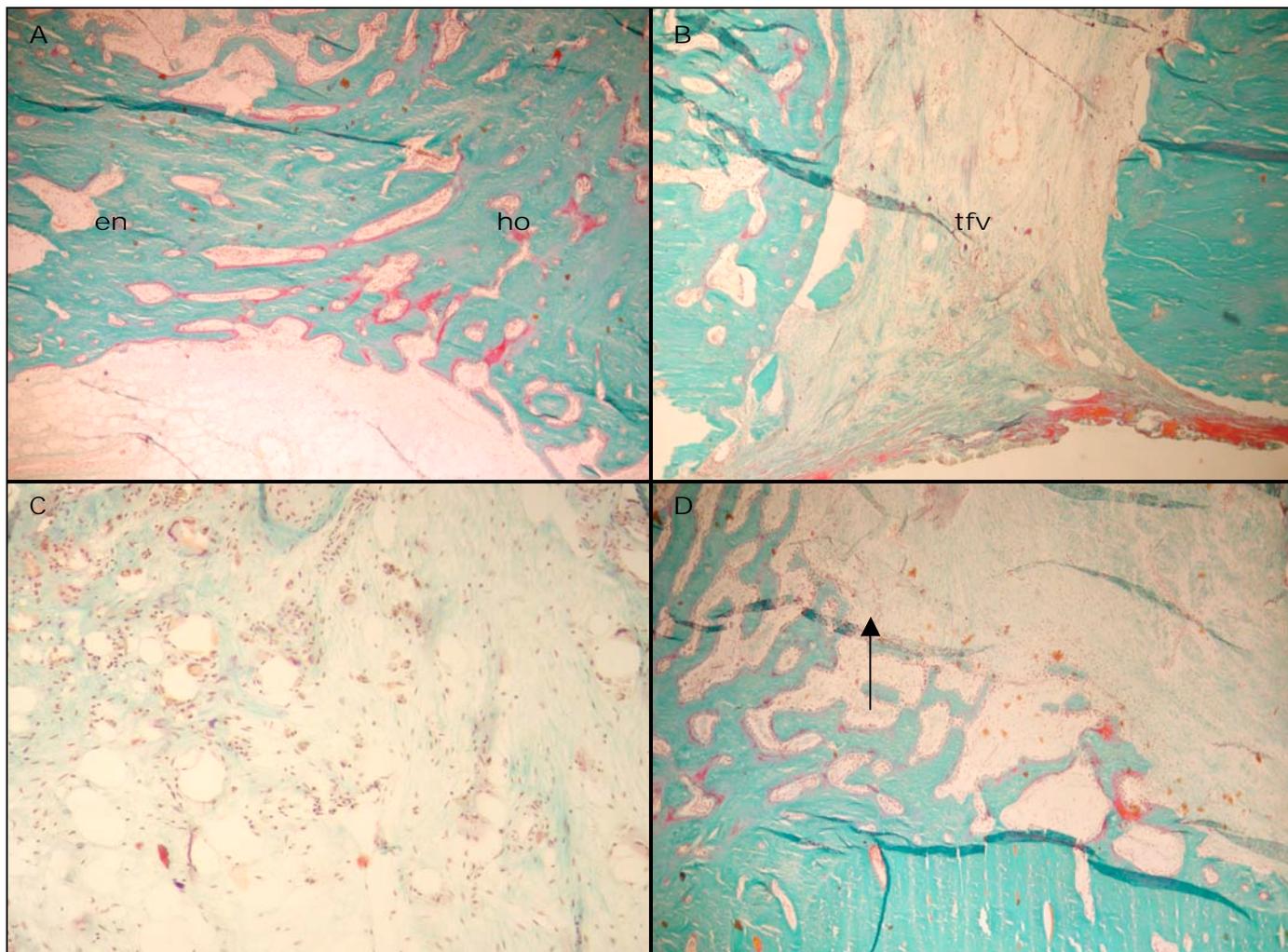


Figura 27 - Aspecto histológico do enxerto e da região de contato com o osso hospedeiro no animal COA 10 -. (A) – Interface proximal entre o enxerto (en) e o osso hospedeiro (ho), unida por osso neoformado. (B) – Interface distal do enxerto preenchida por tecido conjuntivo fibro-vascular (tfv). (C) – Restos de osso esponjoso homólogo sendo ativamente reabsorvidos por osteoclastos sem evidências de acoplamento com formação óssea. (D) - Neoformação óssea na interface proximal do enxerto, a partir do osso hospedeiro, no sentido da porção superior do canal medular (seta).

(A) 4x, (B) 4x, (C) 10x, (D) 4x. Tricrômico de Goldner para inclusão em resina

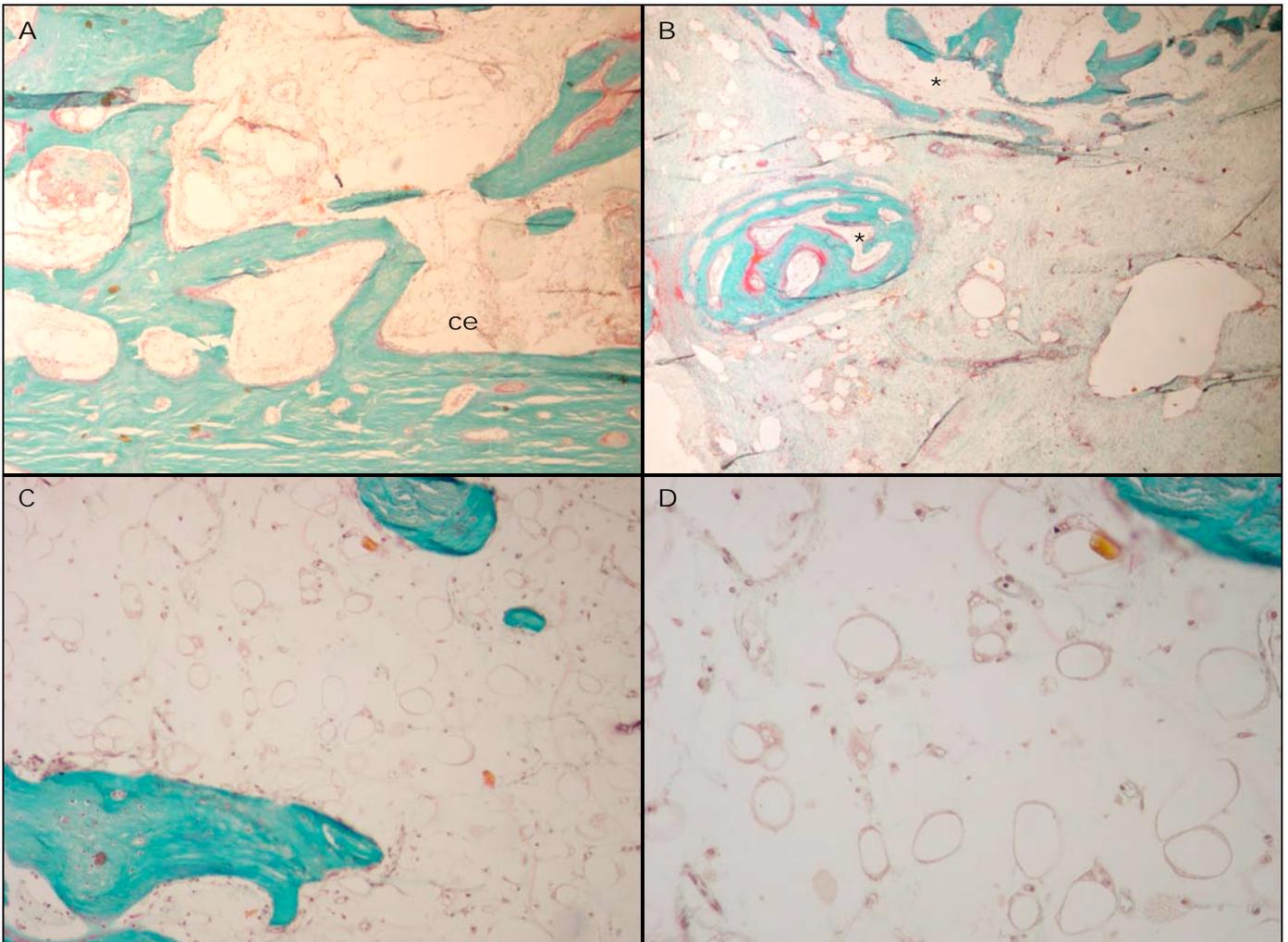


Figura 28 - Aspecto histológico do enxerto e da região de contato com o osso hospedeiro no animal COA 10 - . (A) – Neoformação óssea a partir da superfície cortico-endosteal (ce) com pequena extensão medular. (B) – Focos isolados de formação óssea e de estroma medular (\*) no tecido conjuntivo do preenchimento do enxerto. (C) – Focos de adipogênese no espaço medular em relação com traves ósseas neoformadas. (D) – Detalhe dos adipócitos jovens em meio a estroma frouxo com poucos elementos celulares. (A) 4x, (B) 4x, (C) 10x, (D) 20x. Tricrômico de Goldner para inclusão em resina.

Tabela 3 – Análise histológica do enxerto e das extremidades proximal e distal do osso hospedeiro nos animais sacrificados 10 semanas após a criação do defeito segmentar e enxertia com osso homólogo (Figuras 25-28).

	COA 10+	COA 10-
<i>Contato enxerto osso hospedeiro</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fusão completa do enxerto com o osso hospedeiro na interface distal (Fig. 25A). Na proximal a zona de contato está preenchida por osso neoformado e de tecido conjuntivo fibrovascular (Fig. 25B).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Parte da interface distal preenchida por tecido conjuntivo denso, recoberto externamente por periósteo (Fig. 27B). Na extremidade proximal observa-se união do osso hospedeiro ao enxerto (Fig. 27A).</li> </ul>
<i>Osso Cortical</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Orifícios preenchidos por osso neoformado remodelado (Fig. 25D).</li> <li>- Estruturação do osso compacto em osteons (Fig. 25C).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Orifícios preenchidos por quantidades variáveis de osso neoformado e tecido conjuntivo.</li> </ul>
<i>Espaço Medular</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Preenchimento não uniforme constituído por neoformação óssea com alta atividade celular (Fig. 26B e 26C) tecido conjuntivo com e sem atividade osteogênica e ilhas de cartilagem hialina (Fig. 26A).</li> <li>- Medula óssea gordurosa com focos de atividade hematopoética (Fig. 26D).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Preenchimento por tecido fibrovascular contendo cavidades vazias sem (Fig. 27C) e com (Fig. 28B) relação com focos esparsos de osteogênese.</li> <li>- Pequena neoformação óssea a partir da superfície cortico-endosteal (Fig. 28A) e do osso hospedeiro (Fig. 27D).</li> <li>- Focos de adipogênese (Fig. 28D e 28C) sem atividade hematopoética.</li> </ul>

E  
N  
X  
E  
R  
T  
O

Os principais achados histológicos considerados na análise comparativa entre os animais COA 14+ e COA14- estão ilustrado nas figuras 29-32 e resumidos na tabela 4.

Como nos animais dos dois grupos anteriores, as principais diferenças entre os animais COA 14+ e COA 14- está na constituição do tecido do preenchimento do espaço medular.

No animal COA 14+ ambas as interfaces do enxerto estavam preenchidas por osso neoformado, estabelecendo a união entre o osso enxertado e o osso nativo (Fig. 29A). Estes achados confirmam a consolidação observada no RX, nas osteotomias proximal e distal (Fig. 14). Além de promover a união entre as duas extremidades ósseas, o osso neoformado nestas duas regiões penetra para o interior do enxerto, contribuindo para o preenchimento ósseo do canal medular na região adjacente ao enxerto (Fig. 29B). Além da contribuição da neoformação óssea a partir das osteotomias, traves ósseas também se formaram a partir da superfície cortico-endosteal (Fig. 29C) e do tecido conjuntivo osteogênico depositado no interior do enxerto cortical (Fig. 29D). Independentemente da origem da neoformação óssea, uma vez ocorrida, observou-se que o estroma circunjacente as traves ósseas adquiria características morfológicas de estroma medular (Fig. 29D). Neste tecido medular neoformado, além da recomposição da medula óssea gordurosa (Fig. 30A), eram evidentes focos de repovoamento por elementos das linhagens hematopoéticas (Fig. 30B).

Um outro aspecto da neoformação óssea no espaço medular foi a organização das traves sob a forma de trama reticular interconectada, (Fig. 30C) recobertas em alguns segmentos por rebordos osteóide de várias espessuras, quase sempre relacionados com osteoblastos volumosos (Fig. 30D). O aumento da população e da atividade osteoblástica, identificadas através da deposição de quantidades significativas de matriz osteóide, confirma a presença de um processo ativo de formação óssea, onde a atividade biológica ou *turnover* tecidual é alto. Neste ponto não foram mais observados restos de enxerto esponjoso ou de medula hematopoética homóloga. Os orifícios do enxerto de osso cortical encontravam-se totalmente preenchidos por osso compacto remodelado.

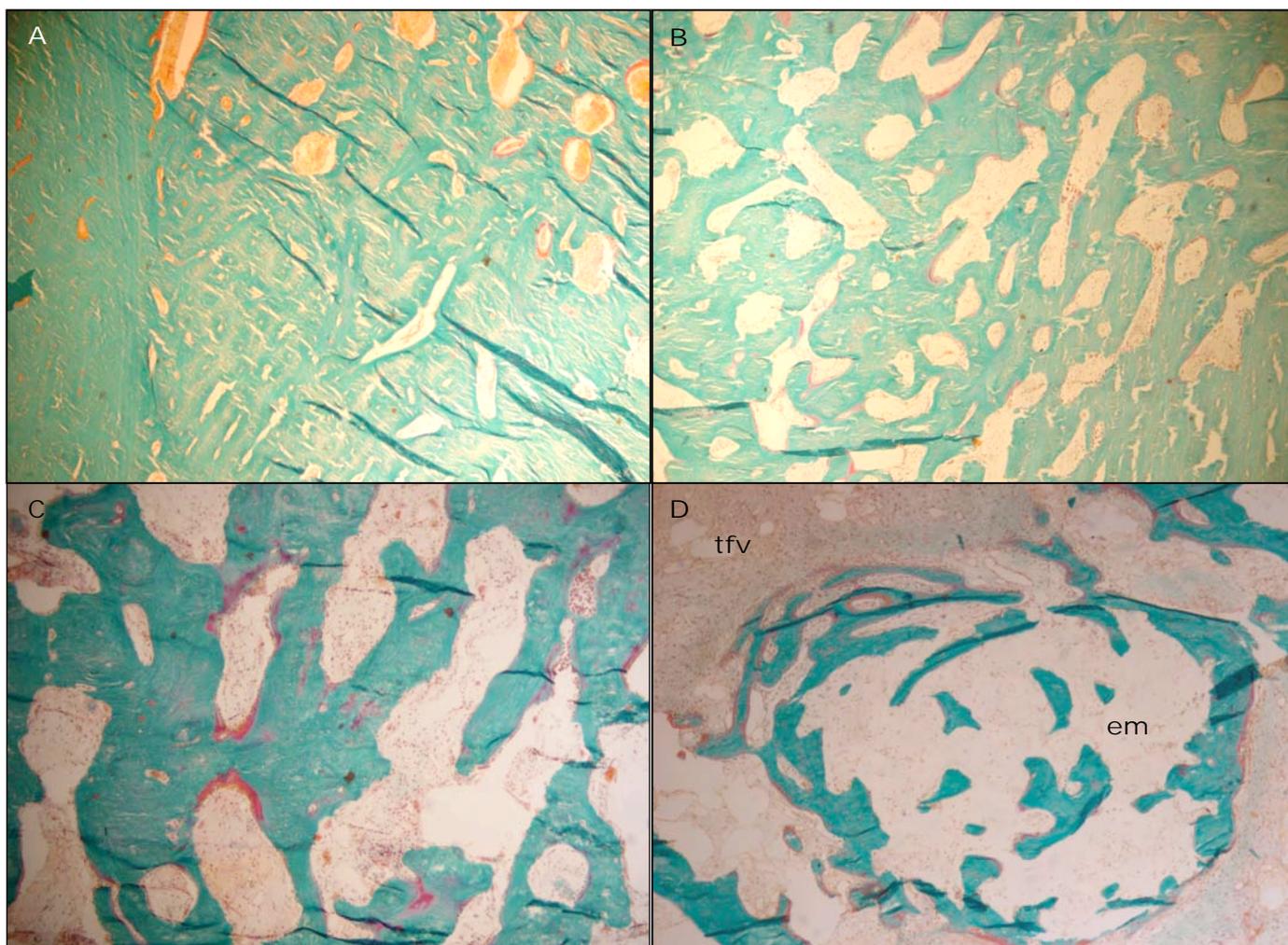


Figura 29- Aspecto histológico do enxerto e da região de contato com o osso hospedeiro 14 semanas após o procedimento no animal tratado com enxerto celularizado (COA 14+). (A) - Interface entre o enxerto e o osso hospedeiro preenchida por traves ósseas espessas. (B) - Osso neoformado na região da interface avançando para o interior do espaço medular. (C) - Aspecto do preenchimento medular. As traves ósseas apresentam um bom grau de conectividade e são circundadas por tecido conjuntivo frouxo, com características de estroma medular. (D) - Neoformação óssea a partir de precursores osteogênicos presentes no tecido conjuntivo intra-medular e recomposição do estroma medular (em). Comparar com o tecido fibro-vascular (tfv) circunjacente a neoformação óssea.

(A) 4x, (B) 4x (C) 20x, (D) 4x. Tricrômico de Goldner para inclusão em resina.

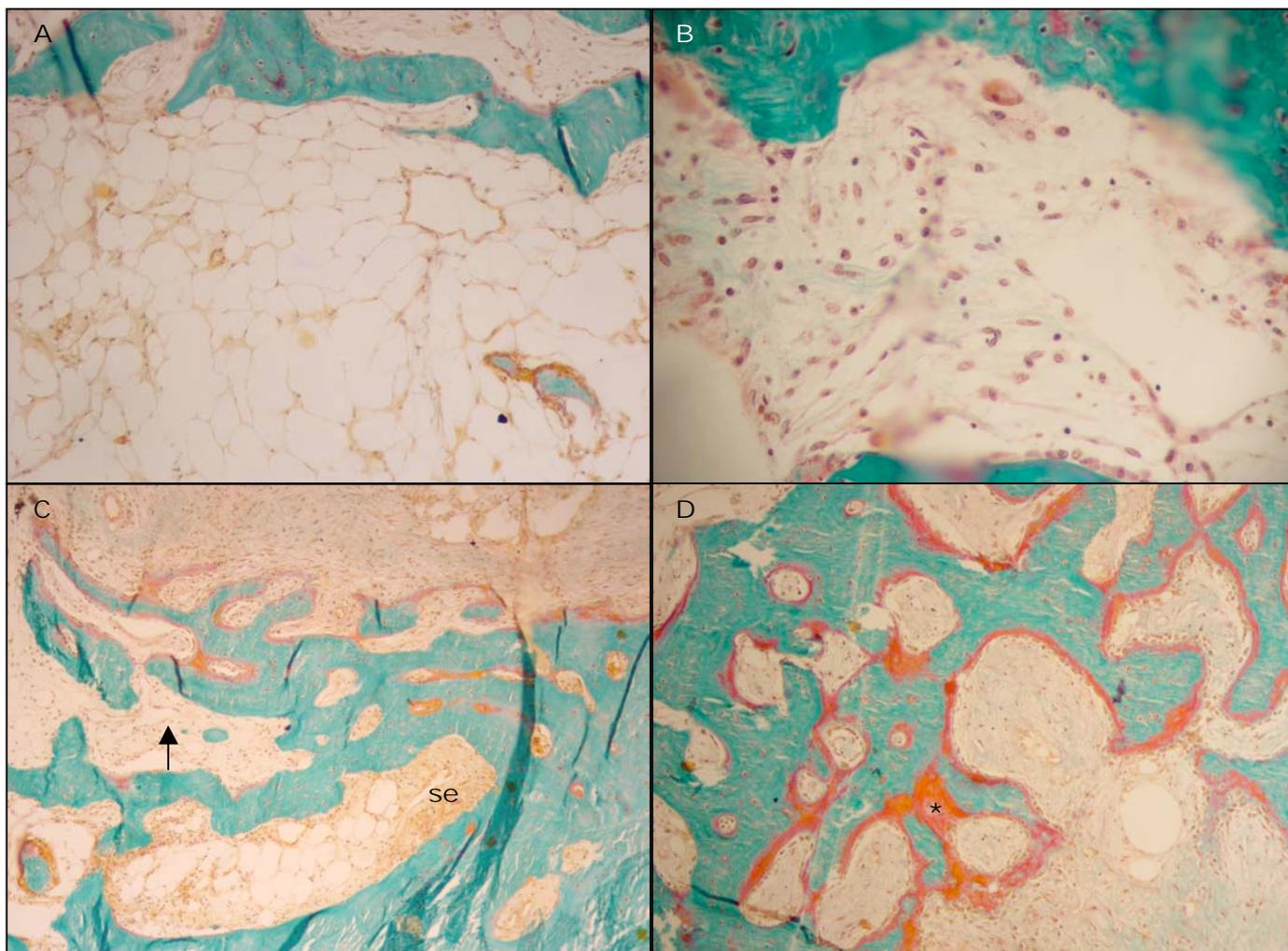


Figura 30- Aspecto histológico do enxerto e da região de contato com o osso hospedeiro 14 semanas após o procedimento no animal tratado com enxerto celularizado (COA 14+). (A) – Recomposição da medula óssea gordurosa entre as traves neoformadas. (B) - Células da linhagem hematopoética presentes no tecido estromal de medula óssea, reconstituído no interior do enxerto cortical. (C) – Neoformação óssea (seta) a partir da superfície endosteal (se) do enxerto. (D) - Formação óssea ativa no espaço medular do enxerto caracterizada por traves ósseas com rebordos osteóide (\*) com espessuras variáveis, em geral relacionados com osteoblastos cuboidais. (A)4x, (B) 20x, (C) 4x, (D) 4x. Tricrômico de Goldner para inclusão em resina.

No animal COA 14-, a semelhança do animal experimental COA 14+, as interfaces proximal e distal do enxerto estavam totalmente preenchidas por osso neoformado, sendo responsável pela união do enxerto ao osso hospedeiro (Fig. 31A). A formação óssea na região da interface proximal mostrava ainda continuidade com a formação óssea periosteal, que por sua vez, se estendia sobre a extremidade distal do segmento proximal da tibia. Uma outra característica da formação óssea nas interfaces do enxerto era a presença de atividade celular mais evidente no bordo voltado para o osso hospedeiro. Ainda em relação ao enxerto cortical, observou-se que a maior parte dos orifícios já se encontrava totalmente preenchida por osso compacto com atividade celular reduzida. Em alguns pontos o osso neoformado nos orifícios penetrava para o interior do espaço medular, contribuindo para o seu preenchimento (Fig. 31B).

No animal COA 14- o preenchimento medular não ocorreu de forma homogênea e diferiu em função da proximidade com os bordos do osso hospedeiro. Nas regiões imediatamente adjacentes às interfaces do enxerto, o espaço medular estava preenchido principalmente por tecido conjuntivo denso contendo cavidades vazias e vasos neoformados. A neoformação óssea nesta região era moderada e se originava tanto da superfície endosteal do enxerto como das interfaces com o osso hospedeiro. O preenchimento do espaço medular, na porção central do enxerto, era constituído tanto

por tecido conjuntivo pouco denso, sem associação com neoformação óssea (Fig. 31C) como por tecido conjuntivo denso osteogênico relacionado com os estágios iniciais da formação de traves ósseas (Fig. 31D). Nas regiões do canal medular, onde ainda estavam presentes restos de medula óssea homóloga, o tecido conjuntivo circunjacente não tinha caráter osteogênico (Fig. 32A).

De uma forma global, neste animal os focos de neoformação óssea não eram extensos e se localizavam na porção superficial da interface cortico-endosteal (Fig. 31D). Além desta origem, a neoformação óssea ocorria também em escala reduzida, sobre os restos de enxerto homólogo de osso esponjoso (Fig. 32B) por vezes incluindo restos de medula óssea gordurosa homóloga (Fig. 32C). Neste caso, os restos do enxerto esponjoso desvitalizado, funcionaram como suporte para a neoformação óssea. No restante da cavidade ainda eram observados restos de osso esponjoso sendo ativamente reabsorvido por osteoclastos multinucleados e pequenos focos isolados de adipogênese e de medula óssea gordurosa, sem evidências de hematopoese (Fig. 32D).

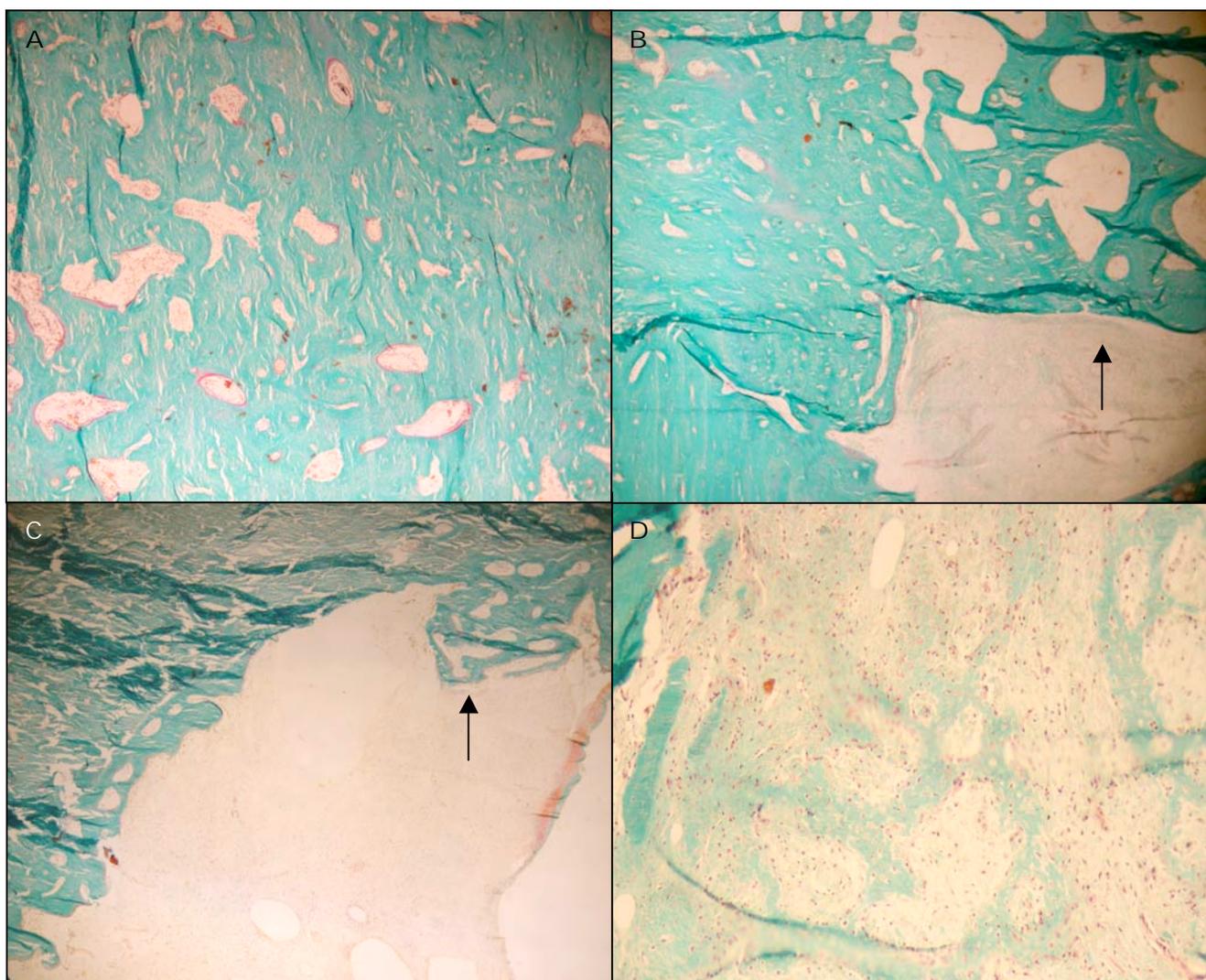


Figura 31 - Aspecto histológico do enxerto e da região de contato com o osso hospedeiro no animal COA 14-. (A) – Interface totalmente preenchida por osso resultando na união do enxerto com o osso hospedeiro. (B) – Projeção de neoformação óssea (seta) a partir de um orifício da cortical, se estendendo para o espaço medular. (C) – Preenchimento do espaço medular do enxerto por tecido conjuntivo sem potencial osteogênico, exibindo pequena neoformação óssea a partir da superfície endosteal (seta). (D) – Preenchimento do espaço medular do enxerto por tecido conjuntivo com atividade osteogênica e travess ósseas em fase inicial de formação. (A) 4x, (B) 4x, (C) 4x, (D) 4x. Coloração pelo Tricrômico de Goldner para inclusão em resina.

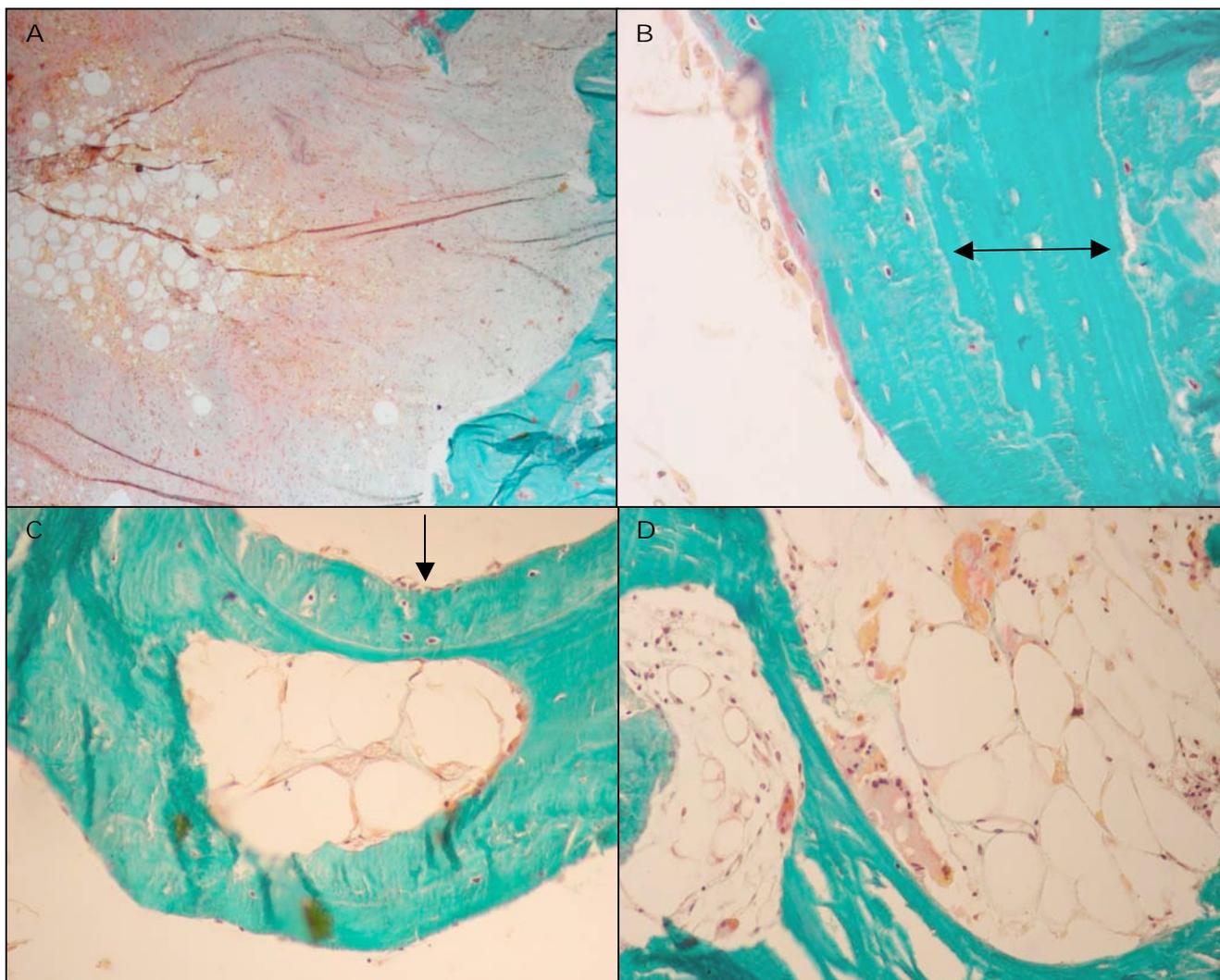


Figura 32 - Aspecto histológico do enxerto e da região de contato com o osso hospedeiro no animal COA 14-. (A) – Restos de medula óssea homóloga em meio a tecido conjuntivo sem atividade osteogênica. (B) – Detalhe de uma trave óssea neoformada na cavidade medular, constituída centralmente por osso homólogo desvitalizado (seta), com lacunas osteocíticas vazias, parcialmente recoberta por osso mineralizado viável e por osteoblastos. (C) – Restos de medula óssea homóloga e osso desvitalizado envolvidos por osso neoformado (seta). (D) – Estroma medular localizado em torno das traves ósseas neoformadas na cavidade medular com focos de adipogênese e adipócitos maduros sem evidências de hematopoese. (A) 4x, (B) 20x, (C) 10x, (D) 10x. Coloração pelo Tricrômico de Goldner para inclusão em resina.

Tabela 4 – Análise histológica do enxerto e das extremidades proximal e distal do osso hospedeiro nos animais sacrificados 14 semanas após a criação do defeito segmentar e enxertia com osso homólogo (Figuras 29-32).

	<i>COA 14+</i>	<i>COA 14-</i>	
<i>E N X E R T O</i>	<i>Contato enxerto osso hospedeiro</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- União completa com o osso hospedeiro, através do preenchimento das interfaces do enxerto por tecido ósseo (Fig. 29A) que se estende para o canal medular adjacente (Fig. 29B).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Interfaces do enxerto unidas ao osso hospedeiro (Fig. 31A).</li> </ul>
	<i>Osso Cortical</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Orifícios preenchidos por osso neoformado.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Orifícios em geral preenchidos por osso neoformado que ocasionalmente se estende para a região medular (Fig. 31B).</li> </ul>
	<i>Espaço Medular</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Preenchimento por traves ósseas neoformadas a partir do endóstio (Fig. 29C) ou por diferenciação osteogênica do tecido conjuntivo (Fig. 29D).</li> <li>- Traves organizadas em rede tridimensional (Fig. 30C) e com alta atividade celular (Fig. 30D).</li> <li>- Recomposição do estroma medular (Fig. 29D), da medula óssea gordurosa (Fig. 30A) e de focos isolados de hematopoese (Fig. 30B).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Preenchimento por quantidades variáveis de tecido conjuntivo, com (Fig. 31D) ou sem relação (Fig. 31C) com osteogênese.</li> <li>- Restos de medula homóloga (Fig. 32A) e de osso esponjoso desvitalizado envolvido por osso neoformado (Fig. 32B e 32C).</li> <li>- Medula óssea gordurosa sem evidências de hematopoese (Fig. 32D).</li> </ul>

Os principais achados histológicos considerados na análise comparativa entre os animais COA 18+ e COA18- estão ilustrados nas figuras 33-36 e resumidos na tabela 5.

Após 18 semanas, no animal tratado com enxerto celularizado (COA 18+), a região das interfaces com o enxerto não eram mais identificáveis histologicamente. Neste período de tempo, como observado nas radiografias simples e na tomografia (Figs. 16 e 20), não apenas ocorreu a consolidação do enxerto em ambas as interfaces com o osso hospedeiro como houve remodelação completa do calo ósseo. O osso compacto na região do enxerto era constituído por estruturas com características morfológicas de osteons (Fig. 33A) com deposição concêntrica de osso lamelar e osteócitos em torno de estruturas vasculares (Fig. 33B). Com a finalização do processo de consolidação e remodelação do calo ósseo, as superfícies endosteal (Fig. 33C) e periosteal (Fig. 33D) não mostravam mais atividade celular, encontrando-se recobertas por fino rebordo osteóide sem relação com osteoblastos, que caracteriza as superfícies ósseas inativas ou em estado de latência.

O componente ósseo do preenchimento do espaço medular era representado por trabéculas ósseas em geral espessas, interconectadas e que promoviam o contato entre as duas superfícies endosteais (Fig. 34A). As superfícies das traves em geral se encontravam em estado de repouso e ocasionalmente exibiam alguns focos isolados com pequena atividade celular (Fig.34B).

O componente medular do preenchimento do canal era representado por estroma medular bem desenvolvido contendo adipócitos maduros (Fig.

34C) e alguns focos isolados de adipogênese. A reconstrução do espaço medular envolveu também a reconstituição focal da medula hematopoética, sendo possível identificar em diversos destes focos, elementos celulares jovens das linhagens monocítica, granulocítica e eritrocítica (Fig. 34D). A distribuição das traves ósseas e da medula óssea no interior do canal medular foi homogênea em toda a extensão do enxerto. Não eram mais visualizados restos de enxerto homólogo ou de orifícios patententes no osso compacto.

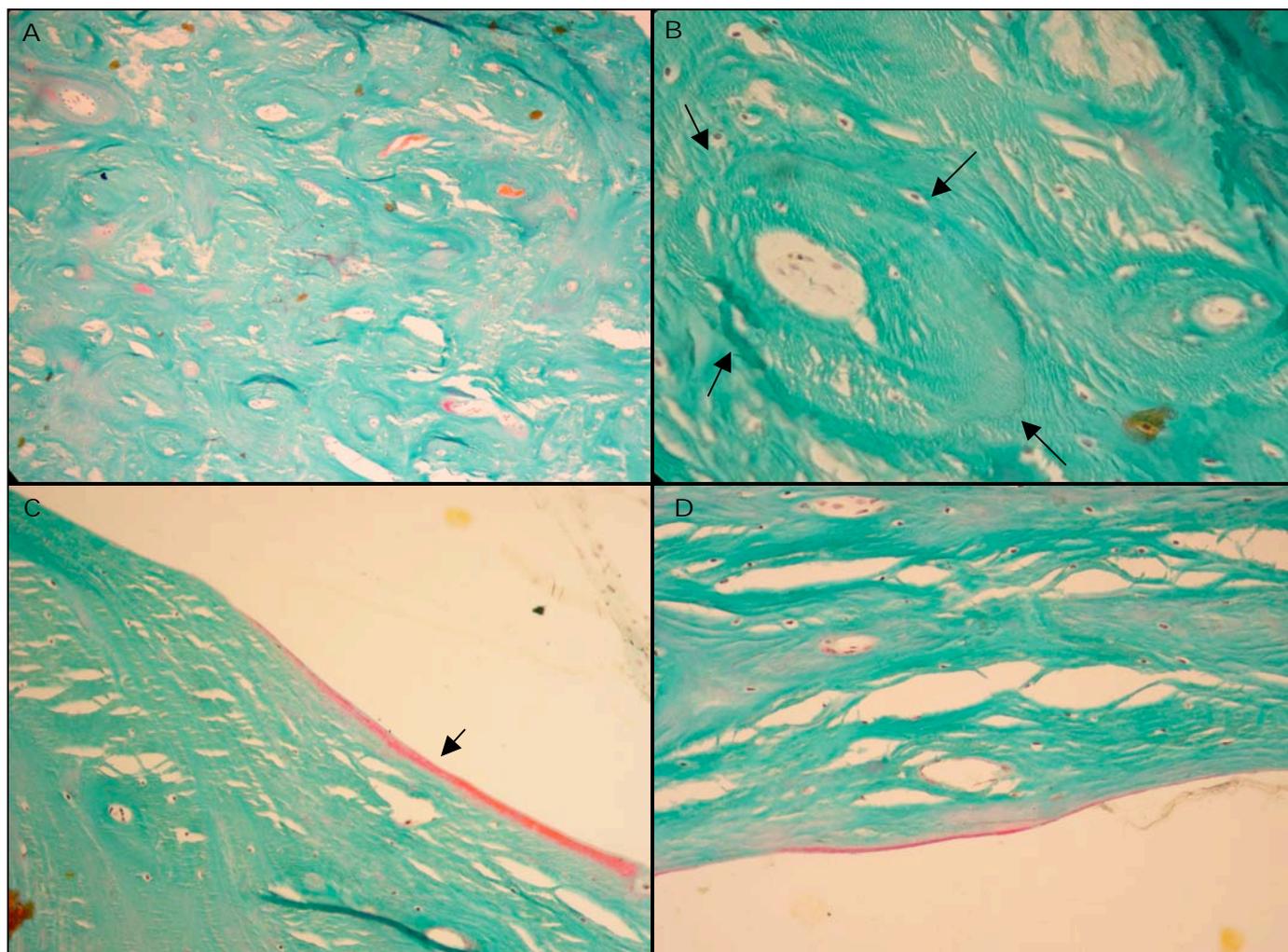


Figura 33 – Aspecto histológico do enxerto 18 semanas após a correção do defeito segmentar com enxerto homólogo celularizado com COA. (A) - Cortical do enxerto constituído por estruturas com características morfológicas de osteons. (B) – Detalhe dos osteons (setas) com disposição concêntrica das lamelas ósseas e osteócitos no interior de lacunas. (C) - Superfície cortico-endosteal em estado basal de repouso, recoberta por fino rebordo osteóide (seta). (D) - Superfície periosteal sem atividade celular, em estado de repouso.

(A) 4x, (B) 20x, (C) 10x, (D) 10x. Tricrômico de Goldner para inclusão em resina.

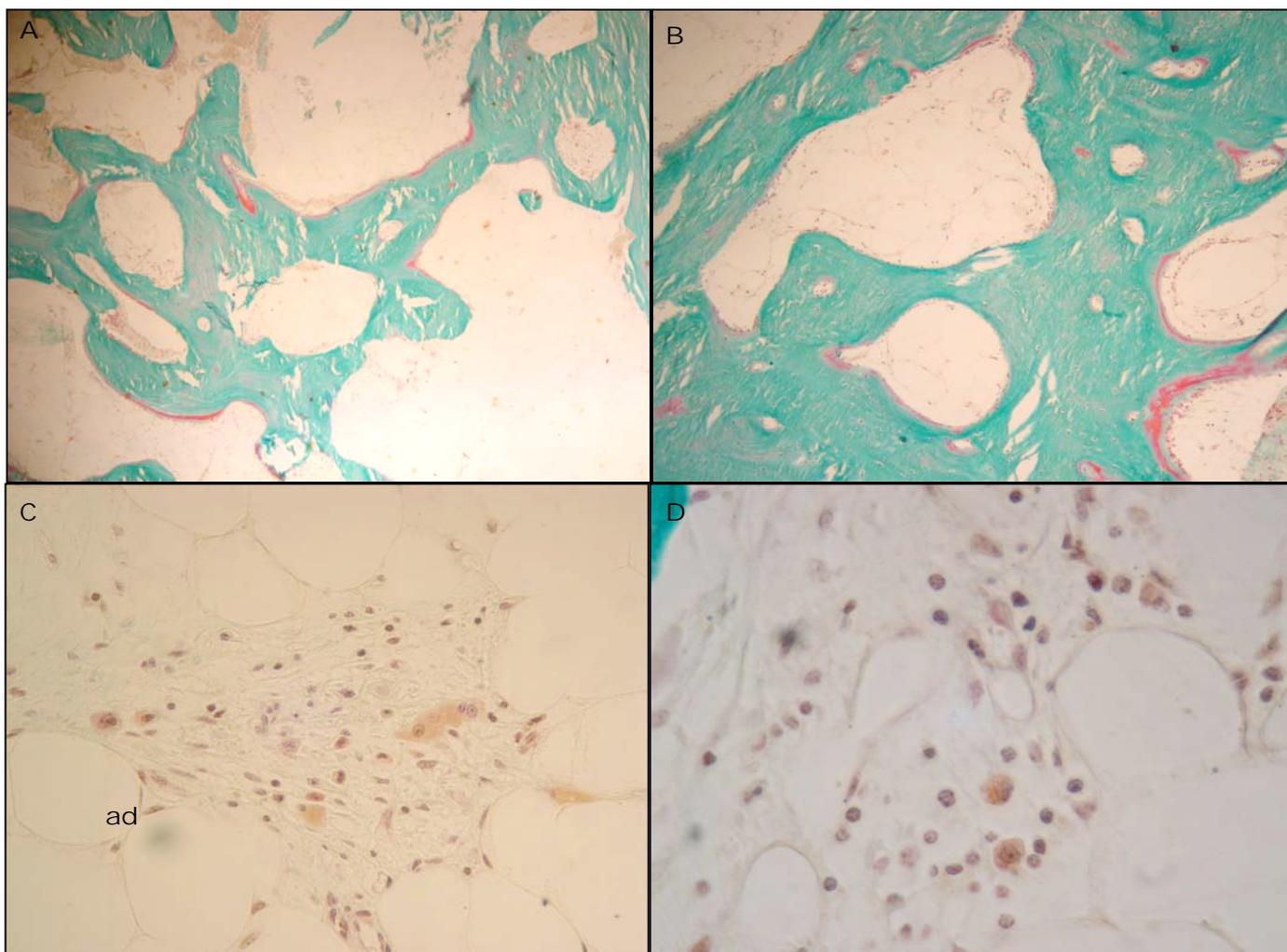


Figura 34 – Aspecto histológico do enxerto 18 semanas após a correção do defeito segmentar com enxerto homólogo celularizado com COA. (A) - Traves de osso esponjoso, conectadas entre si e promovendo o contato entre as duas superfícies cortico-endosteais. (B) – Detalhe das traves ósseas e do estroma medular no canal medular do enxerto. (C) – Foco de hematopoese com elementos celulares jovens das linhagens monocítica, granulocítica e eritrocítica ao lado de adipócitos (ad) maduros. (D) – Detalhe dos elementos celulares em foco de hematopoese no espaço medular do enxerto. (A) 4x, (B) 10x, (C) 20x, (D) 40x. Tricrômico de Goldner para inclusão em resina.

A comparação entre os dois animais sacrificados após 18 semanas mostrou diferenças importantes no padrão e na evolução temporal do processo de reparo ósseo no local do enxerto. No animal COA 18- a interface distal encontrava-se preenchida por uma mistura de traves ósseas neoformadas, tecido fibrovascular e ilhas de cartilagem hialina (Fig. 35A). Na outra interface, a união com o osso hospedeiro aparentemente encontrava-se num estágio mais adiantado e era constituída por osso neoformado e tecido conjuntivo osteogênico (Fig. 35B).

Ao contrário do que foi observado no animal COA 18+, onde o processo de remodelação do calo ósseo já estava concluído, no animal COA 18- a presença de reação periosteal recobrimdo grande parte do enxerto, incluindo a região das osteotomias, confirmou que o processo de consolidação do enxerto ainda estava em andamento (Fig. 35C). Um outro achado histológico que confirma a diferença no andamento do reparo ósseo entre os dois animais foi a permanência, no animal COA 18-, de alguns orifícios no osso compacto. Alguns destes orifícios mostravam preenchimento parcial por tecido conjuntivo jovem, intensamente vascularizado e traves ósseas neoformadas a partir do seu bordo interno (Fig. 35D).

No interior do enxerto o tecido do preenchimento não mostrava uniformidade na sua composição. Na porção mais central, o tecido era representado por traves ósseas formadas a partir da superfície cortico-

endosteal e do tecido conjuntivo intramedular e ainda por tecido conjuntivo fibrovascular não comprometido com osteogênese (Fig. 36A).

Nas regiões menos centrais do enxerto o tecido do preenchimento alternava entre traves ósseas espessas com atividade celular focal, bom padrão de conectividade e relacionadas com tecido conjuntivo com características de estroma medular e medula óssea gordurosa (Fig. 36B) com áreas representadas exclusivamente por tecido conjuntivo intensamente vascularizado, sem relação com formação óssea (Fig. 36C). Um outro constituinte do tecido do preenchimento medular eram restos de enxerto homólogo, incluindo medula óssea e traves de osso desvitalizado (Fig. 36D).

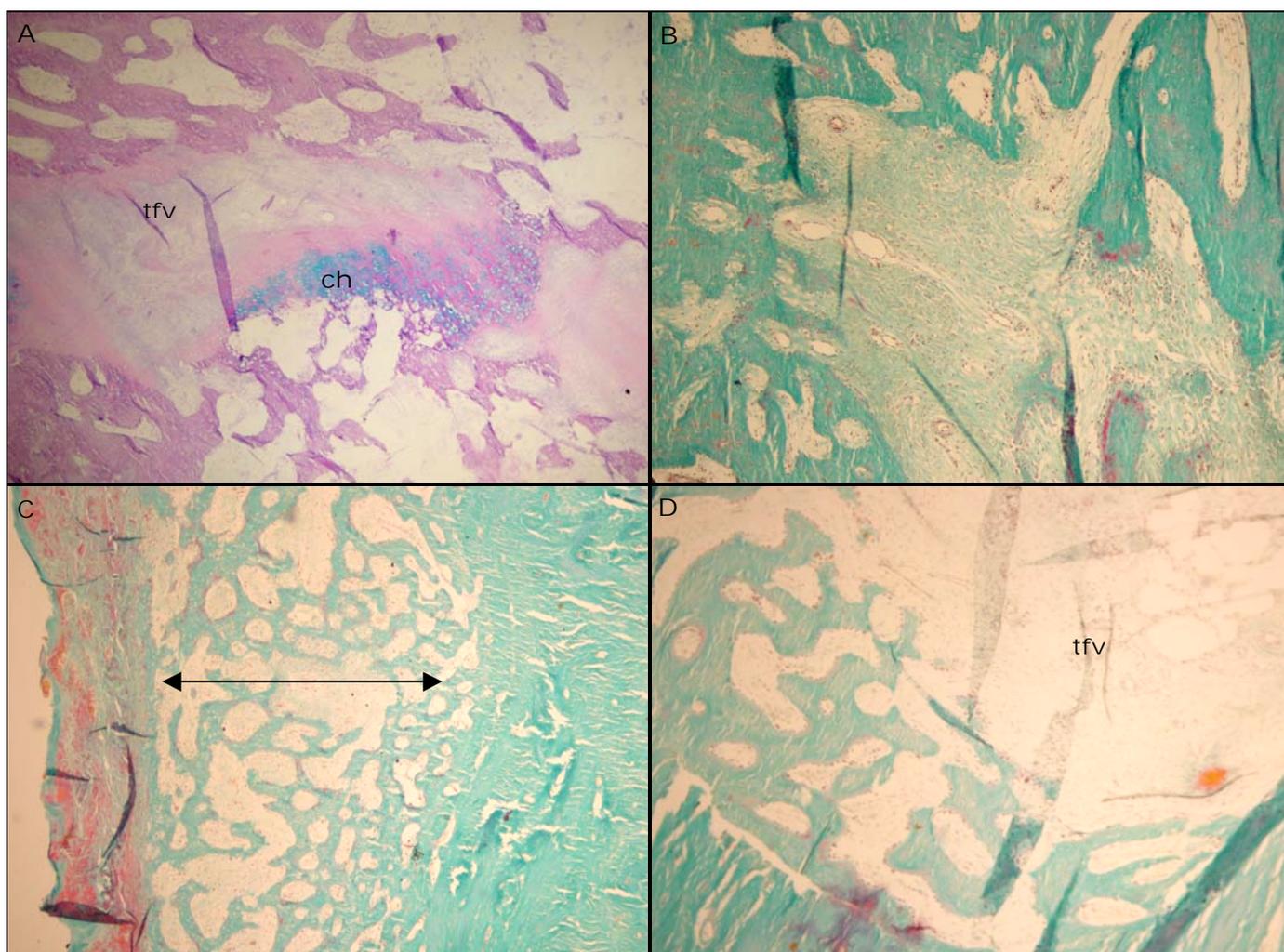


Figura 35 – Aspecto histológico do enxerto e da região de contato com o osso hospedeiro no animal COA 18-. (A) – Interface entre o osso hospedeiro e o enxerto preenchida por mistura de tecido ósseo neoformado, tecido conjuntivo fibro-vascular (tfv) e cartilagem hialina (ch). (B)- Outra interface preenchida predominantemente por osso neoformado e tecido conjuntivo osteogênico. (C) - Neoformação óssea periosteal (seta) sobre o enxerto cortical. (D) – Área correspondente ao orifício da perfuração do osso compacto do enxerto, parcialmente preenchido por osso neoformado e por tecido conjuntivo fibro-vascular (TFV). (A) 4x, (B) 4x, (C) 4x (D) 4x. Alcian Blue/PAS (A) e Tricrômico de Goldner para inclusão em resina.

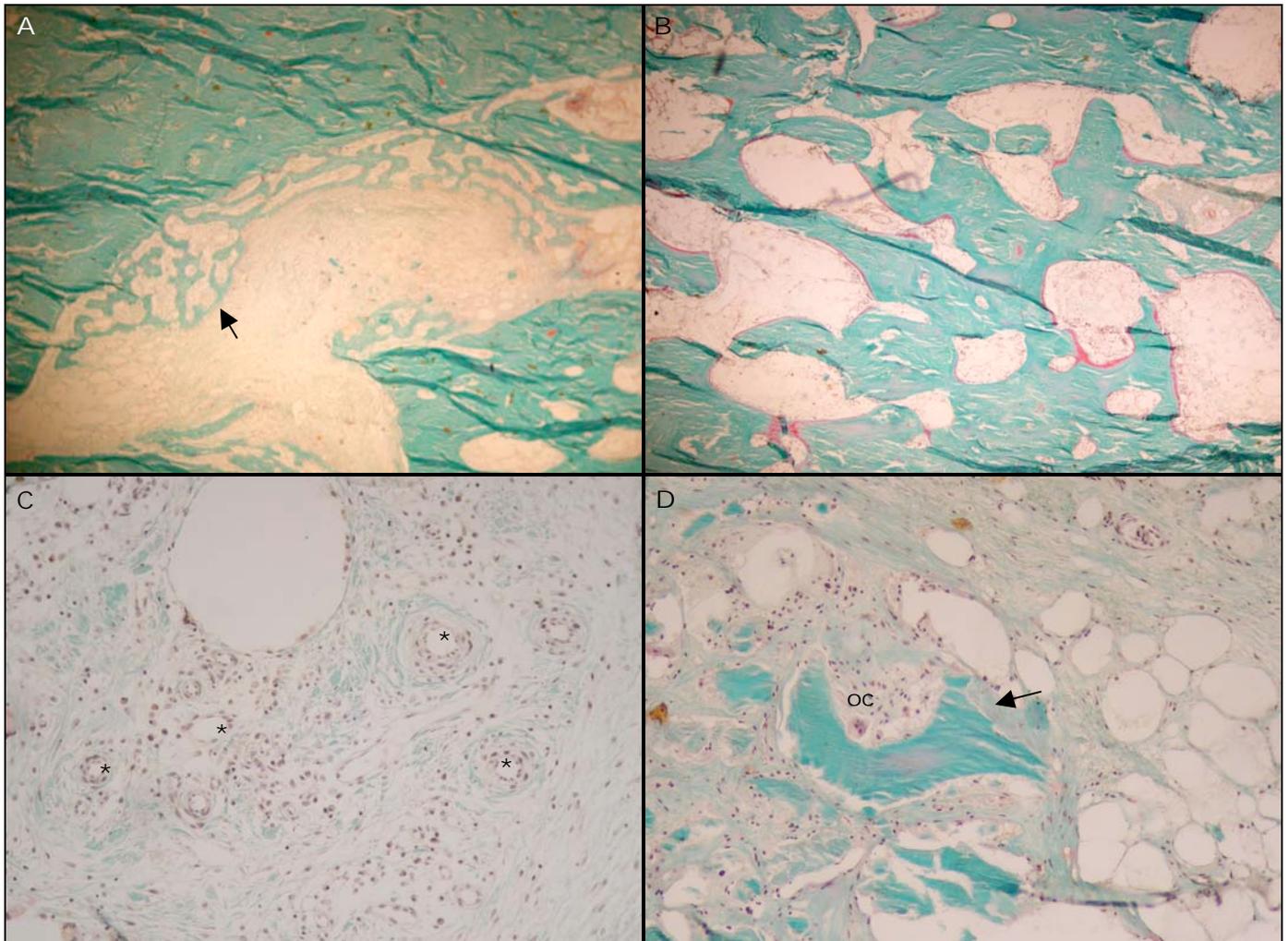


Figura 36 – Aspecto histológico do enxerto e da região de contato com o osso hospedeiro no animal COA 18-. (A) – Preenchimento do espaço medular constituído por quantidades variáveis de tecido conjuntivo fibro-vascular com atividade osteogênica e osso neoformado principalmente a partir da superfície cortico endosteal (seta). (B) – Detalhe da organização das traves ósseas no interior da cavidade medular. As traves são espessas, mostram bom grau de conectividade e são circundadas por tecido frouxo com características de estroma medular. (C) – Tecido conjuntivo intensamente vascularizado (\*), não osteogênico, presente em algumas regiões do espaço medular. (D) - Restos desvitalizados de enxerto de osso esponjoso homólogo (seta) que permaneceram no interior do espaço medular, sendo removidos por reabsorção osteoclástica (oc).

(A) x4, (B) x4, (C) x10, (D) x20. Tricrômico de Goldner para inclusão em resina.

Tabela 5 – Análise histológica do enxerto e das extremidades proximal e distal do osso hospedeiro nos animais sacrificados 18 semanas após a criação do defeito segmentar e enxertia com osso homólogo.

	<i>COA 18+</i>	<i>COA 18-</i>	
	<i>Contato enxerto osso hospedeiro</i>	- Cortical e medular do enxerto contínua com o osso hospedeiro.	- Quantidades variáveis de cartilagem hialina (Fig. 35A), tecido conjuntivo e osso neoformado (Fig. 35B).
<i>E N X E R T O</i>	<i>Osso Cortical</i>	- Osso compacto constituído por osteons (Fig. 33 A e 33B).  - Superfície periosteal e endosteal em repouso (Fig. 33C e 33D).	- Atividade periosteal (Fig. 35C)  - Orifícios parcialmente preenchidos por tecido conjuntivo (Fig. 35D).
	<i>Espaço Medular</i>	- Traves ósseas conectadas entre si, restabelecendo contato entre as duas superfícies cortico-endosteais (Fig. 34A).  - Baixa atividade de remodelação óssea (Fig. 34B).  - Medula óssea gordurosa madura com focos de hematopoese (Fig 34C e 34D).	- Osso neoformado a partir das superfícies cortico-endosteais (Fig. 36A e 36B)  - Tecido conjuntivo não osteogênico (Fig. 36C).  - Restos de enxerto esponjoso (Fig. 36D).  - Adipogênese focal.

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que grandes defeitos diafisários podem ser eficientemente tratados com enxertos homólogo irradiado em associação com fixação externa e que células osteoprogenitoras autólogas, quando adicionadas a estes enxertos, aceleram a neoformação óssea, a incorporação e a remodelação do enxerto em defeitos segmentares diafisários e não desencadeiam reações adversas locais ou sistêmicas. Os resultados também demonstraram que a adição de células precipita a substituição do osso enxertado por tecido ósseo esponjoso, cortical ou medula óssea. Neste estudo, o modelo experimental utilizando mamífero de médio porte mostrou-se uma eficiente opção para avaliação de tratamento das perdas ósseas extensas na diáfise tibial.

### 5.1 - Considerações sobre o modelo

A escolha pela utilização de ovelhas neste modelo experimental - tratamento de defeitos diafisários com enxertos homólogos - foi feita baseada no fato de que o esqueleto destes animais sofre a influência de forças biomecânicas semelhantes ao ser humano. Além disso, pelo fato das ovelhas serem animais filogeneticamente evoluídos, o processo de reparo ósseo é muito semelhante ao humano (GEUSENS et al., 1996). Por este conjunto de características, as ovelhas são consideradas modelos animais

ideais para reproduzir as doenças do aparelho locomotor especialmente o processo de consolidação de fraturas.

Na tentativa de criar o cenário mais desafiador para a consolidação de uma fratura, escolhemos o terço médio da tíbia como local para criação do defeito ósseo a ser tratado com enxerto homólogo e avaliar o papel da associação de células osteoprogenitoras autólogas na evolução do processo de consolidação. A particularidade desta região está relacionada com seu suprimento sanguíneo precário e por estar localizada excentricamente muito próxima da pele, quando comparada com ossos concêntricos circundados por grande massa muscular e com abundante suprimento vascular como o fêmur (COLLINGE et al., 2000). Além disso, a dissecação agressiva como a executada para a criação do defeito ósseo mimetiza o trauma decorrente de uma fratura exposta grave, que causa dano extenso a vascularização local, o que não só amplia muito o risco de não consolidação como também diminui a capacidade biomecânica do segmento ósseo desta região (WHITESIDE e LESKER, 1978). Este tipo de lesão óssea e também as falhas ósseas causadas por tumores, seriam as principais indicações para o uso do enxerto homólogo em conjunto com as células osteoprogenitoras autólogas.

O fixador externo foi considerado um excelente implante para estabilização da correção do defeito ósseo. Com este tipo de fixação todos os animais foram liberados para deambular imediatamente após o procedimento cirúrgico sem necessidade de utilizar métodos restritivos ou

que impedissem a ação de cargas sobre o membro operado. A marcha dos animais inicialmente era claudicante com melhora progressiva durante as primeiras semanas, não havendo diferença clínica entre os animais tratados com e sem células.

Trabalhos prévios relatam a utilização de placas e parafusos, com o propósito de atingir a estabilização de enxertos celularizados no tratamento de defeitos segmentares (BRUDER et al., 1998; ARINZEH et al., 2003; LUCARELLI et al., 2005; BRODKE et al., 2006). Com este tipo de implante a estabilização alcançada é absoluta, com ocorrência de consolidação primária, sem a participação direta dos progenitores mesenquimais localizados na região sub-periosteal. A remodelação do osso compacto e a recomposição do sistema harvesiano ocorrem diretamente sem que as células do hematoma fraturário tenham participação ativa na consolidação (BUCKWALTER et al., 2006).

Já a montagem utilizada com fixador externo, alcança uma estabilidade relativa dependendo da formação de calo ósseo pelas células presentes ao redor do foco de fratura para que ocorra a consolidação. Assim, no nosso entender, a melhor forma de avaliar o possível papel das células osteoprogenitoras autólogas na consolidação de defeitos ósseos é estabilizando esses defeitos com implantes que promovam a consolidação secundária e não primária. Além disso, a utilização da placa, que implica na presença de parafusos no interior do enxerto prejudicaria a avaliação tomográfica e histológica. A haste intramedular também poderia ser utilizada

para fixação, mas o fato deste implante ocupar o canal medular não permitiria a utilização do enxerto ósseo homólogo esponjoso como suporte para os osteoprogenitores autólogos. Neste estudo, o uso do fixador externo mostrou ser uma forma eficaz de manter as células e o enxerto ósseo inviolados durante a fixação.

Como citado anteriormente, o fixador externo é considerado um estabilizador relativo uma vez que permite micro-movimentos no foco de descontinuidade óssea. Este fator, associado ao início de carga precoce observado em todos os animais, talvez possa explicar a formação de calo ósseo em menor ou maior extensão em todos os animais. Entretanto, comparativamente, tanto nas radiografias de acompanhamento do processo de consolidação como na tomografia ao final do experimento, a formação de calo ósseo e sua extensão ao longo do enxerto foram mais precoces e progressivamente mais exuberantes nos animais tratados com enxertos celularizados.

As perfurações dos cilindros corticais utilizados como enxerto estrutural no preenchimento dos defeitos foram realizadas com o objetivo de facilitar o aporte sangüíneo ao canal medular e para melhorar a incorporação óssea do enxerto cortical, como previamente descrito por DELLOYE et al. (2002). Num modelo semelhante em coelhos, FOLLMAR et al. (2007) associaram enxerto cortical perfurado com células pluripotentes isoladas de tecido adiposo autólogo e, ao contrário dos nossos resultados, observaram que as perfurações não favoreceram a invasão vascular e as células não

induziram neoformação óssea. Apesar das perfurações terem sido feitas de forma similar nos dois estudos, a implantação ectópica do cilindro ósseo no dorso dos animais, induziu uma resposta inflamatória com formação de cápsula fibrosa e conseqüente obstrução dos orifícios. Além de não permitir avaliar o papel facilitador das perfurações na invasão vascular, o encapsulamento por fibrose provocou redução na oferta de nutrientes e oxigênio às células injetadas que, provavelmente, por este motivo não sobreviveram. Além disso, SHARP et al. (2005) não observaram formação óssea quando células mesenquimais foram transplantadas para região subcapsular do rim, mostrando que neste tipo de implantação heterotópica, se não houver indução das células por citocinas específicas, não ocorre osteogênese.

Assim, mesmo nosso trabalho não configurando estudo comparativo, a interposição do enxerto com perfurações na porção central de um osso longo como o que foi realizado, e ainda, associado com o processo de irradiação não ocasionou maior risco de fratura do enxerto, como evidenciado também por DELLOYE et al. (2002). Além disso, há fortes evidências histológicas de que existe benefício na facilitação da invasão vascular através perfurações nos enxertos celularizados, contribuindo significativamente para a neoformação óssea do canal medular.

A esterilização terminal através de irradiação gama é reconhecidamente um processo que causa enfraquecimento do enxerto homólogo cortical (CURREY et al 1997; JINNO et al 2000; AKKUS et al.

2001). LIETMAN et al. (2000) constatou que apesar do risco infecção ser menor nos enxertos irradiados, a frequência de fratura aumentou de 18% para 38% após a esterilização terminal. Além disso, este autor observou que a prevalência de fraturas não tinha relação com a não consolidação do enxerto, o que sugere que o processo de irradiação não altera as propriedades osteoindutoras do enxerto e sim suas características físicas. No nosso estudo, nenhum animal apresentou fratura do enxerto, mesmo tendo sido todos os implantes submetidos à irradiação.

No contexto da bioengenharia ortopédica, o tipo de enxerto e o suporte utilizado para sustentar as células, podem determinar a forma de introdução das células no implante. Os enxertos sintéticos porosos, a base de hidroxiapatita, facilmente absorvem células em suspensão (KON et al., 1999; QUARTO et al., 2001). Este processo de absorção das células pode ser ainda potencializado com a aplicação de pressão negativa, para facilitar a entrada das células nos poros do biomaterial sintético (BRUDER et al., 1998; ARINZEH et al., 2003). Pelas características do nosso modelo, simulando um enxerto cortico-esponjoso no qual utilizamos o osso esponjoso como suporte para as células, optamos pela introdução mecânica da suspensão celular pelos orifícios do osso cortical. Desta forma direcionamos a injeção das células e procuramos garantir que as mesmas atingissem a porção mais central do enxerto esponjoso, em toda a extensão do implante. O aspecto positivo da injeção direta das células através dos orifícios do osso cortical foi a facilidade do procedimento sob ponto de vista técnico, que implicou na

manipulação mínima da suspensão. Embora esta estratégia não garanta que a suspensão celular foi distribuída uniformemente por todo o osso esponjoso, podemos sugerir, baseado nos achados histológicos, que ela não constitui uma desvantagem ou limitação do modelo, uma vez que em todos os animais tratados com enxertos celularizados o tecido responsável pela reconstituição estrutural e morfológica do canal medular estava distribuído uniformemente em toda a extensão do enxerto.

Outra variável que acreditamos poder interferir no resultado final da celularização é o tipo de suporte ou carreador utilizado para sustentar as células. Meios semi-sólidos como plasma rico em plaquetas e géis de fibrina permite a distribuição mais homogênea das células no interior dos enxertos, mas podem interferir sobre o reparo do implante. LUCARELLI et al. (2005) sugerem que a liberação de fatores angiogênicos, pela ativação e desgranulação plaquetária, pode ter um efeito positivo sobre o reparo do implante. Desta forma, a avaliação da celularização, quando feita em conjunto com outros carreadores, impede a definição de qualquer vantagem específica das células osteoprogenitoras autólogas.

A nossa opção, pela utilização de osso esponjoso como suporte para as células expandidas *in vitro*, se baseou no fato de estarmos reproduzindo as propriedades biomecânicas e estruturais do osso vivo e mimetizando as condições de um enxerto cortico-esponjoso. Uma outra justificativa para considerarmos superior a escolha do osso esponjoso como suporte seria pelo fato das células estarem em contato com um substituto ósseo

reconhecidamente osteocondutor (CORNELL e LANE, 1998) com algum potencial de osteoindução. RUST et al. (2006) demonstraram que fragmentos de osso esponjoso, mesmo após tratamento com 2.5-Mrad de raios gama, são capazes de reter proteínas bioativas na matriz óssea e influenciar a diferenciação de progenitores pluripotentes em osteoblastos.

Um outro aspecto do estudo de LUCARELLI et al. (2005) que pode ser relevante na comparação com os nossos resultados é o fato das células mesenquimais terem sido isoladas a partir de uma amostra inicial de 10mL de aspirado de medula. Mesmo considerando-se que nos dois estudos, o resultado favorável da celularização dos enxertos sobre o processo de consolidação não decorreu de um fator isolado, mas da associação de um conjunto de fatores, é provável que o nosso protocolo de isolamento e expansão das células osteoprogenitoras autólogas tenha gerado um produto com melhor potencial biológico e mais adequado para o reparo de lesões ósseas. No nosso estudo, o isolamento das células foi feito a partir de um volume inicial de aspirado de medula óssea duas a três vezes maior. A medula óssea adulta contém cerca de 32 milhões/mL de células nucleadas e apenas uma dentre 18.000 células nucleadas tem características fenotípicas de célula tronco mesenquimal (MUSCHLER et al., 2001). Desta forma, um maior volume de amostra inicial de medula óssea, necessitará menos tempo de expansão *in vitro* para se atingir o mesmo número de células, que seria obtido a partir de uma amostra inicial menor. A obtenção de um número adequado de células para utilização em terapias celulares, se expandidas

num menor intervalo de tempo, além de ser um evento desejado nas estratégias de bioengenharia, potencialmente gera um produto final com melhor potencial biológico. Isto se deve em grande parte a manutenção das características fenotípicas iniciais das células que não são perdidas durante passagens sucessivas.

A alegação dos autores de que volumes maiores de aspirados promovem a diluição dos progenitores pela “contaminação” com sangue periférico, em nossa opinião, se constitui num problema técnico e não biológico. A aspiração lenta, de volumes individuais pequenos de medula óssea com o reposicionamento da agulha de punção, como foi realizada no nosso estudo, reduz o efeito diluente do sangue periférico durante a coleta (MUSCHLER et al., 1997).

## 5.2 – Considerações sobre a consolidação radiográfica

A análise radiográfica utilizando a escala de TAIRA et al. (2004) evidenciou pontuações maiores em todos os animais tratados com enxerto celularizado quando comparado aos animais do grupo controle. Este método de avaliação radiográfica leva em consideração a reação periosteal, a união entre o enxerto e o osso hospedeiro e as alterações radiológicas do corpo do enxerto, conferindo pontuação crescente para cada item em função da intensidade do processo de consolidação.

Radiograficamente foi constatado osteólise devido à infecção local ao redor de dois pinos do fixador no animal COA 18-. Este animal foi tratado

com antibióticos tendo apresentado boa evolução e resolução do processo infeccioso em sete dias, sem comprometer a estabilidade do implante. A infecção no trajeto dos pinos de fixadores externos é uma complicação comum podendo ocorrer em até 27% dos casos e não tem nenhuma relação com o tipo de substituo ósseo (MYERS et al., 2007).

Nos animais COA 6, ao término da 4<sup>a</sup> semana, o processo de consolidação nos pontos de contato entre o enxerto homólogo e o osso hospedeiro, embora incompleto, era radiograficamente evidente. Neste período, já era possível observar no enxerto celularizado a formação de pontes ósseas partindo tanto do osso hospedeiro quanto do enxerto e expressiva neoformação óssea ao longo da cortical lateral. Este padrão de evolução não foi verificado no animal tratado com o enxerto não celularizado. ENNEKING e CAMPANACCI (2001) através da análise histológica de dezesseis enxertos homólogos observaram que a formação do calo ósseo se originou apenas do periósteo do osso hospedeiro, sem a participação do enxerto homólogo. No nosso estudo, nos enxertos celularizados, tanto nas radiografias como na tomografia o calo ósseo se originou de ambos os lados da junção, demonstrando que o enxerto teve participação no processo de formação de ponte óssea unindo os fragmentos ósseos.

Nos animais COA 10 e COA 14, nas radiografias com acompanhamento de 10 semanas, a consolidação entre o enxerto e o osso hospedeiro era radiograficamente evidente tanto nos animais tratados com enxertos

celularizados como não celularizados. A principal diferença radiográfica existente entre os enxertos celularizados e não celularizados neste grupo de animais era a reação periosteal consideravelmente mais expressiva nos animais tratados com as células osteoprogenitoras autólogas.

Todas as etapas do processo de consolidação observadas nos outros animais tratados com enxerto celularizado se repetiram no animal COA18+. Neste animal, devido ao maior tempo de acompanhamento, a remodelação do calo e a incorporação do enxerto foram completas. Após a consolidação do enxerto, a diáfise tibial recuperou o formato cilíndrico e houve completa recanalização do canal medular.

A maior formação óssea nas faces laterais dos enxertos, observada nos animais COA6+, COA10+, COA14+ e COA18+ pode ser atribuída ao fato da face lateral ter sido o local de introdução da suspensão celular através das perfurações do osso cortical, como citado anteriormente, e assim possivelmente o local onde a concentração de células era maior. Esta observação radiográfica, indiretamente confirma o potencial osteoprogenitor das células que foram injetadas no enxerto.

A avaliação tomográfica, além de confirmar a consolidação dos fragmentos, evidenciou nos animais tratados com implantes celularizados a maior formação óssea recobrando os enxertos e preenchendo os orifícios. A nosso ver a utilização de tomografia para a avaliação da incorporação dos enxertos não traz informações relevantes em relação à avaliação radiográfica, sendo um exame de alto custo e sem vantagens adicionais para

este tipo de análise. Serão necessários estudos futuros para determinar se a evolução do processo de reparo e da consolidação dos enxertos celularizados pode ser melhor investigada por ressonância nuclear magnética.

ENNEKING E CAMPANACCI (2001) também descreveram aumento significativo de neoformação óssea ao redor de enxertos homólogos quando associados aos enxertos ósseos autólogos. Este resultado certamente se deve a presença, nos enxertos autólogos, de uma grande quantidade de progenitores mesenquimais, progenitores endoteliais, células comprometidas com a linhagem osteogênica e elementos celulares diferenciados.

KON et al. (1999) em estudo semelhante, mas utilizando enxerto cilíndrico de cerâmica de hidroxiapatita, também constatou maior neoformação óssea na superfície dos substitutos ósseos combinados previamente com células mesenquimais obtidas da medula óssea e expandidas *in vitro*.

Por outro lado, LUCARELLI et al. (2005) constataram diminuição na formação de calo ósseo em enxertos homólogos tratados com células mesenquimais e concentrado de plaquetas quando comparados com enxertos homólogos isolados. Neste trabalho a fixação foi efetuada com placa e parafuso, caracterizando uma montagem estática, isto é, que não permite qualquer movimento nos focos de osteotomia. A consolidação nestes casos ocorre diretamente, sem a formação de calo ósseo, diferentemente da consolidação que ocorre quando da utilização do fixador externo, onde a consolidação é indireta, com formação de calo ósseo. Analisando em

conjunto os resultados dos dois trabalhos, podemos sugerir que a adição de células osteoprogenitoras autólogas auxilia tanto na consolidação direta, com placa e parafuso, quanto na consolidação indireta, com fixador externo.

### 5.3 - Considerações sobre o reparo histológico

Os resultados de estudos experimentais (BRUDER et al., 1998; KON et al. 2000; ARINZEH et al., 2003) e clínicos (QUARTO et al., 2001; MARCACCI et al., 2007) utilizando células mesenquimais ou osteoprogenitoras autólogas isoladas da medula óssea, expandidas *in vitro* e associadas com hidroxiapatita para tratar defeitos diafisários foram altamente favoráveis. A recuperação das lesões ocorreu através da reparação completa dos defeitos, sem relato de complicações locais ou sistêmicas relacionadas diretamente com os implantes ou com os componentes celulares.

Embora não tenha sido objetivo do presente estudo avaliar outras fontes de obtenção de células osteoprogenitoras, os aspirados de medula continuam sendo considerados, pela maioria dos autores, como a fonte clássica de obtenção dessas células. A utilização alternativa de tecido adiposo para o isolamento das células osteoprogenitoras pode levar a formação óssea insuficiente como observada no estudo de FOLLMAR et al. (2007). Está relativamente bem estabelecido que a expansão de células pluripotentes, isoladas de tecido adiposo, geram um grande número de progenitores comprometidos com a linhagem adipogênica com pouca ou nenhuma capacidade de trans-diferenciação em células osteogênicas (KERN et al., 2006).

Grande parte das observações do estudo pioneiro realizado por BRUDER et al. (1998) coincidem com os nossos resultados. Os autores deste estudo utilizaram no preenchimento do defeito segmentar um cilindro de hidroxiapatita e tri-cálcio fosfato celularizado com células mesenquimais expandidas *in vitro*. Algumas desvantagens e complicação da utilização deste tipo de material sintético tais como reabsorção lenta e ocorrência de fraturas, foram pouco freqüentes nos animais tratados enxertos celularizados. Como no nosso estudo, o resultado mais expressivo sob o ponto de vista histológico foi a capacidade das células adicionadas ao enxerto induzirem a neoformação óssea. Em ambos os estudos, a neoformação óssea foi modesta no interior dos enxertos não celularizados. Entretanto, um avanço do nosso estudo foi a possibilidade de avaliar a qualidade do preenchimento medular numa escala temporal. Nos animais tratados com enxertos celularizados, nos tempos iniciais, o tecido possuía, características histológicas de um tecido osteogênico jovem caracterizado por osteoblastos cuboidais depositando ativamente matriz óssea sobre traves de osso imaturo e focos freqüentes de ossificação intramembranosa. Com a evolução do processo nos tempos de análise subseqüentes, a redução do número e da atividade das células acompanhou o processo de remodelação das traves que passaram progressivamente a ter distribuição sob a forma de trama tri-dimensional interconectada. A recomposição da medula óssea adiposa e hematopoética acompanharam a reestruturação do osso esponjoso. Já nos animais tratados com enxertos não celularizados, no tecido de preenchimento da cavidade medular predominavam as

características de um tecido de reparação fibro-vascular com menos evidências morfológicas de diferenciação osteogênica.

Como sugerido por BRUDER et al. (1998) as células mesenquimais que estão em processo de diferenciação osteogênica secretam fatores indutores do recrutamento de novas células mesenquimais e da diferenciação na linhagem osteogênica. A exuberância da reação periosteal no osso hospedeiro dos animais tratados com enxertos celularizados poderia ser explicada pelo menos em parte, pelos efeitos parácrinos destes fatores sintetizados pelas células implantadas. Células mesenquimais pluripotentes, tanto no perióstio como no osso, respondem a estes fatores se diferenciando em osteoblastos e produzindo matriz óssea madura. Esta explicação também se aplica para formação óssea mais lenta e reduzida nos defeitos tratados com enxertos não celularizados. Estudos recentes complementam a hipótese de BRUDER et al. (1998) ao demonstrar que o TGF- $\beta$ , BMPs, FGF, IGF e PDGF são os principais fatores de crescimento comprovadamente capazes de influenciar a proliferação e a diferenciação de células mesenquimais em osteoprogenitores e em osteoblastos (LIEBERMAN et al., 2002).

Em relação à caracterização fenotípica das células após a expansão *in vitro*, os resultados do nosso estudo coincidem com o relato de KON et al. (1999). Apesar de ser uma constatação biológica esperada e das repetidas tentativas que foram realizadas em várias amostras, a expressão de fosfatase alcalina foi consistentemente negativa. Estudos adicionais, num

contexto mais amplo da biologia geral, seriam necessários para explicar o resultado observado em ambos os estudos.

O único relato clínico sobre a utilização de células mesenquimais expandidas *in vitro* associada com um implante sintético foi realizado em quatro pacientes com defeitos segmentares (QUARTO et al., 2001). O acompanhamento destes pacientes, 6-7 anos após a cirurgia, mostrou que não ocorreram complicações precoces ou tardias (MARCACCI et al., 2007). Não houve relato em nenhum dos pacientes de dor, aumento de volume, infecção ou fratura. A integração do implante, observada após 5-7 meses, estava mantida 6-7 anos após a cirurgia. Considerando que os resultados foram favoráveis, apesar do baixo grau de reabsorção e de estabilidade mecânica dos compostos de hidroxiapatita, podemos sugerir que resultados clínicos superiores podem ser obtidos através da associação enxerto ósseo homólogo com células osteoprogenitoras autólogas. Esta suposição se baseia nos resultados do presente estudo em que observamos que no período máximo de 18 semanas houve consolidação e remodelação do enxerto com recomposição estrutural e possivelmente funcional da medula óssea, o que não é observado com as biocerâmicas.

## 6 CONCLUSÕES

1. O tratamento de defeitos diafisários segmentares em ovelhas com enxerto homólogo irradiado em associação com células osteoprogenitoras autólogas e fixação externa mostrou ser uma opção terapêutica eficaz sob o ponto de vista ortopédico.

2. Células osteoprogenitoras autólogas isoladas da medula óssea e expandidas *in vitro*, quando adicionadas a enxertos homólogos do tipo cortico-esponjoso, aceleram a neoformação óssea, a incorporação e a remodelação do enxerto em defeitos diafisários e não desencadeiam reações adversas locais ou sistêmicas.

3. Células osteoprogenitoras autólogas adicionadas a enxertos homólogos favorecem a substituição do osso enxertado por osso esponjoso, osso cortical e medula óssea respectivamente.

4. Mamíferos de médio porte como os ovinos constituem uma excelente opção de modelo experimental para avaliação do tratamento de perdas ósseas diafisárias.

5. O fixador externo é um excelente implante para estabilização da correção de defeitos ósseos diafisários em animais do porte de ovinos por permitir a deambulação imediatamente após o procedimento cirúrgico e por evitar a necessidade de utilizar métodos restritivos que impedem a ação

de cargas sobre o membro operado.

6. As perfurações realizadas e a irradiação do enxerto cortical não alteraram a função estrutural do implante, já que nenhum dos oito animais desenvolveu fratura, apesar da deambulação ter sido permitido precocemente e mantida livremente durante todo o período experimental de 6 a 18 semanas.

7. O osso esponjoso utilizado como suporte para as células reproduz as propriedades biomecânicas e estruturais do osso vivo e mimetiza as condições de um enxerto cortico-esponjoso.

8. A maior formação óssea nas faces laterais dos enxertos celularizados possivelmente está relacionada com a maior concentração da suspensão celular nos orifícios desta região. Esta observação também pode ser utilizada para comprovar que as células injetadas sofreram diferenciação osteogênica neste local.

9. Células osteoprogenitoras autólogas potencializam a neoformação óssea e a recomposição da medula óssea em enxertos homólogos durante todo o período de reparo e consolidação de defeitos ósseos extensos.

10. Os enxertos homólogos celularizados com COA podem levar a resultados clínicos superiores ao uso de biocerâmicas por

consolidar, remodelar e reconstituir estruturalmente e morfológicamente o osso e a medula óssea num período de tempo relativamente curto. Estas características tornam esta estratégia bastante atraente para utilização clínica em bioengenharia ortopédica e provavelmente superam biomecanicamente as biocerâmicas.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-AAL AM. Ilizarov bone transport for massive tibial bone defects. *Orthopedics* 29: 70-74, 2006.

AKKUS O, RIMNAC CM. Fracture resistance of gamma radiation sterilized cortical bone allografts. *J Orthop Res* 19: 927 -34, 2001.

ALDEGHERI R. Distraction osteogenesis for lengthening of the tibia in patients who have limb-length discrepancy or short stature. *J Bone Joint Surg Am* 81: 624-34, 1999.

ALLAN DG, LAVOIE GJ, MCDONAL S, OAKESHOTT R, GROSS A. Proximal femoral allografts in revision hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Br* 73: 235-240, 1991.

ALHO A, STROMSOE K, HOISETH AP. Pairwise strength relationships of cortical and cancellous bone in human femur: an autopsy study. *Arch Orthop Trauma Surg* 114: 211-214, 1995.

ARINZEH TL, PETER SJ, ARCHAMBAULT MP, van den BOS C, GORDON S, KRAUS K, SMITH A, KADIYALA S. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg Am* 85: 1927-1935, 2003.

ATTIAS N, LEHMAN RE, BODELL LS, LINDSEY RW. Surgical management of a long segmental defect of the humerus using a cylindrical titanium mesh cage and plates: a case report. *J Orthop Trauma* 19: 211-216, 2005.

AWAD HA, BUTLER DL, BOIVIN GP, SMITH FN, MALAVIYA P, HUIBREGTSE B, CAPLAN AI. Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue Eng* 5: 267-277, 1999.

BABHULKAR SS, PANDE KC, BABHULKAR S. Ankle instability after fibular resection. *J Bone Joint Surg Br* 77: 258-261, 1995.

BACKSTEIN D, SAFIR O, GROSS A. Management of bone loss: structural grafts in revision total knee arthroplasty. *Clin Orthop Rel Res* 446: 104-112, 2006.

BANFI A, BIANCHI G, NOTARO R, LUZZATTO L, CANCEDDA R, QUARTO R. Replicative aging and gene expression in long-term cultures of human bone marrow stromal cells. *Tissue Eng* 8: 901-910, 2002.

BASSET CAL. Clinical implications of cell function in bone grafting. *Clin Orthop Relat Res* 87: 49-59, 1972

- BERRY BH, LORD CF, GEBHARDT MC, MANKIN HJ. Fractures of allografts. *J Bone Joint Surg Am* 72: 823-833, 1990.
- BIANCO P, GHERON ROBEY P. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* 105: 1663-1668, 2000.
- BIANCO P, RIMINUCCI M, GRONTHOS S, ROBEY PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology and potential applications. *Stem Cells* 19: 180-192, 2001.
- BIANCO P, KUZNETSOV SA, RIMINUCCI M, ROBEY PG. Postnatal skeletal stem cells. *Methods Enzymol* 419: 117-148, 2006.
- BISHOP AT, WOOD MB, SHEETZ KK. Arthrodesis of the ankle with a free vascularized autogenous bone graft. Reconstruction of segmental loss of bone secondary to osteomyelitis, tumor, or trauma. *J Bone Joint Surg Am* 77: 1867-1875, 1995.
- BONFIGLIO M. Repair of bone-transplant fractures. *J Bone Joint Surg Am* 40: 446-456, 1958.
- BRIEN EW, TEREK RM, HEALEY JH, LANE JM. Allograft reconstruction after proximal tibial resection for bone tumors. An analysis of function and outcome comparing allograft and prosthetic reconstructions. *Clin Orthop Relat Res* 303: 116-127, 1994.
- BRODKE D, PEDROZO H, KAPUR TA, ATTAWIA M, KRAUS KH, CHANTAL EH, KADIYALA S, BRUDER S. Bone grafts prepared with selective cell retention technology heal canine segmental defects as effectively as autograft. *J Orthop Res* 5: 857-865, 2006
- BRUDER SP, KRAUS KH, GOLDBERG VM, KADIYALA S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 80: 985-996, 1998.
- BUCKWALTER JA, COOPER RR. Bone structure and function. *Instr Course Lect* 36: 27-48, 1987.
- BUCKWALTER JA, EINHORN TA, MARSH JL. Bone and Joint Healing. *In*: Bucholz RW, Heckman JD, Court-Brown C (eds): *Fractures in Adults* (6<sup>th</sup> edition). Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2006, pp 297-311.
- BURWELL RG. The fate of bone grafts. *In* Apley AG (ed): *Recent advances in orthopaedics*. London, Churchill Livingstone, 1969, pp 115-207.
- BUSH JL, WILSON JB, VAIL TP. Management of bone loss in revision total knee arthroplasty. *Clin Orthop Rel Res* 452: 186-192, 2006.

CANCEDDA R, DOZIN B, GIANNONI P, QUARTO R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biol* 22: 81-91, 2003.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL (CDC). Transmission of HIV through bone transplantation: case report and public health recommendation. *Morb Mortal Wkly Rep* 37: 597-599, 1988.

CHANG DW, WEBER KL. Use of a vascularized fibula bone flap and intercalary allograft for diaphyseal reconstruction after resection of primary extremity bone sarcomas. *Plast Reconstr Surg* 116: 1918-1925, 2005.

CHMELL MJ, MCANDREW MP, THOMAS R, SCHWARTZ HS. Structural allografts for reconstruction of lower extremity open fractures with 10 centimeters or more of acute segmental defects. *J Orthop Trauma* 9: 222-226, 1995.

CHARBORD P, TAVIAN M, HUMEAU L, PEULT B. Early ontogeny of the human marrow from long bones: an immunohistochemical study of hematopoiesis and its microenvironment. *Blood* 87: 4109-4119, 1996.

CIERNY G, ZORN KE. Segmental tibial defects. Comparing conventional and Ilizarov methodologies. *Clin Orthop Rel Res* 301: 118-123, 1994.

COBOS JA, LINDSEY RW, GUGALA Z. The cylindrical titanium mesh cage for treatment of a long bone segmental defect: description of a new technique and report of two cases. *J Orthop Trauma* 14: 54-59, 2000.

COLLINGE C, SANDERS R, DI PASQUALE T. Treatment of complex tibial periarticular fractures using percutaneous techniques. *Clin Orthop Rel Res* 375: 69-77, 2000.

CORNELL CN, LANE JM. Current understanding of osteoconduction in bone regeneration. *Clin Orthop Rel Res* 355 :267-273, 1998.

CROSSETT LS, RAJ KS, SECHRIEST VF, RUBASH HE. Reconstruction of a ruptured patellar tendon with achilles tendon allograft following total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 84: 1354-1361, 2002.

CURREY JD, FOREMAN J, LAKETIC I, MITCHELL J, PEGG DE, REILLY GC. Effects of ionizing radiation on the mechanical properties of human bone. *J Orthop Res* 15: 111 -7, 1997.

DAGA A, MURAGLIA A, QUARTO R, CANCEDDA R, CORTE G. Enhanced engraftment of EPO-transduced human bone marrow stromal cells transplanted in a 3D matrix in non-conditioned NOD/SCID mice. *Gene Ther* 9: 915-921, 2002.

DAMIEN DJ, PARSON JR. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater* 2: 187-208, 1991.

DE BOER HD, WOOD MB. Bone changes in the vascularised fibular graft. *J Bone Joint Surg Br* 71: 374-378, 1989.

DELLOYE C, SIMON P, NYSSSEN-BEHETS C, BANSE X, BRESLER F, SCHMITT D. Perforations of cortical bone allografts improve their incorporation. *Clin Orthop Rel Res* 396: 240-247, 2002.

DENNIS JE, CHARBORD P. Origin and differentiation of human and murine stroma. *Stem Cells* 20: 205-214, 2002.

DICK HM, STRAUCH RJ. Infection of massive bone allografts. *Clin Orthop Rel Res* 306: 46-53, 1994.

DIPASQUALE D, OCHSNER MG, KELLY AM, MALONEY DM. The Ilizarov method for complex fracture nonunions. *J Trauma* 37: 629-634, 1994.

DONATI D, DI LIDDO M, ZAVATTA M, MANFRINI M, BACCI G, PICCI P, CAPANNAR, MERCURI M. Massive bone allograft reconstruction in high-grade osteosarcoma. *Clin Orthop Rel Res* 377: 186-194, 2000.

EINHORN TA. Enhancement of fracture healing. Current concept review. *J Bone Joint Surg Am* 77: 940-956, 1995.

ENNEKING WF, MINDELL ER: Observations on massive retrieved human allografts. *J Bone Joint Surg Am* 73: 1123-1142, 1991.

ENNEKING WF, CAMPANACCI DA. Retrieved human allografts: a clinicopathological study. *J Bone Joint Surg Am* 83: 971-986, 2001.

EZOE S, MATSUMURA I, SATOH Y, TANAKA H, KANAKURA Y. Cell cycle regulation in hematopoietic stem/progenitor cells. *Cell Cycle* 3: 314-318, 2004.

FINKEMEIER CG. Bone graft and bone-grafts substitutes. *J Bone Joint Surg Am* 84: 454-464, 2002.

FINNEGAN MA, UHTHOFF HK. Healing of trabecular bone. *In*: Lang, JM (ed): *Fracture healing*. New York, Churchill Livingstone, 1987, pp. 33-38.

FOLLMAR KE, PRICHARD HL, DE CROOS FC, WANG HT, LEVIN LS, KLITZMAN B, OLBRICH KC, ERDMANN D. Combined bone allograft and adipose-derived stem cell autograft in a rabbit model. *Ann Plast Surg* 58: 561-565, 2007.

FRIEDENSTEIN AJ, SHAPIRO-PIATETZKY II, PETRAKOVA KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 16: 381-390, 1966.

FRIEDENSTEIN AJ, CHAILAKHJAN RK, LALYKINA KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 3: 393-403, 1970.

FRIEDENSTEIN AJ, GORSKAJA JF, KULAGINA NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 4: 267-274, 1976.

FRIEDENSTEIN AJ, LATZINIK NW, GROSHEVA AG. Marrow microenvironment transfer by heterotopic transplantation of freshly isolated and cultured cells in porous sponges. *Exp Hematol* 10: 217-227, 1982.

FRIEDLAENDER GE: Current concepts review: Bone graft. *J Bone Joint Surg Am* 69: 786-790, 1987.

GANG EJ, BOSNAKOVSKI D, FIGUEIREDO CA, VISSER JW, PERLINGEIRO RCR. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood* 109: 1743-1751, 2007.

GEORGIADIS GM, DESILVA SP. Reconstruction of skeletal defects in the forearm after trauma: treatment with cement spacer and delayed cancellous bone grafting. *J Trauma* 38: 910-914, 1995.

GEUSENS P, BOONEN S, NIJS J, JIANG Y, LOWET G, VAN AUDERKERCKE R, HUYGHE C, CAULIN F, VERY JM, DEQUEKER J, VAN DER PERRE G. Effect of salmon calcitonin on femoral bone quality in adult ovariectomized ewes. *Calcif Tissue Int* 59: 315-320, 1996.

GITELIS S, PIASECKI P. Allograft prosthetic composite arthroplasty for osteosarcoma and other aggressive bone tumors. *Clin Orthop Rel Res* 270: 197-201, 1991.

GOODCARE TE, WALKER CJ, JAWAD AS, JACKSON AM, BROUGH MD. Donor site morbidity following osteocutaneous free fibula transfer. *Br J Plast Surg* 43: 410-412, 1990.

GORE DR, GARDNER GM, SEPIC SB, MOLLINGER LA, MURRAY MP. Function following partial fibulectomy. *Clin Orthop Rel Res* 220: 206-210, 1987.

GRAY JC, ELVES MW: Early osteogenesis in compact bone isografts: a quantitative study of the contributions of the different graft cells. *Calcif Tissue Int* 29: 225-237, 1979.

GREEN SA. Skeletal defects. A comparison of bone grafting and bone transport for segmental skeletal defects. *Clin Orthop Rel Res* 301: 111-117, 1994.

HADDAD FS, MASRI BA, GARBUZ S, DUNCAN CP. Femoral bone loss in total hip arthroplasty: classification and preoperative planning. *Instr Course Lect* 49: 83-96, 2000.

HAZAN EJ, HORNICEK FJ, TOMFORD W, GEBHARDT MC, MANKIN HJ. The effect of adjuvant chemotherapy on osteoarticular allografts. *Clin Orthop Rel Res* 385: 176-181, 2001.

HEITMANN C, ERDMANN D, LEVIN LS. Treatment of segmental defects of the humerus with an osteoseptocutaneous fibular transplant. *J Bone Joint Surg Am* 84: 2216-2223, 2002.

HERNIGOU P, DELEPINE G, GOUTALLIER D, JULIERON A. Massive allografts sterilised by irradiation. Clinical results. *J Bone Joint Surg Br* 75: 904-913, 1993.

HORNICEK FJ, GEBHARDT MC, TOMFORD WW, SORGER JI, ZAVATTA M, MENZNER JP, MANKIN HJ. Factors affecting nonunion of the host-allograft junction. *Clin Orthop Rel Res* 382: 87-98, 2001.

ILIZAROV GA, LEDYAEV VI. The replacement of long tubular bone defects by lengthening distraction osteotomy of one of the fragments. *Clin Orthop Rel Res* 280: 7-10, 1992.

JESUS-GARCIA R. Endoprosthetic reconstruction following bone sarcoma resection. *Curr Opin Orthop* 17: 545-550, 2006.

JIANG Y, JAHAGIRDAR BN, REINHARDT RL, SCHWARTZ RE, KEENE CD, ORTIZ-GONZALEZ XR, REYES M, LENVIK T, LUND T, BLACKSTAD M, DU J, ALDRICH S, LISBERG A, LOW WC, LARGAESPADA DA, VERFAILLIE CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418: 41-49, 2002.

JINNO T, MIRIC A, FEIGHAN J, KIRK SK, DAVY DT, STEVENSON S. The effects of processing and low dose irradiation on cortical bone grafts. *Clin Orthop* 375: 275-85, 2000.

JUPITER JB, GERHARD HJ, GUERRERO J, NUNLEY JA, LEVIN LS. Treatment of segmental defects of the radius with use of the vascularized osteoseptocutaneous fibular autogenous graft. *J Bone Joint Surg Am* 79: 542-550, 1997.

KADIYALA S, YOUNG RG, THIEDE MA, BRUDER SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant* 6: 125134, 1997.

- KALE AA, DICESARE PE. Osteoinductive agents: Basic science and clinical applications. *Am J Orthop* 24: 752-761, 1995.
- KASASHIMA T, MINAMI A, KUTSUMI K. Late fracture of vascularized fibular grafts. *Microsurgery* 18: 337-343, 1998.
- KERN S, EICHLER H, STOEVE J, KLUTER H, BIEBACK K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24: 1294-1301, 2006.
- KHAN SN, CAMMISA FP, SANDHU HS, DIWAN AD, GIRARDI FP, LANE JM. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg* 13: 77-86, 2005.
- KINCADE PW, LEE G, PIENSTRANGELI CE, HAYASHI SI, GIMBLE JM. Cells and molecules that regulate B lymphopoiesis in bone marrow. *Annu Rev Immunol* 7: 111-143, 1988.
- KON E, MURAGLIA A, CORSI A, BIANCO P, MARCACCI M, MARTIN I, BOYDE A, RUSPANTINI I, CHISTOLINI P, ROCCA M, GIARDINO R, CANCEDDA R, QUARTO R. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res* 49: 328-337, 2000.
- LEXER E. Joint transplantations and arthroplasty. *Surg Gynecol Obstet* 40: 728-809, 1925.
- LIEBERMAN JR, DALUISKI A, EINHORN TA. The role of growth factors in the repair of bone. *J Bone Joint Surg Am* 84: 1032-1044, 2002.
- LIETMAN SA, TOMFORD WW, GEBHARDT MC, SPRINGFIELD DS, MANKIN HJ. Complications of irradiated allografts in orthopaedic tumor surgery. *Clin Orthop* 375: 214 -217, 2000.
- LORD F, GEBHARDT MC, TOMFORD WW, MANKIN HJ. Infection in bone allografts. *J Bone Joint Surg Am* 70: 369-375, 1988.
- LIECHTY KW, MacKENZIE TC, SHAABAN AF, RADU A, MOSELEY AM, DEANS R, MARSHAK DR, FLAKE AW. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nature Med* 6:1282-1286, 2000.
- LORD F, GEBHARDT MC, TOMFORD WW, MANKIN HJ. Infection in bone allografts. *J Bone Joint Surg Am* 70: 369-375, 1988.
- LUCARELLI E, FINI M, BECCHERONI A, GIAVARESI G, DiBELLA C, ALDINI NN, GUZZARDELLA G, MARTINI L, CENACCHI A, DiMAGGIO N, SANGIORGI L, FORNASARI PM, MERCURI M, GIARDINO R, DONATI D.

Stromal stem cells and platelet-rich plasma improve bone allograft integration. *Clin Orthop Rel Res* 435: 62-68, 2005.

MAKLEY JT. The use of allografts to reconstruct intercalary defects of long bones. *Clin Orthop Rel Res* 197: 58-75, 1985.

MANKIN HJ, GEBHARDT MC, JENNINGS LC, SPRINGFIELDS DS, TOMFORD WW. Long-term results of allograft replacement in the management of bone tumors. *Clin Orthop Relat Res* 324: 86-97, 1996.

MANKIN HJ, DOPPELT S, TOMFORD W. Clinical experience with allograft implantation: the first ten years. *Clin Orthop Rel Res* 174: 69-86, 1983.

MARCACCI M, KON E, MOUKHACHEV V, LAVROUKOV A, KUTEPOV S, QUARTO R, MASTROGIACOMO M, CANCEDDA R. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng* 13: 947-955, 2007

MARSH JL, PROKUSKI L, BIERMANN JS. Chronic infected tibial nonunions with bone loss: conventional techniques versus bone transport. *Clin Orthop Rel Res* 301: 139-146, 1994.

MINAMI A, KIMURA T, MATSUMOTO O, KUTSUMI K. Fracture through united vascularized bone grafts. *J Reconstr Microsurg* 9: 227-232, 1993.

MINAMI A, KASASHIMA T, IWASAKI N, KATO H, KANEDA K. Vascularised fibular grafts: an experience of 102 patients. *J Bone Joint Surg Br* 82: 1022- 1025, 2000.

MNAYMNEH W, MALININ TI, LACKMAN RD, HERNICEK FJ, GHANDUR-MNAYMNEH L. Massive distal femoral osteoarticular allografts after resection of bone tumors. *Clin Orthop Rel Res* 303: 103-115, 1994.

MOHAN S, BAYLINK DJ: Bone growth factors. *Clin Orthop Rel Res* 263: 30-48, 1991

MORRISON SJ, UCHIDA N, WEISSMAN IL. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11: 35-71, 1995.

MOUTSATSOS IK, TURGEMAN G, ZHOU S, KURKALLI BG, PELLED G, TZUR L, KELLEY P, STUMM N, MI S, MULLER R, ZILBERMAN Y, GAZIT D. Exogenously regulated stem cell-mediated gene therapy for bone regeneration. *Mol Ther* 3: 449-461, 2001.

MURAGLIA A, CANCEDDA R, QUARTO R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 113: 1161-1166, 2000.

MUSCHLER GF, NITTO H, BOEHM CA, EASLEY KA. Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *J Orthop Res* 19:117-125, 2001.

MUSCOLO DL, CALETTI E, SCHAJOWICZ F, SANTINI ARAUJO E, MAKINO A. Tissue-typing in human massive allograft of frozen bone. *J Bone Joint Surg Am* 69: 583-595, 1987.

MUSCOLO DL, AYERZA MA, CALABRESE ME, SANTINI ARAUJO E. Long term performance of massive allografts. *In: Galante JO, Rosenberg AG, Callaghan JJ (eds): Total hip revision surgery.* New York, Raven Press, 1995, pp. 445-460.

MUSCOLO DL, AYERZA MA. The adult hip. *In: Callaghan JJ, Rosenberg AG, Rubash HE, (eds): Allografts.* Philadelphia, Lippincott, 1998, pp. 297-311.

MUSCOLO DL, AYERZA MA, APONTE-TINAO L, RANALETTA M, ABALO E. Intercalary femur and tibia segmental allografts provide an acceptable alternative in reconstruction tumor resections. *Clin Orthop Rel Res* 426: 97-102, 2004.

MUSCHLER GF, BOEHM C, EASLEY K. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume *J Bone Joint Surg Am* 79: 1699 – 1709, 1997.

MYERS SH, SPIEGEL D, FLYNN JM. **External fixation** of high-energy tibia fractures. *J Ped Orthop* 27:537-539, 2007.

NAGGER L, CHEVALLEY F, BLANC CH, LIVIO JJ. Treatment of large bone defects with the Ilizarov technique. *J Trauma* 34: 390-393, 1993.

OWEN M, FRIEDENSTEIN AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* 136: 42-60, 1988.

PADGETT DE, LANE JM, WILSON PD. The biology of bone grafting. *In: Galante JO, Rosenberg AG, Callaghan JJ (eds): Total hip revision surgery.* New York, Raven Press, 1995, pp. 173-178.

PIRELA-CRUZ MA, DECOSTER TA. Vascularized bone grafts. *Orthopedics* 17: 407-412, 1994.

PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, JAISWAL RK, DOUGLAS R, MOSCA JD, MOORMAN MA, SIMONETTI DW, CRAIG S, MARSHAK DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147, 1999.

- PROCKOP DJ. Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues. *Science* 276: 71-74, 1997.
- PROKUSKI LJ, MARSH JL. Segmental bone deficiency after acute trauma. The role of bone transport. *Orthop Clin North Am* 25: 753-763, 1994.
- QUARTO R, MASTROGIACOMO M, CANCEDDA R, KUTEPOV SM, MUKHACHEV V, LAVROUKOV A, KON E, MARCACCI M. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 344: 385-386, 2001.
- QUINTAVALLA J, UZIEL-FUSI S, YIN J, BOEHNLEIN E, PASTOR G, BLANCUZZI V, SINGH HN, KRAUS KH, O'BYRNE E, PELLAS TC. Fluorescently labeled mesenchymal stem cells (MSCs) maintain multilineage potential and can be detected following implantation into articular cartilage defects. *Biomaterials* 23: 109-119, 2002.
- RODRIGO JJ, PROLO DJ, Allografts. *In*: Chapman, M (ed): *Operative orthopaedics*. Philadelphia, Lippincott, 1988, pp. 911-928.
- ROSE PS, SHIN AY, BISHOP AT, MORAN SL, SIM FH. Vascularized free fibula transfer for oncologic reconstruction of the humerus. *Clin Orthop Rel Res* 438: 80-84, 2005.
- RUST PA, KALSI P, BRIGGS TWR, CANNON SR, BLUNN GW. Will mesenchymal stem cells differentiate into osteoblasts on allograft? *Clin Orthop Rel Res* 457: 220-226, 2006.
- SATOMURA K, KREBSBACH P, BIANCO P, GEHRON ROBEY P. Osteogenic imprinting upstream of marrow stromal cell differentiation. *J Cell Biochem* 78: 391-403, 2000.
- SCHATZKEN J, WADDELL J, STOLL JE. The effect of motion on the healing of cancellous bone. *Clin Orthop Rel Res* 245: 282-287, 1989.
- SHPITZER T, NELIGAN P, BOYD B, GULLANE P, GUR E, FREEMAN J. Leg morbidity and function following fibular free flap harvest. *Ann Plast Surg* 38: 460-464, 1997.
- SESHI B, KUMAR S, SELLERS D. Human bone marrow stromal cell: co-expression of markers specific for multiple mesenchymal cell lineages. *Blood Cells Mol Dis* 26: 234-246, 2000.
- SHARP JG, MURPHY BO, JACKSON JD, BRUSNAHAN SK, KESSINGER A, NEFF JR. Promises and pitfalls of stem cell therapy for promotion of bone healing. *Clin Orthop Relat Res* 435: 52-61, 2005.
- SPRINGFIELD, DS. Autogenous bone graft: non-vascular and vascular. *Orthopedics* 15: 1237-1241, 1992.

STEVENSON S, HOROWITZ M. Current concepts review. The response to bone allografts. *J Bone Joint Surg Am* 74: 939-947, 1992.

STEVENSON S, EMERY SE, GOLDBERG VM: Factors affecting bone graft incorporation. *Clin Orthop Rel Res* 324: 666-674, 1996.

STEVENSON S. Biology of bone grafts. *Orthop Clin North Am* 30: 543-552, 1999.

STREET J, WINTER D, WANG JH, WAKAI A, MCGUINNESS A, REDMOND HP. Is human fracture hematoma inherently angiogenic? *Clin Orthop Rel Res* 378: 224-237, 2000.

TAIRA H, MORENO J, RIPALDA P, FORRIOL F. Radiological and histological analysis of cortical allografts: an experimental study in sheep femora. *Arch Orthop Trauma Surg* 124: 320-325, 2004.

TANG CL, MAHONEY JL, MCKEE MD, RICHARDS RR, WADDELL JP, LOUIE B. Donor site morbidity following vascularized fibular grafting. *Microsurgery* 18: 383-386, 1998.

TAYLOR GI: Tissue defects in limbs: replacement with free vascularized tissue transfers. *Aust NZ J Surg* 47: 276-284, 1977.

THOMPSON RC Jr, PICKVANCE EA, GARRY D. Fractures in large-segment allografts. *J Bone Joint Surg Am* 75: 1663-1673, 1993.

TOH CL, JUPITER JB. The infected nonunion of the tibia. *Clin Orthop Rel Res* 315: 176-191, 1995.

TOMFORD WW, THONGPHASUK J, MANKIN HJ, FERRARO MJ. Frozen musculoskeletal allografts. *J Bone Joint Surg Am* 72: 1137-1143, 1990.

TOMFORD WW. Transmission of disease through transplantation of musculoskeletal allografts. *J Bone Joint Surg Am* 77: 1742-1754, 1995.

TOMFORD WW, MANKIN HJ. Bone banking: update on methods and materials. *Orthop Clin North Am* 30: 565-570, 1999.

UHFHOFF HK, RAHN BA. Healing patterns of metaphyseal fracture. *Clin Orthop Rel Res* 160: 295-303, 1981

UNWIN PS, CANNON SR, GRIMER RJ, KEMP HB, SNEATH RS, WALKER PS. Aseptic loosening in cemented custom-made prosthetic replacements for bone tumours of the lower limb. *J Bone Joint Surg Br* 78: 5-13, 1996.

VAN DER KOOY D, WEISS S. Why stem cells? *Science* 287: 1439-1441, 2000.

VAIL TP, URBANIAK JR. Donor-site morbidity with use of vascularized autogenous fibular grafts. *J Bone Joint Surg Am* 78: 204-211, 1996

VANDER GRIEND RA. The effect of internal fixation on the healing of large allografts. *J Bone Joint Surg Am* 76: 657-663, 1994.

VIROLAINEN P, VUORIO E, ARO HT. Gene expression at graft-host interfaces of cortical bone allografts and autografts. *Clin Orthop Rel Res* 297: 144-149, 1993.

VIROLAINEN P, PERALA M, VUORIO E, ARO HT. Expression of matrix genes during incorporation of cancellous bone allografts and autografts. *Clin Orthop Rel Res* 317: 263-272, 1995.

WEILAND, AJ. Current concepts review: vascularized free bone transplant. *J Bone Joint Surg Am* 63: 166-169, 1981.

WIRGANOWICZ PZ, ECKARDT JJ, DOREY FJ, EILBER FR, KABO JM. Etiology and results of tumor endoprosthesis revision surgery in 64 patients. *Clin Orthop Relat Res* 358: 64-74, 1999.

WHITESIDE LA, LESKER PA. The effects of extraperiosteal and subperiosteal dissection. II. On fracture healing. *J Bone Joint Surg Am* 60: 26-30, 1978.

YOUNGER EM, CHAPMAN MW. Morbidity at bone graft donor site. *J Orthop Trauma* 3: 192-195, 1989.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)