



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia

Epitácio Leite Rolim Filho

EFEITO DAS CÉLULAS-TRONCO AUTÓGENAS DO ESTROMA MEDULAR NO REGENERADO ÓSSEO DURANTE A DISTRAÇÃO OSTEOGÊNICA PELA TÉCNICA DE ILIZAROV EM RÁDIOS DE CÃES

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Cirurgia.

Orientador-Interno

Dr. José Lamartine de A. Aguiar

Prof. Associado do Departamento de Cirurgia
do Centro de Ciências da Saúde da UFPE

Orientador-Externo

Dr. Saulo Monteiro dos Santos

Prof. Adjunto do Departamento de Cirurgia
do Centro de Ciências da Saúde da UFPE

Recife,
2009

Rolim Filho, Epitácio Leite

Efeito das células-tronco autógenas do estroma medular no regenerado ósseo durante a distração osteogênica pela técnica de Ilizarov em raios de cães / Epitácio Leite Rolim Filho. – Recife : O Autor, 2009.
xiv, 93 folhas ; il., fig., tab., quadros.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Cirurgia, 2009.

Inclui bibliografia, anexo e apêndice.

1. Distração osteogênica - Ilizarov. 2. Células tronco.
I. Título.

616-089.23
617.47

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
CCS2009-106

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

Relatório da Defesa de Tese do Dr. Eptácio Leite Rolim Filho, aluno de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Cirurgia, Área de Concentração: Cirurgia: Clínica e Experimental.

Às nove horas do dia oito de junho de dois mil e nove na Sala Prof. Porto Carreiro, Pós-Graduação em Cirurgia, UFPE, tiveram início os trabalhos de defesa de tese do Dr. Paulo Eptácio Leite Rolim Filho, para obtenção do grau de Doutor em Cirurgia. A comissão Julgadora – eleita pelo Colegiado do Programa e homologada pela Câmara de Pesquisa e Pós-graduação – foi integrada pelos professores: Dr. Carlos Teixeira Brandt, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE (Presidente da Banca Examinadora); Fernando Ribeiro de Moraes Neto, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE; Dr. Sílvio da Silva Caldas Neto, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE; Dr. Múcio Brandão Vaz de Almeida, Doutor do Departamento de Cirurgia da UFPE; Dr. Jairo de Andrade Lima, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE; e, para suplentes: interno: Salvador Vilar Correia Lima, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE e, finalmente, externo, Nicodemus Telles de Pontes Filho, Doutor do Departamento de Patologia do CCS/UFPE, tendo, como orientador interno, o Dr. José Lamartine de Andrade Aguiar, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE. A tese apresentada pelo doutorando Eptácio Leite Rolim Filho, versou sobre: **“Efeito das células-tronco indiferenciadas do estroma medular no regenerado ósseo durante a distração osteogênica pela técnica de Ilizarov em raios de cães”**. Após, a explanação de 30(Trinta) minutos, Pelo candidato, justificando a escolha, o objetivo da pesquisa, a metodologia empregada e os resultados obtidos, baseados na análise estatística, ilustrados com datashow, foram realizadas as arguições na seguinte ordem: Prof. Dr. Carlos Teixeira Brandt (Presidente da Banca Examinadora), Prof. Dr. Fernando Ribeiro de Moraes Neto, Prof. Dr. Sílvio da Silva Caldas Neto, Prof. Dr. Múcio Brandão Vaz de Almeida, e Prof. Dr. Jairo de Andrade Aguiar; todas as arguições foram feitas no tempo regulamentar, e respondidas pelo candidato. Ao término das mesmas, a Comissão Julgadora proferiu o seguinte resultado: Prof. Dr. Carlos Teixeira Brandt (Presidente da Banca Examinadora), menção “Aprovado”, Prof. Dr. Fernando Ribeiro de Moraes Neto, menção “Aprovado”, Prof. Dr. Sílvio da Silva Caldas Neto, menção “Aprovado”, Prof. Dr. Múcio Brandão Vaz de Almeida, menção “Aprovado”, e Prof. Dr. Jairo de Andrade Lima, menção “Aprovado”. Conclusão, o candidato, foi aprovado com a menção “Aprovado”. Nada mais havendo a registrar foram encerrados os trabalhos do que, para constar, elaborei o presente relatório que vai por mim, Isabela Nogueira Pimentel, Técnica em Assuntos Educacionais, assinados depois do Senhor Presidente, e demais integrantes da Comissão Examinadora. Recife, 08 de junho de maio de 2009.

Prof. Carlos Teixeira Brandt

Prof. Fernando Ribeiro de Moraes Neto

Prof. Sílvio da Silva Caldas Neto

Prof. Múcio Brandão Vaz de Almeida

Prof. Jairo de Andrade Lima

Sra. Isabela Nogueira Pimentel (Técnica em Assuntos Educacionais)

Universidade Federal de Pernambuco

REITOR

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. José Thadeu Pinheiro

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DIRETOR SUPERINTENDENTE

Prof. George da Silva Telles

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

CHEFE

Prof. Salvador Vilar Corrêa Lima

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

NÍVEL MESTRADO E DOUTORADO

COORDENADOR

Prof. Carlos Teixeira Brandt

VICE-COORDENADOR

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

CORPO DOCENTE

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

Prof. Carlos Teixeira Brandt

Prof. Cláudio Moura Lacerda de Melo

Prof. Edmundo Machado Ferraz

Prof. Fernando Ribeiro de Moraes Neto

Prof. Frederico Teixeira Brandt

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

Prof. Salvador Vilar Corrêa Lima

Prof. Sívio Caldas Neto

Dedicatória

Aos meus *pais*, por todo carinho, amparo, paciência
e compreensão pelo longo período de ausência.

A minha querida irmã, *Patrícia Rolim*,
pelo inquestionável amor.

Ao meu grande amigo e irmão,

Múcio Vaz, pela ajuda indireta

prestada e pelo apoio inquestionável.

Agradecimentos

Ao Professor *Dr. José Lamartine de Andrade Aguiar*, orientador e mestre, pela orientação e, principalmente por ter acreditado em mim. Obrigado!

Ao Professor *Dr. Saulo Monteiro dos Santos*, co-orientador.

A *Dr^a. Vanessa Vanderline*, coordenadora clínica da Associação de Assistência a Criança Deficiente (AACD) – Recife/PE.

Aos funcionários do Núcleo de Cirurgia Experimental do Centro de Ciências da Saúde: *Sr^a. Maria de Lourdes*, não apenas pela inegável ajuda, mas, principalmente pela amizade que ficou; ao *Dr. Antônio Roberto*, Coordenador deste Núcleo; ao veterinário, *José Joaquim*; e ao auxiliar de limpeza, *Paulo Silva*, que toma conta dos animais deste biotério.

À *Dr^a. Célia Castro*, pelo grande colaboração neste experimento.

Aos Patologistas, *Dr. Roberto Lemos*, o “o pob” pelos dois meses de ensinamentos práticos, e *Dr. Nicodemos Freitas*, por ter me fornecido os primeiros “passos” sobre histomorfometria.

À *Dr^a. Paula Arruda*, por ter me incentivado a continuar.

À *Márcia e Mércia* que aceitaram, com competência exemplar, a extenuante tarefa de concluir esta tese comigo.

A todos os *residentes* da Traumatologia-Ortopedia do Hospital Getúlio Vargas e aos acadêmicos de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco.

Em fim, a *todos* àqueles que *direta* ou *indiretamente* contribuíram para a realização deste experimento.

Normatização adequada

Esta tese está de acordo com:

International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)

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

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Sample References

Updated February 2006

Last reviewed: 22 May 2007

Last updated: 25 April 2007

First published: 09 July 2003

Metadata | Permanence level: Permanent: Dynamic Content

Copyright, Privacy, Accessibility

U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda,

MD 20894

National Institutes of Health, Health & Human Services

www.icmje.org/

www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	01
1.1	Apresentação do problema.....	2
1.2	Justificativa	4
1.3	Objetivos	5
1.3.1	<i>Geral</i>	5
1.3.2	<i>Específicos</i>	5
2	LITERATURA	6
2.1	Mecanismo de reparo das lesões ósseas.....	7
2.2	Evolução do tratamento das falhas ósseas	8
2.2.1	<i>Evolução do alongamento ósseo</i>	8
2.2.2	<i>Utilização de enxertos ósseos convencionais</i>	12
2.2.3	<i>Auto-enxerto no reparo de lesões ósseas</i>	13
2.3	Células-Tronco.....	14
2.4	Métodos de avaliação do regenerado durante a distração óssea	19
2.4.1	<i>Métodos de imagem</i>	19
2.4.2	<i>Histologia e histomorfometria óssea</i>	20
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1	Local e tipo de estudo	23
3.2	Seleção	23
3.2.1	<i>Seleção dos grupos</i>	23
3.2.2	<i>Crítérios de exclusão</i>	24
3.3	Procedimentos.....	24
3.3.1	<i>Procedimentos cirúrgicos</i>	25
3.3.2	<i>Técnica de coleta da medula óssea e cultivo das células-tronco autógenas</i>	33
3.3.2.1	<i>Técnica de aspiração da medula óssea</i>	33
3.3.2.2	<i>Técnica de inoculação das células tronco na região da DO</i>	35
3.3.3	<i>Técnica de obtenção do regenerado ósseo e procedimentos histológicos e histomorfométricos</i>	36
3.3.3.1	<i>Técnica de obtenção do regenerado ósseo (espécime)</i>	36
3.3.3.2	<i>Processamento do regenerado ósseo para análise histológica e histomorfométrica</i>	36
3.3.4	<i>Análise histomorfométrica</i>	37
3.3.5	<i>Análise histológica</i>	40

3.3.6	<i>Análise radiográfica</i>	43
3.3.6.1	Critérios de consolidação radiográficos e clínicos do regenerado ósseo.....	43
3.3.6.2	Critérios para definir pseudartrose e retardo de CRO	45
3.4	Análise estatística.....	46
3.5	Considerações bioéticas	47
4	RESULTADOS	48
4.1	Resultados radiográficos e clínicos.....	49
4.2	Análise histomorfométrica.....	52
4.3	Análise histológica.....	54
5	DISCUSSÃO	58
5.1	Escolha do tema	59
5.2	Materiais e métodos	62
5.3	Resultados	65
5.3.1	<i>Clínicos e radiográficos</i>	65
5.3.2	<i>Resultados histomorfométricos e histológicos</i>	67
6	CONCLUSÕES	70
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
8	APÊNDICES	87
8.1	Apêndice A – Protocolo de coleta dos dados.....	88
9	ANEXOS	91
9.1	Anexo A – Aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética da Universidade Federal Rural de Pernambuco.....	92

Lista de Abreviaturas e Siglas

B.Ar	Área óssea
B.Pm	Perímetro ósseo
BMP	Proteínas morfogênicas ósseas
BPM	Proteínas morfogênicas ósseas
BV/TV	Volume ósseo
CgAr	Tecido cartilaginoso
CgAr(%)	Percentual da área do tecido cartilaginoso
CT	Células-tronco
CTA	Células-tronco autógenas
CTE	Células-tronco embrionárias
CTI	Células-tronco indiferenciadas
CTM	Células-tronco mesenquimais
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
FTAr	Áreas de tecido fibroso
FTAr	Percentual da área do tecido fibroso
HE	Hematoxilina eosina
ICD	Índice de consolidação-distração
ICR	Índice de consolidação regenerada
IGF-1	Fator de crescimento de insulina
Ob.S/BS	Superfície osteoblástica
OE	Ossificação endocondral
OHP	Osteoblastos hiperplásicos
OHT	Percentual de osteoblastos hipertróficos

OI	Ossificação intramembranosa
OP 1	Proteína morfogênica 1
OT	Total de osteoblastos
PBS	Tampão fosfato
PDGF	Fator de crescimento plaquetário
PRP	Plasma rico em plaquetas
PVP-I	Povidine Degermante [®]
RO	Regenerado ósseo
T.Ar	Área total do tecido
T.Ar(%)	Percentual da área total do tecido
Tb.N	Número de trabéculas
Tb.Th	Espessura trabecular
TCR	Tempo de consolidação regenerada
TCT	Tempo de consolidação total
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TM	Tricrômico de Masson
TTC	Tempo total de consolidação óssea
TTDO	Tempo total de distração osteogênica
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Distribuição do tempo de consolidação do regenerado (TCR) em dias, nos 10 cães dos grupos controle e estudo	49
Tabela 2 – Distribuição do índice de consolidação-distração (ICD) do regenerado ósseo dos 10 animais dos grupos controle e estudo	50
Tabela 3 – Distribuição do tipo radiográfico do regenerado ósseo do rádio dos grupos controle e estudo, na data da consolidação clínica de radiográfica	50
Tabela 4 – Distribuição dos valores médios, mínimo, máximo e desvio padrão dos índices histomorfométricos	53
Tabela 5 – Distribuição do tipo de ossificação do regenerado ósseo dos grupos controle e estudo	55
Tabela 6 - Distribuição da atividade osteoblástica nos regenerados ósseos dos rádios nos grupos controle e estudo	55
Tabela 7 – Distribuição dos percentuais de ocupação de área total dos campos histológicos por tecido conjuntivo (ósseo e não ósseo) nos grupos controle e estudo.....	56

Lista de Figuras

Figura 1 – Radiografia panorâmica do antebraço do cão.....	25
Figura 2 – Fixador externo circular de Ilizarov utilizado no experimento.....	26
Figura 3 – Cão anestesiado submetido à ventilação mecânica assistida	27
Figura 4 - Cão em decúbito dorsal	28
Figura 5 - Técnica de Ilizarov, modificada por Catagni et al.....	29
Figura 6 – Osteotomia do rádio (seta azul)	30
Figura 7 – Cão em período pós-operatório.....	31
Figura 8 – Aspecto radiográfico da osteotomia do rádio e ulna. Início da distração osteogênica.....	32
Figura 9 - Regenerado ósseo com 10% de comprimento total do rádio.....	32
Figura 10 – Punção aspirativa da medula óssea.....	34
Figura 11 – Equipamentos empregados para contagem de células-tronco.....	34
Figura 12 - Desenho esquemático da punção do regenerado ósseo para infusão de CTI.....	34
Figura 13 – Programa Image J	38
Figura 14 – Desenhos esquemáticos de regeneração óssea.....	45
Figura 15 - Desenho esquemático demonstrando regenerado ósseo	45
Figura 16 - Desenho esquemático demonstrando a ausência de união entre os fragmentos do regenerado (pseudartrose)	44
Figura 17 - Aspectos radiográficos (rádio controle)	51
Figura 18 – Aspectos histológicos da ossificação	54
Figura 19 – Osteoblastos	55

Lista de Quadros

Quadro 1 - Sumarização das técnicas cirúrgicas empregadas nos grupos controle e estudo durante o experimento.....	37
Quadro 2 – Classificação histológica quanto ao tipo de consolidação do regenerado ósseo em endocondral, intramembranoso e misto, com ou sem predominância.....	41
Quadro 3 – Classificação histológica quanto à atividade osteoblástica do regenerado ósseo intensa, moderada e baixa ou ausente.....	42
Quadro 4 – Classificação histológica do percentual de ocupação de tecido conjuntivo neoformado ...	42
Quadro 5 – Classificação radiográfica do regenerado ósseo de acordo com o aspecto radiográfico....	42

Resumo

Introdução: A distração osteogênica pelo método de Ilizarov foi um grande avanço no tratamento das falhas e encurtamentos ósseos. Segmentos musculoesqueléticos que anteriormente eram submetidos à amputação puderam ser salvos com esse método. Entretanto, não está isento de complicações, sendo o longo tempo necessário para que o regenerado ósseo consolide uma limitação desse método.

Objetivos: Avaliar o efeito das células-tronco autógenas do estroma medular, durante a distração osteogênica pela técnica de Ilizarov, com o objetivo de reduzir o tempo de consolidação do regenerado ósseo.

Material e Métodos: Foram utilizados 10 cães (20 raios), submetidos a distração osteogênica pela técnica de Ilizarov no ritmo de 1mm por dia dividido em 0,5mm a cada 12 horas. O alongamento foi realizado até o regenerado obter 20% do comprimento total do rádio. As células-tronco foram introduzidas após isolamento e cultivo prévio no regenerado ósseo, quando este apresentou comprimento de 10% do rádio total. O acompanhamento foi realizado através de radiografias simples nas incidências ântero-posterior e perfil. O tempo de consolidação total (TCT) e o índice de consolidação distração (ICD) do regenerado ósseo foram mensurados em centímetros por dia de osso alongado. Adicionalmente, o regenerado ósseo foi avaliado através de exames histológicos e histomorfométricos.

Resultados: no grupo controle o TCT e ICD foram em média 117,4 ($\pm 28,0$) dias e 58,7 ($\pm 14,0$) dias, respectivamente. No grupo estudo o TCT foi de 64,3 ($\pm 8,2$) dias e o ICD de 32,15 ($\pm 4,1$) dias. Os índices histomorfométricos foram significativamente maiores no grupo estudo. Na avaliação histológica o tipo de consolidação óssea foi misto em 80% (ossificação intramembranosa e endocondral) em ambos os grupos; a atividade osteoblástica de moderada a alta foi maior no grupo estudo; e, quanto a ocupação pelo tecido neoformado foi mais significativa no grupo estudo.

Conclusão: Os resultados sugerem que o uso de células-tronco autógenas injetadas no regenerado ósseo durante a distração osteogênica pela técnica de Ilizarov em raios de cães, acelera a consolidação do regenerado.

Descritores: Ilizarov; Distração osteogênica; Células-tronco.

Abstract

Introduction: Osteogenesis distraction using the Ilizarov technique was a great advance in the treatment of bone defect and shortening. Musculoskeletal segments that were previously amputated could be saved using this technique. However, it is not free of complication, being the long duration necessary for the bone regeneration a limitation of this method. **Purposes:** To evaluate the effects of undifferentiated stem cells in the medullar stroma, during osteogenesis distraction, when using the Ilizarov technique, aiming at reducing the consolidation time of the bone regeneration. **Material and Methods:** Ten dogs (20 radiuses) underwent osteogenic distraction by using the Ilizarov technique, at the pace of 1mm per day divided in 0.5mm each 12 hours. The elongation was performed up to the regeneration reaching 20% of the total radial length. The stem cells were injected after previous isolation and cultivation of the bone regenerated, when it reach the length of 10% from the total radius. The follow-up was performed using X ray in the frontal and lateral positions. The consolidation time of the regenerate (CTR), and the index of distraction consolidation (IDC) were measured in centimeters per day of elongated bone. Additionally, the bone regenerate was evaluated using histology and histomorphometric analysis. **Results:** In the control group the mean of the CTR and the IDC were: 117.4 ± 28.0 days and 58.7 ± 14.0 days, respectively. In the study group the mean CTR was 64.3 ± 8.2 days and the mean IDC was 32.5 ± 4.1 days. The histomorphometric indexes were significantly greater in the study group. In the histology evaluation the consolidation type was mixed in 80% (intra membrane and endocondral) in both groups; the osteoblastic activity from moderate to intense was greater in the study group; and, regarding to occupying space by the neo formed tissue it was more evident in the study group. **Conclusion:** The results suggest that the use of self stem cells injected in the bone regenerate during osteogenesis distraction, using the Ilizarov technique in radius from dogs speeds the consolidation of the regenerate tissue.

Keywords: Ilizarov; Distraction osteogenesis; Stem cells.

Introdução

1.1 Apresentação do problema

A correção das falhas e encurtamentos ósseos continua sendo um problema complexo e de difícil solução¹⁻⁵, pois geralmente necessita de múltiplas intervenções cirúrgicas, longo tempo de tratamento, tem altos índices de complicações e resultados funcionais questionáveis^{1,6,7}.

No início do século XX, o tratamento desses defeitos ósseos consistia em encurtamento do membro, imobilização em aparelhos gessados, utilização de prótese, amputação ou apenas observação. Com o desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas cirúrgicas, sobretudo do fixador externo circular de Ilizarov, foi possível obter melhores resultados clínicos no tratamento dessas afecções ósseas⁶.

Ilizarov, em 1951, revolucionou o tratamento das lesões músculo-esqueléticas, não apenas pelo desenvolvimento de um fixador externo circular, mas principalmente pelo novo conceito de regeneração óssea, a distração osteogênica⁸⁻¹¹. A técnica utiliza princípios biológicos e mecânicos. Após uma corticotomia seguida pela distração lenta e progressiva dos segmentos ósseos, osteotomizados por meio de um distrator ósseo (como o fixador externo), é gerado um estresse mecânico de tensão no foco da fratura (osteotomia), que estimula a formação de osso novo (regenerado ósseo) e, concomitantemente, o crescimento de tecidos moles adjacentes, preenchendo o espaço criado pela osteotomia^{8,12}.

O ritmo de alongamento ótimo, que mais favorece a formação de osso novo e histogênese, conforme preconizado por Ilizarov, é de um milímetro por dia subdividido em ¼ de volta a cada seis horas⁸. Ritmo diário acima de 1,5mm pode causar falha na formação do regenerado, enquanto um ritmo menor que 0,5 mm pode promover consolidação óssea precoce^{8,9,12}.

O método de distração osteogênica de Ilizarov foi um grande avanço na terapêutica das lesões músculo-esqueléticas, pois, além de possibilitar o salvamento de membros

anteriormente submetidos à amputação, dispensa cirurgias abertas, uso de material de osteossíntese interno e, a princípio, de enxertos ósseos^{4,9,12,13}.

Teoricamente, não existe limite para alongamentos ósseos pela técnica de Ilizarov^{4,9,10,14}. No entanto um dos fatores mais limitantes dessa técnica é o longo tempo necessário para o osso neoformado consolidar. Isso ocorre principalmente nos grandes encurtamentos e falhas ósseas dos membros nos quais o tempo prolongado com o fixador externo está associado a complicações como rigidez articular, subluxação ou luxação, contratura de partes moles, infecção, afrouxamento dos fios ou pinos e instabilidade do fixado⁹.

A instabilidade da armação pode comprometer a integridade do regenerado ósseo ocasionando fratura, deformidade, hipotrofia, retardo de consolidação ou pseudartrose do mesmo. Adicionalmente, em alguns casos, é necessário reduzir o ritmo de alongamento ósseo, para evitar essas complicações^{5,9}.

A dinamização do fixador externo, o mecanismo de compressão-distração (mecanismo de “sanfona”), redução ou parada da distração osteogênica e enxerto ósseo autógeno são os métodos habitualmente empregados para estimular a consolidação óssea nos casos de retardo de ossificação ou pseudartrose do regenerado, durante a distração osteogênica. Esses métodos têm indicações e resultados limitados^{15,16}.

O osso autógeno esponjoso da medula óssea é considerado o melhor material para enxerto ósseo, não apenas por suas propriedades osteogênicas e osteoindutoras, como também por ser não imunogênico (obtido do próprio paciente), não transmitir doenças infectocontagiosas e ter menor custo de obtenção¹⁷. Apesar disso, em determinadas situações, como nos grandes defeitos ósseos, a quantidade necessária de osso autógeno ou a morbidade da área doadora inviabiliza ou limita seu uso^{18,19}. Nesse caso, com o objetivo de substituir ou auxiliar o enxerto ósseo autógeno, foram idealizados substitutos, tais como: enxertos

heterólogos, homólogos e biocerâmicas, cujo uso revelou uma série de riscos e complicações incluindo rejeição, instabilidade e infecções²⁰.

Estudos visando à melhoria das características biológicas dos aloenxertos ósseos estão descritos na literatura^{21,22}. Dentre os quais, está o enriquecimento do aloenxerto com a medula óssea autógena, rica em células indiferenciadas precursoras de osteoblastos^{23,24}. A medula óssea possui células-tronco com potencial para se diferenciarem nas linhagens celulares envolvidas na reparação das lesões ósseas. Essas células desempenham papel importante na osteogênese ou fagocitose, dependendo das condições do meio²⁵. No entanto a medula óssea autógena não é capaz de preencher grandes defeitos ósseos, devendo, nesses casos, associá-la a enxertos ou substitutos ósseos^{23,24,26,27}.

O aprimoramento de técnicas de obtenção e cultivo das células-tronco, além de permitir um melhor conhecimento do mecanismo de ação dos fatores biológicos envolvidos no reparo das lesões ósseas, possibilitou seu uso terapêutico. Esses agentes, denominados de auto-enxertos, são utilizados de forma isolada ou mais frequentemente associados a enxertos ósseos ou seus substitutos.

1.2 Justificativa

As grandes falhas ósseas são relevantes em ortopedia e traumatologia, tendo-se tornado atualmente motivo de freqüentes estudos científicos. O tratamento dessas lesões ganhou nova vertente, no final do século passado e início deste século, com a utilização coadjuvante de células-tronco, obtidas da medula óssea, fatores de crescimento derivados de plaquetas e proteínas morfogênicas ósseas²⁸⁻³². Esses agentes biológicos, comumente, são usados com o objetivo de promover ou acelerar o processo de consolidação ou osteointegração, em associação com enxertos ósseos ou seus substitutos, como enxertos não autógenos e biocerâmicas^{26,29,33,34}. No entanto a utilização de células-tronco no regenerado

ósseo durante a distração osteogênica pela técnica de Ilizarov, com o objetivo de abreviar o processo de ossificação, é escassa na literatura^{26,33,34}.

A necessidade de promover adequada formação óssea, assim como reduzir o tempo de consolidação do regenerado e as complicações inerentes ao longo tempo de permanência com o fixador, justifica a realização de estudos experimentais com uso de agentes biológicos. Além disso, que esses agentes possam ser obtidos por técnica simples, de baixo custo e índices de complicações aceitáveis. O emprego de células-tronco no regenerado ósseo durante a distração osteogênica pela técnica de Ilizarov pode se mostrar um procedimento factível, com possibilidade de ser estendido a seres humanos.

1.3 Objetivos

1.3.1 Geral

Comparar os resultados clínico-radiográficos, histológicos e histomorfométricos da distração osteogênica pela técnica de Ilizarov, em raios de cães, com e sem utilização de células-tronco autógenas no regenerado ósseo.

1.3.2 Específicos

- ❖ Avaliação clínica e radiográfica do tempo de consolidação do regenerado ósseo com e sem o uso de células-tronco autógenas;
- ❖ Avaliar diferenças histológicas e histomorfométricas, quantitativas e qualitativas (tecidos/células), no regenerado ósseo, com e sem o uso de células-tronco autógenas.

Literatura

2.1 Mecanismo de reparo das lesões ósseas

O mecanismo de consolidação óssea depende de vários fatores, como tipo de tratamento realizado, estabilidade da osteossíntese, da vascularização e do contato entre os fragmentos ósseos, além do tempo necessário para que ocorra união estável entre eles^{15,35}.

Os mecanismos biológicos de reparo das lesões ósseas são complexos e ainda não foram totalmente elucidados^{11,20}. Independente da causa, o reparo das lesões ósseas segue uma seqüência de eventos que podem ser divididos em três fases, de acordo com as mudanças morfológicas: fase inflamatória, reparativa e de remodelação³⁶. Na fase inicial, há formação e reorganização do hematoma, liberação de fatores de crescimento plaquetário e formação de tecido rico em células progenitoras provenientes do próprio tecido ósseo e sangue periférico. Essas células, na fase de reparo, vão formar o tecido ósseo primário (imaturo) por um processo semelhante à ossificação endocondral e a intramembranosa³⁶. Posteriormente, esse tecido imaturo sofre remodelação óssea auxiliada pelos osteoclastos, até formar o tecido ósseo maduro ou lamelar. Esta fase pode durar meses ou anos, até que o osso neoformado, auxiliado por forças mecânicas, adquira as características estruturais, fisiológicas e mecânicas prévias à lesão. Os estágios são modulados por mecanismos biológicos e mecânicos complexos^{35,37}.

A estabilidade da osteossíntese utilizada no reparo das lesões ósseas interfere no mecanismo de consolidação óssea, que pode ser primária, sem formação de calo ósseo, ou secundária, com formação de calo ósseo. A primária acontece após osteossíntese com estabilidade absoluta, sem micro movimentos no foco de fratura e com contato menor que um milímetro entre os fragmentos ósseos³, enquanto que a secundária ocorre nos casos tratados sem fixação óssea ou na presença de estabilidade relativa da osteossíntese³⁸.

Independente do tipo de consolidação óssea, primária ou secundária, células de origem mesenquimal e plaquetas liberam polipeptídeos que atuam no reparo das lesões ósseas regulando a proliferação de células mesenquimais e sua diferenciação em células

osteogênicas, assim como a quimiotaxia e a formação de matriz óssea²⁴. Dentre essas moléculas, estão o fator de crescimento transformador beta (TGF- β), as proteínas morfogênicas ósseas (BMP), o fator de crescimento fibroblástico (FGF) e o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF). As variantes 1 e 2 do TGF- β têm como funções a quimiotaxia e a mitogênese das células precursoras dos osteoblastos, estimulando a deposição de matriz óssea, além de inibir a reabsorção de osso pelos osteoclastos, originando um calo ósseo maior e forte. Além do TGF- β , as BMP são os principais fatores pelo recrutamento e pela diferenciação das células mesenquimais em condroblastos e osteoblastos para formação do tecido ósseo secundário (lamelar) com calo duro, mas não pelo aumento da atividade mitótica. O PDGF é o primeiro fator a aparecer numa lesão e promove aumento de células reparadoras, desbridamento do local da lesão, mas, embora aumente o tamanho do calo ósseo, não aumenta a estabilidade mecânica. Além disso, promove a angiogênese, sem a qual não formará o tecido viável³⁹⁻⁴¹.

Os procedimentos terapêuticos de reconstrução das falhas ósseas (neoformação óssea) evoluíram, ao longo dos anos, para que pudessem atuar sinergicamente com o organismo em cada uma das fases da reparação óssea, ensejando as melhores condições fisiológicas.

2.2 Evolução do tratamento das falhas ósseas

O tratamento das falhas ósseas pode ser dividido em três processos: alongamento ósseo, enxertos ósseos e auto-enxertos.

2.2.1 Evolução do alongamento ósseo

O primeiro relato sobre alongamento ósseo foi descrito, em 1905, por Alessandro Codivilla (1904-1905), entretanto os resultados foram desapontadores. A partir de então, vários estudos experimentais e clínicos foram desenvolvidos para determinação da melhor

técnica de alongamento ósseo e explicação dos mecanismos biológicos e mecânicos envolvidos na regeneração óssea^{2,3,13,42,43}.

Anderson, em 1952, foi o primeiro a mostrar a importância da preservação dos tecidos moles e da osteoclasia fechada na regeneração óssea⁵¹. Apesar disso, só com o surgimento do fixador externo circular, desenvolvido pelo Professor Gavriil Abramovich Ilizarov, na década de 50, no Centro de Reabilitação Ortopédica e Traumatológica de Kurgun, localizado na Sibéria, antiga União Soviética; um novo conceito sobre regeneração óssea foi enunciado - a distração osteogênica⁵²⁻⁵⁵.

Ilizarov estudou a distração osteogênica e, por meio de estudos experimentais em animais e clínicos, em humanos, definiu suas bases biológicas e estabeleceu um protocolo de tratamento em ossos longos, possibilitando índices menores de complicação durante a formação de tecido ósseo. Além disso, apresentou os princípios da tensão gradual dos tecidos nas doenças do aparelho osteomuscular, denominando-a técnica de compressão-distração, ressaltando como vantagens da técnica: cirurgia menos traumática, diminuição no tempo total de tratamento, resolução de casos antes considerados incuráveis e regeneração de tecidos moles, como músculos, vasos e nervos, além do tecido ósseo, sem a necessidade de enxertos^{8,44,45}.

Submetendo 480 cães adultos a alongamento de tíbia, o autor concluiu que com o uso de um fixador suficientemente estável, associado à máxima preservação dos tecidos moles, do osso medular e do suprimento sanguíneo no local da corticotomia, ocorre neoformação óssea mais favorável e rápida (cerca de 21 dias), do que nos casos com osteotomia medular agressiva e interrupção do aporte sanguíneo⁸.

Em seguida, Ilizarov desenvolveu estudo com 120 animais, divididos em dois grupos, segundo osteotomia aberta ou fechada da tíbia, para avaliar a quantidade, ritmo e frequência de alongamento ósseo. Para tanto, formou seis sub-grupos, variando o ritmo (0,5mm, 1,0mm,

2,0mm por dia) e a frequência (uma, quatro e 60 voltas por dia). Os espécimes foram sacrificados em intervalos variando de sete dias a seis meses e estudados radiográfica, histológica e biomecanicamente. Observou que a melhor resposta tecidual foi obtida quando o ritmo de alongamento foi de 1mm/dia, na frequência de 60 voltas/dia, assim como detectou consolidação prematura com 0,5mm/dia e formação de tecido fibroso, com ritmo de 2,0mm/dia⁵⁷.

A partir desses estudos, Ilizarov recomendou quatro princípios para boa qualidade e quantidade de osso regenerado no alongamento dos ossos longos: corticotomia percutânea com menor dano possível aos vasos; aplicação de fixador externo circular com máxima estabilidade dos fragmentos ósseos, mas não rígido; período de latência de cinco a 10 dias antes do início do alongamento e distração óssea progressiva, seguida por um período de consolidação antes da remoção do fixador⁴⁵.

Na mesma época em que Ilizarov pesquisava o uso do fixador circular, De Bastiani *et al.* (1986) utilizavam a técnica de distração osteogênica com um fixador externo unilateral, constituído por uma barra cilíndrica articulada, fixada ao osso por pinos cônicos, capaz de proporcionar maior conforto para o paciente durante a distração osteogênica. Apesar disso, esse fixador não era tão estável com a do fixador externo circular, e a utilização apenas de pinos para fixação ao osso, tornava-o mais rígido, impedindo os micro movimentos que, sabidamente, estimulam a osteogênese⁵⁸.

Com o uso do fixador circular, o estiramento das partes moles na região do segmento músculo-esquelético alongado, a hipovascularização e o tempo prolongado de consolidação do regenerado ósseo foram identificados como principais fatores limitantes da distração osteogênica. Foi também comprovado que a fraqueza muscular, ocorrida após alongamento ósseo, não estava associada apenas ao desuso do músculo, mas, principalmente, à denervação muscular e a lesões de suas microfibras, ocasionadas pelo alongamento com ritmos superiores

a 1,0mm/dia. Complicações decorrentes do longo tempo do fixador externo incluíram infecção no trajeto dos fios de Kirschner ou dos pinos de Schantz, encurtamentos musculares e rigidez articular, assim como fratura ou deformidade do regenerado ósseo, após a retirada do fixador^{46,47}.

Com o objetivo de reduzir o tempo de uso do aparelho, e, portanto, as complicações relacionadas, Paley *et al*⁴⁸, em 1997, propuseram uma técnica de alongamento ósseo com fixador externo uniaxial associado a uma haste intramedular, com a função de tutor interno durante o alongamento.

Outros sistemas de alongamento ósseo incluíram o uso exclusivo de hastes intramedulares^{49,50}, com bons resultados e menores complicações relacionadas com as partes moles e com o regenerado, quando comparados aos alongamentos ósseos realizados com fixadores externos. No entanto o uso de hastes intramedulares não esteve livre de desvantagens e complicações. Foram identificadas complicações relacionadas à técnica, como tempo cirúrgico mais prolongado, maior sangramento, maior índice de infecção e de embolia gordurosa, como também à complexidade da deformidade ortopédica e sua causa, compreendendo deformidades multiaxiais associadas com discrepância dos membros e decorrentes de osteomielite⁴⁸.

Mais recentemente, sistemas automatizados para alongamento ósseo, com hastes intramedulares, foram desenvolvidos e aprimorados, os quais, além do alto custo financeiro e da possibilidade de falha do sistema mecânico com bloqueio da distração óssea, associam desvantagens e complicações das hastes convencionais⁵¹.

Estudos biomecânicos demonstram que os fixadores circulares ainda são os que apresentam melhores resultados quanto à estabilidade e versatilidade, principalmente nos casos de discrepâncias adquiridas dos ossos longos, associadas a deformidades multiaxiais e osteomielites, como também nas afecções ortopédicas de origem congênita⁶⁶⁻⁶⁸.

2.2.2 Utilização de enxertos ósseos convencionais

A enxertia óssea é um procedimento antigo. O primeiro registro do uso de enxerto ósseo data de 1668, para tratamento de doenças diversas como consolidação óssea tardia, pseudartroses adquiridas ou congênitas, defeitos ósseos pós-traumatismo, infecções e tumores, enquanto que o primeiro enxerto de osso craniano foi realizado 1682⁵².

Ao longo do tempo, o processo de enxertia óssea foi evoluindo, do que derivaram diversas classificações. Quanto à origem do tecido enxertado, a terminologia moderna reconhece: enxertos autólogos, quando a origem é o próprio indivíduo; aloenxertos, aqueles originados de indivíduo da mesma espécie, porém com características genéticas diferentes; isoenxertos ou enxertos singênicos, quando oriundos de indivíduos geneticamente idênticos, e xenoenxertos, quando advindos de indivíduos de espécies diferentes⁵². Considerando o sítio doador, os enxertos ósseos podem ser de osso cortical, esponjoso ou de osso total, cujas propriedades específicas interferem sobre o sucesso ou insucesso do procedimento⁵³.

Apesar da evolução no tratamento com enxertos ósseos convencionais, o insucesso ainda é frequente, devido a necrose e reabsorção dos enxertos, soltura precoce do material de osteossíntese por falência mecânica, pseudartrose e não incorporação do enxerto⁶.

O desafio de obter melhores resultados no tratamento de falhas ósseas tem feito com que novas técnicas sejam desenvolvidas. Busca-se obter resultados no mínimo comparáveis àqueles com o uso de enxertia autóloga, considerada o melhor método para indução da consolidação óssea, porém sem a desvantagem de ser fonte esgotável, causar seqüelas no sítio doador, além de ter qualidade dependente da idade e das condições gerais do paciente⁵⁴.

Esses insucessos suscitam questionamentos relacionados aos custos diretos e indiretos envolvidos na recuperação das falhas ósseas. A amputação com uso de prótese poderia parecer uma solução mais prática do que o desenvolvimento de técnicas de recuperação, mas

o custo do tempo de vida útil do paciente tem feito com que se busque o desenvolvimento dos auto-enxertos¹⁰.

2.2.3 Auto-enxerto no reparo de lesões ósseas

Auto-enxertos são fatores biológicos que vão atuar durante todo ou parte do reparo óssea, regulando as atividades autócrinas e parácrinas dos osteoblastos, e estão sendo utilizados como alternativa aos enxertos ósseos ou, mais comumente, associados a estes, para promover a cura ou acelerar o reparo das lesões ósseas²⁰.

Os auto-enxertos podem ser substâncias osteoindutoras, osteocondutoras e osteogênicas. As osteoindutoras são capazes de desencadear proliferação e diferenciação de células-tronco em diferentes tipos celulares especializados, como o fazem, por exemplo, as proteínas morfogênicas ósseas (BPM) e o plasma rico em plaquetas por conter os TGF- β e o fator de crescimento plaquetário (PDGF)^{20,58}.

A função das proteínas morfogênicas ósseas foi descrita em tópicos anteriores, mas cabe acrescentar, que dentre todos os fatores de crescimento ósseo atualmente conhecidos, apenas as BMP têm a capacidade de induzir o processo de formação de osso ectópico, em vertebrados, mas precisam ser implantadas associadas a um carreador, que, além de atuar como espaçador tridimensional fornecendo a estrutura necessária para a formação do novo tecido, assegura concentração dessas proteínas no local desejado, porque elas são solúveis em água e rapidamente difusíveis^{55,56}.

O plasma rico em plaquetas foi inicialmente descrita por Lynch et al⁵⁷., em 1991. É um coágulo de fibrina, autólogo, rico em plaquetas que liberam, de forma cíclica, PDGF e TGF- α . Adicionados ao enxerto ósseo para tratamento de uma falha, são capazes de acelerar o processo de consolidação e mineralização da lesão óssea em cerca da metade do tempo, bem

como aumentar a densidade óssea do osso trabecular em 15% a 30%, comparativamente aos casos sem uso de plasma rico em plaquetas^{31,32,57}.

Os agentes osteocondutores funcionam como arcabouço para formação óssea, podendo ou não ser absorvidos ou incorporados, como, por exemplo, as biocerâmicas. Nessa categoria de auto-enxertos, as substâncias mais empregadas são a hidroapatita, o fosfato de cálcio, o sulfato de cálcio, além da associação entre eles, especialmente da hidroxiapatita com o fosfato tricálcico, e deles com as BMP, temas que ainda necessitam ser mais amplamente pesquisados para que se obtenha um nível mais alto de evidência²⁰.

As substâncias osteogênicas, como, por exemplo, as células-tronco mesenquimais, são capazes de produzir células ósseas envolvidas no reparo das lesões ósseas⁵⁸ e se constituem no tema central do presente trabalho.

Vários estudos têm demonstrado a ação dessas substâncias no mecanismo de reparo das lesões ósseas, técnicas para obtenção e utilização, além de indicações, vantagens, desvantagens e complicações^{20,54,59-61}.

2.3 Células-Tronco

A hipótese de que a medula óssea autógena transplantada para uma região heterotópica induzia a formação de osso foi aventada por Goujon (1869, *apud* BURWELL, 1985). Com o avanço tecnológico, foi possível identificar que essas células, atualmente denominadas de células-tronco, estão presentes em praticamente todos os tecidos.

Não há um conceito único para células-tronco, por isso são caracterizadas por suas propriedades funcionais^{58,62}. Células-tronco são células não especializadas, capazes de se multiplicar assimetricamente por longo período, mantendo-se indiferenciadas, de forma que um pequeno número dessas células pode originar uma grande população de células semelhantes. No entanto, diante de um evento ou estímulo apropriado, podem se diferenciar

em várias linhagens de células especializadas, formando tecidos específicos⁵⁸. A divisão assimétrica é a capacidade que permite à célula-tronco permanecer indiferenciada e originar células-filhas à semelhança da célula-mãe, mantendo as reservas celulares do tecido, como também originar uma outra linhagem celular, a qual irá se diferenciar em células especializadas⁶³.

As células-tronco (CT) podem ser classificadas quanto a origem e capacidade de diferenciação nos tipos embrionária e adulta, cada qual com indicações terapêuticas, vantagens e desvantagens próprias⁵⁸.

As CT embrionárias (CTE), obtidas do embrião nas fases iniciais do desenvolvimento uterino ou por técnicas genéticas (clonagem), são pluripotentes, por isso podem se diferenciar em qualquer tipo de tecido. As desvantagens do uso terapêutico dessas células não se restringem às dificuldades técnicas, financeiras, éticas e políticas que envolvem sua obtenção, mas incluem também a possibilidade de desencadeamento de resposta imune do hospedeiro, maior tendência à formação de células neoplásicas por elas não serem autógenas^{59,64}.

As CT adultas são células pós-natais, presentes em múltiplos tecidos, como medula óssea, tecido adiposo, periósteo, músculos esqueléticos, sangue periférico, dentre outros⁶⁵⁻⁶⁷. O uso de CTA apresenta vantagens em relação às CTE: possibilidade de isolamento de múltiplos tipos de tecido, presença em indivíduos de qualquer idade, baixa tumorigenicidade por serem autólogas, além de envolverem menor exigência financeira. Apesar disso, apresentam menor capacidade de diferenciação quando comparadas às CTE, o que constitui em uma desvantagem^{62,68}.

As fontes mais comuns de CT são medula óssea, sangue periférico, placentário ou de cordão umbilical, assim como tecidos fetais, ou ainda cultura de CT adultas⁶⁹.

Burwell⁹⁴ (1964) atribuiu às células osteogênicas primitivas da medula óssea a eficácia biológica dos enxertos ósseos esponjosos, entretanto foram Friedenstein *et al*⁹⁵, em 1974, que

demonstraram pioneiramente que as células-tronco medulares aderem à placa de cultura e assemelham-se a fibroblastos “*in vitro*” e formam colônias. Essas células da medula óssea foram descritas como indiferenciadas, caracterizadas por baixa taxa de crescimento, alta capacidade de auto-renovação e potencial para se diferenciarem em várias linhagens celulares. Na reparação óssea, elas desempenham papel importante na osteogênese ou fagocitose, dependendo das condições do meio²⁵. A estas células, foram dados os nomes de células-tronco estromais da medula óssea, células progenitoras do tecido conjuntivo, células-tronco esqueléticas ou células-tronco mesenquimais (CTM)^{63,72}.

Estudos posteriores demonstraram que as CTM da medula óssea são células multipotentes e podem ser isoladas, expandidas e diferenciadas, por meio de técnicas de cultivo específicas, em células especializadas principalmente osteoblastos, condroblastos, adipócitos e fibroblastos^{73,74}.

As CTM correspondem a 0,01 de todas as células presentes na medula óssea adulta, mas, embora a medula óssea seja a reserva dessas células, estão presentes em diversos outros tecidos, como periósteo, músculo, fígado, sangue e tecido adiposo. Outra característica que lhe é peculiar é o declínio de sua frequência com a idade⁷⁵.

Essas informações são importantes porque o aspirado da medula óssea é a principal fonte para utilização de células-tronco em ortopedia. A alta plasticidade dessas células possibilita seu uso terapêutico em várias afecções médicas, tornando-se motivo de estudos clínicos e pré-clínicos que as utilizam como alternativa aos enxertos ósseos ou a seus substitutos, como as biocerâmicas⁵⁸.

Efeitos positivos do uso dessas células, isoladas ou associadas com enxertos ósseos ou substitutos, no reparo de lesões ósseas críticas ou osteointegração, são descritos em vários estudos⁷⁵⁻⁷⁹.

A utilização do aspirado da medula óssea, como enxerto “fresco” sem isolamento ou cultura prévia de CTM, apresenta resultados controversos no reparo das falhas ósseas. Krzymanski et al⁸⁰, em 1997, compararam o reparo ósseo, em ratos, submetidos a CT de medula óssea “fresca”, células mesenquimais obtidas da medula óssea, isoladas e diferenciadas em células fibroblastóides em meio de cultura; aloenxerto e autoenxerto. Identificaram não haver diferença significativa quanto ao reparo das lesões ósseas, no grupo do aspirado da medula óssea com os das células cultivadas (fibroblastóides), entretanto o efeito na consolidação óssea foi significativamente menor no grupo do aloenxerto, comparado aos outros grupos. Resultados diferentes foram obtidos por outros autores³, em 2004 que não observaram aumento da formação do calo ósseo com o uso do aspirado da medula óssea “fresca” em defeitos de fêmures de ratos.

A associação de BPM e de células-tronco da medula com aloenxerto, em defeito ósseo de tíbias de cães, promoveu osteointegração mais rápida e eficaz do que nos grupos em que foi empregado isoladamente o autoenxerto, o aloenxerto ou este associado à BPM⁸¹.

Em outros estudos pré-clínicos e clínicos, foram utilizadas CTM, após isolamento e cultivo prévio, associadas ao plasma autólogo rico em plaquetas (PRP), a BPM, a aloenxertos ou biocerâmicas, no reparo de defeitos ósseos críticos. Independente dos componentes associados, os resultados mais significativos de consolidação óssea ou de osteointegração ocorreram na associação de células-tronco da medula óssea com PRP ou BPM, comparativamente ao uso isolado de CTM ou PRP^{24,82}.

Estudos sobre a ação das CTM indiferenciadas no regenerado ósseo, durante a distração osteogênica pela técnica de Ilizarov, são escassos na literatura. Kitoh *et al*²⁶. (2004), durante a distração osteogênica utilizaram plasma rico em plaquetas e células-tronco mesenquimais, após expansão e diferenciação em cultura, em três pacientes, dois com acondroplasia e um com pseudartrose congênita da tíbia. Obtiveram consolidação clínica e

radiológica mais rápida, representada por índice de consolidação médio de 23 dias para cada centímetro de osso alongado, e com menores índices de complicações em todos os casos, em relação àqueles relatados na literatura e tratados apenas com fixador ou enxerto ósseo²⁶.

Outro aspecto já investigado foi a ação das CTM na isquemia, porque esse fenômeno atua como fator limitante da distração osteogênica. Com os objetivos de estabelecer a área de extensão da isquemia no regenerado ósseo, durante a distração, e a participação das CTM na vasculogênese local após sua diferenciação em células progenitoras endoteliais, Cetrulo Jr *et al*⁸³, em 2005 injetaram CTM autógenas nas carótidas das cobaias, no início da distração osteogênica da mandíbula. Concluíram haver uma expansão seletiva de células progenitoras endoteliais nas zonas isquemiadas durante a fase de ativação da distração osteogênica, as quais permanecem na fase de consolidação, sugerindo que a injeção de CTM poderia reduzir a extensão da área de tecido isquêmico.

A ação dos auto-enxertos sobre a osteogênese também foi comprovada por Mandu-Hrit *et al.*⁸⁴, em 2006, ao demonstrarem que a introdução de proteína morfogênica 1 (OP 1) no regenerado ósseo, ao início da distração osteogênica, acelera a consolidação do osso neoformado em fêmures de coelhos, no entanto, diferente de outros autores⁸³. A injeção de BPM OP-1 no regenerado ósseo não aumenta a vascularização sanguínea na área do alongamento e atribuíram a aceleração da consolidação óssea a um outro fator, que não o aumento da angiogênese⁸⁵.

Na medida em que as comprovações foram ocorrendo, houve a necessidade de avaliar de forma mais objetiva os eventos presentes no regenerado ósseo durante a distração osteogênica por meio de exames de imagem.

2.4 Métodos de avaliação do regenerado durante a distração óssea

2.4.1 Métodos de imagem

Há vários métodos descritos para acompanhar a evolução do regenerado ósseo durante a distração osteogênica quanto a: tamanho, largura, qualidade, deformidades que podem ocorrer durante o alongamento, e, sobretudo ao grau de maturação e consolidação do osso alongado. O objetivo dessas avaliações é definir a data mais adequada para retirada do fixador externo, isto é, da consolidação do regenerado¹⁶. Dentre os métodos de imagem utilizados, estão radiografia convencional, ultrassonografia, tomografia axial computadorizada, cintilografia óssea, densitometria óssea e análise de imagens digitais através de programas de computador^{7,16,19,86,87}.

Embora haja opiniões discordantes relativas aos sinais clínicos de consolidação óssea quanto ao uso da radiografia convencional, ela continua sendo o método mais utilizado para definir a data adequada da retirada do fixador, isto é, da consolidação do regenerado^{46,86}.

Essa afirmação foi comprovada por Aronson et al.⁸⁸, em 2003, em estudo com tíbia de 65 cães, alongadas pela técnica de Ilizarov, para comparação dos métodos empregados para acompanhar a evolução do grau de maturação e consolidação do regenerado ósseo e tomar a decisão sobre a data ideal para remover o fixador externo. Dentre seis métodos de imagem analisados, a radiografia convencional mostrou ser o mais eficaz para o acompanhamento de todos os aspectos do regenerado ósseo durante a distração osteogênica, incluindo a relação custo/benefício, embora outras técnicas possam ser utilizadas, como a tomografia computadorizada quantitativa que permite melhor avaliação da densidade óssea; a ultrassonografia para documentar a presença de cistos no regenerado e cintilografia para avaliar a vascularização do regenerado. Acrescentaram que, durante o acompanhamento do alongamento ósseo, nenhum método invasivo é necessário para decisões clínicas referentes ao

retardo de consolidação do regenerado, como alterar o ritmo da distração osteogênica, uso de enxerto ósseo, dinamização do fixador ou remoção deste, após evidenciar consolidação adequada do regenerado através dos exames de imagem.

2.4.2 Histologia e histomorfometria óssea

A utilização da histomorfometria (verbeta derivado do grego significando *histós* – tecido; *morphe* – forma; *métron* – medida) do tecido ósseo data da década de 40, quando se obteve maior conhecimento da arquitetura óssea. A utilização das técnicas de biópsia, e, estudos com bases da histomorfometria óssea, estão estabelecidos, com a qual se analisam, de maneira quantitativa, componentes da morfologia óssea como volume, superfície, área e perímetro^{89,90}.

A histomorfometria emprega os princípios da estereologia, com a qual se analisam estruturas tridimensionais de amostras bidimensionais⁹¹. Em 1847, o geologista francês Delese, estudando rochas, determinou que a fração de área é igual à fração de volume nas secções infinitamente finais, demonstrando que a espessura da secção é o parâmetro mais importante, porque, quanto menor a espessura do corte, menor a probabilidade de erro. No entanto, nessa época, a análise estereológica restringia-se a estruturas isotrópicas, isto é, cuja distribuição e orientação, no espaço, fossem uniformes, o que impedia a análise de amostras ósseas, cuja principal característica é apresentar distribuição espacial anisotrópica, pois as trabéculas ósseas estão dispostas em diferentes orientações⁸⁹. A comprovação feita por Baddeley et al⁹², em 1986, utilizando um sistema de amostragem ao acaso, de que os procedimentos estereológicos poderiam ser aplicados na análise de estruturas anisotrópicas; abriu uma nova perspectiva de estudo do tecido ósseo, que foi ainda mais expandida com a padronização dos índices de histomorfometria óssea, feita por Parfitt et al.⁹⁰, em 1987, e

aceita mundialmente. Esses avanços metodológicos serviram de motivação para outros autores⁹² que iniciarem um estudo de comprovação de que tal metodologia pode ser aplicada em osso trabecular.

Poucos meses depois, foi publicada a técnica de análise histomorfométrica de amostras de reparo ósseo, obtidas por cortes transversais, associada aos critérios que permitiram correlacionar as medidas histomorfométricas às propriedades biomecânicas e às imagens radiográficas, definindo funcionalmente as taxas do tecido ósseo reparado. As medidas histomorfométricas podem avaliar a quantidade de tecido ósseo, as taxas de formação e reabsorção, a qualidade da sua micro-arquitetura e da conectividade da malha trabecular³⁸. Com a maior divulgação do método histomorfométrico, outros avanços se somaram, dentre os quais está a automatização da leitura das lâminas por meio de programas informatizados de análise de imagem⁹⁴.

Materiais e Métodos

3.1 Local e tipo de estudo

O estudo foi experimental, prospectivo, analítico, realizado no Núcleo de Cirurgia Experimental do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), no período de setembro de 2006 a janeiro de 2008.

Os animais foram mantidos durante todo o experimento no biotério do Núcleo de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da UFPE, onde foram conduzidos por técnicos e veterinários habilitados, seguindo normas internacionais para pesquisa com animais.

3.2 Seleção

Foram estudados 22 raios do antebraço, direito e esquerdo, de 11 cães adultos, mestiços, com peso corpóreo variando de 15 a 20Kg, com idade média de 4,5 anos (mínimo de 4 anos; máximo 5 anos), clinicamente sadios, oriundos do Centro de Vigilância Animal da Prefeitura da Cidade do Recife – PE.

3.2.1 Seleção dos grupos

Os grupos foram constituídos pelos antebraços dos cães, determinando-se por sorteio, que, para cada cão, o grupo I (controle) fosse constituído pelo antebraço direito, ficando o esquerdo, do mesmo animal, como grupo II (estudo).

Grupo I (controle):

- ❖ antebraço direito (11 cães): 11 raios;
 - ❖ distração osteogênica isolada dos onze raios pelo método de Ilizarov.
-

Grupo II (estudo):

- ❖ antebraço esquerdo (11 cães): rádio esquerdo;
- ❖ distração osteogênica pelo método de Ilizarov, associada a células-tronco autógenas indiferenciadas.

3.2.2 Critérios de exclusão

Foi considerada como critério de exclusão, a presença de qualquer dos seguintes eventos: alterações ósseas e deformidades congênitas, infecção pós-operatória grave (infecção do regenerado ósseo), exposição da área do osso alongado com deiscência da ferida operatória, assim como outras intercorrências que comprometessem a distração osteogênica, como, por exemplo, perda da instabilidade do fixador externo por quebra dos fios de Kirschner ou dos pinos de Schantz.

De acordo com estes critérios, um cão foi excluído do estudo, durante o procedimento controle, por falha do material de osteossíntese (quebra de um fio de Kirschner), comprometendo o regenerado ósseo, durante a fase de distração osteogênica.

3.3 Procedimentos

Os animais foram medicados com drogas antiparasitárias para: *Ancylostoma*, *Spirocerca*, *Uncinaria* e *Toxocara canis*, e imunizados preventivamente contra raiva, cinomose, *Adenovírus coronavírus*, *parvovírus*, vírus da parainfluenza e *Leptospira*. Após a vacinação, aguardaram-se 40 dias para iniciar os procedimentos cirúrgicos.

Os animais foram então submetidos a exames laboratoriais (hemograma e coagulograma) e radiográficos, nas incidências ântero-posterior e perfil das quatro patas, com o objetivo descartar alterações ósseas e deformidades congênitas.

A alimentação diária consistiu de água e 800g de ração *PopDog Natural*[®], produzida pela *Kowalski Alimentos Ltda*, contendo proteínas e vitaminas A, D3, E, K3, B1, B2, B12 e niacina, além de cálcio, fósforo, ácido pantotênico, colina, zinco, ferro, manganês, cobre, iodo e selênio. O consumo diário dessa ração com peso entre 12 e 25 Kg variou de 340 a 680g.

3.3.1 Procedimentos cirúrgicos

3.3.1.1 Pré-operatório

O cão selecionado para a cirurgia foi mantido em jejum por 12 horas. A higiene corporal foi realizada meia hora antes da cirurgia.

Radiografias em incidência ântero-posterior e perfil panorâmico do antebraço do animal foram realizadas antes do procedimento cirúrgico, para auxiliar na montagem prévia do fixador de Ilizarov e na determinação do tempo total de distração osteogênica (TTDO). Para o cálculo do TTDO, admitiu-se um alongamento de 20% do tamanho total do rádio de cada cão em ritmo de 1 mm/dia, variando de 19 mm a 22 mm, correspondendo a TTDO de 19 a 22 dias (Figura 1).

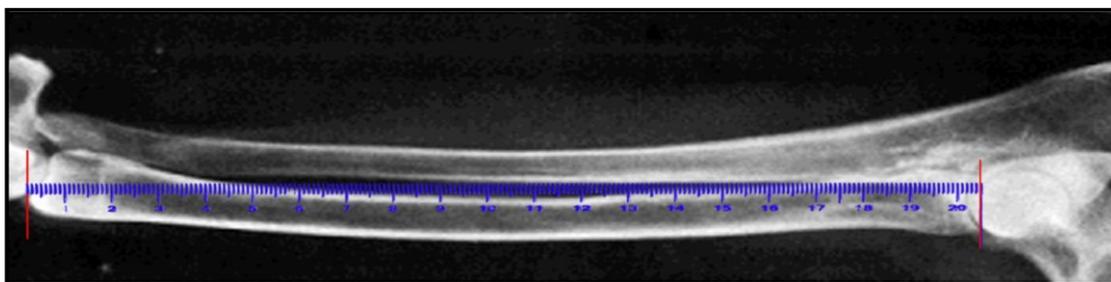


Figura 1. Radiografia panorâmica do antebraço do cão: em azul - mensuração do comprimento total do rádio com régua

A montagem do aparelho de Ilizarov foi composto por quatro anéis em aço inoxidável de 100mm diâmetro, dois em cada extremidades, conectados por quatro hastes rosqueadas de tamanho tal que os anéis ficassem posicionados em cada extremidade óssea proximal e distal de ulna e rádio. A mesma configuração da armação do fixador foi utilizada nos grupos estudo e controle (Figura 2).

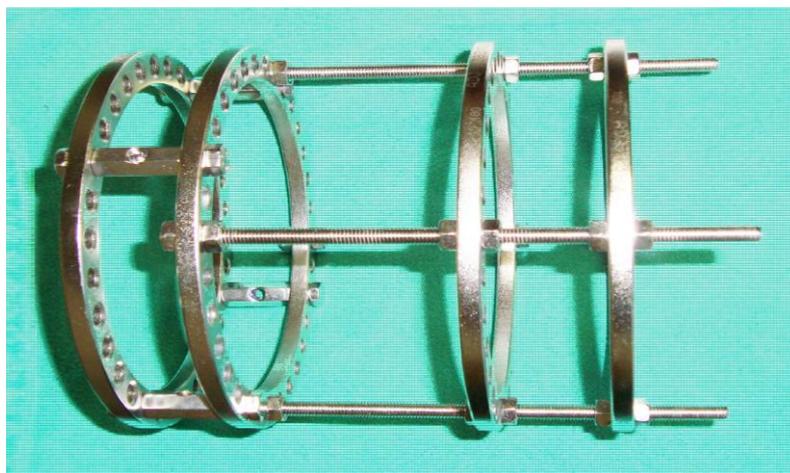


Figura 2. Fixador externo circular de Ilizarov utilizado no experimento

a) Anestesia

Nos procedimentos com maior duração cirúrgica, como fixação do aparelho, osteotomia e ressecção do regenerado ósseo, o animal foi submetido indução anestésica com tiopental sódico (12,5mg/Kg peso) por via intravenosa, seguindo-se anestesia geral, conduzida com cloridrato de cetamina (2,5mg/Kg peso) e brometo de pancurônio (0,1mg/Kg peso a 0,2mg/Kg peso) administrados por via endovenosa, sob com entubação orotraqueal. A assistência ventilatória mecânica controlada foi realizada com volume corrente de 15mL/Kg peso, FiO₂ de 21% e frequência respiratória de 16 ciclos/minuto. Para reversão do bloqueio neuromuscular, foi utilizado metilsulfato de neostigmina (0,06mg/Kg peso) e atropina (0,02mg/Kg peso) por via endovenosa (Figura 3).



Figura 3. Cão anestesiado submetido à ventilação mecânica assistida

Nos procedimentos com menor tempo cirúrgico, como punção da medula óssea e inoculação percutânea das células-tronco no regenerado ósseo, foi realizada sedação anestésica com tiopental e anestesia local, com xilestesin[®] a 2%, sem vasoconstrictor.

A antibiocioprofilaxia foi realizada com o protocolo de Rahal et al.⁹⁵, em 2002, modificado, que consistiu na infusão endovenosa de cefalotina sódica na dose de 40mg/Kg peso, durante e após duas horas da indução anestésica, assim como após o término da cirurgia, nesse caso, associada a penicilina G benzatina, na dosagem de 40.000 UI/dose⁹⁶.

b) Técnica de fixação do Ilizarov e osteotomia

Decorridos os cinco minutos de latência da anestesia geral, foi realizada nova limpeza do membro, com gaze umedecida com PVP-I¹ a 10%. Posteriormente, procedeu-se à tricotomia de todo o antebraço canino, seguida da antisepsia da pele, com a mesma solução. Colocado um campo cirúrgico estéril sobre a mesa, o animal foi posicionado em decúbito

¹ Povidine Degermante[®] . Johnson, BR

dorsal e suas quatro patas fixadas à mesa com faixa de crepe. Os campos cirúrgicos foram posicionados, expondo o antebraço a ser submetido ao procedimento cirúrgico (Figura 4).



Figura 4 - Cão em decúbito dorsal

Procedeu-se à exsanguinação do antebraço, utilizando faixa de Esmarch ao nível do braço, com o objetivo de reduzir a perda sanguínea e facilitar a intervenção cirúrgica. O fixador externo circular de Ilizarov foi fixado em cada extremidade dos ossos do antebraço, de acordo com técnica de Ilizarov modificada por Catagni et al.⁹⁶ (1991). Empregaram-se quatro fios de Kirschner 1,5mm (dois na ulna e dois no rádio) e dois pinos de Schantz (um no rádio e outro na ulna), com diâmetro equivalente a um terço do rádio do animal operado.

Os fios de Kirschner foram transfixados ao rádio e à ulna com perfurador de baixa rotação, sendo dirigidos perpendicularmente ao eixo longitudinal do osso e em ângulo de 90° entre si, pré-tensionados a 100Kg (Newtons), com um tensionador, e fixados ao anel com parafusos sulcados (Figura 5).

Os pinos de Schantz foram introduzidos manualmente, após pré-broqueamento, no ângulo de intersecção entre os dois fios de Kirschner (Figura 5).



Figura 5. Técnica de Ilizarov, modificada por Catagni et al⁶: A) Materiais de Ilizarov utilizados na intervenção cirúrgica; B) Sequências da cirurgia; B1) Posicionamento do fixador; B2) Pré-tensionamento do fio de Kirschner; B3) Introdução do pino de Schantz; e B4) Fixação final da armação.

Terminada a fase de fixação, realizou-se uma incisão longitudinal da pele e do tecido subcutâneo, na face pósteromedial do terço médio do antebraço, seguindo-se a osteotomia transversa na diáfise do rádio com um formão de 2mm e martelo, após prévia perfuração da diáfise com brocas de 2mm (Figura 6). A osteotomia da ulna foi realizada ao mesmo nível daquela do rádio, através de uma segunda incisão na face pósterolateral do antebraço, seguindo a mesma seqüência da técnica utilizada para o rádio.

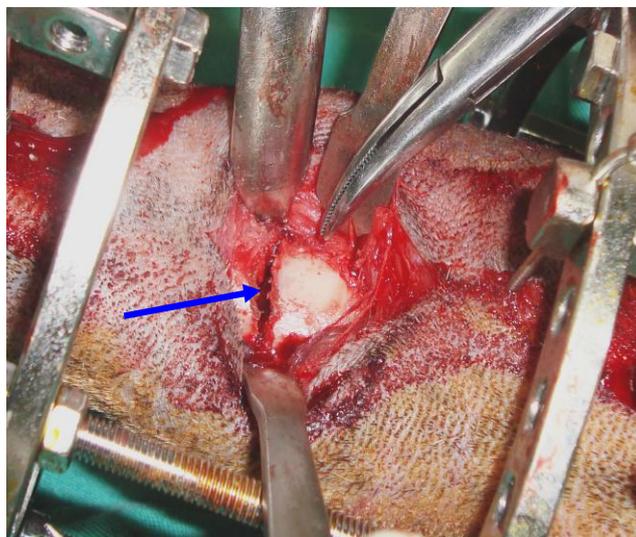


Figura 6. Osteotomia do rádio (seta azul)

Inicialmente foram realizados todos os alongamentos do grupo controle (antebraço direito) e, após remoção do fixador e consolidação óssea, os mesmos procedimentos foram realizados no grupo estudo (antebraço esquerdo). As mesmas técnicas anestésicas, de configuração da armação e fixação do fixador de Ilizarov e de corticotomia dos ossos do antebraço foram utilizadas no grupo estudo e controle em todos os animais.

3.3.1.2 Pós-operatório

Manteve-se a antibioticoterapia profilática, pela administração de penicilina G benzatina na dose de 40.000 UI/kg, por via intramuscular, a cada três dias, até completar três

doses, segundo preconizado por Rahal *et al.* (2002). Para analgesia pós-operatória imediata, foi administrada infusão endovenosa de dipirona sódica (15 mg/Kg peso) associada a cetoprofeno (10mg/Kg peso). Durante os três dias subsequentes, procedeu-se à infusão intramuscular de cetoprofeno (10mg/Kg peso), a cada 12 horas.

Os curativos foram trocados diariamente durante sete dias e, posteriormente, em dias alternados, até a retirada do fixador externo (Figura 7).



Figura 7. Cão em período pós-operatório: Fixador externo de Ilizarov no antebraço esquerdo (seta vermelha)

A) Distração osteogênica e acompanhamento radiográfico

Após sete dias de latência, foi iniciado o alongamento dos ossos do antebraço no ritmo de 1 mm/dia, subdividido em 0,5mm a cada 12 horas. No grupo controle, a distração foi realizada ininterruptamente, até que o regenerado obtivesse um comprimento de 20% do tamanho total do rádio.

Radiografias, nas incidências ântero-posterior e perfil do antebraço, foram realizadas após o término da cirurgia e a cada sete dias, para acompanhamento da distração osteogênica até a obtenção de evidências clínicas e radiográficas de consolidação do regenerado ósseo (Figura 8)⁹⁷.

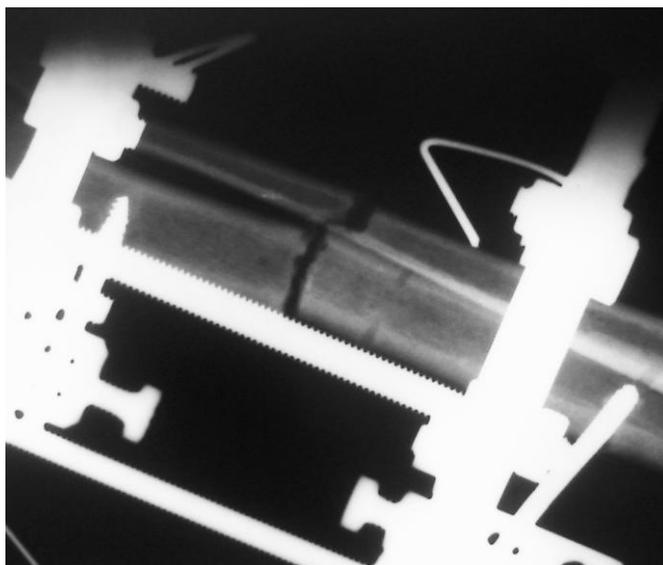


Figura 8. Aspecto radiográfico da osteotomia do rádio e ulna da distração osteogênica.

No grupo estudo, foram realizadas radiografias adicionais, fora desse período, para confirmação do tamanho do regenerado na data estimada em que o mesmo obtivesse 10% do comprimento total do rádio, isto é, 50% do alongamento previsto (Figura 9). Atingido o comprimento desejado, o animal foi preparado para coleta da medula óssea e posterior inoculação das células-tronco autógenas (CTI) dentro do regenerado ósseo.

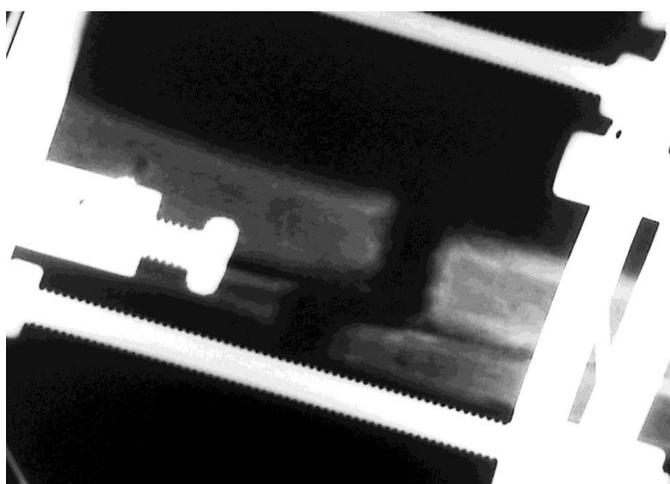


Figura 9. Regenerado ósseo com 10% de comprimento total do rádio

Os critérios clínicos e radiográficos, utilizados para a remoção do fixador externo por consolidação do regenerado ósseo, obedeceram às recomendações de Jeffrey et al⁹⁷. (1994). Vinte e quatro horas após a constatação da consolidação do regenerado ósseo, o animal foi submetido à intervenção cirúrgica para ressecção em bloco do regenerado.

As técnicas cirúrgicas de ressecção do regenerado, a aspiração da medula óssea e a inoculação das CTI no regenerado estão descritas nos itens a seguir.

3.4 Técnica cirúrgica

3.4.1 Técnica de coleta da medula óssea e preparo das células-tronco autógenas

3.4.1.1 Aspiração da medula óssea

A medula óssea foi coletada por técnica percutânea através de punção do canal medular do fêmur do animal estudado (aspirado autógeno), sob anestesia geral e condições assépticas. A região anatômica escolhida para a punção foi o côndilo interno do fêmur da pata traseira, contralateral ao antebraço previamente operado, mantendo-se o joelho do animal em flexão de 90° para facilitar o procedimento. Após a punção, retirou-se o trocarte e a cânula foi conectada a uma seringa de 60mL, contendo 10mL de heparina de baixo peso molecular, procedendo-se à aspiração de 50mL de medula óssea (Figura 10).



Figura 10. Punção aspirativa da medula óssea do fêmur do cão.

O aspirado medular foi conduzido ao setor de Microbiologia do Laboratório de Imunologia Keiso Asami da UFPE, para isolamento e cultivo primário das células-tronco autógenas, segundo Abukawa et al⁹⁸. fundamentado por de Pittenger et al⁹⁹.

Após a realização da coleta, as células-tronco foram separadas num gradiente de Ficoll (Sigma[®]), sob centrifugação a 1200rpm por 30 minutos (Figura 10B). A camada de células-tronco, sobrenadante ao Ficoll, foi aspirada com pipetador automático (*IBS Integra Bioscience, Pipetboy açu*[®]) e acondicionada em tubo cônico estéril com capacidade pra 60mL (Falcon[®]), e ressuspensa em tampão PBS na concentração 0,1M, pH 7,2. Após centrifugação a 1800rpm por 10 minutos, descartou-se o sobrenadante, isolando o *pellet* de células-tronco. As células-tronco foram ressuspensas em meio de cultura de Dulbecco[®], modificado por Eagle (DMEM) com alta concentração de glicose e suplementado com 10% de soro fetal bovino e com antibiótico (Ampicilina 1 g, Invitrogen[®]).

Decorridas 2 horas de incubação, suspendeu-se uma alíquota de 10 μ L de células-tronco em 90 μ L de *Trypan blue*, a uma diluição de 1:10. A contagem foi realizada em câmara de *Neubauer* e o resultado ajustado para 10⁶células/mL (Figura 11), correspondendo a uma suspensão celular na concentração de 2x10⁶ células-tronco autógenas/mL.



Figura 11. Equipamentos empregados para contagem de células-tronco: A - Tubo Falcon estéril contendo suspensão do aspirado medular com Heparina 1:10 em PBS 0,1 M, pH 7,2; B – *Pellet* de células-tronco separadas após centrifugação; C - Câmara de Neubauer para contagem de células D - Microscópio óptico com condensador dicrótico e contador para contagem das células

3.4.2 Técnica de inoculação das células tronco na região da distração osteogênica

O volume de 2mL de concentrado de células-tronco autógenas autógenas foi acondicionado e transportado sob refrigeração até o biotério, onde o experimento prosseguiu.

O concentrado de CTI foi injetado no regenerado ósseo do rádio-estudo através de técnica percutânea e sob anestesia geral, em sala cirúrgica, tomando-se todos os cuidados necessários de assepsia. Por meio de jelco de calibre 20, a solução de células-tronco foi infundida no centro do regenerado ósseo, determinado com base na região central da cicatriz cirúrgica prévia. O posicionamento correto da extremidade do jelco dentro do centro do regenerado ósseo foi confirmado através de radiografias transoperatórias, simples com incidência em AP e perfil (Figura 12).

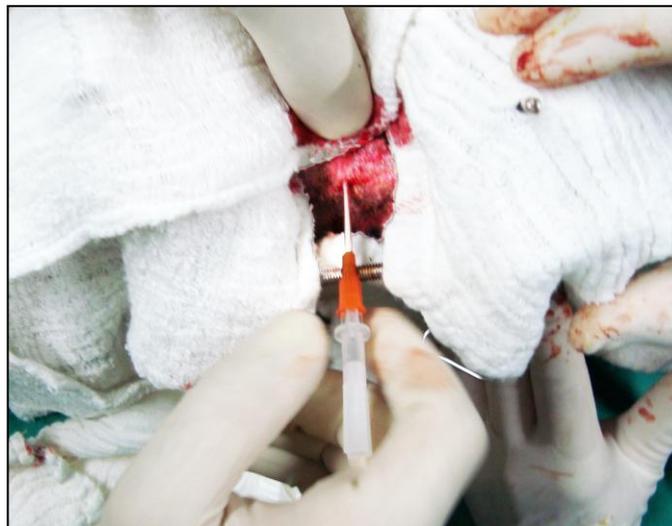


Figura 12. Inoculação das CTI no regenerado ósseo.

Após a retirada do mandril, o jelco foi conectado a uma seringa contendo os 2 mL do preparo de células-tronco, que foram inoculados dentro do regenerado ósseo. Um curativo compressivo foi realizado, para evitar extravasamento do volume injetado através do pertúito do jelco (Figura 12).

3.4.3 Técnica de obtenção do regenerado ósseo (espécime)

Após a consolidação do segmento ósseo alongado dos raios direito e esquerdo, o animal foi submetido a novo procedimento cirúrgico para ressecção em bloco do regenerado ósseo, sob as mesmas condições anestésicas e cirúrgicas. O acesso cirúrgico utilizado foi ao nível da cicatriz cirúrgica das incisões anteriores. Os limites entre osso regenerado (rádio e ulna) e primitivo do animal foram identificados nas duas extremidades, proximal e distal, e nesses limites, as osteotomias foram realizadas.

Os regenerados do rádio e ulna foram ressecados em bloco os quais foram imersos em formol a 10% contido em tubos estéreis, para posterior preparo das lâminas histológicas. A ulna foi desprezada, pois não foi objeto do estudo.

3.4.1.1 Processo do regenerado ósseo para análise histológica e histomorfométrica

As peças foram fixadas em formol a 10% em tampão fosfato (PBS), à temperatura ambiente, e descalcificadas em solução de ácido nítrico a 0,5%, por 10 a 15 dias. Após descalcificação, as peças foram lavadas com água destilada corrente por 2 min; seccionadas no centro, em duas metades iguais, e submetidas à rotina histológica: lavagem em água corrente por 24 h, desidratação em bateria de soluções de álcool absoluto a 70%, 80% e 90%, diafanização em banhos de xilol e inclusão em blocos de parafina. O bloco foi desgastado por microtomia de maneira que se obtivessem três secções transversais de 5 µm de espessura, com relação ao eixo longitudinal do regenerado. A primeira secção transversa foi obtida do centro do regenerado, as outras duas, 2 mm eqüidistantes da primeira.

As secções assim obtidas foram coradas por hematoxilina e eosina (HE) e Tricrômico de Masson (TM), para posterior estudo histológico e histomorfométrico.

As técnicas cirúrgicas adotadas nesse estudo estão sumarizadas no Quadro 1.

Quadro 1. Sumarização das técnicas cirúrgicas empregadas nos grupos controle e estudo durante experimento

Técnicas cirúrgicas	Grupos	
	Estudo	Controle
Fixação do fixador	sim	sim
Osteotomia	sim	sim
Ressecção do regenerado ósseo para exame histológico	sim	sim
Punção da medula óssea do fêmur para obtenção do aspirado medular	sim	não
Técnica percutânea de inoculação das células tronco no regenerado ósseo	sim	não

A princípio os cães não foram sacrificados, pois, após a coleta da peça (regenerado ósseo), foi realizada a compressão no local da falha óssea, utilizando o mesmo fixador do início do estudo, o qual foi removido após consolidação clínica e radiográfica do local da pseudartrose criada previamente. Os animais foram doados para instituições próprias para animais.

3.5 Análise histomorfométrica

A captura das imagens para análise histomorfométrica foi realizada através de uma câmera digital do sistema *Motic (Micro-Optic Industrial Group CO[®] Ltda)*, acoplada a um microscópio trilocular da marca Nikon[®] e a um computador portátil.

As imagens capturadas pela câmera foram processadas e analisadas pelo programa de morfometria *ImageJ[®]*, versão 1.42, de domínio público (<http://rsbweb.nih.gov/ij>), com *plugins* específicos. O programa *AdobePhotoshop[®]* versão Cs4 Extendido, da Adobe[®], foi utilizado para auxiliar o processamento das imagens, assim como a segmentação e a seleção das áreas histológicas de interesse com a ferramenta máscara, permitindo a mensuração dos

parâmetros histomorfométricos (Figura 13). Os dados obtidos foram armazenados e calculados no programa *Excel* versão 2007 da *Microsoft*[®].

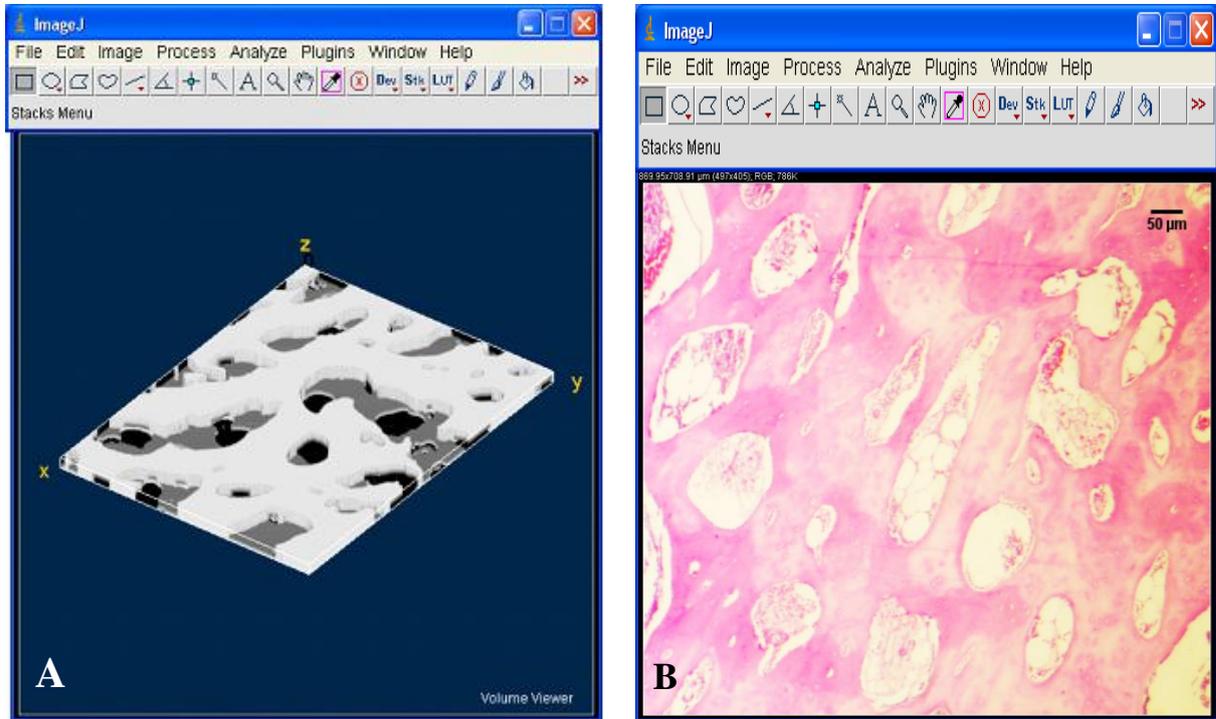


Figura 13. Programa imageJ: A) Na imagem segmentada o tecido ósseo esta representado pela cor branca. B) Calibração do sistema. Imagem não segmentada.

Para calibração do sistema, empregaram-se os mesmos programas, exceção feita ao *plung-ings* específico (<http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/index.html>) do programa *ImageJ*[®] e de imagens de sistema micrométrico, com as quais foi possível converter medidas em *pixel* para milímetros ou micrômetros.

Os índices histomorfométricos foram analisados de acordo com a metodologia proposta por Gerstenfeld et al³⁵. (2005), obedecendo à nomenclatura preconizada por Parfitt et al.⁹⁰ (1987) e padronizada pela *American Society of Bone and Mineral Research*.

A histomorfometria foi analisada utilizando-se 10 campos (correspondendo a 869,65 µm por foto) em cada corte histológico com aumento de 10X, e 20 campos, com aumento de 40X (Figura 13). Os pólos opostos dos cortes histológicos (norte-sul, leste-oeste), foram

previamente marcados para possibilitar a localização dos campos durante a realização da captura das imagens. Desta forma, a análise foi iniciada em um dos pólos até chegar ao lado oposto, divididos sempre de cima para baixo, e não no sentido transversal para evitar a análise de um campo anteriormente capturado.

Os seguintes índices histomorfométricos foram calculados:

- a) **Percentual de tecido ósseo neoformado mineralizado ou não** (TOTAr (%)), mensurado calculando-se a área, expressa em mm^2 , do tecido ósseo neoformado, descontadas as áreas correspondentes às lacunas (VdAr (mm)), dividida pelo valor da área total de tecido conjuntivo (T.Ar(mm)), e este multiplicada por 100. O VdAr (mm) é a área correspondente à cavidade medular, elementos hematopoéticos e espaço com áreas vazias;
- b) **Volume ósseo** (BV/TV (%)) - correspondente ao volume ocupado pelo osso, mineralizado ou não, expresso como porcentagem do volume ocupado pela medula e o tecido não ósseo;
- c) **Espessura trabecular** (Tb.Th (μm)), que é a espessura das trabéculas ósseas, expressa em micron e mensurada por meio da fórmula:

$$Tb.Th = \frac{2.000 \times B.Ar}{1.199 \times B.Pm}$$

onde:

B.Ar = área

B.Pm = perímetro do segmento histológico ósseo analisado

- d) **Número de trabéculas** (Tb.N (mm)), correspondendo ao número de trabéculas ósseas por milímetro de tecido;
 - e) **Separação trabecular** (Tb.Sp (μm)), que é a distância entre os pontos médios das trabéculas ósseas, obtida por meio da fórmula:
-

$$\text{Tb.Sp} = (2,000/1,199) \times (\text{T.Ar} - \text{B.Ar}) / \text{B.Pm}$$

onde:

T.Ar = área total

B.Ar = área óssea

B.Pm = perímetro do segmento histológico ósseo analisado

- f) *Superfície osteoblástica* (Ob.S/BS (%)), correspondente à porcentagem da superfície trabecular total, que apresenta osteoblastos.

Os percentuais das áreas de tecido fibroso (FTAr(%)), tecido cartilaginoso (CgAr(%)), área total do tecido (T.Ar(%)), percentual de osteoblastos hipertróficos (OHT(%)) e osteoblastos hiperplásicos (OHP(%)) foram adicionalmente mensurados para auxiliar na avaliação histológica.

3.6 Análise histológica

A análise histológica, em microscópio óptico, foi realizada no Laboratório de Patologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE-PE) por patologista especializado no estudo de tecidos e lesões ósseas, mas sem conhecimento prévio dos grupos (controle e estudo).

Todas as lâminas foram identificadas com numeração progressiva, correspondente ao número no animal, e marcas específicas para os grupos controle e estudo, de forma tal que fossem reconhecidas apenas pelo pesquisador.

As lâminas foram avaliadas à microscopia óptica com aumento de 20X, 40X e 100X, analisando-se: tipo de consolidação óssea, a atividade osteoblástica, tipo de tecido proliferado e a ocupação do tecido conjuntivo com relação às áreas analisadas dos cortes histológicos.

Esses parâmetros, associados aos índices histomorfométricos (CgAr(%), FTAr(%), T.Ar(%) e TOT.Ar (%)) e aos percentuais de osteoblastos hipertróficos OHT(%) e hiperplásicos OHP(%), foram utilizados para agrupar os achados histológicos quanto ao tipo de consolidação, atividade osteoblástica e percentual de ocupação do tecido conjuntivo neoformado.

Para classificação do tipo de consolidação óssea, foram avaliados 20 campos com aumento 40X, nas lâminas coradas com TM. Foram levados em consideração o percentual de CgAr(%), FTAr(%) com relação a área total (T.Ar(%)) analisada (Quadro 2). No tipo de consolidação óssea mista, foi considerada predominância para OE, quando o percentual da área de tecido cartilaginoso foi, pelo menos, 5% maior que a área de tecido membranoso.

Quadro 2 Classificação histológica quanto ao tipo de consolidação do regenerado ósseo em endocondral, intramembranoso e misto, com ou sem predominância

Tipos de consolidação	Crítérios de avaliação
Intramembranosa	Apenas área de tecido fibroso
Endocondral	Apenas área de tecido cartilaginoso
Mista	Sem predominância: CgAr (%) = FTAr (%)
	Com predominância de OE: CgAr (%) > FTAr (%)
	Com predominância de OI: CgAr (%) < FTAr (%)

A avaliação da atividade osteoblástica foi realizada pela contagem do número total de osteoblastos (OT), osteoblastos hipertróficos e osteoblastos hiperplásicos (OHT), em 20 campos aleatórios, com aumento de 100X, nas lâminas coradas com HE. Os percentuais de OHP(%) e OHT(%) foram obtidos pela soma de OHP e OHT, dividido pelo número total de osteoblastos (OT), e multiplicado por 100. Dessa forma, a atividade osteoblástica foi considerada alta quando a soma do percentual de OHT e OHP foi superior a 50% de todos os osteoblastos da amostra; atividade moderada, quando o percentual da soma de OHP e OHT

foi menor que 50% e maior 10%; e, a atividade baixa, quando a soma do percentual de OHT e OHP foi menor que 10% da contagem total de osteoblastos (Quadro 3).

Quadro 3. Classificação histológica quanto à atividade osteoblástica do regenerado ósseo intensa, moderada e baixa ou ausente

Atividade osteoblástica	Critérios de avaliação (*)
Alta	Percentual de OHP e OHT > a 50%
Moderada	Percentual de OHP e OHT < a 50%
Baixa ou Ausente	Percentual de OHP e OHT inferior a 10%.

OHP osteoblastos hiperplásicos; OHT: osteoblastos hipertróficos

O percentual de ocupação do tecido conjuntivo, ósseo ou não, foi calculado com relação à área total de tecido conjuntivo (TAr.(%)) de 20 campos aleatórios das lâminas coradas com HE. O TAr foi considerado ótimo, quando o percentual. foi igual ou maior que 90%; bom, quando menor que 90% mas igual ou maior que 50%; regular, quando menor que 50% e igual ou maior que 10%; e, ruim, quando o TAr foi menor que 10% (Quadro 4).

Quadro 4. Classificação histológica do percentual de ocupação de tecido conjuntivo neoformado

Classificação	Critérios de avaliação TAR (%)
Ótimo	$\geq 90\%$
Bom	$< 90\%$ e $\geq 50\%$
Regular	$< 50\%$ e $\geq 10\%$
Ruim	$< 10\%$

3.7 Análise radiográfica

Para relacionar os achados ao exame radiográfico com a evolução temporal, nas diferentes fases de ossificação do regenerado, foram utilizados os índices de consolidação-distração (ICD)^{48,100,101} e o tempo total de consolidação óssea (TTC).

A classificação radiográfica de Catagni et al.⁹⁶ (1991) foi utilizada como parâmetro para avaliação qualitativa do regenerado ósseo na data provável da consolidação (Quadro 5).

Quadro 5. Classificação radiográfica do regenerado ósseo de acordo com o aspecto radiográfico

Tipos de Regenerado	Aspectos radiográficos	
Normotrófico	Os primeiros sinais radiolucentes aparecem com 20 dias após a osteotomia/corticotomia. O osso neoformado tem diâmetro semelhante a região da osteotomia.	
Hipertrófico	Formação óssea radiográfica aparece antes 20 dias após a osteotomia/corticotomia; ou o osso neoformado tem diâmetro maior que a região da coticotomia/osteotomia.	
Hipotrófico	Atraso na formação óssea, após trinta dias da osteotomia; múltiplas radiolucências no regenerado; ou, osso em forma de “ampulheta”.	

3.7.1 Critérios de consolidação radiográficos e clínicos do regenerado ósseo

Os critérios radiográficos consistiram da corticalização contínua do regenerado, observada nas radiografias simples, nas incidências AP e PP. Quando três ou quatro corticais contínuas formavam-se no regenerado ósseo, realizava-se o teste clínico no local do osso alongado. Para este procedimento, os anéis do fixador foram desconectados (retidas as hastes telescópadas) e uma manobra clínica foi realizada para observar se havia ou não mobilidade entre os segmentos ósseos em nível do regenerado. Constatada a ausência de mobilidade no regenerado ósseo, este foi considerado consolidado e o fixador removido. Caso contrário, ou seja, com a constatação de alguma mobilidade clínica do regenerado, as hastes foram reposicionadas ao seu local de origem, e decorridos 15 dias, o mesmo teste foi realizado.

Na presença de consolidação do regenerado ósseo, dois parâmetros foram empregados: para caracterizar esse processo.

- a) Tempo de Consolidação Total (TCT) é o tempo decorrido da data da osteotomia óssea até a consolidação clínica e radiográfica do regenerado ósseo, conforme critérios anteriormente descritos;
- b) Índice de Consolidação Distração (ICD) que representa a razão entre o tempo de consolidação do osso alongado (TCT) e o comprimento total do regenerado ósseo (regenerado ósseo - RO). A fórmula utilizada no cálculo do ICD é:

$$ICD = \frac{TCT}{RO}$$

onde:

TCT é o intervalo em dias, da data da osteotomia até consolidação do osso (rádio) alongado, conforme os critérios clínicos e radiográficos descritos

RO = comprimento total do regenerado ósseo

ICD = tempo em dias em que um centímetro de osso alongado leva para consolidar.

3.7.2 Classificação do regenerado ósseo

O regenerado foi classificado baseado nos critérios de avaliação radiográfica de Catagni et al⁹⁶. (1991) em três tipos:

- a) Tipo I (bom) foi considerado bom o regenerado hipertrófico ou normotrófico (Figura 14);
 - b) Tipo II (regular) foi considerado regular o regenerado hipotrófico ou com retardo de consolidação clínico-radiográfico (Figura 15);
 - c) Tipo III (insuficiente) foi considerado insuficiente o regenerada hipotrófico com características de pseudartrose clínica e radiográfica (Figura 16).
-

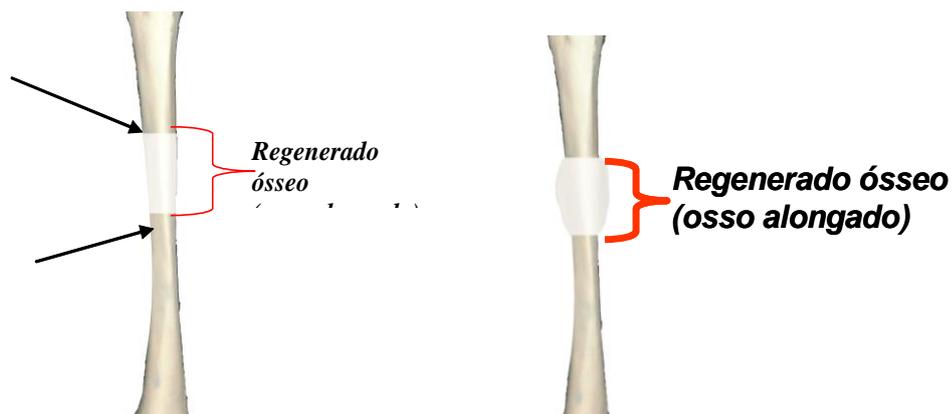
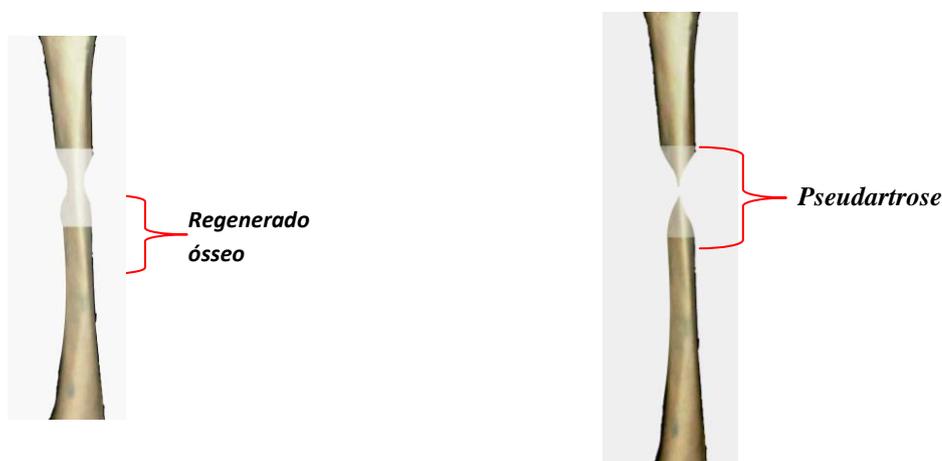


Figura 14. Desenhos esquemáticos de regeneração óssea: A Desenho esquemático



de regenerado normotrófico; B Desenho esquemático demonstrando regenerado hipertrófico

Figura 15. Desenho esquemático demonstrando regenerado ósseo

Figura 16. Desenho esquemático demonstrando a ausência de união entre os fragmentos do regenerado

3.7.2 Critérios para definir pseudartrose e retardo de consolidação do regenerado ósseo

a) Retardo de consolidação

Neste estudo foi considerado retardo de consolidação, quando havia sinais radiográficos de consolidação (formação de corticais contínuas entre as extremidades proximal e distal do regenerado ósseo), associado à ausência de sinais clínicos (mobilidade persistente no foco do regenerado) por até cinco meses após a osteotomia (Figura 15).

b) Pseudartrose

Considerou-se pseudartrose, quando não havia sinais clínicos (mobilidade anormal no local da distração osteogênica) e radiográficos (ausência de corticais contínuas nas radiográficas em AP e PP) de consolidação óssea, após cinco meses da realização da osteotomia. Adicionalmente, levou-se em consideração a presença de uma linha radiotransparente na região central do regenerado ósseo, indicando descontinuidade entre os fragmentos alongados.

O tamanho da área alongada (regenerado ósseo) foi mensurado em centímetros nas radiografias ântero-posteriores, com régua milimetrada, sobre a imagem radiográfica, aposta sobre um negatoscópio. Os parâmetros utilizados para realizar essa medida foram as áreas de transições entre o osso neoformado e o osso primitivo, isto é, as áreas correspondentes às extremidades terminais, proximal e distal, do osso alongado.

Os dados coletados foram armazenados em tabelas no programa Excel Microsoft[®], versão 2007, para cálculo do ICD e do TCT, e, também para controlar o ritmo da distração osteogênica até a consolidação clínica e radiográfica. Os dados de comprimento avaliados nas radiografias foram reduzidos em 10% do valor total, pois, pela técnica radiográfica utilizada, há uma ampliação de 10% na imagem obtida, com relação à estrutura radiografada.

3.8 Análise estatística

Os dados histológicos e radiográficos foram inicialmente coletados em formulários confeccionados para esta finalidade e posteriormente tabulados em tabelas padronizadas no programa Excel[®] da Microsoft, compatível com Windows[®]. Os dados histomorfométricos foram armazenados diretamente em planilhas do Excel da Microsoft.

As variáveis quantitativas (índices histomorfométricos, ICD e TCT) foram expressas como média e desvio padrão (Técnicas de estatística descritiva). Foi utilizado o teste estatístico t-Student para amostras pareadas.

As variáveis qualitativas (atividade osteoblástica, ocupação do tecido neoformado, tipo de consolidação óssea e classificação radiográfica do regenerado ósseo), foram distribuídas em tabelas de contingências. Essas variáveis foram analisadas pelo teste não paramétrico de Stuart-Maxwell.

O programa estatístico utilizado para a obtenção dos cálculos foi o Statistical Analysis System (SAS), versão 8.0. O nível de significância utilizado para rejeição ou aceitação da hipótese de nulidade foi de 5,0%.

3.9 Considerações Éticas

O projeto foi aprovado previamente pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Federal Rural de Pernambuco e posteriormente revalidado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFPE, sob o Processo N° 23076.020444/2008-49 (Anexo A).

Resultados

4.1 Resultados radiográficos e clínicos

O tempo total de consolidação clínica e radiográfica (TCR) do regenerado ósseo no grupo controle variou de 62 a 155 dias (média de $117,4 \pm 28,0$ dias); e, no grupo estudo, variou de 47 a 78 dias (média de $64,3 \pm 8,2$ dias). O TCR de consolidação no grupo controle foi, em média, 51 dias maior do que no grupo estudo e esta diferença foi significativa ($p=0,0003$). (Tabela-1).

Tabela 1. Distribuição do tempo total de consolidação do regenerado (TCT) em dias, nos 10 cães dos grupos controle e estudo

Cães	Tempo de consolidação (dias)	
	Grupo Controle (n=10)	Grupo Estudo (n=10)
444	124	47
487	116	67
507	155	71
508	155	65
528	127	67
494	106	57
501	104	67
495	94	78
9	62	62
10	131	62
Média	117,4	64,3
Desvio padrão	28,04	8,2
$p^{(1)}$		0,0003

Nota: ⁽¹⁾ - Teste t de Student

Na tabela 2 são apresentados os valores do ICD, como também a média e o desvio padrão dos grupos controle e estudo. No grupo controle, o ICR variou de 31 a 77,5 dias (média de $58,7 \pm 14,02$ dias), e, no grupo estudo, variou de 23,5 a 39 dias (média de $32,1 \pm 4,1$ dias). A diferença média do ICR entre os grupos foi 26,5 dias menor no grupo estudo, isto é, o tempo de consolidação por centímetro de osso alongado foi mais rápida no grupo estudo e esta diferença foi significativa ($p=0,0003$) (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição do índice de consolidação-distração (ICD) do regenerado ósseo dos 10 animais dos grupos controle e estudo

Cães	ICD em cm por dia	
	Grupo Controle (n=10)	Grupo Estudo (n=10)
444	62	23,5
487	58	33,5
507	77,5	35,5
508	77,5	32,5
528	63,5	33,5
494	53	28,5
501	52	33,5
495	47	39
9	31	31
10	65,5	31
Média	58,7	32,1
Desvio padrão	14,0	4,1
$p^{(1)}$	0,0003	

Nota: ⁽¹⁾ - Teste t de Student

Quanto à classificação radiográfica do regenerado ósseo na data da consolidação clínica e radiográfica, nos raios do grupo controle, 8 (80%) foram do tipo I, 1 (10%) do tipo II e 1 (10%) do tipo III. Nos raios do grupo estudo, todos foram considerados tipo I (Tabela 3). Não houve diferença significativa entre os grupos ($p=1,000$).

Tabela 3 – Distribuição do tipo radiográfico do regenerado ósseo do rádio dos grupos controle e estudo, na data da consolidação clínica e radiográfica.

Tipos	Grupos				$p^{(1)}$
	Controle		Estudo		
	n	%	n	%	
I	8	80	10	100	
II	1	10	-	-	
III	1	10	-	-	
Total	10	100	10	100	$p=1,000$

Nota: ⁽¹⁾ - Teste *Stuart-Maxwell*

No grupo controle, houve 1 (10%) caso de pseudartrose e 1 (10%) de retardo de consolidação. No grupo controle, não ocorreu qualquer caso de pseudartrose e de retardo de consolidação.

Na figura 17 são apresentados os aspectos radiográficos do regenerado ósseo, desde o momento da inoculação das células-tronco até a consolidação clínica e radiográfica.

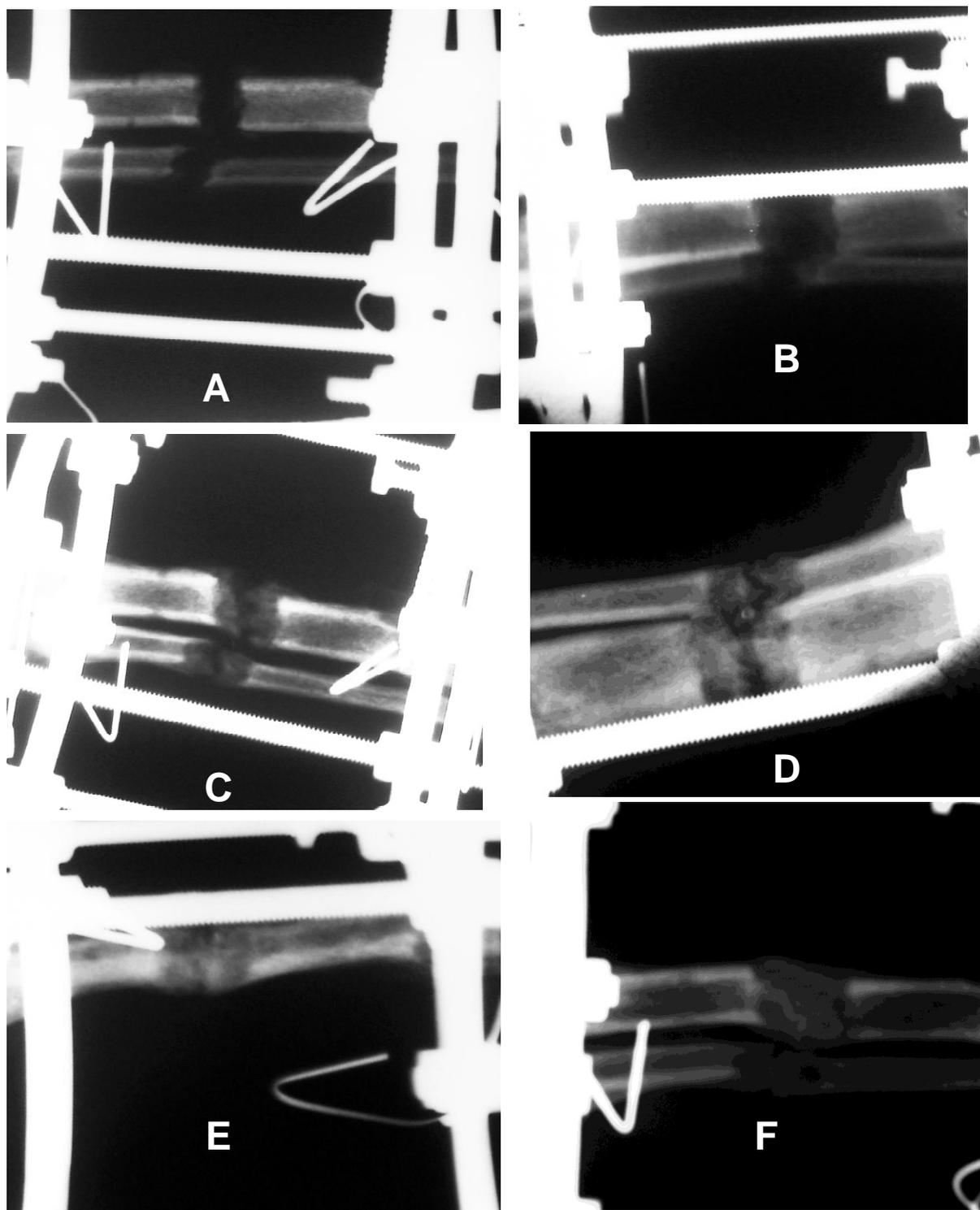


Figura 17. Aspectos radiográficos (rádio controle): A) Regenerado ósseo no dia da inoculação das Células tronco. B) Observar pequena formação óssea nas extremidades do regenerado 12 dias após a inoculação das CTI. C) Observar aumento significativo da radiopacidade do regenerado ósseo, 28 dias após a inoculação das CTI. D) Radiografia com 36 dias após a inoculação das CTI. E e F) Observar corticalização completa do regenerado, dois meses após a osteotomia e 43 dias após a inoculação das CTI

4.2 Análise histomorfométrica

Na Tabela 4, estão apresentados os valores médios dos índices histomorfométricos relativos a número de trabéculas [Tb.N (mm)], volume ósseo [BV/BT(%)], espessura trabecular [Tb.Th (μm)], separação trabecular [Tb.Sp (μm)], e superfície osteoblástica [SO (%)], dos grupos controle e estudo.

No grupo que recebeu as células-tronco, o índice histomorfométrico referente ao número de trabéculas por milímetro [Tb.N(mm)] foi maior ($14,3 \pm 4,86$ mm) do que no grupo controle ($6,9 \pm 2,0$ mm). Essa diferença foi em média 9,4mm maior no grupo estudo, correspondendo a uma diferença significativa ($p = 0,0019$). (Tabela 4).

O volume ósseo médio [BV/BT (%)] foi menor nos rádios do grupo controle ($36,2 \pm 12,2\%$) do que do grupo estudo ($59,2 \pm 5,6\%$). A diferença de 47,0%, entre essas médias foi significativa ($p = 0,0005$). (Tabela 4).

Nos rádios do grupo estudo, a espessura trabecular média [Tb.Th (μm)] foi maior ($161,4 \pm 36,1$ μm) do que nos do grupo controle ($94,2 \pm 41,2$ μm). A diferença entre essas médias (67,2 μm) foi significativa ($p = 0,0116$). (Tabela 4).

O valor médio da separação trabecular [Tb.Sp (μm)] nos rádios do grupo controle ($173,67 \pm 65,46$ μm) foi maior do que no grupo estudo ($112,73 \pm 33,69$ μm). A diferença de 60,94 μm entre essas médias foi significativa ($p=0,0231$). (Tabela 4).

A média do percentual da superfície osteoblástica (SO (%)) dos rádios do grupo estudo ($70,52 \pm 16,24\%$) foi maior que a do grupo controle ($42,31 \pm 18,13\%$). A diferença entre essas médias de 28,21% foi significativa ($p=0,0073$). (Tabela 4).

Tabela 4. Distribuição dos valores médios e desvio padrão dos índices histomorfométricos

Índices histomorfométricos	Grupos				p ⁽¹⁾
	Controle (n=10)		Estudo (n=10)		
	média	desvio padrão	média	desvio padrão	
Número de trabéculas (Tb.N (mm))	6,86	1,97	14,3	4,86	0,0019
Volume ósseo (BT/TV (%))	36,23	12,16	59,18	5,63	0,0005
Espessura trabecular (Tb.Th (µm))	94,23	41,25	161,46	36,132	0,0116
Separação trabecular (Tb.Sp (µm))	173,67	65,46	112,73	33,69	0,0231
Superfície osteoblástica (%)	42,31	18,13	70,52	16,24	0,0073

Nota: ⁽¹⁾ Teste t de Student

No gráfico 1, pode-se observar que os grupos estudo e controle diferiram em todos os parâmetros histomorfométricos.

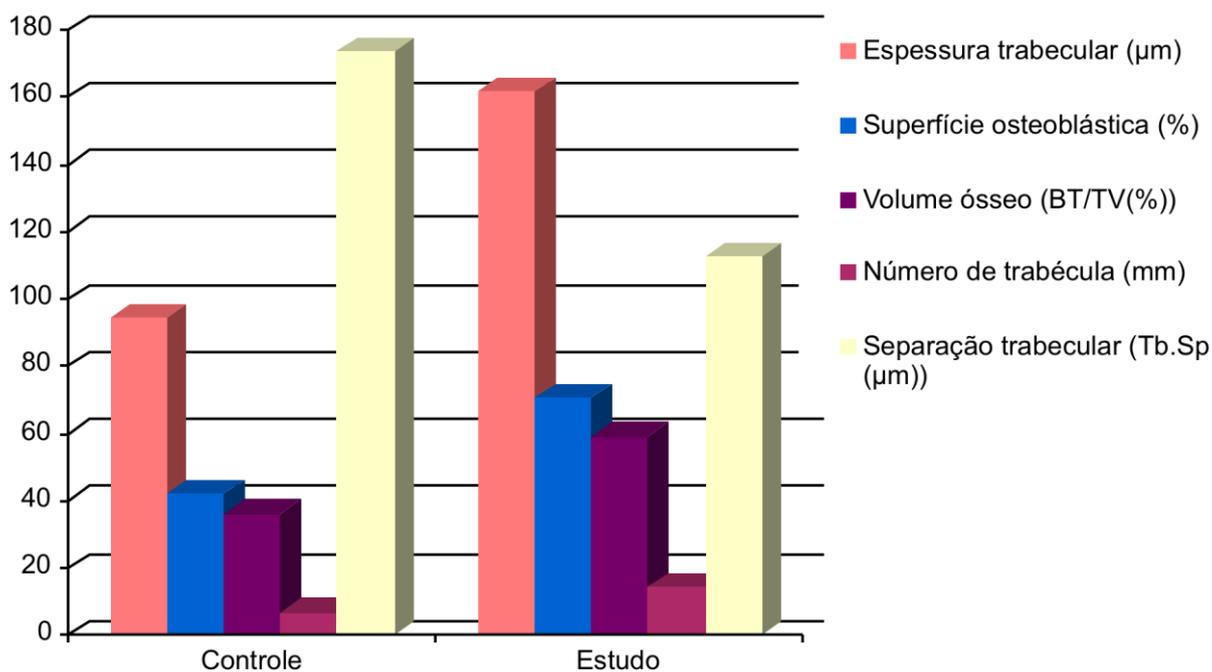


Gráfico 1. Distribuição dos valores médios e desvio padrão dos índices histomorfométricos.

4.3 Análise histológica

Na Tabela 5 apresentam-se os tipos de consolidação óssea dos grupos controle e estudo, classificados em endocondral (OE), intramembranosa (OI) e mista (endocondral e intramembranosa).

O tipo de consolidação óssea foi semelhante nos grupos controle e estudo. No grupo controle, o tipo de ossificação puramente endocondral ocorreu em 1 (10%) rádio, a ossificação intramembranosa, também em 1 (10%) rádio, e a ossificação mista foi verificada em 8 (80%) rádios. Dentre os casos de ossificação mista, cinco ocorreram com predominância de um tipo de ossificação, sendo endocondral em três e intramembranosa em dois casos. Nos outros três (30%) rádios, não foi observada predominância de um tipo de ossificação sobre o outro. No grupo estudo, houve 1 (10%) rádio com OI, 1 (10%) caso com OE, e 8 (80%) rádios com ossificação mista; dentre os quais, 3 (30%) tiveram predomínio de OI, 3 (30%), predomínio de OE. Nos outros 2 (20%) rádios, não se encontrou predominância de um tipo de ossificação sobre o outro (Figura 18).

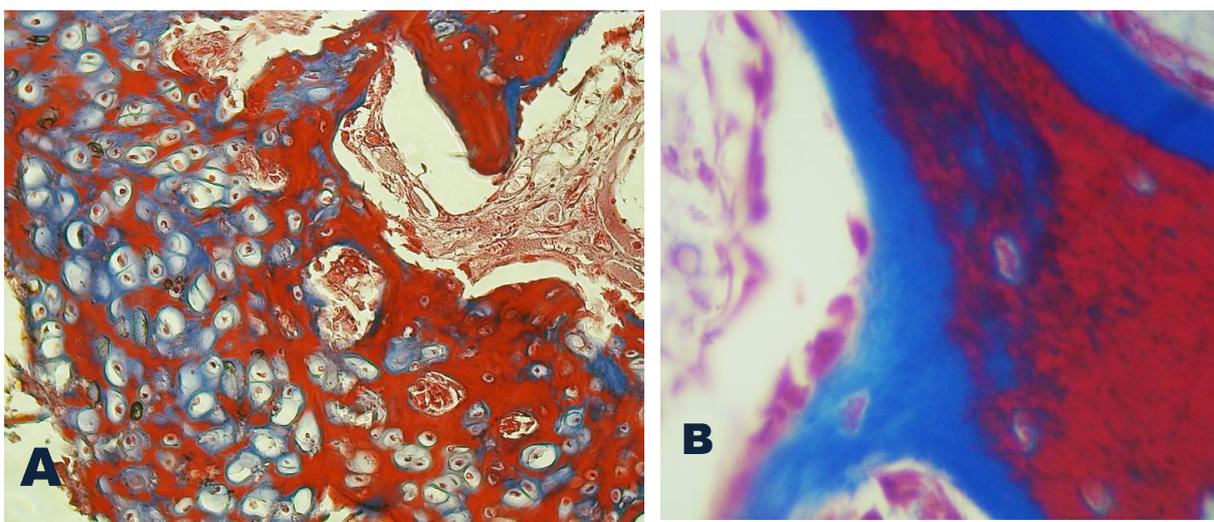


Figura 18. Aspectos histológicos da ossificação. A) Ossificação endocondral (Aumento de 100x) TM B) Ossificação intramembranosa (Aumento de 100X, TM).

Aplicando o teste de Stuart-Maxwell em nível de significância de 5%, não houve diferença significativa entre os grupos controle e estudo ($p=0,9999$).

Tabela 5. Distribuição do tipo de ossificação do regenerado ósseo dos grupos controle e estudo

Tipo de consolidação	Grupos			
	Controle (n=10)		Estudo (n=10)	
	n	%	n	%
OE	1	10	1	10
OI	1	10	1	10
Predomínio de OE	2	20	3	30
Predomínio de OI	2	20	3	30
Sem predomínio	4	40	2	20
TOTAL	10	100	10	100
$p^{(1)}$			0,9999	

Nota: ⁽¹⁾ - Teste de *Stuart-Maxwell*²

Legenda: OE = ossificação endocondral; OI=ossificação intramembranosa

A atividade osteoblástica em todos os raios do grupo estudo distribuiu-se equitativamente entre moderada e alta. No grupo controle, predominou atividade osteoblástica moderada, presente em 7 (70%) casos, sendo diagnosticada como alta em 1 (10%) caso, e baixa em 2 (20%) casos (Tabela 6). Estas diferenças de atividade osteoblástica entre os regenerados dos raios do grupo controle e estudo, não foram significantes ($p=0,9999$) (Figura 19).

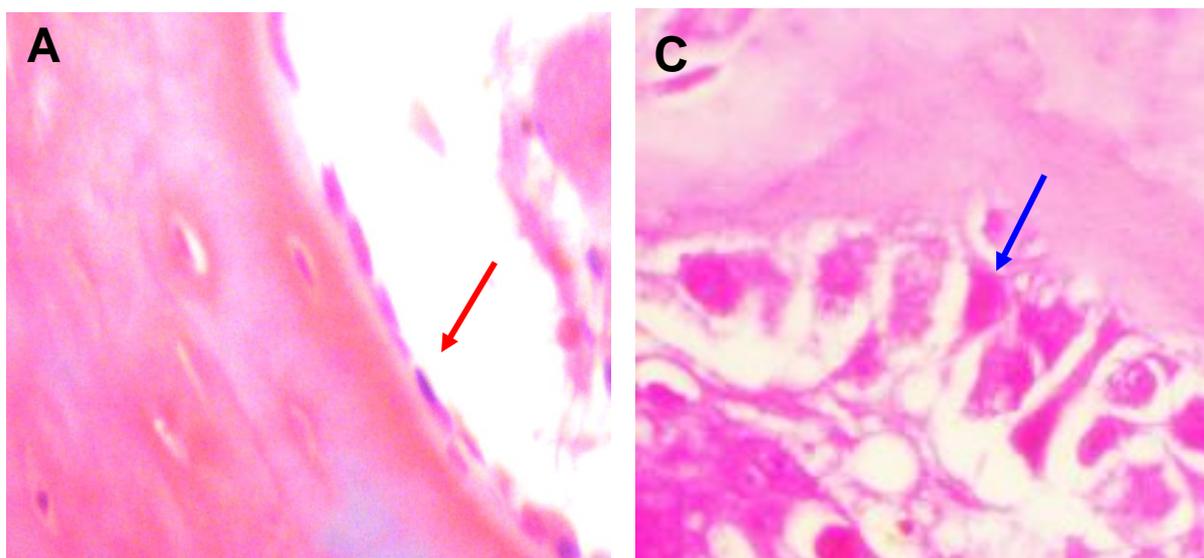


Figura 18. Osteoblastos (Aumento 100X – HE): A) Osteoblastos fusiformes (seta vermelha). B) Osteoblastos hipertróficos/hiperplásicos (seta azul).

Tabela 6. Distribuição da atividade osteoblástica nos regenerados ósseos dos rádios nos grupos controle e estudo

Atividade osteoblástica	Grupos				p ⁽¹⁾
	Controle (n=10)		Estudo (n=10)		
	n	%	n	%	
<i>Alta</i>	1	10	5	50	
<i>Moderada</i>	7	70	5	50	
<i>Baixa</i>	2	20	-	-	
Total	10	100	10	100	0,9999

 NOTA: ⁽¹⁾ - Teste de *Stuart-Maxwell*.

Os percentuais de ocupação de área total dos campos histológicos por tecido conjuntivo (ósseo e não ósseo) estão descritos na Tabela 7. No grupo controle, em quatro rádios, o percentual de ocupação por tecido conjuntivo, ósseo ou não, foi maior que 90%; em quatro rádios esteve no intervalo de 50% a 90%; em 1 (10%) caso a ocupação foi menor que 50% e em 1 (10%), menor que 10%. No grupo estudo, a ocupação com osso e outros tecidos conjuntivos superou os 50% nos 10 rádios; dentre os quais 7 (70%) tinham ocupação em mais de 90% da área analisada e em 3 (30%) rádios, a ocupação ficou entre 50% e 90%. Em nível de significância de 5%, não houve diferença significativa entre os grupos (p=0,705).

Tabela 7. Distribuição dos percentuais de ocupação de área total dos campos histológicos por tecido conjuntivo (ósseo e não ósseo) nos grupos controle e estudo

Percentuais de ocupação	Grupos				p ⁽¹⁾
	Controle (n=10)		Estudo (n=10)		
	n	%	n	%	
≥ 90	4	40	7	70	
50 90	4	40	3	30	
10 50	1	10	-	-	
≤ 10	1	10	-	-	
Total	10	100	10	100	0,705

 Nota: ⁽¹⁾ - Teste de *Stuart-Maxwell*.

No estudo observacional dos campos histológicos com relação ao tipo de tecido proliferado não ósseo, constatou-se que as áreas não preenchidas por tecido ósseo foram ocupadas por tecido fibro-cartilagenoso, medular ósseo ou ainda mantiveram lacunas. Os tecidos fibroso e cartilagenoso predominavam na região central do regenerado. Apenas em um rádio (grupo controle), foi observada uma área central com expressiva quantidade de tecido granulomatoso, rico em fibroblastos. Não houve qualquer campo microscópico com tecidos ou células que caracterizassem processo infeccioso, neoplásico, teratogênico ou formação heterotópica de tecidos, nas áreas analisadas.

Discussão

5.1 Escolha do tema

As recentes descobertas a respeito dos mecanismos biológicos das células-tronco e seu envolvimento no reparo das falhas ósseas trouxeram novas perspectivas de tratamento dessas lesões. Com isso, vários estudos pré-clínicos e clínicos estão sendo desenvolvidos com a finalidade de promover ou acelerar o reparo dessas lesões utilizando as CT, após expansão e diferenciação em culturas^{23,24,26,85,102-104}. Geralmente, essas células são associadas a enxertos ósseos¹⁰⁶, substitutos ósseos^{22,24} e fatores de crescimento (BPM, TGF- α , PDGF, OP-1)¹⁰⁴.

Apesar dos estudos, poucos são os relatos que utilizam agentes biológicos durante a distração osteogênica com fixador externo para acelerar a consolidação do regenerado ósseo^{26,84,102} e nenhuma pesquisa foi localizada abordando a utilização de CTI no regenerado ósseo durante a distração osteogênica com o fixador externo de Ilizarov.

Ao ponderar sobre os benefícios que esse método poderia acarretar, este estudo foi proposto, baseado na hipótese de acelerar a consolidação do regenerado ósseo e abreviar o tempo de tratamento de alongamento ósseo com fixador externo, reduzindo, conseqüentemente, as complicações inerentes ao método.

Na escolha do objeto do presente estudo, dois aspectos foram importantes para a decisão: as características técnicas do procedimento cirúrgico e o método de estimulação da consolidação óssea.

O conceito de que fatores biomecânicos possam influenciar a osteogênese está bem estabelecido nos estudos realizados em ossos intactos e pós-fratura⁸⁰, como também já foi comprovado que a intensidade, a direção e o tempo de aplicação das forças são fatores críticos na formação óssea^{2,106}. Como os fatores mecânicos estão relacionados com o material de osteossíntese, sua estabilidade é importante para evitar mobilidade excessiva entre os fragmentos ósseos, causando ruptura dos neovasos e de osso imaturo, o que pode impedir ou

retardar a consolidação óssea, mas estudos experimentais relatam a importância de micromovimentos controlados, para esse processo fisiológico¹⁰⁶.

A necessidade de fixar as estruturas ósseas por meio de um sistema que mantivesse os micromovimentos, levantou o primeiro questionamento, cuja resposta foi encontrada ao estudar o fixador circular de Ilizarov.

O fixador externo circular de Ilizarov, biomecanicamente, promove anulação das forças que tendem a desviar os fragmentos ósseos. Embora seja estável, não é tão rígido como as montagens triangulares dos fixadores externos lineares. O aumento da rigidez diminui ou elimina a elasticidade que, normalmente, está presente na estrutura óssea. A rigidez do fixador de Ilizarov é reduzida com o uso de fios de Kirschner sob tensão, permitindo, durante os movimentos e carga do membro, micromovimentos nos segmentos ósseos, o que estimula a osteogênese¹³.

O fixador circular de Ilizarov promove osteogênese sem a necessidade de um fator osteocondutor ou osteogênico adicional, além de ser versátil, permitindo correção simultânea das discrepâncias e das deformidades ósseas multiaxiais, alongamentos maiores que os realizados com outros métodos⁴⁶. No entanto, nas grandes falhas ósseas, o tempo para que ocorra consolidação do regenerado ósseo é longo, do que advêm complicações, que poderão comprometer o resultado do tratamento⁴⁷.

A maior incidência de complicações no tratamento das grandes falhas ósseas pelo método de Ilizarov freqüentemente está relacionada ao tempo de permanência com o fixador, e inclui contraturas de tecidos moles, infecções no trajeto dos pinos, afrouxamento dos fios ou pinos, instabilidades do fixador, fratura e deformidade do regenerado^{9,42,46}. Falhas na formação óssea durante a distração osteogênica, como retardo de consolidação e pseudartrose, podem ocorrer em até 40% dos casos¹³³.

Os métodos habitualmente empregados para reduzir essas complicações e estimular a consolidação do regenerado ósseo, são: interrupção ou redução da velocidade do alongamento ósseo, dinamização do fixador externo, mecanismo de compressão-distração (mecanismo de “sanfona”) e enxerto ósseo autógeno⁸⁸.

A busca de um fator ou método terapêutico que reduza o tempo de consolidação do regenerado e, conseqüentemente, diminua ou previna as complicações inerentes ao método de distração óssea, também atuou como motivação da escolha do tema do presente estudo. Adicionalmente, considerou-se que o fator ou método a ser utilizado na pesquisa deveria ter técnica de obtenção a mais simples possível, índices de complicações aceitáveis, baixo custo e fácil reprodução em seres humanos.

Nesse contexto, a solução proposta foi o emprego de células-tronco autógenas. Essa linha de raciocínio fez com que a proposta deste estudo apresentasse como características, a obtenção das células-tronco autógenas da medula óssea colhidas do próprio animal e o método de Ilizarov para distração osteogênica - técnicas facilmente reprodutíveis e economicamente viáveis nos centros de tratamento de lesões ortopédicas.

As forças mecânicas de tração/distração que atuam no regenerado ósseo, durante a distração osteogênica, ativam metabolicamente as células osteoprogenitoras, aumentando o índice mitótico dessas células e a síntese de matriz óssea. Além disso, tais forças mecânicas estão relacionadas com o aumento da expressão dos genes que codificam as proteínas morfogênicas ósseas BMP-2 e BMP-4. Essas forças também induzem ao aumento de fatores de crescimento de insulina (IGF-1), fator de crescimento de transformação beta (TGF- β) e fator de crescimento fibroblástico (FGF-1)¹⁰⁷. Estes fatores desencadeiam e mantêm a proliferação e a diferenciação de CTM indiferenciadas em células osteoprogenitoras^{41,108}. Adicionalmente, as CMI são capazes de recrutar fatores de crescimento ao foco da osteotomia, promovendo quimiotaxia adicional de outras CTI¹⁰⁹.

Durante a escolha do tema, aventou-se a hipótese de associar o emprego de CT a plasma rico em plaquetas, com base em estudos demonstrando que as CTI, quando combinadas com fatores de crescimento em enxertos ósseos, aumentam a resposta osteogênica¹¹⁰. No entanto há controvérsia se os fatores de crescimento ósseo utilizados em lesões ósseas “in vivo” são capazes de induzir a diferenciação de CTI em células osteoprogenitoras¹¹¹.

Corroborando tal controvérsia, Torigoe et al²⁴. (2009) demonstraram, em macacos, que o plasma pobre em plaquetas, mas rico em fibrina, associado a CTM e biomaterial, tem maior potencial para induzir a formação de osso, do que plasma rico em plaquetas que contem altas concentrações de TGF- α e PDGF.

Não apenas a controvérsia da associação de CT com plasma rico em plaquetas fez com que fosse empregado apenas o concentrado de CT no regenerado ósseo, na presente pesquisa. Também a hipótese de que o regenerado ósseo possivelmente já apresente um meio propício para promover a diferenciação de CTI permitiu supor que não haveria necessidade de adicionar mais fatores de crescimento ou BMP e, nem mesmo, diferenciar as CTM em pré-osteoblastos “in vitro”. Essa argumentação é passível de questionamentos, que fogem aos objetivos do presente estudo e, provavelmente, serão elucidados em pesquisas adicionais com CTI associadas a fatores de crescimento no regenerado ósseo, durante a distração osteogênica.

5.2 Materiais e Métodos

A escolha do cão como modelo animal utilizado nos estudos da regeneração óssea está bem estabelecida¹⁰⁸, já tendo sido utilizada inclusive em distração osteogênica pelo método de Ilizarov⁴¹. Por outro lado, a opção por cães de grande porte, na presente pesquisa, atuou como fator facilitador para obtenção das células-tronco, por punção aspirativa do fêmur do próprio

animal submetido ao experimento, restringindo a necessidade de uso de expansor de volume da suspensão dessas CT.

No fêmur de cães de grande porte, é possível a coleta de um volume de medula óssea suficiente para o preparo da suspensão de CT com concentração adequada para promover aceleração do regenerado ósseo, afirmação comprovada pelos resultados obtidos. Assim, também esse sítio apresenta boa concentração de CTM⁴¹, o que contribuiu para dispensar a expansão de CT *in vitro*, procedimento que forçosamente iria requerer maior duração da pesquisa e custos adicionais¹¹².

Neste estudo, cada animal foi controle dele mesmo, ao se admitir o antebraço direito como controle e o esquerdo, integrando o grupo estudo. Isso permitiu a redução do número de animais necessários no experimento, além de tornar a amostra mais homogênea. Outro procedimento metodológico voltado para a homogeneidade amostral foi a osteotomia e o alongamento do rádio e da ulna, já que o alongamento apenas do rádio poderia ocasionar alterações biomecânicas e comprometer o regenerado ósseo.

O estudo da consolidação do regenerado ósseo apenas do rádio pode parecer, num primeiro julgamento, ter sido a lesão da ulna um procedimento desnecessário, já que ambos os ossos do antebraço foram alongados. A não utilização da ulna como controle do rádio ipsilateral decorreu da hipótese de que a inoculação de células-tronco no rádio poderia, por contigüidade ou via hematogênica, interferir positivamente na consolidação do regenerado da ulna, criando um viés ao estudo. Por esta mesma razão, a intervenção cirúrgica foi primeiro realizada no grupo controle, e após a ressecção desse regenerado, realizada a intervenção no grupo estudo.

Outros aspectos a serem elucidados neste estudo referem-se à escolha dos ossos do antebraço em detrimento das estruturas das patas traseiras e do nível diafisário.

Uma possível vantagem da realização do procedimento no antebraço e, não, nas patas traseiras do animal, foi supor que a intervenção nas patas traseiras estaria sujeita a maior risco de autocontaminação da cirurgia, além de submeter o animal a maior desconforto.

Com a escolha da porção diafisária do antebraço, buscou-se uma condição experimental comprovadamente mais sujeita a complicações relacionadas à distração osteogênica⁹⁷ na suposição de que, se os resultados da pesquisa fossem favoráveis numa condição mais adversa, poderiam ser exequíveis nas lesões em que a osteotomia metafisária para distração osteogênica fosse inviabilizada por motivos adversos.

O ritmo de alongamento ósseo de 1mm/dia, dividido em 0,5mm a cada 12 horas, foi uma tentativa de viabilização de maior praticidade, seja para estudos experimentais semelhantes ou para tratamento de seres humanos, caso os resultados comprovassem sua efetividade em promover a consolidação do regenerado em tempo semelhante ou ainda menor que o conseguido com o ritmo a cada seis horas, como preconizado por Ilizarov et al¹¹³. O alongamento a cada seis horas, poderia ser realizado através de hastes telescopadas motorizadas, entretanto houve dificuldades técnicas e financeiras para sua aquisição.

Uma crítica que se pode fazer ao ritmo adotado nesta pesquisa advém da afirmação de Ilizarov et al.⁸ (1989) de que o ritmo de alongamento ótimo, que mais favorece a formação de osso novo e histogênese, é de 1mm/dia subdividido em 0,25mm a cada seis horas. No entanto Welck *et al*¹¹⁴, em 1998, não demonstraram diferenças histológicas e histomorfométricas em tíbias de cães submetidos à distração osteogênica com hastes motorizadas nos ritmos diários de 0,75mm e 1mm, divididos em incrementos de 1mm, 0,25mm e 0,001mm. Estes achados foram corroborados por outros autores que não observaram alterações relevantes no tempo de consolidação e na estrutura do regenerado em tíbias de cães submetidos à distração osteogênica nos ritmos de 1mm por dia, divididos em 0,5mm a cada 12 horas^{42,115}.

A maioria dos estudos descritos na literatura considera o tempo entre a osteotomia e o início do alongamento ósseo necessário para a reorganização vascular e a prévia formação de calo e recomenda duração de cinco a 10 dias^{115,116}. A decisão de adotar, no presente estudo, um período de latência de sete dias além de ser condizente com a literatura, objetivou também maior fidelidade aos parâmetros técnicos de Ilizarov.

Para acompanhamento da distração osteogênica quanto a comprimento, espessura e data ideal para remoção do fixador externo, foram empregadas radiografias convencionais, nas incidências antero-posterior e perfil, associadas aos testes clínicos^{97,100}, mas sobretudo porque esse método de imagem apresenta uma relação custo/benefício maior que a de métodos mais complexos^{16,19,117}.

Embora a avaliação da evolução da consolidação do regenerado ósseo baseada na análise radiográfica da região alongada pode não ser precisa, do que derivam complicações pela retirada precoce do fixador externo¹¹¹, a análise de tais complicações não foi objetivo deste estudo.

5.3 Resultados

5.3.1 Clínicos e radiográficos

Do ponto de vista clínico e radiográfico, comprovou-se que o tempo de consolidação óssea e o índice de consolidação de extração foram significativamente menores no grupo estudo que no grupo controle.

O índice de consolidação do regenerado ósseo varia de 20 a 60 dias¹⁰⁰. Como esse índice é o intervalo de tempo necessário para que cada centímetro de osso alongado se consolide, fatores que interfiram em sua variação promovem conseqüente aumento ou redução do tempo de consolidação óssea, e, portanto, também do tempo de tratamento^{39,97}.

Esse raciocínio explica a redução concomitante do índice e do tempo de consolidação do regenerado ósseo.

Para compreender a razão da redução do tempo de consolidação óssea no grupo estudo, é preciso considerar a ação sinérgica de fatores que o influenciam, quais sejam: idade do indivíduo, região da distração óssea, osso alongado e técnica cirúrgica utilizada.

Já se comprovou que o tempo de consolidação do regenerado ósseo é maior em indivíduos com idade acima de 30 anos e que chega a reduzir em 50% a 100%, naqueles abaixo dessa idade¹⁰⁰. Esse tempo também poderá duplicar nos casos em que o alongamento ósseo é realizado em nível diafisário, quando comparado ao metafisário e nos ossos longos do antebraço, comparativamente à tibia e fêmur^{42,97,118-120}.

Considerando-se que, neste estudo, a idade dos cães, entre quatro a cinco anos, correspondeu à idade fisiológica de seres humanos de 40 a 45 anos de idade; o nível da osteotomia foi diafisário, o procedimento foi realizado em antebraço com o alongamento médio ósseo de 2cm, o tempo de consolidação do regenerado ósseo deveria ser longo em ambos os grupos, controle e estudo. De fato, isso ocorreu nos raios do grupo controle, nos quais o tempo de consolidação foi 1,8 vezes maior que no grupo estudo e o índice, 2,1 vezes maior.

Como o fator diferencial entre os grupos foi o uso de células-tronco no regenerado ósseo, parece plausível atribuir essa redução ao estímulo local desencadeado pelas células inoculadas.

Outra constatação do presente estudo foi a ausência de pseudartrose e retardo de consolidação, apenas no grupo estudo, mesmo realizando um ritmo de alongamento de 0,5 mm a cada 12 horas, sabidamente relacionado a retardo de consolidação, regenerado hipotrófico e pseudartrose, quando realizado nos ossos do antebraço¹⁰⁰. Isso pode ser

explicado também pela ação das células-tronco que promoveram adequada formação óssea e em menor tempo de consolidação.

5.3.2 Histomorfométricos e histológicos

Neste estudo, os índices histomorfométricos que expressam a microarquitetura (espessura trabecular, separação trabecular e número de trabéculas) e a quantidade óssea (volume ósseo) foram mais expressivos no grupo estudo. Estes dados sugerem que a utilização de células-tronco indiferenciadas, autógenas da medula óssea induz uma osteogênese com maior quantidade e qualidade óssea.

Trabalhos recentes^{16,22,23} têm demonstrado que a diminuição da espessura das trabéculas ósseas, seu grau de perfuração, com conseqüente desarranjo da microarquitetura, são responsáveis pela menor capacidade de o osso suportar cargas, uma vez que uma boa quantidade de massa óssea nem sempre significa boa resistência (conectividade normal).

Comparados esses resultados com os de outros estudos, nos quais o agente biológico foi introduzido no início ou após o término da distração osteogênica e os efeitos foram semelhantes^{26,27,102,120}. No entanto essa comparação deve ser feita com cautela pela diferença de metodologia adotada em relação ao agente biológico utilizado. O emprego de células-tronco autógenas indiferenciadas promoveu resposta histológica semelhante a uma relação custo benefício menor e mais favorável.

O índice histomorfométrico de superfície osteoblástica (Ob.S/BS (%)) foi maior nos raios do grupo estudo, indicando maior efetividade da osteogênese, que parece estar intimamente relacionada com a inoculação das células-tronco adicionais, fato comprovado em estudos experimentais^{42,108}. Mehara et al¹²¹, em 1999, demonstraram que a diferenciação de CT em osteoblastos e síntese de matriz óssea coincide com a ativação do gene que expressa o

TGF- β . Outros autores⁴² encontraram uma forte correlação, durante a distração osteogênica em cães, entre os índices histomorfométricos e o tempo de consolidação óssea, e que Isso sugere que não está reduzida, após a aparente consolidação do regenerado ósseo.

No presente experimento, o tipo de consolidação do regenerado foi misto (ossificação endocondral e intramembranosa) em 80% dos raios, tanto no grupo controle como no grupo estudo.

Os achados de ossificação endocondral durante a distração osteogênica foram atribuídos por Ilizarov^{8,45,122,123} e Paley¹²⁴ (1988) à instabilidade da armação do fixador. No entanto os achados de ossificação endocondral, neste estudo, não foram atribuídos a esse fator, porque foram obedecidos os critérios biomecânicos seguidos em outros experimentos, os quais utilizaram configurações equivalentes^{108,125,126}. Esses achados de ossificação endocondral parecem decorrer do próprio processo de consolidação da espécie animal, das diferenças macro e microscópicas existentes nas estruturas ósseas e dos mecanismos homeostáticos do esqueleto^{127,128}.

Fink et al.¹²⁹, em 2003, após estudos histomorfométricos do tipo de ossificação do regenerado ósseo na distração osteogênica pela técnica de Ilizarov a que foram submetidos 24 cães, concluíram que as formações endocondral e intramembranosa ocorreram numa proporção de 5:1, e não se deviam a situações adversas como instabilidades do fixador de Ilizarov.

As células-tronco adultas autógenas (adultas) obtidas da medular óssea possuem algumas vantagens com relação às células-tronco fetais, como menor tumorigenicidade, técnica de obtenção mais fácil e menores problemas éticos⁶². Isso foi corroborado neste experimento, uma vez que, nos regenerados ósseos nos quais as células-tronco foram introduzidas, não foi observada formação de tecidos neoplásicos ou heterotópicos. Além disso, a ausência de aspectos histológicos de processo infeccioso nesses raios sugere que as

técnicas utilizadas na obtenção, no preparo e na inoculação dessas células-tronco no regenerado ósseo durante a distração osteogênica, são relativamente seguras.

Os dados deste estudo sugerem que a inoculação de CTI pode reduzir o tempo total de consolidação do regenerado ósseo durante a distração osteogênica pela técnica de Ilizarov, além de promover formação óssea em maior quantidade e qualidade, dados esses comprovados pelos índices histomorfométricos. Adicionalmente, a técnica é relativamente segura, quanto a degenerações neoplásicas e infecções secundárias.

A consolidação óssea permanece ainda como um verdadeiro desafio para o ortopedista moderno, apesar da introdução das novas terapias com agentes biológicos, como as células-tronco. Uma compreensão mais profunda da fisiopatologia do reparo da consolidação é necessária para desenvolver melhores estratégias para o tratamento, direcionado aos processos moleculares e celulares que afetam condições clínicas específicas.

A realidade social, econômica e política de saúde, não apenas no Brasil, mas em todo o mundo é preocupante pela falta de recursos, especialmente nos países em desenvolvimento. Por esse motivo, o que de melhor se puder fazer será bem-vindo. O uso de células-tronco em grandes lesões ósseas tende a ser uma técnica promissora, associada às técnicas de alongamento ósseo com fixador externo, com altos índices custo/benefício, podendo, desta forma, ser incorporado na rotina de tratamento de lesões ortopédicas.

Conclusões

Após avaliação dos resultados com base na metodologia empregada em um modelo experimental em cães pode-se afirmar que a utilização de células-tronco indiferenciadas da medula óssea resultou nas seguintes conclusões:

- ❖ O uso de células-tronco indiferenciadas do estroma da medula óssea, durante a distração osteogênica da diáfise do rádio reduz o tempo de consolidação clínica e radiográfica do rádio alongado.
 - ❖ O tecido ósseo neoformado pela distração osteogênica, associado ao uso de células-tronco indiferenciadas apresenta características histomorfométricas, quantitativas e qualitativas superiores ao controle.
 - ❖ O uso de células-tronco indiferenciadas autógenas não induz a princípio, nos limites do modelo estudado, a formação de tecido neoplásico ou ectópico no regenerado ósseo resultante da distração osteogênica.
-

Referências

1. Porto LCK, Fujiki EM, Ohara GH, Costa JEP, Fazoli PC, Mucciolo FMA. Tratamento pelo método Ilizarov. Análise das complicações e suas repercussões no objetivo proposto. *Rev Bras Ortop.* 1995;50(7):503-8.
 2. Rotbade I, Ramos, M, Hashimoto R, Rabelo GL, Carvalho ALC. Contribuição ao estudo biomecânico do aparelho de fixação externa de Ilizarov. *Rev Bras Ortop,* 1996; 31(8):620-4.
 3. Durigan Junior A, Batista LC. Corticotomia. *Rev Bras Ortop.* 1997;33(8):623-9.
 4. Song HR, Cho SH, Koo KH, Jeong ST, Park YJ, Ko JH. Tibial bone defects treated by internal bone transport using the Ilizarov method. *Inter Orthop.* 1998;22(5):293-7.
 5. Moselin CF. Discrepância no comprimento do membro. In: Morrissy RT, Weinstein SL, editors. *Ortopedia Pediátrica de Lovell e Winter.* 5^a ed. São Paulo: Manole; 2001. p.1203-54.
 6. Ramos M, Rotbade I, Ramos R, Gomes R, Carvalho JG, Santos LAVM. Tratamento das grandes falhas ósseas pelo método Ilizarov - Técnica trifocal. *Rev Bras Ortop.* 1999; 34(4):255-9.
 7. Souza PM, Marchiori E, Dinoá VA, Knackfuss IG. Aspectos radiográficos e ultrassonográficos dos pacientes submetidos a alongamento ósseo pelo método de Ilizarov. *Radiol Bras.* 2003;36(6):1-17.
 8. Ilizarov GA. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part I: The influence of stability of fixation and soft-tissue preservation. *Clin Orthop.* 1989; 238(1):249-81.
 9. Golyakhovsky V, Frankel V, editores. *Manual de técnicas operatórias do método de Ilizarov.* Rio de Janeiro: Revinter; 1996.
 10. Catagni M, Tejan J, Felici JVN, Bongiovanni JC. Tratamento da perda óssea da tíbia usando a fíbula e o aparelho de Ilizarov. *Rev Bras Ortop.* 1997;32(8):603-10.
-

11. Prado I, Quirino A. Tratamento cirúrgico da pseudartrose não infectada da tíbia, pelo método Ilizarov. *Rev Bras Ortop.* 1999;34(6):369-74.
 12. Mercadanti MT, Santin RAL. Desigualdade de comprimento dos membros inferiores. In: Hebert S, editor. *Ortopedia e traumatologia: princípios e práticas.* 3. ed. Porto Alegre: Artmed; 2003. p.681-94.
 13. Grenn SA. Management of fractures, nonunions, and malunions with Ilizarov techniques. In: Chapman, M, editors. *Chapman's Orthopaedic Surgery.* California: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
 14. Catagni M, Felic J. Alongamento de dois níveis e o método de Ilizarov (trifocal) no tratamento da pseudartrose tibial com perda óssea. *Rev Bras Ortop.* 1996; 31(8):613-9.
 15. Rahal SC, Volpi RS, Iamaguti P, Ueda A. Avaliação histológica da regeneração óssea do rádio e ulna em cães submetidos ao alongamento com fixador de Ilizarov. *Braz J Res Sci.* 2001;38(3):122-6.
 16. Hazra S, Song HR, Biswal S, Lee SH, Lee SH, Jang KM, et al. Quantitative assessment of mineralization in distraction osteogenesis. *Skeletal Radiol.* 2008;37(9):843-7.
 17. Doi K, Kubo T, Hayashi K, Imura K, Akagawa Y. Development of cell-hybrid artificial bone: effect of osteogenic differentiation of bone marrow stromal stem cells on bone formation with newly developed interconnected porous calcium hydroxyapatite. *Dent Mater J.* 2007;26(2):162-9.
 18. Lively MW. Sports medicine approach to low back pain. *South Med J.* 2002;95(6):642-6.
 19. Kawano M, Taki J, Tsuchiya H, Tomita K, Tonami N. Predicting the outcome of distraction osteogenesis by 3-phase bone scintigraphy. *J Nucl Med.* 2003;44(3):369-74.
 20. Zabeu JLA, Mercadante MT. Substitutos ósseos comparados ao enxerto ósseo autólogo em cirurgia ortopédica – Revisão sistemática da literatura. *Rev Bras Ortop.* 2008;43(3):59-68.
-

21. Lucarelli E, Fini M, Beccheroni A, Giavaresi G, Di Bella C, Aldini NN, et al. Stromal stem cells and platelet-rich plasma improve bone allograft integration. *Clin Ortop Related Res.* 2005;435(6):62-8.
 22. Giordano V, Albuquerque RP, Rezende R, Senna LF, Pompei A, Amaral NP, et al. Estudo histomorfológico da incorporação de aloenxerto fresco e da hidroxiapatita de alta porosidade em defeito ósseo produzido em fêmures de ratos. *Rev Bras Ortop.* 2006;88(11):381-91.
 23. Croci AT, Camargo OP, Bitar G, Pereira SLB, Freire TM, Cardoso SCI. The use of inhaled bone marrow of ileum in bone failures of femurs of rats. Experimental study. *Acta Ortop Bras.* 2004;12(1):40-4.
 24. Torigoe I, Sotome S, Tsuchiya A, Yoshii T, Maehara H, Sugata Y, et al. Bone regeneration with autologous plasma, bone marrow stromal cells, and porous beta-tricalcium phosphate in nonhuman primates. *Tissue Engineering Part A.* - Not available -, ahead of print. doi:10.1089/ten.tea.2008.03179.
 25. Burwell RG, The function of bone marrow in the incorporation of a bone graft. *Clin Orthop.* 1985;200(11):125-41.
 26. Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H, Mitsuyama H, Nakamura H, Katoh M, et al. Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis - a preliminary result of three cases. *Bone.* 2004;35(4):892-8.
 27. Qi M, Hu J, Zou S, Zhou H, Han LC. Mandibular distraction osteogenesis enhanced by bone mesenchymal stem cells in rats. *J Cranio-Maxillofac Surg.* 2006;34(1):283-9.
 28. Nyman R, Sennerby L, Nyman S, Lundgren D. Influence of bone marrow on membrane-guided bone regeneration of segmental long-bone defects in rabbits. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 2001;35(3):239-6.
-

29. Arinzech TL, Peter SJ, Archambault MP, van den Bos C, Gordon S, Kraus K, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg.* 2003;85-A(10):1927-35.
 30. Lucarelli E, Donati D, Cenacchi A, Fornasari PM. Bone reconstruction of large defects using bone marrow derived autologous stem cells. *Transfus Apheresis Sci.* 2004; 30(2):169-74.
 31. Grageda E, Lozada JL, Boyne PJ, Caplanis N, Mcmillan PJ. Bone formation in the maxillary sinus by using platelet-rich plasma: an experimental study in sheep. *J Oral Implantol.* 2005;31(1):2-17.
 32. Ito K, Yamada Y, Nagasaka T, Baba S, Ueda M. Osteogenic potential of injectable tissue-engineered bone: a comparison among autogenous bone, bone substitute (Bio-Oss(R)), platelet-rich plasma, and tissue-engineered bone with respect to their mechanical properties and histological findings. *J Biomed Mater Res A.* 2005;73-A(1):63-72.
 33. Robiony M, Polini F, Costa F, Politi M. Osteogenesis distraction and platelet-rich plasma for bone restoration of the severely atrophic andible: preliminary results. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002;60(6):630-5.
 34. Swennen GR, Schutyser F, Mueller MC, Kramer FJ, Eulzer C, Schliephake H. Effect of platelet-rich-plasma on cranial distraction osteogenesis in sheep: preliminary clinical and radiographic results. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005;34(3): 294-304.
 35. Gerstenfeld LC, Wronski TJ, Hollinger JO, Einhorn TA. Application of histomorphometric methods to the study of bone repair. *J Bone Mineral Res.* 2005;20(10):1715-22.
 36. Utvag SE, Grundnes O, Rindal DB, Reikeras O. Influence of extensive muscle injury on fracture healing in rat tibia. *J Orthop Trauma.* 2003;17(6):430-5.
-

37. Smith-Adaline EA, Volkman SK, Ignelzi Jr MA, Slade J, Platte S, Goldstein SA. Mechanical environment alters tissue formation patterns during fracture repair. *J Orthop Res.* 2004;22(5):1079-85.
 38. Richards M, Goulet JA, Schaffler MB, Goldstein SA. Temporal and spatial characterization of regenerate bone in the lengthened rabbit tibia. *J Bone Mineral Res.* 1999;14(11):1978-86.
 39. Píspico R, Leme JJ. Utilização de plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos - proposta de um protocolo de obtenção simplificado. *Rev APCD.* 2001;4(7):5-7.
 40. Johnstone EW, Foster BK. Aspectos biológicos das fraturas em criança. In: Rockwood e Wilkins. *Fraturas em Crianças.* 5. ed. São Paulo: Manole; 2004. p. 179-221.
 41. Kusec V, Jelic M, Borovecki F, Kos J, Vukicevic S, Korzinek K. Distraction osteogenesis by Ilizarov and unilateral external fixators in a canine model. *Int Orthop.* 2003;27(1):47-52.
 42. Aronson J, Harp JH. Mechanical forces as predictors of healing during tibial lengthening by distraction osteogenesis. *Clin Orthop Related Res.* 1994;301(4):73-9.
 43. Leivas TP, Arenas EC, Targa WHC, Leopizzi N, Okamoto AM, Rossi JDMBA, et al. Análise da estabilidade de três montagens do fixador externo circular. *Rev Bras Ortop.* 1997;32(3):611-4.
 44. Ilizarov GA. The principles of the Ilizarov method. *J Dis Orthop Inst.* 1988;48(1):1-11.
 45. Ilizarov GA. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part II: The influence of the rate and frequency of distraction. *Clin Orthop.* 1989;239(2):263-85.
 46. Paley D. Problems, obstacles, and complications of limb lengthening by the Ilizarov technique. *Clin Orthop.* 1990;250(1):81-104.
 47. Borges JLP, Silva VC, Oliveira LF, Laghi R, Nogueira MP. Estudo anatomopatológico do tecido muscular e nervoso no alongamento ósseo. *Rev Bras Ortop.* 2001;36(6):219-24.
-

48. Paley D, Herzenberg J, Paremain G, Bhave A. Femoral lengthening over an intramedullary nail: a matched case comparison with Ilizarov femoral lengthening. *JBJS*. 1997;79(10):1464-80.
 49. García-Cimbrelo E, Curto-de-La-Mano A, Garcia-Rey E, Cordero J, Marti-Ciruelos R. Intramedullary elongation nail for femoral lengthening. *Bone Joint Surg*. 2002;84(7):971-7.
 50. Perttunen JR, Anttila E, Sodergard J, Merikanto J, Komi, P. V. Effect of intramedullary gradual elongation of the shorter limb on gait patterns. *Pediatr Int*. 2003;45(3):324-32.
 51. Potaczek T, Kacki W, Jasiewicz B, Tesiorowski M, Lipik E. Femur lengthening with a telescopic intramedullary nail ISKD-method presentation and early clinical results. *Chir Narzadow Ruchu Ortop Pol*. 2008;73(1):10-14.
 52. Chapman MW, Bucholz R, Cornell, C. Treatment of acute fractures with a collagen-calcium phosphate graft material. A randomized clinical trial. *J Bone Joint Surg Am*. 1997;79(4):495-502.
 53. Huang YC, Kaigler D, Rice KG, Krebsbach PH, Mooney DJ. Combined angiogenic and osteogenic factor delivery enhances bone marrow stromal cell-driven bone regeneration. *J Bone Miner Res* 2005;20(5):848-57.
 54. Ahlmann E, Patzakis M, Roidis N, Shepherd L, Holtom P. Comparison of anterior and posterior iliac crest bone grafts in terms of harvest-site morbidity and functional outcomes. *J. Bone Joint Surg Am*. 2002;84(5):716-20.
 55. Groeneveld EH, Burger EH. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol* 2000;142(1):9-21.
 56. Peng H, Wright V, Usas A, Gearhart B, Shen HC, Cummins J, et al. Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4. *J Clin Invest* 2002;110(6):751-9.
-

57. Lynch SE, Buser D, Hernandez RA. Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *J Periodontol.* 1991;62(11):710-6.
 58. Gates CB, Karthikeyan T, Fu F, Huard J. Regenerative medicine for the musculoskeletal system based on muscle-derived stem cells. *J Am Acad Orthop Surg.* 2008;16(2):68-76.
 59. Gibson S, Mcleod I, Wardlaw D, Urbaniak S. Allograft versus autograft in instrumented posterolateral lumbar spinal fusion: a randomized control trial. *Spine.* 2002;27(15):1599-603.
 60. Parikh SN. Bone graft substitutes: past, present, future. *J Postgrad Med.* 2002;48(2):142-8.
 61. Suchomel P, Barsa P, Buchvald P, Svobodnik A, Vanickova E. Autologous versus allogenic bone grafts in instrumented anterior cervical discectomy and fusion: a prospective study with respect to bone union pattern. *Eur Spine J.* 2004;13(6):510-5.
 62. Oliveira LAC, Sponchiado G, Adam MI. Conceitos e aplicações de células-tronco em medicina regenerativa: uma revisão. *RUBS.* 2006;2(2):32-42.
 63. Muschler GF, Midura RJ. Connective tissue progenitors: practical concepts for clinical applications. *Clin Orthop Relat Res.* 2002;395(1):66-80.
 64. Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthr Rest Her.* 2003;5(1):32-45.
 65. De Barri C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arth Rheum.* 2001;44(8):1928-42.
 66. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7(2):211-28.
-

67. Qu-Petersen Z, Deasy B, Jankowski R, Ikezawa M, Cummins J, Pruchnic R, et al. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol.* 2002;157(5):851-64.
 68. Del Carlo RJ. Células-tronco: células da esperança. *Rev Cons Fed Med Vet.* 2005;35(1):60-8.
 69. Minguell JJ, Conget P, Erices A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Braz J Med Biol Res.* 2000;33(8):881-7.
 70. Burwell RG. Studies in the transplantation of bone. 7. The fresh composite homograft-autograft of cancellous bone: an analysis of factors leading to osteogenesis in marrow transplants and in marrow-containing bone grafts. *J Bone Joint Surg Br.* 1964;46(1):110-40.
 71. Friedenstein AJ, Deriglazova U, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luria EA, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol.* 1974;2(2):83-92.
 72. Fibbe WE, Noort WA. Mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cell transplantation. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;996(5):235-44.
 73. Eisenberg LM, Kubalak SW, Eisenberg CA. Stem cells and the formation of the myocardium in the vertebrate embryo. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2004;276(1):2-12.
 74. Lee J, Kim J, Kim S, Park J, Hong S, Roh S, et al. Comparative characteristics of three human embryonic stem cell lines. *Mol Cells.* 2004 ;19(1):31-8.
 75. Wu W, Chen X, Mao T, Ch NF, Feng X. Bone marrow-derived osteoblasts seeded into porous beta-tricalcium phosphate to repair segmental defect in canine's mandibula. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2006;12(4):268-76.
-

76. Yuan J, Cui L, Zhang WJ, Liu W, Cao Y. Repair of canine mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and porous beta-tricalcium phosphate. *Biomaterials*. 2007;28(6):1005-13.
 77. Dumas A, Moreau MF, Ghérardi RK, Baslé MF, Chappard D. Bone grafts cultured with bone marrow stromal cells for the repair of critical bone defects: An experimental study in mice. *J Biomed Mater Res*. 2008 Aug 5.
 78. Giannoni P, Mastrogiacomo M, Alini M, Pearce SG, Corsi A, Santolini F, et al. Regeneration of large bone defects in sheep using bone marrow stromal cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2008;2(5):253-62.
 79. Liu G, Zhao L, Zhang W, Cui L, Liu W, Cao Y. Repair of goat tibial defects with bone marrow stromal cells and beta-tricalcium phosphate. *J Mater Sci Mater Med*. 2008;19(6):2367-76.
 80. Krzymanski G, Kalczak M, Wiktor-Jedrzejczak W. The use of bone-marrow-derived fibroblastoid cells and fresh bone marrow in the treatment of bone defects: an experimental study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1997;26(1):55-60.
 81. Del Carlo RJ, Pinheiro LCP, Monteiro BS, Silva PSA, Viana VW. Integração de aloenxertos ósseos corticais associados ou não a células-tronco da medula óssea, proteína óssea morfogenética (BMP) e autoenxerto esponjoso em cães. *Vet Zootec*. 2007; 14(2):204-15.
 82. Clarke SA, Hoskins NL, Jordan GR, Marsh DR. Healing of an ulnar defect using a proprietary TCP bone graft substitute, JAX, in association with autologous osteogenic cells and growth factors. *Bone*. 2007;40(4):939-47.
 83. Mandu-Hrit M, Haque T, Lauzier D, Kotsiopriftis M, Rauch F, Tabrizian M, et al. Early injection of OP-1 during distraction osteogenesis accelerates new bone formation in rabbits. *Growth Factors*. 2006;24(3):172-83.
-

84. Cetrulo Jr CL, Knox KR, Brown DJ, Ashinoff RL, Dobryansky M, Ceradini DJ, et al. Stem cells and distraction osteogenesis: endothelial progenitor cells home to the ischemic generate in activation and consolidation. *Plast Reconstr Surg.* 2005;116(4):1053-64.
 85. Mandu-Hrit M, Seifert E, Kotsiopriftis M, Lauzier D, Haque T, Rohlicek C, et al. OP-1 injection increases VEGF expression but not angiogenesis in a rabbit model of distraction osteogenesis. *Growth Factors.* 2008;26(3):173-51.
 86. Grigolon MV, Etchebehere ECSC, Lima MCL, Ramos CD, Santos AO, Belangero W, et al. Valor prognóstico da cintilografia na avaliação da formação do regenerado ósseo no tratamento por alongamento do fêmur curto congênito. *Rev Bras Ortp.* 2001;36(2):225-9.
 87. Starr KA, Fillman R, Raney EM. Reliability of radiographic assessment of distraction osteogenesis site. *J Pediatr Orthop.* 2004;24(1):26-9.
 88. Aronson J, Shin HD. Imaging techniques for bone regenerate analysis during distraction osteogenesis. *J Pediatr Orthop.* 2003;23(4):550-60.
 89. Mandarim-de-Lacerda CA, editor. Métodos quantitativos em morfologia. Rio de Janeiro: Editora UERJ; 1995.
 90. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. *J Bone Mineral Res.* 1987;2(6):595-610.
 91. Garcia Y, Breen A, Burugapalli K, Dockery P, Pandit A. Stereological methods to assess tissue response for tissue-engineered scaffolds. *Biomater.* 2007;28(2):175-86.
 92. Baddeley AJ, Gundersen HJ, Cruz-Orive LM. Estimation of surface area from vertical sections. *J Microsc.* 1986;142(Pt 3):259-76.
 93. Verterby A. Star volume in bone research. A histomorphometric analysis of trabecular bone structure using vertical sections. *Anat Record.* 2005;235(2):325-34.
-

94. Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc.* 2003;75(4):470-85.
 95. Sheila CR, Reinaldo SV, Paulo I, Anete U. Avaliação histológica da regeneração óssea do rádio e ulna em cães submetidos ao alongamento com o fixador de Ilizarov. *Braz J Vet Res Anim Sci São Paulo.* 2001;38(3):122-6.
 96. Catagni M, Bolano L, Cattaneo R. Management of fibular hemimelia using the Ilizarov method. *Orthop Clin North Am.* 1991;22(4):715-22.
 97. Jeffrey I, Drorp A, Charless, U. Variables affecting time to bone healing during limb lengthening. *Clin Orthopaed Related Res.* 1994;301(4):31-7.
 98. Abukawa H, Shin M, Williams Wb, Vacanti Jp, Kaban Lb, Troulis Mj. Reconstruction of mandibular defects with autologous tissue-engineered bone. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62(5):601-6.
 99. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999; 284(5411):143-7.
 100. Paley D, Bhatnagar J, Herzenberg JE, Bhave A. New procedures for tightening knee collateral ligaments in conjunction with knee realignment osteotomy. *Orthop Clin North Am.* 1994;25(3):533-55.
 101. Aldegheri R. Distraction osteogenesis for lengthening of the tibia in patients who have limb-length discrepancy or short stature. *J Bone Joint Surg.* 1999;81(5):624-4.
 102. Özeç Y, Öztürk M, Kylyç E, Yeler H, Göze F, Gümüş C. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on mandibular distraction osteogenesis. *J Craniofacial Surg.* 2006;17(1):80-3.
-

103. Lee DY, Cho TJ, Kim JA, Lee HR, Yoo WJ, Chung CY, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in fracture healing and distraction osteogenesis. *Bone*. 2008;42(5):932-41.
 104. Kempen DHR, Lu L, Heijink A, Hefferan TE, Creemers LB, Maran A, et al. Effect of local sequential VEGF and BMP-2 delivery on ectopic and orthopic bone regeneration. *Biomaterials*. 2009;30(14):2816-25.
 105. Goodship AE, Lanyon LE, McFie H. Functional adaptation of bone to increased stress. An experimental study. *J Bone Joint Surg*. 1979;61(4):539-43.
 106. Figueiredo UM. Efeitos da aplicação de micromovimentos controlados em distração osteogênica. *Rev Bras Ortop*. 1996;31(5):35-8.
 107. Farhadieh RD, Dickinson R, Yu Y, Gianoutsos MP, Walsh WR. The role of transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor 1, and basic fibroblast growth factor in distraction osteogenesis of the mandible. *J Craniofac Surg*. 1999;10(1):80-6.
 108. Pacicca DM, Moore D, Ehrlich MG, editors. *Physiologic weight-bearing and consolidation of new bone in a rat model of distraction osteogenesis*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002. p.652-9.
 109. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passing. *Exp Hematol*. 2004;32(5):414-25.
 110. Barry PF, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Intern J Bioch Cell Biol*. 2004;36(2):568-84.
 111. Freymiller EG, Aghaloo TL. Platelet-rich plasma: ready or not? *J Oral Maxill Surg*. 2004;62(4):484-88.
 112. Pagliosa GM, Alves GES. Considerações sobre a obtenção e o uso do plasma rico em plaquetas e das células mesenquimais indiferenciadas em enxertos ósseos. *Ciência Rural*. 37(4):1202-5.
-

113. Ilizarov GA, Palienko LA, Shrejner A. Bone marrow hemopoietic function and its relation to osteogenesis activity during reparative regeneration in leg lengthening in the dog. *Ontogenez*. 1984;15(2):146-52.
 114. Welch RD, Jones AL, Bucholz RW, Reinert CM, Tjia JS, Pierce WA, et al. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on fracture healing a goat tibial fracture model. *J Bone Miner Res*. 1998;13(9):1483-7.
 115. Aronson J, Good B, Stewart C, Harrison B, Harp JH. Preliminary studies of mineralization during distraction osteogenesis. *Clin Orthop*. 1990;250(1):43-9.
 116. Ilizarov GA, Palienko LA, Shrejner AA, Bogomiagkov VS. The bone marrow hemopoietic function and its relationship with the activity of osteogenesis upon reparative regeneration under the conditions of crus elongation in dogs. *Ontogenez*. 1983;14(6):617-23.
 117. Li R, Saleh M, Yang L, Coulton L. Radiographic classification of osteogenesis during bone distraction. *J Orthop Res*. 2006;24(3):339-47.
 118. L'rafton PG. Closed unstable fractures of the tibia. *Clin Orthop*. 1988;230(5):58-67.
 119. Villa A, Paley D. Lengthening of the forearm by Ilizarov technique. *Clin Orthop*. 1989;260(1):125-37.
 120. Mizumoto Y, Moseley T, Drews M, Cooper III VN, Reddi H. Acceleration of regenerate ossification during distraction osteogenesis with recombinant human bone morphogenetic protein-7. *J Bone Joint Surg*. 2003;85(Suppl. 3):124-30.
 121. Mehara BJ, Rowe NM, Steinbrech DS, Dudziak ME, Saadeh PB, McCarthy G, et al. Rat mandibular distraction osteogenesis: II. Molecular analysis of transforming growth factor beta-1 and osteocalcin gene expression. *Plast Reconstr Surg*. 1999;103(2):536-47.
 122. Ilizarov GA. Clinical application of the tension-stress effect for limb lengthening. *Clin Orthop*. 1990;250(1):8-26.
-

-
123. Ilizarov GA. Transosseous osteosynthesis. Berlin. 1992.
 124. Paley D. Current techniques of limb lengthening. *J Pediatr Orthop*. 1988;8(1):73-92.
 125. Rotbade IS, Ramos MRF. Atualização em fixação externa: conceitos e revisão. *Rev Bras Ortop*. 2000;35(4):103-8.
 126. Andrade Filho EF, Picado CHF, Moro CA. Comparação biomecânica entre pinos de Schanz de diferentes materiais empregados na fixação externa: estudo experimental em coelhos *Rev Bras Ortop*. 2003;38(11/12):692-702.
 127. Karaharju EO, Aalto K, Kahri A, Lindberg LA, Kallio T, Karaharju-Suvanto T, et al. Distraction bone healing. *Clin Orthop*. 1993;297(12):38-43.
 128. De Pablos J, Barrios C, Alfaro C, Cañadell J. Large experimental segmental bone defects treated by bone transportation with monolateral external distractors. *Clin Orthop*. 1994;298(1):259-65.
 129. Fink B, Pollnau C, Vogel M, Skripitz R, Enderle A. Histomorphometry of distraction osteogenesis during experimental tibial lengthening. *J Orthop Trauma*. 2003;17(2):113-8.
-

Apêndices

Apêndice A – Protocolo de coleta dos dados

1. Cão N.º: _____
2. Idade: _____
3. Peso: _____
4. Datas das cirurgias e consolidação clínica e radiográfica
 - a. Fixação do Ilizarov + osteotomia
 - i. Antebraço direito: ____/____/____
 - ii. Antebraço esquerdo: ____/____/____
 - b. Ressecção do regenerado ósseo
 - i. Antebraço direito: ____/____/____
 - ii. Antebraço esquerdo: ____/____/____
 - c. Inoculação das células-tronco:
 - i. Data: ____/____/____
 - d. Retirada do fixador do antebraço direito
 - i. Data: ____/____/____
5. Evolução clínica e radiográfica (Rx AP e perfil)
 - a. Data: ____/____/____ ; Pata: D (), E ()
 - i. Aspectos radiográficos: _____
 - ii. N.º. de corticais: _____
 - iii. Aspectos clínicos: Mobilidade anormal: S (), N ()
6. Retardo de consolidação e/ou pseudartrose: N (); S (),
qual(is): _____

Apêndice B – Amostras histológicas qualitativas dos grupos controle e estudo

TIPO DE CONSOLIDAÇÃO	GRUPOS			
	Controle (n=10)		Estudo (n=10)	
	n	%	n	%
OE	1	10	1	10
OI	1	10	1	10
Predomínio de OE	2	20	3	30
Predomínio de OI	2	20	3	30
Sem predomínio	4	40	2	20
TOTAL	10	100	10	100
$p^{(1)}$	0,8995			

AMOSTRAS QUALITATIVAS

Distribuição da atividade osteoblástica nos regenerados ósseos dos rádios nos grupos controle e estudo

ATIVIDADE OSTEABLÁSTICA	GRUPOS				$p^{(1)}$
	CONTROLE (n=10)		ESTUDO (n=10)		
	n	%	n	%	
Alta	1	10	5	50	0,0821
Moderada	7	70	5	50	
Baixa	2	20	-	-	
TOTAL	10	100	10	100	

Distribuição dos percentuais de ocupação de área total dos campos histológicos por tecido conjuntivo (ósseo e não ósseo) r

PERCENTUAIS DE OCUPAÇÃO	Area total de tecido conjuntivo (%)				$p^{(1)}$
	GRUPO CONTROLE (n=10)		GRUPO ESTUDO (n=10)		
	n	%	n	%	
≥ 90	4	40	7	70	0,2818
50 90	4	40	3	30	
10 50	1	10	-	-	
≤ 10	1	10	-	-	
TOTAL	10	100	10	100	

Distribuição do tipo radiográfico do regenerado ósseo do rádio dos grupos controle e estudo, na data da consolidação clínica:

TIPOS	GRUPOS				$p^{(1)}$
	CONTROLE		ESTUDO		
	n	%	n	%	
I	8	80	10	100	0,4066
II	1	10	-	-	
III	1	10	-	-	
TOTAL	10	100	10	100	

Apêndice C – Amostras histomorfométricas quantitativa dos grupos controle e estudo

B.Ar/T.Ar(BV/TV)		B.Ar/T.Ar(BV/TV)		Tb.Th(mc)=2*B.Ar/1.199*B.Pm		Tb.Th(mc)=2*B.Ar/1.199*B.Pm		Superfície Osteoblástica (%)		Superfície Osteoblástica (%)																																																
CONTROLE	ESTUDO	CONTROLE	ESTUDO	CONTROLE	ESTUDO	CONTROLE	ESTUDO	CONTROLE	ESTUDO	CONTROLE	ESTUDO																																															
23,23156431	61,83075325	76,60312521	128,0808154	43,19	59,27	29,26882203	54,89824868	210,2902961	21,7	74,31	38,69275473	67,40384698	68,94173048	135,2942773	61,58	36,53	48,74068428	58,99926055	140,5183803	141,952283	40,35	67,82	55,56301876	50,90978223	189,8337479	119,0759495	62,34	95,52	46,03299583	69,22469609	71,61568375	215,2772618	43,09	89,25	20,75808396	59,50298464	78,60148532	152,2348465	23,5	78,43	40,57088498	56,60897821	103,9509192	139,3862712	26,38	65,11	27,66062326	56,58051746	57,35145991	168,2660558	73,03	68,64	29,157346	55,93088679	90,04044185	204,7578611	27,97	70,32

Tb.Sp(mc)=Tb.Th*100/(BV/TV-1)		Tb.Sp(mc)=Tb.Th*100/(BV/TV-1)		Tb.N(mm)		Tb.N(mm)																																	
CONTROLE	ESTUDO	CONTROLE	ESTUDO	CONTROLE	ESTUDO	CONTROLE	ESTUDO																																
253,1341417	79,06661318	7	12,75	156,8802441	172,7643571	9,67	11,5	109,2356336	65,42761522	7,33	14,8	147,7795425	98,64782228	10,5	12,83	164,6636077	114,8200609	6,86	27,25	83,95899145	95,70606349	5,2	12,25	300,0533339	103,6092047	6	10,8	152,269568	106,8401678	6,86	11,25	149,9882641	129,1261622	4,86	16,6	218,7683292	161,3329929	4,4	13

AMOSTRAS QUANTITATIVAS PAREADAS

Anexos

Anexo A – Aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética da Universidade

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 14 de outubro de 2008

Ofício nº 68/08

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: **Epitácio Leite Rolim Filho**
Aluno do Doutorado em Cirurgia - CCS
Professor orientador: Dr. Lamartine
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076. 020444 / 2008 - 49

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado ***“Uso de plasma rico em plaquetas e células tronco autógenas no regenerado ósseo durante a distração osteogênica pela técnica de Ilizavo: Estudo experimental em cães”***.

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,

Observação:
Projeto previamente aprovado pelo comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal Rural de Pernambuco.


 Profa. Maria Teresa Jansen
Presidente do CEEA



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINARIA

Recife, 25 de julho de 2005

PARECER

A comissão de Ética do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, é de parecer favorável à execução do projeto intitulado “Uso de plasma rico em plaquetas e células tronco autógenas no regenerado ósseo durante o alongamento ósseo pela técnica de Ilizarov: Estudo em cães”, a ser realizado pelo Doutorando Eptácio Leite Rolim Filho, sob a orientação do Prof. Dr. Jairo de Andrade Lima, Médico Adjunto do Departamento de Cirurgia, CCS – UFPE.

Os animais serão alojados durante o experimento na Clínica do Médico Veterinário Dr. Vitor Fernandes Sobrinho, localizada na Avenida 17 de agosto nº 1472, em Casa Forte – Recife-PE. Os cães irão receber cuidados pré e pós operatórios, alimentação e higiene geral, por pessoa contratada para estes fins.



Prof. Edvaldo Lopes de Almeida
Comissão de ética do departamento de Medicina Veterinária - UFRPE