

DAMARIS RIZZO OLIVEIRA

**MATRIZ ÓSSEA HOMÓLOGA DESMINERALIZADA ASSOCIADA OU NÃO À
MEDULA ÓSSEA AUTÓGENA NA UNIÃO VERTEBRAL DORSO-LATERAL
LUMBAR
EM COELHOS.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2002**

A Deus, pelo dom da vida, pelas coisas boas que permitiu que me acontecessem com este trabalho e aos meus pais que me legaram a educação e a importância de viver com humildade, dignidade e perseverança.

“Ó Deus, sois o amparo dos que em vós esperam e, sem vosso auxílio, ninguém é forte, ninguém é santo; redobrai de amor para conosco, para que, conduzido por vós, usemos de tal modo os bens que passam, que possamos abraçar os que não passam...”

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais. Pela presença e confiança, apoio e exemplo, que formou o alicerce do que sou hoje. Muito obrigada, eu amo vocês.

Aos meus irmãos Filipe e Jônatas, que são mais que família, eles são meus amigos para qualquer hora.

Ao Marcos, pelo apoio, amor, força e paciência em mim depositada nas horas difíceis de realização deste trabalho. Muito obrigada.

À minha irmã e amiga Alessandra (Lelé), muito mais que amiga é uma luz, força em minha vida. Pessoa que é parte deste trabalho e que mostrou que trabalho em equipe faz a diferença. A minha eterna amizade e desejo de toda a felicidade deste mundo!!!

Ao professor Ricardo que me ensinou e mostrou como ser forte durante esta caminhada e mais que isso, deu liberdade para crescer na área que acreditei. Com certeza, continuará a me ensinar ainda mais. Muito obrigada professor.

Ao meu amigo e anjo-da-guarda Marcelo. Sua amizade está comigo onde estiver.

Ao Fabrício, pessoa excepcional e profissional competente. Muito obrigada pela ajuda (essencial) na realização deste trabalho e pela sua amizade.

À equipe e também amigas: Betânia, Katalia, Paloma e Camila que participaram com tamanha eficiência, além de trazer sempre muito bom humor o que, com certeza deu um toque especial ao “nosso trabalho”. Não me esquecerei de vocês.

Ao professor Rubens, por ensinar, guiar com tanta paciência e dedicação. Professor, sua orientação foi essencial e indispensável para a realização deste trabalho, com certeza é um exemplo profissional a ser inspirado.

À professora Marlene, por dispor de seu tempo e conhecimento para auxiliar na realização do presente trabalho.

Ao Adão, pela ajuda no laboratório e bom humor sempre presente.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1.0 – INTRODUÇÃO GERAL.....	01
2.0 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	09
3.0 – MATRIZ ÓSSEA HOMÓLOGA DESMINERALIZADA NA UNIÃO VERTEBRAL DORSOLATERAL LOMBAR EM COELHOS.....	13
Resumo.....	13
Abstract.....	14
Introdução.....	15
Material e Método.....	16
Resultados.....	20
Discussão.....	22
Conclusões.....	26
Referências Bibliográficas.....	27
4.0 – MATRIZ ÓSSEA HOMÓLOGA DESMINERALIZADA ASSOCIADA À MEDULA ÓSSEA AUTÓGENA FRESCA NA UNIÃO VERTEBRAL DORSOLATERAL LOMBAR EM COELHOS.....	36
Resumo.....	36
Abstract.....	37
Introdução.....	38

Material e Método.....	39
Resultados.....	43
Discussão.....	45
Conclusões.....	49
Referências Bibliográficas.....	50
5.0 – CONCLUSÕES GERAIS.....	60

RESUMO

OLIVEIRA, Damaris Rizzo, MS. Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2002.
Matriz óssea homóloga desmineralizada associada ou não à medula óssea autógena na união vertebral dorso-lateral lombar em coelhos. Orientador: Prof. Ricardo Junqueira Del Carlo. Conselheiros: Prof. Luiz Gonzaga Pompermayer e Marlene Isabel Vargas Vilorio.

O presente estudo objetivou avaliar o uso da matriz óssea desmineralizada (MOD) isoladamente ou associada à medula óssea (MO), como agente de união vertebral dorsolateral lombar, em 48 coelhos da raça Nova Zelândia Branca. Vinte e quatro animais receberam a MOD sobre os processos transversos de L₅-L₆, previamente descortificados. Outros vinte e quatro constituíram o grupo que recebeu a MOD associada à MO na mesma localização e, em nove coelhos, grupo controle, foi realizado apenas a descortificação destes processos transversos. Oito animais de ambos os grupos tratados e três do grupo controle foram sacrificados às 5, 7 e 9 semanas após a cirurgia e submetidos a avaliações radiográfica, histológica e por palpação manual. O teste de resistência biomecânica foi realizado somente nos dois primeiros grupos. No grupo controle, nas diferentes avaliações, foi observado insignificante reação periosteal local. Dentre os que receberam somente a MOD, às 5 semanas, 37,5% dos animais apresentaram união à palpação, que estava presente em 50% nas semanas seguintes. As análises radiográficas demonstraram índice de união de 25% às 5 semanas, seguido por um índice de 100% de não-união às 7 semanas e 33,3% de união às 9 semanas. A avaliação histológica demonstrou predominantemente a fragmentação seguida pela reabsorção da MOD sendo esta substituída em quase sua

totalidade por tecido conjuntivo fibroso. A formação óssea endocondral se deu a partir dos processos transversos descortificados. As evidências histológicas demonstraram que a MOD comportou-se como agente osteocondutor, com ação osteoindutora apenas na interface dos processos transversos com a MOD. O teste biomecânico demonstrou diferença significativa ($p < 0,05$), referente à força e resistência, entre os segmentos operados e os adjacentes. Com os resultados foi possível concluir que a matriz óssea homóloga desmineralizada serviu como arcabouço para a formação óssea. Contudo, o baixo índice de união tornou-a ineficaz na formação de uma união vertebral dorsolateral lombar estável. No grupo que recebeu a MOD associada à MO, às 5 semanas, 87,5% dos animais apresentaram união à palpação, seguido por 75 e 100 % às 7 e 9 semanas. As análises radiográficas demonstraram índice de união de 50% às 5 semanas, 62 % às 7 semanas e 75 % de união às 9 semanas. Na avaliação histológica, às 5 semanas havia características de osteointegração da MOD com o processos transversos, a matriz sendo penetrada por vasos sanguíneos e tecido cartilaginoso no centro do enxerto. Nas semanas seguintes a MOD foi sendo fragmentada e substituída por tecido cartilaginoso seguido por ossificação endocondral, que continuou a evoluir, sendo a MOD substituída em quase sua totalidade por tecido ósseo trabecular, formando uma ponte de osso maduro entre os processos transversos adjacentes. O teste biomecânico demonstrou diferença significativa ($p < 0,05$), referente à força e resistência, entre os segmentos operados e os adjacentes. Os resultados demonstraram que a matriz óssea homóloga desmineralizada associada à medula óssea autógena fresca determinou um tecido ósseo de união homogêneo em toda sua extensão, cuja vascularização originou-se nos processos transversos decortificados e na interface osso/enxerto a ossificação endocondral gradativamente substituiu a matriz. Além da ação osteoindutora sobre as células tronco, a matriz foi responsável pela deposição óssea de forma organizada e restrita ao ambiente, atuando como arcabouço osteocondutor.

Os trabalhos apresentados como parte integrante desta tese estão seguindo as normas da Revista Brasileira de Ortopedia, órgão de publicação científica da Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia, que é uma publicação indexada ao Index Medicus Latino Americano (IMLA), Excepta Medica e Biologent Abstract. IBICT: 0102-3616.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Damaris Rizzo, MS. Universidade Federal de Viçosa, december, 2002.
Homologous demineralized bone matrix associated or not to autologous bone marrow in a rabbit dorsolateral lumbar vertebral union. Adviser: Prof. Ricardo Junqueira Del Carlo. Committee members: Prof. Luiz Gonzaga Pompermayer and Marlene Isabel Vargas Vilorio.

The present study evaluated the behavior of demineralized bone matrix (DBM) associated or not to autogenous bone marrow in the dorsolateral lumbar vertebral fusion in forty-eight New Zealand white rabbits. Twenty-four animals (group 1) received the DBM over the previously decorticated L₅-L₆ transverses processes. Others twenty-four animals (group 2) received the association of DBM to autogenous bone marrow at the same site and nine rabbits, control group, only the decortication of the transverses processes was made. Eight animals from both treated groups and three animals from control group were killed at 5, 7 and 9 weeks after surgery and underwent to radiographic, microscopic, manual palpation. Only the treated groups were submitted to biomechanical evaluations. In the control group, in all evaluations made, it was observed only a minimum periosteal reaction without union. Among those who received only the DBM, at 5 weeks, the union rate on manual palpation was 37,5 %, followed by 50 % at next weeks. The radiographics analysis demonstrated a union rate of 25 % at 5 weeks; 100 % of nonunion, at 7 weeks and 33,3 % of union at 9 weeks. Microscopic evaluation, at 5 weeks, showed predominantly the fragmentation followed by DBM reabsorption that was substituted almost entirely by fibrous connective tissue. In the cases where the union was observed, the endocondral

ossification originated from decorticated transverses processes. Microscopic evidences demonstrated that DBM was osteoconductive but it was osteoconductive only in the interface transverse processes/DBM. The biomechanical test showed a significant difference ($p < 0,05$) referred to force and resistance between the operated and adjacent segments. The presented results allowed concluding that the DBM acts as a scaffold to bone formation. Although its osteoconductive action, the low union rate made the DBM ineffective in the dorsolateral lumbar vertebral union. In the group who received DBM associated to bone marrow, at 5 weeks, the union rate on manual palpation was 87,5 %, followed by 75 and 100 % at 7 and 9 weeks, respectively. The radiographics analysis demonstrated a fusion rate of 50 % at 5 weeks; 62 %, at 7 weeks and 75 % at 9 weeks. Microscopic evaluation, at 5 weeks, showed incorporation between DBM and the transverses processes, site where the majority of the blood vessels came from toward the graft. It was observed the presence of cartilaginous tissue in the graft center. In the follows weeks the endochondral ossification continues and the DBM was almost entirely substituted by trabecular bone tissue, forming a mature bone bridge between and over the adjacent transverses processes. The biomechanical test showed a significant difference ($p < 0,05$) referred to force and resistance between the operated and adjacent segments. The results demonstrated the formation of a homogeneous fusion mass in all graft extension. The vascularization came from the decorticated transverses processes and, the interface bone/graft endochondral ossification gradually substituted the matrix. Besides the osteoinductive actions over the stem cells, the matrix is responsible from the organized and restricted bone deposition to local environment, acting as osteoconductive scaffold. The results permitted to conclude that the association of these compounds may be used with success as a promoter agent of posterolateral lumbar spinal fusion.

1.0 – INTRODUÇÃO GERAL

A união (artrodese) lombar é um procedimento cirúrgico que objetiva tratar condições traumáticas e de deformidade que acometem a coluna vertebral e que determinam sintomatologia dolorosa na região dorsal e membros pélvicos, tais como espondilolistesia, escoliose, estenose, hérnias e doenças degenerativas do disco intervertebral e fraturas. Este procedimento é recomendado quando medicamentos e programas de fisioterapia, que incluem alongamento, força e condicionamento aeróbico não são suficientes para aliviar a dor ^(1,2).

A dor pode ser originada devido a diferentes níveis de subluxação vertebral com conseqüente desalinhamento da coluna ou onde há lesão dos discos intervertebrais ou articulações, determinando irritação ou compressão de raízes nervosas nesses locais ^(3,4).

A união vertebral consiste na formação de uma ponte óssea sólida, criada por procedimento cirúrgico, que une as vértebras acometidas, mantendo o alinhamento e promovendo estabilidade e resistência à forças deformantes resultantes da mobilidade da coluna vertebral, eliminando a sensação dolorosa ⁽⁵⁾.

Quando são referidos quais discos estão acometidos, podem ser utilizados os termos “níveis envolvidos”. Uma união vertebral lombar em um nível une dois ossos vertebrais adjacentes, um a cada lado do disco intervertebral em questão. Uma união vertebral lombar em dois níveis une três ossos vertebrais com envolvimento de dois discos ⁽⁵⁾.

O sucesso das cirurgias na coluna vertebral depende da restauração da estabilidade destas vértebras em longo prazo. Porém, diversas técnicas de fixação interna utilizadas isoladamente fornecem estabilidade temporária, e não permanente, da região envolvida ^(3,6).

A união vertebral dorsolateral lombar consiste no método padrão para união lombar e é também denominada de união bilateral-lombar, massa de união lateral ou ainda fusão dos processos transversos ou fusão espinhal intertransversa ⁽⁷⁾. Este procedimento pode ser obtido por meio da deposição de autoenxerto ósseo na superfície previamente descortificada dos processos transversos vertebrais, sendo considerado por muitos cirurgiões um método de tentativa e erro ⁽⁸⁾.

Na união vertebral dorsolateral lombar, o acesso cirúrgico à coluna vertebral se dá através de incisão na linha média dorsal e o enxerto ósseo, geralmente originário da crista ilíaca, é obtido pela mesma incisão de pele⁽⁹⁾ e depositado na porção dorsolateral da coluna, que é bastante vascularizada, favorecendo o crescimento ósseo⁽⁶⁾.

Os grandes músculos lombares que ancoram nos processos transversos e que são afastados para criar um leito de enxertia precisam ser reposicionados de forma a criar tensão e manter o enxerto no local. O pico de união é alcançado, na maioria dos casos, aos três meses após a cirurgia e continua por um a dois anos e uma vez sólido é pouco provável que o osso formado a partir do enxerto, frature^(4,7).

De acordo com Kanayama⁽¹⁰⁾ um dos fatores que comprometem o sucesso da união vertebral é a movimentação excessiva dos segmentos operados. Por esta razão a instrumentação (utilização de placas, parafusos e outros) é utilizada para aumentar a rigidez em questão. Um estudo avaliando a biologia e biomecânica da união vertebral posterolateral lombar em coelhos sugere que procedimentos com fixações rígidas promovem uma maior união⁽¹⁾. Clinicamente, está documentado que a taxa de união na artrodese dorsolateral é aumentada com a utilização de parafusos quando comparada a segmentos que não receberam instrumentação^(1,10-13).

Segundo Martin⁽¹⁴⁾, a dor recorrente é citada em pacientes humanos após um procedimento cirúrgico de sucesso e, provavelmente, está relacionada à transferência da lesão ao segmento móvel adjacente ao sítio de união, conseqüente ao estresse mecânico no próximo nível, determinando alterações degenerativas⁽¹⁴⁾.

Para Bassewitz et al.⁽¹⁵⁾ o risco de insucesso mais comum relacionado à união vertebral, independente da técnica utilizada, é a persistência dos sintomas dolorosos, alcançando um índice de 20 % em pacientes humanos. Outras situações participam com baixa freqüência, contando com aproximadamente 1 a 3 % e estão relacionadas com infecção, sangramento e complicações anestésicas.

Apesar da artrodese se mostrar efetiva no alívio da dor, a ausência de união sólida (não-união) e conseqüentemente a necessidade de novo procedimento cirúrgico permanece uma complicação relevante^(2,14,16). Em pacientes humanos, a não-união, que pode variar entre 10 a 50%, resulta em perda da qualidade de vida e freqüentemente requer nova cirurgia^(2,8).

Para Cook et al. ⁽⁸⁾ o índice de não-união varia entre 10 e 40% e aumenta naqueles pacientes que já foram submetidos a procedimentos similares; em fumantes, pois a nicotina diminui o índice de fusão espinhal ⁽¹⁷⁻¹⁹⁾; obesos e naqueles que necessitam de múltiplas uniões ou foram submetidos à radioterapia para o tratamento de neoplasias. Fatores relacionados ao enxerto (fonte, tipo, quantidade, técnica de descortificação) e fatores biomecânicos locais (instabilidade, compressão e tensão) também podem interferir no índice de não-união ^(9,10).

O autoenxerto com a crista ilíaca consiste no método padrão de união vertebral dorsolateral lombar e o índice de sucesso da união estará comprometido quando a quantidade de material coletado não for suficiente para cobrir adequadamente o leito receptor ^(2,16).

Uma união óssea sólida pode ser alcançada por meio de enxerto ósseo autógeno ou alógeno e cada qual apresenta suas vantagens e desvantagens ⁽³⁾. A compreensão da biologia básica e princípios fisiológicos do transplante ósseo e sua reparação acrescentarão ao cirurgião a capacidade de optar por técnicas mais eficazes ⁽⁷⁾.

Um enxerto ósseo com o propósito de determinar artrodese vertebral é afetado por princípios anatômicos, histológicos e biomecânicos. Além disso, propriedades do enxerto ósseo como a osteogênese, osteoindução e osteocondução determinam, diretamente, o sucesso ou a falha de sua incorporação ^(3,7).

Osteogênese consiste na habilidade do enxerto produzir osso ^(3,20,21) e depende exclusivamente da presença de células ósseas vivas no material. Um enxerto osteogênico apresenta, portanto, células da linhagem óssea ou células capazes de se diferenciarem em células osteoprogenitoras, as chamadas “células tronco”. A osteogênese é uma propriedade encontrada somente em enxerto ósseo autógeno fresco e em células da medula óssea, apesar de alguns autores afirmarem que somente pequena quantidade destas células sobrevivem à transplantação ⁽²²⁾.

Osteocondução é uma propriedade física do enxerto, que torna-se arcabouço para a formação de osso novo ⁽⁷⁾. Ela permite a adesão, migração, distribuição e infiltração de células osteogênicas assim como vasos sanguíneos dentro do material ⁽³⁾. É encontrada no auto e aloenxerto ósseos, na matriz óssea desmineralizada, na hidroxiapatita e fosfato de

cálcio, sendo que o potencial osteocondutor é influenciado pelas características físicas de cada material, como porosidade, tamanho dos poros e arquitetura tridimensional ^(3,7).

Osteoindução é a capacidade do enxerto induzir a multiplicação e diferenciação de células tronco em células da linhagem óssea ^(3,7). Esta está associada à presença de fatores de crescimento ósseo no enxerto e proteínas morfogenéticas ósseas. Em pequena escala, auto e aloenxerto ósseos também apresentam propriedades osteoindutoras ^(3,22).

Um enxerto ósseo ideal para ser utilizado na união vertebral precisa possuir como características: osteoindução e osteocondução; promover estabilidade biomecânica; estar livre de doenças e possuir mínimos fatores antigênicos ⁽⁷⁾. Estas características estão todas presentes no autoenxerto ósseo que é considerado o padrão com o qual outros materiais são comparados ^(3,22), e suas desvantagens incluem a necessidade de uma outra incisão para coleta do material, aumento do período trans-operatório e perda sanguínea, risco de complicações no sítio doador como dor e infecção e freqüentemente, obtenção de insuficiente quantidade de osso ^(7,14).

O osso é um tecido biológico dinâmico e seu potencial de reparação, independentemente se em uma fratura ou em modelo de união vertebral, é influenciado por mecanismos bioquímico, biomecânico, celular, hormonal e patológico⁽⁷⁾. Portanto, o sucesso de um enxerto ósseo para fusão espinhal também dependerá de fatores locais como a vascularidade do sítio de fusão, além da estabilidade e movimentação do segmento ^(1,23).

O aloenxerto evita a morbidade relacionada ao sítio doador e suas conseqüências, além de estar disponível na configuração e quantidade desejadas ⁽⁷⁾. Esse é significativamente menos osteogênico, agindo como um arcabouço passivo para o crescimento vascular e deposição óssea ⁽³⁾. As desvantagens do aloenxerto incluem a penetração vascular retardada, lenta formação óssea, reabsorção acelerada e incorporação tardia ou incompleta. De uma forma geral, o aloenxerto ósseo apresenta uma alta incidência de não-união ou união tardia em relação ao autoenxerto ⁽⁷⁾.

A medula óssea é constituída por células primordiais, indiferenciadas, denominadas “*Stem cells*” ou “células tronco” ⁽²⁴⁾. Estas células possuem grande capacidade de auto-renovação, baixa taxa de crescimento e potencial para se diferenciarem em várias linhagens celulares ^(21,25,26).

A propriedade osteogênica da medula óssea autógena fresca se deve à presença de células primitivas indiferenciadas conhecidas como “células tronco” ⁽²⁷⁾. Estas células possuem a capacidade de se proliferarem e se diferenciarem em células que substituirão as perdidas por senilidade, migração ou lesão. Virtualmente cada sistema possui algum tipo de célula tronco funcional. Apesar de não serem distinguíveis morfológicamente existe o grupo de células tronco hematopoiéticas que são células precursoras comprometidas em se diferenciar em células da linhagem sanguínea (linfócitos, eritrócitos, megacariócitos, granulócitos e monócitos) e as células tronco estromais, células mesenquimais pluripotentes, precursoras comprometidas em se diferenciarem em células de linhagem celular cartilaginosa, óssea e ainda fibroblástica (fibroblastos, células endoteliais, células reticulares e outras) ^(28,29). Portanto, o potencial osteogênico da medula óssea se deve às suas células osteoprogenitoras do estroma ⁽²⁷⁾.

A coleta da medula óssea autóloga fresca da crista ilíaca possui relativo baixo custo, é simples e o mecanismo pelo qual produz osso se dá através da proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras contidas na cavidade medular. Porém, apenas 0,001% das células nucleadas presentes na medula óssea normal são células mesenquimais indiferenciadas, tornando muitas vezes difícil implantar uma quantidade suficiente de células tronco para que se alcance resultados clínicos satisfatórios. Além disso, em pacientes muito idosos ou debilitados o número destas células reduz-se consideravelmente tornando o procedimento ineficaz ⁽³⁾.

Em enxertos com medula óssea fresca, as células tronco hemocitopoiéticas morrem rapidamente após a coleta e há um supercrescimento de fibroblastos. Estes fibroblastos também são originados da célula tronco estromal, porém apresentam a capacidade de se desdiferenciar e ainda se multiplicarem e rediferenciar em células formadoras de osso ⁽²⁹⁾.

A utilização da medula óssea autógena fresca associada a aloenxerto melhora a osteogênese deste ^(29,30-33). Em pacientes e situações clínicas selecionadas o aspirado de medula óssea pode incrementar o potencial osteoindutor do enxerto e em combinação com fatores de crescimento pode tornar-se uma opção atrativa de tratamento ⁽³⁾.

Poucos estudos foram realizados no intuito de avaliar a utilização da medula óssea na união vertebral. Curylo et al ⁽²⁾ e Frenkel et al. ⁽³⁴⁾ demonstraram que a adição de medula

óssea autógena fresca pode aumentar a quantidade de osso formado e conseqüentemente o sucesso da união.

Em 1965, Urist ⁽³⁵⁾ demonstrou que o implante de matriz óssea desmineralizada (MOD) na musculatura determina formação óssea através de mecanismos indutores. E Oikarinen ⁽³⁶⁾ em um estudo de união vertebral em coelhos obteve resultados que indicam que a matriz óssea descalcificada representa um melhor substituto para o autoenxerto ósseo quando comparado ao aloenxerto de osso cortical congelado.

A presença de proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) na matriz óssea desmineralizada indica seu potencial osteoindutor e o propósito da desmineralização do osso alogênico é disponibilizar uma maior quantidade de BMP ⁽⁸⁾.

A matriz óssea desmineralizada não apresenta atividade antigênica, o que constituiu uma vantagem sobre o aloenxerto ósseo preservado, que apresenta um baixo potencial osteogênico, alta taxa de reabsorção, pouca revascularização, além de estar acompanhado de atividade antigênica ⁽³⁷⁾.

A indução óssea produzida pela matriz óssea desmineralizada consiste em uma cascata múltipla de eventos. As principais fases de osteoindução são: quimiotaxia de células pluripotentes indiferenciadas, mitose e diferenciação. Quimiotaxia pode ser definida como a migração de células em resposta a um gradiente químico. A função quimiotática das BMPs presentes na matriz óssea desmineralizada é bem conhecida e documentada ⁽³⁸⁻⁴⁰⁾. A próxima fase de importância na indução óssea é a mitose, proliferação de células mesenquimais indiferenciadas que agora estão aderidas ao enxerto. A fase mitótica é seguida pela diferenciação destas células em células cartilaginosas e invasão de vasos sanguíneos. Com a invasão de capilares, ocorre a hipertrofia dos condrócitos e então os primeiros sinais de formação mineral na matriz. Ao mesmo tempo, osteoblastos com intensa basofilia aparecem perto do endotélio vascular, e osso novo é formado por crescimento aposicional sobre a superfície da matriz calcificada. Osteoclastos iniciam a remodelação óssea do osso recém formado. Este processo é seguido por uma nova remodelação onde o osso é então preenchido pela medula óssea, com seus constituintes ⁽⁴¹⁾.

Nem todos os resultados em defeitos segmentares demonstraram favoravelmente o potencial osteoindutor da MOD ⁽⁸⁾, sendo as principais limitações das preparações da MOD

os métodos de processamento subótimos, potencial de contaminação com agentes infecciosos e variabilidade individual em relação ao potencial osteoindutor ⁽³⁾.

Oikarinen et al. ⁽³⁶⁾ demonstraram que a MOD pode ser utilizada com sucesso na união vertebral em coelhos. Outro experimento analisando a MOD heteróloga na indução da união dorsolateral vertebral lombar em ratos demonstrou desenvolvimento de calo ósseo similar e de mesmo tempo de formação, quando comparado com a utilização de enxerto ósseo autólogo ⁽⁴²⁾. Em 1993, Frenkel et al. ⁽³⁴⁾, demonstraram em um estudo em cães, que uma significativa menor quantidade de autoenxerto ósseo autógeno seria necessária quando associada a matriz óssea desmineralizada em forma de gel para a união vertebral. Apesar do entusiasmo inicial destas pesquisas, estudos clínicos nos quais investigadores avaliaram o uso da MOD na união vertebral apresentaram resultados amplamente desapontadores ^(8,43,44).

An et al. ⁽⁴³⁾ realizaram um estudo prospectivo e aleatório comparando o osso autólogo sozinho e a MOD com o osso alogênico congelado na união vertebral cervical anterior. Os autores demonstraram que o índice de pseudoartrose foi significativamente menor no grupo do autoenxerto (26%) comparado com a MOD (46%). Além disso, Jorgenson et al. ⁽⁴⁴⁾ demonstraram que quando a MOD foi comparada com o osso autólogo na união dorsolateral vertebral lombar, o enxerto de MOD foi inferior ao osso autólogo com baixo índice de união sólida e densidade óssea, demonstradas radiograficamente.

Em um estudo em cães, os resultados indicaram que a matriz óssea desmineralizada sozinha ou em combinação com aloenxerto foi ineficaz em determinar união vertebral dorsolateral lombar estável ⁽⁸⁾.

Por outro lado, estudos retrospectivos demonstraram radiograficamente que sítios com união vertebral dorsolateral lombar tratados apenas com enxerto ósseo de osso autólogo (54 casos) ou associado a MOD (36 casos) apresentaram características similares ao final de 12 meses, apesar do índice de união não ter sido determinado ⁽⁴⁵⁾.

A utilização de enxerto composto de osso alogênico ou autógeno com medula óssea autógena fresca tem sido recomendada para a reparação de defeito ósseo. Estes tipos de enxerto são mais bem sucedidos em induzir a formação óssea quando comparado com a utilização dos componentes isoladamente ⁽³²⁾.

Estudos indicaram que constituintes da matriz óssea desmineralizada exercem um efeito estimulatório na formação, acelerando a osteogênese. Esta estimulação osteogênica estaria ligada a influência de fatores osteoindutores sobre as células da medula óssea ^(29,32).

A MOD apresenta uma aplicação clínica limitada devido à variabilidade em sua propriedade osteocondutora e osteoindutora ⁽⁴⁶⁾, que pode ser incrementada pela adição de células mesenquimais que são capazes de produzir osso diretamente ⁽³⁾. Devido ao fato de diversos arcabouços osteocondutores também apresentarem a habilidade de se ligarem e fornecerem moléculas bioativas (BMPs), como o caso da MOD, a presença de células osteoprogenitoras no local, sem necessidade de recrutamento prévio, aumenta o potencial osteoindutor deste material ⁽³⁾. Curylo et al., ⁽²⁾ demonstraram que em casos onde a quantidade de autoenxerto ósseo for inadequada, a adição de medula óssea autógena fresca pode aumentar a formação óssea e conseqüentemente o sucesso de união.

Os trabalhos apresentados como parte integrante desta tese estão seguindo as normas da Revista Brasileira de Ortopedia, órgão de publicação científica da Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia, que é uma publicação indexada ao Index Medicus Latino Americano (IMLA), Excerpta Medica e Biologent Abstracts. IBICT: 0102-3616.

2.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Feighan J.E., Stevenson S., Emery S.E.: Biologic and Biomechanic Evaluation of Posterior Lumbar Fusion in the Rabbit – The Effect of Fixation Rigidity. *Spine*. 20: 1561-1567, 1995.
2. Curylo L.J., Johnstone B., Petersilge C. A., et al.: Augumentation of Spinal Arthrodesis With Autologous Bone Marrow in a Rabbit Posterolateral Spine Fusion Model. *Spine*. 24: 434-449, 1999.
3. Helm G. A., Dayoub H., Jane J.: A Bone graft substitutes for the promotion of spinal arthrodesis. *Neurosurg. Focus*. 10: 1-5, 2001.
4. Barrick W. T., Schofferman J. A., Reynolds J. B.; et al: Anterior lumbar fusion improves discogenic pain of prior posterolateral fusion. *Spine*. 25: 853-857, 2000.
5. Wang J. C., Zou D., Yuan H., et al: A biomechanical evaluation of graft loading characteristics for anterior cervical discectomy and fusion. A comparison of tradicional and reverse grafting techniques. *Spine*. 23: 2450-2454, 1998.
6. Kalfas I. H.: Principles of bone healing. *Neurosurg. Focus*. 10: 1-4, 2001.
7. Satuffer R. N., Coventry M. B.: Posterolateral Lumbar-Spine Fusion. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 6: 54-A, 1972.
8. Cook S. D., Dalton J. E., Prewett A. B., et al.: *In Vivo* Evaluation of Demineralized Bone Matrix as a Bone Graft Substiute for Posterior Spinal Fusion. *Spine*. 20: 877-886, 1995.
9. Boden S. D., Schimandle J. H., Hutton W. C.: An Experimental Lumbar Intertransverse Process Spinal Fusion Model. Radiographic, Histologic, and Biomechanical Healing Characteristics. *Spine*. 20: 412-423, 1995.
10. Kanayama M., Cunnigham B. W., Sefter J. C., et al.: Does Spinal Instrumentation Influence the Healing Process of Posterolateral Spinal Fusion? An *In Vivo* Animal Model. *Spine*. 24: 1058-1065, 1999.
11. Bridwell K. W., Sedgewick T.A., O'Brien M. F., et al.: The role of fusion and instrumentation in the treatment of degenerative sapondyololisthesis with spinal stenosis. *J Spinal Disord*. 6: 461-472, 1995.
12. Schwab F. J., Nazarian D. G., Mahmud F., et al.: Effects of spinal instrumentation on fusion of the lumbarsacral spine. *Spine*. 20: 2023-2028, 1995.

13. Wood G. W., Body R. J., Carothers T. A., et al.: The effects of pedicle screw/plate fixation on lumbar/lumbosacral autologous bone graft fusions in patients with degenerative disc disease. *Spine*. 20: 819-830, 1995.
14. Martin G. J., Boden S. D., Titus L., et al.: New Formulation of Demineralized Bone Matrix as a More Effective Graft Alternative in Experimental Posterolateral Lumbar Spine Arthrodesis. *Spine*. 24: 637-645, 1999.
15. Bassewitz H. L., Fischgrund J. S., Herkowitz H. N.: Postoperative Spine Infections. *Seminars in Spine Surgery*. 12: 203-211, 2000.
16. Schimandle J. H., Boden S. D., Hutton W. C.: Experimental Spinal Fusion With Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2. *Spine*. 20: 1326-1337, 1995.
17. Silcox D. H., Daftari T., Boden S. D., et al.: The Effect of Nicotine on Spinal Fusion. *Spine*. 20: 1549-1553, 1995.
18. Riebel G. D., Boden S. D., Whitesides T. E., et al.: The effect of Nicotine on Incorporation of Cancellous Bone Graft in an Animal Model. *Spine*. 20: 2198-2202, 1995.
19. Silcox D. H., Boden S. D., Schimandle J. H., et al.: Reversing the Inhibitory Effect of Nicotine on Spinal Fusion Using an Osteoinductive Protein Extract. *Spine*. 23: 291-297, 1998.
20. Barros S. V. S. G., Del Carlo R. J., Vitoria M. I., et al.: Auto-enxerto percutâneo de medula óssea em coelhos. I. Coleta, preparo e aplicação. *Ciência Rural*. 23: 1013-1018, 2001.
21. Barros S. V. S. G., Del Carlo R. J., Vitoria M. I., et al.: Auto-enxerto percutâneo de medula óssea em coelhos. II. Reparação de Falhas Segmentares Produzidas no Rádio de Coelhos. *Ciência Rural*. 31:627-632, 2001.
22. Lane J. M., Tomin E., Bostrom M. P.: Biosynthetic bone grafting. *Clin. Orthop*. 367 Suppl: S107-117, 1999.
23. Wilson J. W., Rhineland F. W., Stewart C. L.: Vascularization of cancellous chip bone grafts. *Am. J. Vet.* 46: 1691-1699, 1985.
24. Burwell R. G.: The Function of Bone Marrow in the Incorporation of a Bone Graft. *Clin Orthop*. 200: 125-141, 1985.
25. Owen M.: The Origin of Bone Cells in the Postnatal Organism. *Arthritis Rheum.* 23: 1073-1077, 1980.

26. Connolly J. F., Guse R., Tiedeman J., et al.: Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunions. *Clin Orthop.* 266: 259-270, 1991.
27. Ashton B. A., Allen T. D., Howlett C. R., et al.: Formation of Bone and Cartilage by Marrow Stromal Cells in diffusion chambers *in vivo*. *Clin Orthop.* 151: 294-307, 1980.
28. Lindholm T. S., Urist M. R.: A Quantitative Analysis of New Bone Formation by Induction in Compositive Grafts of Bone Marrow and Bone Matrix. *Clinical Orthopedics and related Research.* 150: 288-300, 1980.
29. Wittbjer J., Palmer B., Rohlin M., et al.: Osteogenetic Activity in Composite Grafts of Demineralized Compact Bone and Marrow. *Clinical Orthopedics and Related Research.* 173: 229-238, 1983.
30. Takagi K., Garg N. K., Veliath A. J., et al.: The role of bone marrow in bone morphogenetic protein-induced repair of femoral massive diaphyseal defects. *Clin Orthop.* 171: 224-231, 1982.
31. Boden S. D.: Biology of lumbar spine fusion and use of bone graft substitutes: present, future, and next generation. *Spine.* 6: 383-399, 2000.
32. Green E., Hinton C., Triffitt J.: The Effect of Decalcified Bone Matrix on the Osteogenic Potential of Bone Marrow. *Clin Orthop and Related Research.* 205: 292-298, 1984.
33. Tiedeman, J. J., Garvin, K. L., Kile, T. A., et al.: The role of a composite, demineralized bone matrix and bone marrow in the treatment of osseous defects. *Orthopedics.* 18: 1153-1158, 1995.
34. Frenkel S. R., Moskovich R., Spivak J., et al.: Demineralized Bone Matrix. *Spine.* 18: 1634-1639, 1993.
35. Urist M. R.: Bone: Formation by autoinduction. *Science.* 150: 893, 1965.
36. Oikarinen J.: Experimental spinal fusion with decalcified bone matrix and deep-frozen allogenic bone in rabbits. *Clin Orthop.* 162: 210-218, 1982.
37. Damien C. J., Parsons J. R.: Bone graft and bone graft substitutes. A review of current technology and application. *Journal of Applied Biomaterials.* 2:187-208, 1991.
38. Pajamäki K. J. J., Viljanen V. V.: Demineralized Bone Matrix Inductive Graft. *Bone Morphogenetic Proteins: Biology, Biochemistry and Reconstructive Surgery.* Chapter 18: 201-205. Ed.: T. Sam Lindholm. R. G. Landes Company, 1996.

39. Ragni P. C., Lindholm T. S.: Bone formation and static changes in the thoracic spine at uni- or bilateral experimental spondylodesis with demineralized bone matrix. *Italian J. Orthop. And Traumatol.* 15: 237-252, 1989.
40. Lindholm T. S., Nilsson O. S., Lindholm T. C.: Extraskkeletal and Intraskkeletal New Bone Formation Induced by Demineralized Bone Matrix Combined with Bone Marrow Cells. *Clin Orthop and Related Research.* 171: 251-255, 1982.
41. Reddi A., H., Wientroub S., Muthukumaran N.: *Biologic Principles of Bone Induction.* Orthopedic Clinics of North America. 18: p. 207-212, 1987.
42. Guizzard S., Silvestre M. D., Scandroglio R., et al.: Implants of Heterologous Demineralized Bone Matrix for Induction of Posterior Spinal Fusion in Rats. *Spine.* 17: 701-707, 1992.
43. An H. S., Simpson J. M., Glover J. M., Stephany J.: Comparison between allograft plus demineralized bone matrix versus autograft in anterior cervical fusion. A prospective multicenter study. *Spine.* 20: 2211-2216, 1995.
44. Jorgenson S. S., Lowe T. G., France J.: A prospective analysis of autograft versus allograft in posterolateral lumbar fusion in the same patient. A minimum of 1-year follow-up in 144 patients. *Spine.* 19: 2048-2053, 1994.
45. Russell J. L., Block J. E.: Clinical utility of demineralized bone matrix for osseous defects, arthrodesis, and reconstruction: impact of processing techniques and study methodology. *Orthopedics.* 22: 524-533, 1999.
46. Maddox E., Zhan M., Mundy G. R., et al.: Optimizing human demineralized bone matrix for clinical application. *Tissue Eng.* 6: 441-448, 2000.

3.0 - MATRIZ ÓSSEA HOMÓLOGA DESMINERALIZADA NA UNIÃO VERTEBRAL DORSOLATERAL LOMBAR EM COELHOS

RESUMO

Foi avaliada a atuação da matriz óssea homóloga desmineralizada (MOD) na união dorsolateral lombar em 24 coelhos da raça Nova Zelândia Branco (grupo 1), aplicada sobre os processos transversos de L₅-L₆, após sua descortificação. Em outros nove coelhos, grupo controle (grupo 2), foi realizada apenas a descortificação dos processos transversos. Oito animais do grupo 1 e três do grupo 2 foram sacrificados às 5, 7 e 9 semanas após a cirurgia e submetidos a avaliações radiográfica, histológica, por palpação. Os animais do grupo 1 foram submetidos também ao teste biomecânico. No grupo 1, às 5 semanas, 37,5% dos animais apresentaram união à palpação, que estava presente em 50% nas semanas seguintes. As análises radiográficas demonstraram índice de união de 25% às 5 semanas, seguido por um índice de 100% de não-união às 7 semanas e 33,4% de união às 9 semanas. A avaliação histológica demonstrou predominantemente a fragmentação seguida pela reabsorção da MOD sendo esta substituída em quase sua totalidade por tecido conjuntivo fibroso. Nas amostras onde houve união, a formação óssea endocondral se deu a partir dos processos transversos descortificados. No grupo 2, na avaliação radiográfica foi observada pequena reação periosteal local, não apresentando qualquer sinal de união nas demais análises. As evidências histológicas demonstraram que a MOD comportou-se como agente osteocondutor, e com ação osteoindutora apenas na interface dos processos transversos com a MOD. O teste biomecânico demonstrou diferença significativa ($p < 0,05$), referente à força e resistência, entre os segmentos operados e os adjacentes. Com os resultados foi possível concluir que a matriz óssea homóloga desmineralizada serviu como arcabouço para a formação óssea. Contudo, o baixo índice de união tornou-a ineficaz na formação de uma união vertebral dorsolateral lombar estável.

Unitermos: união vertebral, matriz óssea homóloga desmineralizada, enxerto ósseo.

ABSTRACT

HOMOLOGOUS DEMINERALIZED BONE MATRIX IN RABBIT DORSOLATERAL LUMBAR VERTEBRAL UNION.

The demineralized bone matrix (DBM) was evaluated in the posterolateral lumbar spinal fusion in twenty-four New Zealand white rabbits (group 1). This compound was deposited over L₅-L₆ transverses processes previously decorticated. In the other nine rabbits, control group (group 2), only the decortication of the transverses processes was made. Eight animals from group 1 and two animals from group 2 were killed at 5, 7 and 9 weeks after surgery and underwent to radiographic, microscopic, manual palpation and biomechanical (only group 1) evaluations. In the group 1, at 5 weeks, the fusion rate on manual palpation was 37,5 %, followed by 50 % at next weeks. The radiographics analysis demonstrated a fusion rate of 25 % at 5 weeks; 100 % of nonunion, at 7 weeks and 33,3 % of union at 9 weeks. Microscopic evaluation, at 5 weeks, showed predominantly the fragmentation followed by DBM reabsorption that was substituted almost entirely by fibrous connective tissue. In the cases where the fusion was observed, the endocondral ossification originated from decorticated transverses processes. In the group 2, the radiographics evaluations showed just a little periosteal reaction, and didn't demonstrate any sign of fusion on the other analysis. Microscopic evidences demonstrated that DBM was osteoconductive but not osteoinductive. The biomechanical test showed a significant difference ($p < 0,05$) referred to force and resistance between the operated and adjacent segments. The presented results allow concluding that the DBM acts as a scaffold to bone formation. Although its osteoconductive action, the low fusion rate makes the DBM ineffective in the posterolateral lumbar spinal fusion.

Key words: vertebral union, demineralized homologous bone matrix, bone graft.

INTRODUÇÃO

A união (artrodese) lombar objetiva tratar condições traumáticas e de deformidade que acometem a coluna vertebral e que determinam sintomatologia dolorosa na região dorsal e nos membros pélvicos ^(1,2). Apesar da união com utilização da crista ilíaca ser efetiva no alívio da dor, a não-união varia entre 10 e 50% ^(2,3) e o resultado é comprometido quando são obtidas quantidades insuficientes de osso para cobrir o leito receptor ⁽²⁾.

O conceito de materiais osteogênicos derivados de osso foi introduzido por Urist ⁽⁴⁾, que postulou que a matriz óssea contém substâncias, as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), que são expostas pela desmineralização e que induzem a diferenciação de precursores pluripotentes da linhagem osteogênica ⁽⁵⁾.

Oikarinen et al. ⁽⁶⁾ demonstraram que a matriz óssea desmineralizada (MOD) pode ser utilizada com sucesso na união vertebral em coelhos. Quando foi utilizada na indução da união dorsolateral lombar em ratos, demonstrou desenvolvimento de calo ósseo similar e de mesmo tempo de formação, que o desenvolvido a partir de enxerto ósseo autólogo ⁽⁷⁾. Ragni e Lindholm ⁽⁸⁾ confirmaram o seu potencial osteoindutor e Frenkel et al. ⁽⁹⁾ demonstraram, na união vertebral em cães, que foi necessária menor quantidade de autoenxerto ósseo quando ele foi associado à MOD.

Em cães, a MOD isolada ou em combinação com aloenxerto foi ineficaz na determinação de união vertebral dorsolateral lombar estável ⁽³⁾. Outro estudo ⁽¹⁰⁾ demonstrou radiograficamente, que sítios com fusão tratados apenas com autoenxerto ósseo ou associado a MOD apresentaram características similares ao final de 12 meses, apesar do índice de união não ter sido determinado.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso isolado da matriz óssea homóloga desmineralizada como agente de união vertebral dorsolateral lombar em coelhos.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 33 coelhos, clinicamente saudáveis, adultos jovens (8 semanas), da raça Nova Zelândia Branca, com peso médio de 3 Kg, mantidos em gaiolas individuais no Biotério do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e alimentados com ração comercial, feno e água.

Os animais foram separados aleatoriamente em dois grupos experimentais. O grupo 1 (G1) foi composto por vinte e quatro coelhos que receberam aloenxerto de matriz óssea desmineralizada sobre os processos transversos descortificados das vértebras lombares cinco e seis (L₅ e L₆) bilateralmente. O grupo 2 (G2) constituído de nove coelhos, cujos processos transversos das vértebras lombares (L₅ e L₆) foram descortificados bilateralmente, foi utilizado como controle. Oito coelhos do G1 e três coelhos do G2 foram submetidos à eutanásia às 5, 7 e 9 semanas após os procedimentos cirúrgicos.

A matriz óssea desmineralizada foi coletada a partir da diáfise de fêmur de outros coelhos da mesma raça e porte, sacrificados com sobredosagem anestésica (tiopental sódico¹). Após a remoção de todo tecido mole, com auxílio de bisturi, as diáfises foram desmineralizadas por imersão em ácido hidrocloreídrico 0,6N por 24 a 48 horas em temperatura ambiente. O ácido foi trocado a cada 24 horas e o osso foi considerado desmineralizado quando se apresentou flexível e transparente, sendo estocado em álcool 70% à temperatura ambiente⁵. No momento da cirurgia os ossos foram cortados em seu eixo longitudinal e em segmentos de aproximadamente 0,5 cm de largura por 2,0 cm de comprimento.

Cada coelho recebeu como medicação pré-anestésica acepromazina² na dose de 0,1 mg/kg por via intravenosa seguida de anestesia dissociativa com tiletamina-zolazepam³ completando com infiltrado de anestésico local⁴ na dose de 0,75 ml, no local da incisão.

¹ Thionembutal® 0,5 g, Abbott Laboratories.

² Acepram 1%, Univet S/A Indústria Veterinária.

³ Zoletil®50, Virbac.

⁴ Anestésico Bravet (Lidocaína 2%).

Antibioticoterapia foi realizada com ceftiofur sódico⁵ na dose de 5mg/Kg por via intramuscular, no período pré-operatório e 24 e 48 horas após o procedimento cirúrgico.

Os animais foram posicionados em decúbito ventral, com os membros pélvicos flexionados cranialmente. O procedimento iniciou-se com uma incisão de pele na linha média dorsal lombar, de aproximadamente 5 cm de extensão, tendo como referência os processos espinhosos de L₅ e L₆. Bilateralmente, foi realizada uma incisão na fáscia paramediana após a aplicação de 0,5 ml de lidocaína. Os músculos multífidos e longíssimos foram identificados e o plano entre eles foi divulsionado permitindo a exposição dos processos transversos de L₅ e L₆ e da membrana intertransversa. Com o auxílio de um osteótomo, a face dorsal destes processos, de ambos os lados, foi decortificada até que fosse visualizada a região óssea medular. Então, a MOD foi depositada sobre eles.

Após a realização dos procedimentos, a fáscia paramediana e o tecido subcutâneo foram suturados com fio absorvível⁶ 4-0, com padrão de sutura do tipo Reverdin e a pele aproximada com fio não absorvível⁷ 4-0, em sutura simples contínua. A analgesia pós-operatória foi obtida com morfina⁸ oral (0,4 mg/kg) a cada seis horas durante os três primeiros dias após o procedimento cirúrgico.

As avaliações radiográficas foram efetuadas em todos os animais imediatamente após o procedimento cirúrgico e à época da eutanásia, na incidência dorso-ventral. Foi analisado quanto à presença de tecido ósseo uni ou bilateralmente atribuindo-lhes escores. Os escores 0: para aqueles que apresentaram ausência de tecido ósseo bilateral; 1: para presença de tecido ósseo unilateral; 2: tecido ósseo com áreas de radioluscência bilateralmente, 3: tecido ósseo bilateral com radioluscência unilateral e, 4: tecido ósseo intertransverso bilateral sem radioluscência, único escore caracterizando fusão.

Após a eutanásia, a coluna vertebral lombar foi removida e os segmentos entre L₅ e L₆ de todos os animais foram palpados, assim com os segmentos adjacentes, proximal e distal. Foram considerados sólidos se observado firmeza à movimentação, ou não-sólido. Os níveis graduados como sólidos foram considerados união.

⁵ Excenel, Rhodia-Mérieux Veterinária Ltda.

⁶ Catgut Cromado 3-0. Cirumédica LTDA.

⁷ Nylon Monofilamento Preto 4-0. Cirumédica LTDA.

⁸ Dimorf® Solução Oral, Cristália LTDA.

A avaliação histopatológica foi realizada em doze animais do Grupo 1, quatro a cada época de eutanásia e em nove animais do Grupo 2, três a cada eutanásia. Os cortes histológicos foram corados com Hematoxilina-Eosina e Tricrômico de Masson sendo analisados quanto à presença de tecido cartilaginoso, osteóide, maturidade óssea e presença de tecido fibroso na região do enxerto e dos processos transversos das vértebras adjacentes, bilateralmente. O tecido de união sobre os espaços interlaminares e interface com os processos transversos foram os segmentos de maior interesse.

A avaliação da resistência biomecânica foi realizada entre as vértebras L₅ e L₆, em 12 animais do G1, sendo 4 animais a cada momento de eutanásia. Imediatamente antes do teste biomecânico todo o tecido muscular remanescente foi removido com auxílio de um bisturi, assim como o disco intervertebral e as facetas articulares dos processos articulares. O tecido de união e a membrana intertransversa permaneceram conectados às duas vértebras unidas.

O teste de tensão uniaxial¹ foi realizado no Laboratório de Papel e Celulose da UFV, em sala climatizada com umidade relativa do ar de 50% e temperatura de 23 °C. A leitura dos valores das forças aplicadas foi realizada com a utilização de célula de carga e a determinação das deformações foi feita através do deslocamento da barra de tracionamento do equipamento, ambos conectados através de um sistema de aquisição de dados controlados por computador, o qual permitiu o controle automatizado do sistema responsável pela coleta de dados e derivação das propriedades analisadas.

Os corpos vertebrais das vértebras L₅ e L₆ foram perfurados perpendicularmente com pinos de aço de aproximadamente 3,2 mm de diâmetro e 12 cm de comprimento. Um sistema composto de correntes foi acoplado aos pinos e à máquina (Figura 1). A carga foi aplicada seqüencialmente ao deslocamento e seus valores registrados em Newton e milímetros, respectivamente. A carga foi aplicada nas regiões cranial e caudal dos corpos vertebrais adjacentes até que ocorresse a fratura, sendo registrados seus valores. O par de vértebras craniais, em cada coelho, foi analisado de maneira idêntica. Isto foi feito para obter um controle interno no intuito de minimizar a variação biológica entre os animais.

As propriedades avaliadas no decorrer dos testes de tração foram:

¹ O teste de resistência à tração foi realizado em equipamento do tipo Instron modelo 4204 com sistema computadorizado de aquisição, análise e saída de dados, com distância entre garras de 100mm, velocidade de teste de 25mm/min e capacidade da cédula de garra de 1000N; distância entre garras de 100 mm.

- Força ao ponto de ruptura: força máxima necessária para romper totalmente o corpo de prova, expressa em Newton;
- Força ao limite de elasticidade: força sobre o corpo de prova, acima da qual é necessária para deforma-lo permanentemente, não retornando à sua forma original (deformação inelástica), expressa em Newton;
- Índice de rigidez: expressa habilidade do corpo de prova em resistir as deformações em função das tensões aplicadas, expressa em N/cm;
- Índice de união, analisado de três formas diferentes:
 - Força ao ponto de ruptura do segmento de união / força ao ponto de ruptura do controle;
 - Força ao limite de elasticidade do segmento de união / força ao limite de elasticidade do segmento controle;
 - Índice de rigidez do segmento de união / índice de rigidez controle;

Os escores radiográficos para a presença de união nos dois grupos, avaliações por palpação manual assim como os dados histológicos foram analisados de forma descritiva. Os resultados do teste de resistência biomecânica foram comparados por análise de variância.

RESULTADOS

Todos os animais toleraram bem o procedimento cirúrgico, iniciando movimentos de deambulação imediatamente após a recuperação anestésica e locomovendo-se normalmente no dia seguinte à cirurgia. Todas as feridas cirúrgicas curaram sem complicações ou sinais de infecção. A morbidade pós-operatória foi de 15,15% (5 em 33 animais): 1 animal morreu devido a complicações anestésicas; 1 animal morreu dois dias após a cirurgia de causa não determinada e, 3 animais apresentaram, ao momento de eutanásia, abscesso unilateral não envolvendo a massa de fusão e sem sinal sistêmico de infecção.

À palpação, os segmentos não unidos, adjacentes ao operado, apresentaram mobilidade semelhante em ambos os grupos e em todos os momentos de avaliação, às 5, 7 e 9 semanas. A palpação dos segmentos operados dos animais do grupo controle revelou não-união. No G1, dos oito animais avaliados às 5 semanas, apenas 3 apresentaram união (37,5%). Às 7 e 9 semanas a fusão estava presente em 50% dos coelhos (Quadro 1; Figura 3).

Na avaliação radiográfica do G1, às 5 semanas, dois animais dos oito avaliados (25%), apresentaram radiopacidade na área de enxertia unindo dois processos transversos bilateralmente, considerados união. Às 7 semanas todos os oito animais apresentaram não-união e às 9 semanas, dois (33,3%) apresentaram evidências de união (Quadro 1; Figuras 3 e 4). No G2, nos três momentos avaliados havia discreta reação periosteal sobre os processos transversos, o que também foi observado microscopicamente.

Na análise histológica do G1, às 5 semanas, foi possível observar a matriz fragmentada em quase sua totalidade demonstrando sinais de fagocitose com algumas porções penetradas por vasos sanguíneos, presença de infiltrado inflamatório asséptico (Figura 5A e B) com a MOD atuando como corpo estranho. Foram observadas evidências de que a maioria dos vasos sanguíneos que penetrava o enxerto o fez a partir dos processos transversos descortificados.

Às 7 semanas, o processo de reabsorção da matriz continuou, foi observada integração entre os processos descortificados e a matriz, e nesta interface foi observada a penetração de vasos sanguíneos e a presença de tecido cartilaginoso (Figura 6 A). Porém, o

restante da matriz continuou a ser fagocitada e substituída predominantemente por tecido conjuntivo fibroso.

Às 9 semanas, os achados histológicos foram semelhantes aos da sétima. Contudo, a MOD foi observada em raras ocasiões (Figura 6 B). Presença de tecido cartilaginoso juntamente com tecido ósseo imaturo e trabéculas ósseas foram encontradas predominantemente na interface dos processos transversos com a matriz. Esta evolução se deu a partir dos processos transversos descortificados em direção a MOD e aos processos adjacentes tendendo a formar uma fina ponte óssea.

Os resultados do teste biomecânico para a força máxima ao ponto de ruptura, a força ao limite de elasticidade (Newton) e o índice de rigidez (N/cm) demonstraram uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre as vértebras tratadas com MOD e as vértebras adjacentes. Porém, dentre as semanas analisadas esta diferença não foi significativa (Quadros 1, 2 e 3; Figura 1).

DISCUSSÃO

A MOD foi obtida na configuração e quantidade desejadas e sua obtenção não implicou em morbidade relacionada ao sítio doador e suas conseqüências durante o período avaliado, ao contrário do método que utiliza o autoenxerto da crista ilíaca. Contudo, os resultados apresentados neste experimento não ultrapassaram um índice de união de 50%, à semelhança do encontrado por Jorgenson et al. ⁽¹¹⁾ demonstrando que, considerando o alto índice de não-união, a MOD não foi efetiva como único substituto para o autoenxerto, que apresenta índices de não-união, que variam de 10 a 50 % ^(2,3,12).

De acordo com Kanayama ⁽¹³⁾ um dos fatores que comprometem o sucesso da união vertebral é a movimentação excessiva dos segmentos operados. Por esta razão, tem sido sugerido que procedimentos com fixações rígidas promovem uma maior união ⁽¹⁾. Já para McNaulty et al. ⁽¹⁴⁾ a fixação interna não aumentou a taxa de união ou a sua resistência. Como o presente trabalho não demandou qualquer tipo de fixação, não foi possível tal comparação. Entretanto ficou evidente que a MOD preservou o espaço potencial para o tecido de união, prevenindo ossificação heterotópica e atuou como agente osteocondutor, como citado na literatura ^(9,15,16,17).

Histologicamente, os dados observados foram semelhantes aos de Kalfas ⁽¹⁶⁾ que descreve as desvantagens da MOD como a lenta formação óssea, reabsorção acelerada e incorporação tardia ou incompleta. Estes dados, de uma forma geral, justificam a alta incidência de não-união ou união tardia.

Conforme também observado por Frenkel et. al ⁽⁹⁾, a vascularização para a região do enxerto, que progrediu a partir dos processos transversos descortificados, estimulou a união vertebral, num processo que originou-se na interface enxerto/osso com ossificação endocondral, gradativamente substituindo a matriz reabsorvida.

De acordo com Maddox et al. ⁽¹⁸⁾ a utilização da MOD em pó apresenta uma variabilidade nas propriedades osteocondutoras e osteoindutoras. Eles postularam que as pequenas partículas determinam melhores resultados, pois facilitam a penetração de novos vasos sanguíneos. A MOD utilizada nesta pesquisa, sob a forma de segmentos, não foi empecilho à penetração vascular, pois às 5 semanas, foi evidenciada a presença de vasos sanguíneos distribuídos pelo enxerto.

Na avaliação histológica do sitio de fusão, às 5 semanas, a MOD apresentou áreas de fragmentação e mínima formação óssea a partir dos processos descortificados. A reabsorção da matriz continuou até a nona semana quando, na maioria dos animais, foi substituída quase totalmente por tecido conjuntivo fibroso. Também não foi possível observar a chegada de osteoblastos ou células pluripotentes indiferenciadas provenientes de vasos sanguíneos penetrando a MOD, com a formação óssea acontecendo apenas a partir da interface enxerto/processos transversos previamente descortificados. Estes achados divergiram do encontrado por Oikarinen ⁽⁶⁾ que afirmou que a MOD foi bem aceita pelo hospedeiro sem observação de partículas segmentadas e células do tipo inflamatórias, mas por outro lado concordam com estudos ⁽⁷⁾ que afirmam que a quantidade de BMP liberada na desmineralização não é suficiente para intensificar a formação óssea na coluna vertebral.

Helm et al. ⁽¹⁵⁾ afirmaram que a MOD age como um arcabouço passivo para o crescimento vascular e deposição óssea, o que também foi demonstrado pelo presente estudo. Os resultados das análises histológicas também foram semelhantes aos de Cook et al ⁽³⁾, que observaram reabsorção da matriz até 26 semanas após a cirurgia, sugerindo que, neste ambiente, a MOD atuou predominantemente como agente osteocondutor e não osteoindutor.

Diversos estudos ^(5,19,20) comprovaram a eficácia osteoindutora da MOD em falhas de ossos longos em humanos e animais. Nesta situação, a osteoindução pode ser efetiva pela proximidade com o amplo canal medular, que por sua vez possui células osteoprogenitoras, diminuindo a necessidade de migração destas células de locais distantes para o da enxertia. Porém, quando se trata de união vertebral, o microambiente e biomecânica local são distintos e a descortificação do processo transversal, apesar de colocar a medula óssea em contato com o enxerto, o faz em quantidade reduzida. Porém, a proximidade da região medular dos processos descortificados com a MOD pode ter incrementado seu potencial osteoindutor promovendo a ossificação endocondral no local de interface entre o enxerto e osso (figura 6A).

Os resultados histológicos podem explicar a divergência entre os resultados da palpação manual e da análise radiográfica. Houve casos em que animais receberam escore radiográfico 3 ou 2, cujas áreas radioluscentes representavam ilhas de cartilagem. Estes

animais, radiograficamente foram considerados “não-união”, mas à palpação manual a área de enxertia se encontrava firme e sem mobilidade, sendo considerados “união”.

Quando a massa óssea formada na região do enxerto é submetida a uma determinada força (N) e tal força é capaz de ultrapassar sua deformidade elástica, mesmo não levando a sua ruptura total, é denominada força máxima ao limite de elasticidade. A determinação deste valor consiste em um dado de maior relevância clínica que o determinado pela força máxima ao ponto de ruptura, uma vez que não é preciso que ocorra a ruptura total da massa óssea para determinar a instabilidade da coluna vertebral. O teste biomecânico demonstrou que as vértebras tratadas com a MOD apresentaram maior força máxima e força ao limite de elasticidade quando comparadas com as vértebras adjacentes ($p < 0,05$) (Quadro 1). Contudo, não houve diferença significativa entre as semanas analisadas.

O índice de rigidez também demonstrou diferença significativa entre os segmentos tratados e adjacentes. Isto significa que as vértebras que receberam a matriz óssea desmineralizada suportaram uma determinada força e deformaram menos que as vértebras adjacentes submetidas à mesma força. Para a coluna vertebral que está submetida a forças deformantes constantemente, quanto maior o índice de rigidez da massa óssea, maior a estabilidade do segmento da coluna vertebral.

A média das propriedades mecânicas do sítio de fusão a cada semana (Quadro 2) foi determinada com base nos valores de índice de união de cada animal. Cada média, em relação à força ao ponto de ruptura, força ao limite de elasticidade e ao índice de rigidez que apresenta seu valor menor ou igual a 1 indica que não houve ganho ou aumento da resistência deste material ao contrário daqueles que obtiveram valores maior que 1. No total, em todas as semanas, os segmentos tratados mostraram maior resistência biomecânica quando comparados aos segmentos não tratados, o que pode ser imputado à predominância de tecido conjuntivo e ósseo presente sobre e entre os processo transversos dos segmentos tratados.

Em 1995, Boden et al ⁽¹²⁾ utilizaram o mesmo protocolo para o teste biomecânico, porém avaliando o autoenxerto da crista ilíaca. Quando comparando os resultados de força ao ponto de ruptura encontrados por esses autores, o presente estudo obteve resultados numericamente semelhantes, contudo o índice de união encontrado por eles foi superior.

Esta semelhança somente numérica pode ser justificada pela predominância de tecido conjuntivo fibroso na região de enxertia, encontrado na maioria dos animais aqui tratados. Fazendo uma comparação, foi possível concluir que o tecido conjuntivo fibroso, formado por fibras colágenas, apresentou capacidade de sofrer uma maior força deformante e não romper totalmente quando comparado com o tecido ósseo. Mas do ponto de vista clínico, o tecido conjuntivo formado, apesar de resistente, não foi capaz de manter a imobilidade do segmento da coluna vertebral, não promovendo união vertebral estável.

CONCLUSÕES

A matriz óssea homóloga desmineralizada pode ser obtida em quantidades e configurações desejadas e quando utilizada para união vertebral dorsolateral lombar serve como arcabouço para a formação óssea. Contudo, evidências radiográficas, mecânicas e histológicas demonstraram baixo índice de união tornando-a ineficaz na determinação de uma união vertebral dorsolateral lombar estável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Feighan J. E., Stevenson S., Emery S. E.: Biologic and Biomechanic Evaluation of Posterior Lumbar Fusion in the Rabbit – The Effect of Fixation Rigidity. *Spine*.20: 1561-1567, 1995.
2. Curylo L. J., Johnstone B., Petersilge C. A., Janicki J. A., Yoo J.U.: Augmentation of Spinal Arthrodesis With Autologous Bone Marrow in a Rabbit Posterolateral Spine Fusion Model. *Spine*. 24: 434-49, 1999.
3. Cook S. D., Dalton J. E., Prewett A. B., Whitecloud III, T. S. *In Vivo* Evaluation of Demineralized Bone Matrix as a Bone Graft Substitute for Posterior Spinal Fusion. *Spine*. 20: 877-886, 1995.
4. Urist M. R.: Bone: Formation by autoinduction. *Science*. 150: 893, 1965.
5. Silva, A. M. Avaliação dos potenciais osteoindutor e osteocondutor da matriz óssea desmineralizada em falhas osteoperiosteais no rádio de coelhos. Viçosa. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 2000.
6. Oikarinen J.: Experimental spinal fusion with decalcified bone matrix and deep-frozen allogenic bone in rabbits. *Clin Orthop*. 162: 210-218, 1982.
7. Guizzardi S., Silvestre M. D., Scandroglio R., Ruggeri A., Savini R.: Implants of Heterologous Demineralized Bone Matrix for Induction of Posterior Spinal Fusion in Rats. *Spine*. 17: 701-707, 1992.
8. Ragni P. C., Lindholm T. S.: Bone formation and static changes in the thoracic spine at uni- or bilateral experimental spondylodesis with demineralized boen matrix. *Italian J. Orthop. And Traumatol*. 15: 237-52, 1989.
9. Frenkel S. R., Moskovich R., Spivak J., Zhang Z., Prewett A. B.: Demineralized Bone Matrix. *Spine*. 18: 1634-39, 1993.
10. Russell J. L., Block J. E.: Clinical utility of demineralized bone matrix for osseous defects, arthrodesis, and reconstruction: impact of processing techniques and study methodology. *Orthopedics*. 22: 524-533, 1999.
11. Jorgenson S. S., Lowe T. G., France J.: A prospective analysis of autograft versus allograft in posterolateral lumbar fusion in the same patient. A minimum of 1-year follow-up in 144 patients. *Spine*. 19: 2048-2053, 1994.

12. Boden S. D., Schimandle J. H., Hutton W. C.: An Experimental Lumbar Intertransverse Process Spinal Fusion Model. Radiographic, Histologic, and Biomechanical Healing Characteristics. *Spine*. 20: 412-423, 1995.
13. Kanayama M., Cunningham B. W., Seftor J. C., Goldstein J. A., Stewart G., Kanda K., McAfee P. C.: Does Spinal Instrumentation Influence the Healing Process of Posterolateral Spinal Fusion? An *In Vivo* Animal Model. *Spine*. 24: 1058-1065, 1999.
14. McNulty, J.F, Lenehan, T.M., Maletz, L.M. Modified Segmental Spinal instrumentation in repair of spinal fractures and luxations in dogs. *Vet. Surg*. 5:73-80, 1993.
15. Helm G. A., Dayoub H., Jane J. A.: Bone graft substitutes for the promotion of spinal arthrodesis. *Neurosurg. Focus*. 10: 1-5, 2001.
16. Kalfas I. H.: Principles of bone healing. *Neurosurg. Focus*. 10: 1-4, 2001.
17. Reddi A., H., Wientroub S., Muthukumaran N. Biologic Principles of Bone Induction. *Orthopedic Clinics of North America*. 18: 207-12, 1987.
18. Maddox E., Zhan M., Mundy G. R., Drohan W. N., Burgess W. H.: Optimizing human demineralized bone matrix for clinical application. *Tissue Eng*. 6: 441-448, 2000.
19. Milliken J. B., Glowacki J., Kaban L. B., Murray J. E.: Use of demineralized allogenic bone implants for the correction of maxillocraniofacial deformities. *Ann Surg*. 194: 366-72, 1981.
20. Kaban L. B., Mulliken J. B., Glowacki J.: Treatment of jaw defects with demineralized bone implants. *J Oral Maxillofac Surg*. 40: 623-626, 1982.

Quadro 1. Resultado dos testes biomecânicos realizados na área de enxertia (vértebras tratadas) e nos processos transversos adjacentes (vértebras controle). Resultados dos testes por palpação manual e radiográfico. Semanas 5, 7 e 9.

Teste Biomecânico									
Animal	Semanas	Radiografia	Palpação	Vértebras tratadas			Vértebras Controle		
				Força Máxima	Força Limite*	Índice de Rigidez	Força Máxima	Força Limite*	Índice de Rigidez
01	5	NF (2)	NF	303,8	132,72	896,75	145,2	89,4	687,69
02	5	NF (0)	NF	-	-	-	-	-	-
03	5	NF (1)	NF	296,2	78,33	199,82	295,6	45,255	116,03
04	5	NF (1)	NF	194,9	99,975	448,31	31,73	28,83	160,16
05	5	NF (1)	NF	-	-	-	-	-	-
06	5	F (4)	F	-	-	-	-	-	-
07	5	NF (3)	F	-	-	-	-	-	-
08	5	F (4)	F	253,4	#	#	158,3	#	#
09	7	NF (3)	F	-	-	-	-	-	-
10	7	NF (1)	NF	-	-	-	-	-	-
11	7	NF (2)	NF	-	-	-	-	-	-
12	7	NF (1)	NF	-	-	-	-	-	-
13	7	NF (3)	F	352,6	90,15	751,25	212,2	53,55	267,75
14	7	NF (2)	F	390,5	125,31	724,33	152,9	100,35	590,29
15	7	NF (3)	F	338,9	#	#	279,9	#	#
16	7	NF (1)	NF	328,5	#	#	203,8	#	#
17	9	F (4)	NF	-	-	-	-	-	-
18	9	NF (2)	NF	-	-	-	-	-	-
19	9	NF (2)	NF	354,7	114,45	880,38	223,03	93,6	468,0
20	9	F (4)	F	368,7	223,35	1015,22	214,1	108,75	402,77
21	9	NF (3)	F	382,5	#	#	303,8	#	#
22	9	NF (2)	F	312,9	108,9	780,3	151,2	97,1	470,0

S = união sólida.

NF = não união. Escore radiográfico em parênteses.

Força máxima = força ao ponto de ruptura (N);

* Força ao limite de elasticidade (N);

Índice de rigidez (N/cm);

- animais submetidos à análise histológica.

valores não calculados devido a erro experimental.

Quadro 2 - Propriedades Mecânicas da União Vertebral Dorsolateral Lombar com a utilização da Matriz Óssea Desmineralizada.

Tempo (semanas)	Número de animais	Força máxima relativa*	Força ao limite de elasticidade relativa*	Índice de rigidez relativa*
5	4	2,70±1,71	1,80±0,83	1,61±0,64
7	4	1,75±0,39	1,46±0,63	2,01±1,37
9	4	1,66±0,23	1,17±0,46	1,48±0,71
Total	12			
		2,04±0,78	1,27±0,67	1,74±0,91

* Dados expressos pela razão entre os resultados dos níveis tratados pelo controles.

Quadro 3. Análise de variância da força ao ponto de ruptura (a) e força ao limite de elasticidade (b):

a.

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signifi.
Vértebras tratadas (VT)	1	94481.42	94481.42	25.237	0.00009
Semanas de sacrifício	2	30768.09	15384.04	4.109	0.03389
VT X Semanas	2	144.751	707.3757	0.189	*****
Resíduo	18	67389.10	3743.839		

Coefficiente de variação = 23.498

b.

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signifi.
Vértebras tratadas (VT)	1	45702.43	45702.43	25.809	0.00008
Semanas de sacrifício	2	11008.80	5504.400	3.108	0.06925
VT X Semanas	2	981.2728	490.6364	0.277	*****
Resíduo	18	31874.65	1770.814		

Coefficiente de variação = 24.766

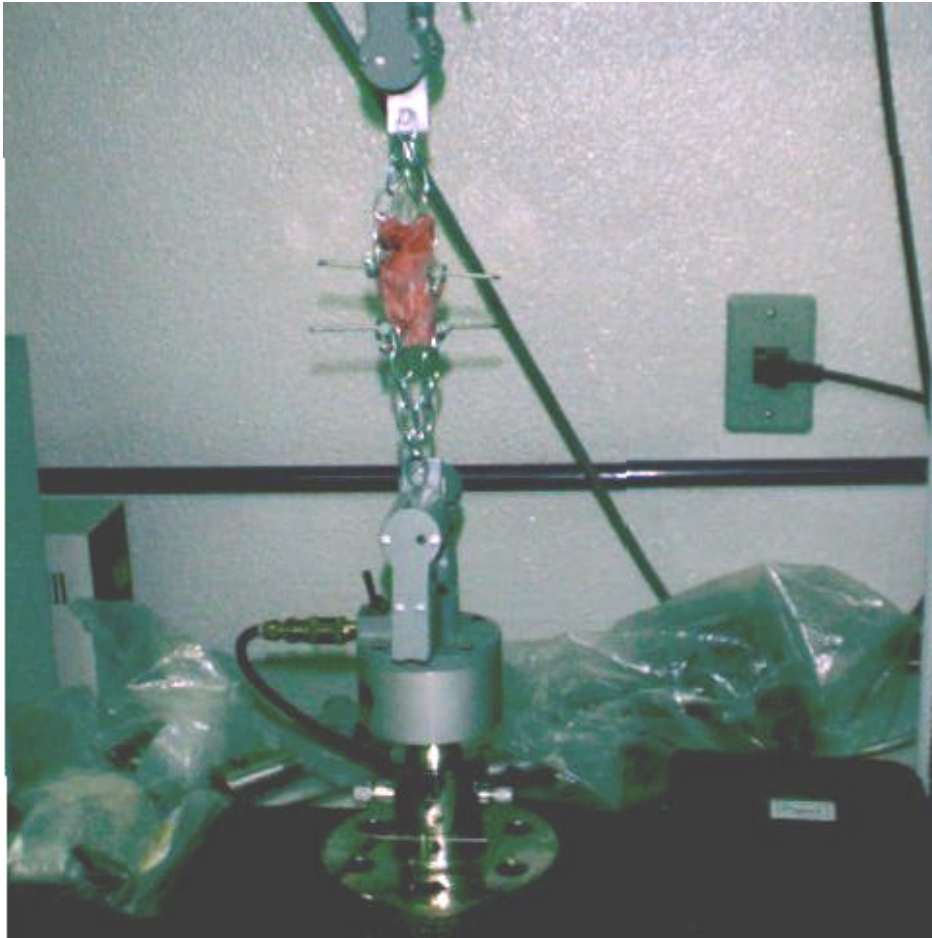


Figura 1. Fotografia do corpo de prova acoplado à máquina Instron, demonstrando o teste biomecânico.

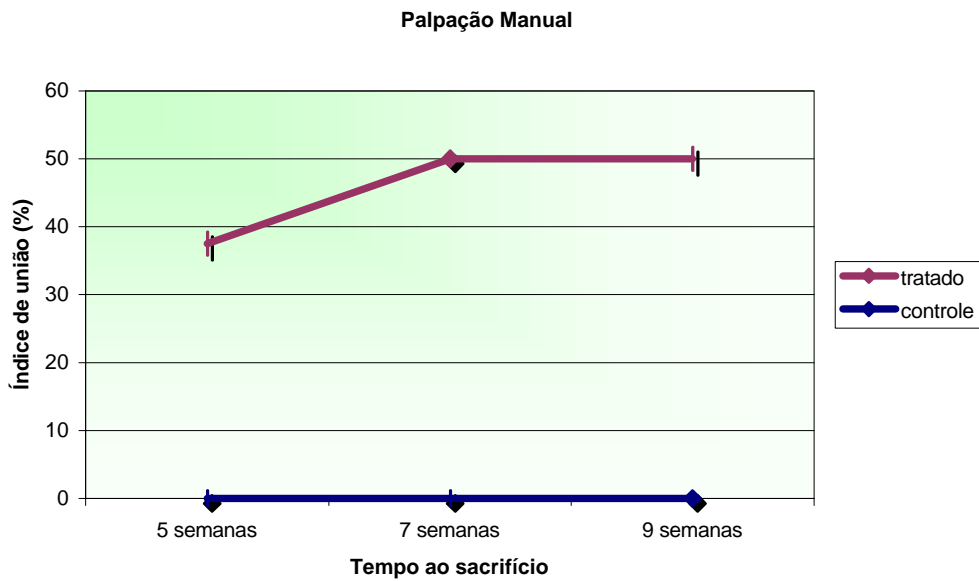


Figura 2 - Representação gráfica da porcentagem do índice de união, à palpação manual, dos animais tratados com matriz óssea desmineralizada e controle em relação às diferentes semanas de sacrifício.

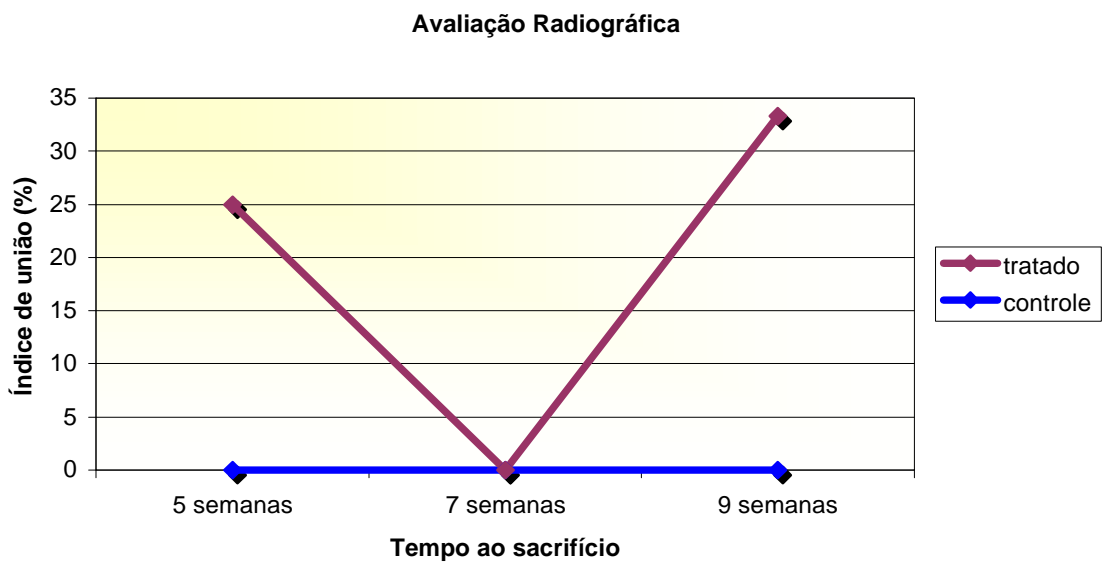


Figura 3 - Representação gráfica da porcentagem do índice de união radiográfica dos animais tratados com matriz óssea desmineralizada e controle em relação às diferentes semanas de sacrifício



Figura 4. Radiografia da coluna vertebral às 9 semanas após enxertia com medula óssea desmineralizada (MOD). Presença de pontes radiopacas unindo os dois processos transversos adjacentes, bilateralmente (Escore 4, fusão).

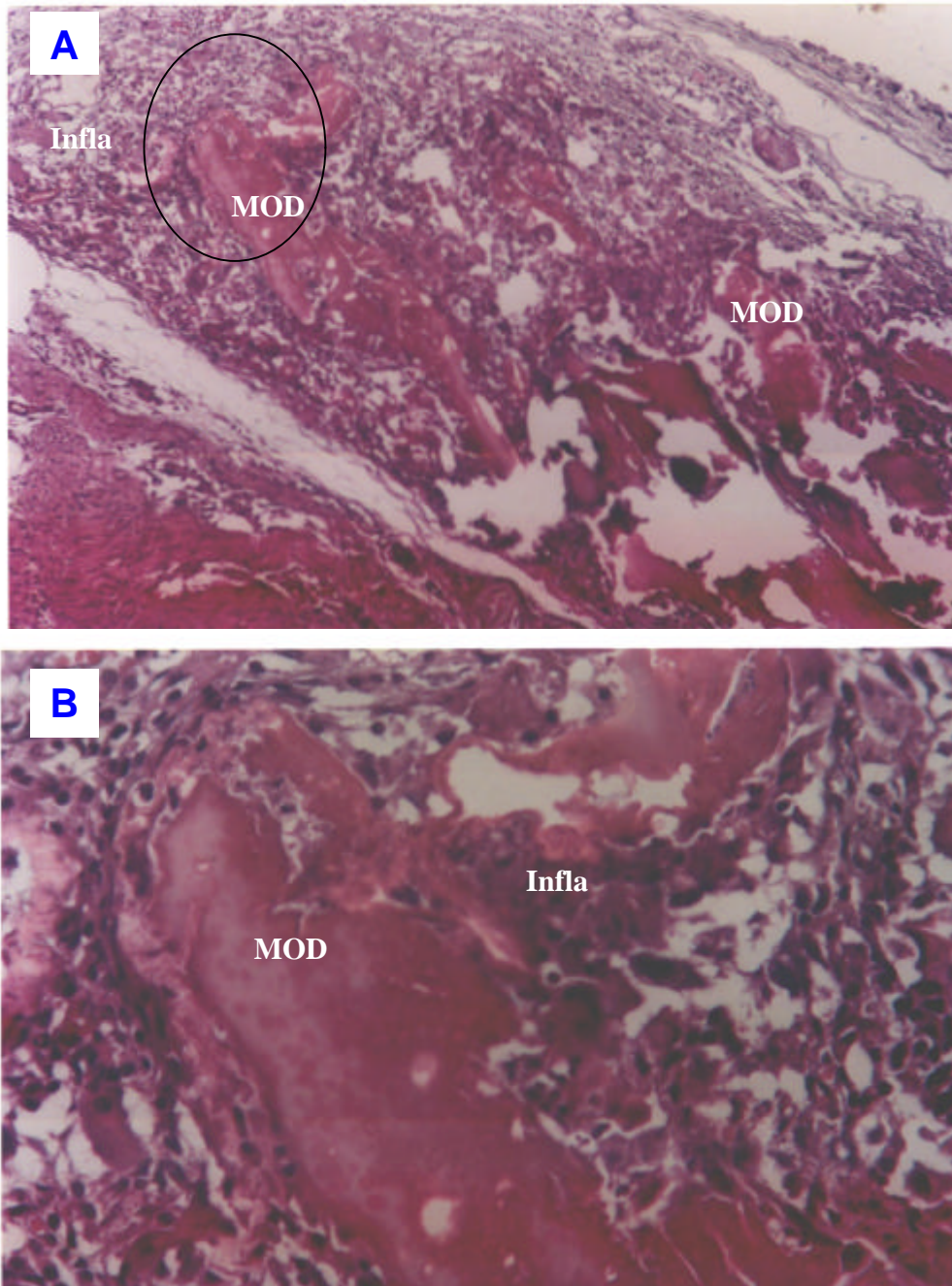


Figura 5. A. Fotomicrografia da área de enxertia às 5 semanas após a cirurgia. Matriz óssea homóloga desmineralizada (MOD) fragmentada e reabsorvida em quase sua totalidade. Presença de infiltrado inflamatório asséptico (Infla). H & E 63 X. B. Detalhe de A. MOD sendo reabsorvida por um infiltrado inflamatório asséptico (Infla). H & E. 100 X.

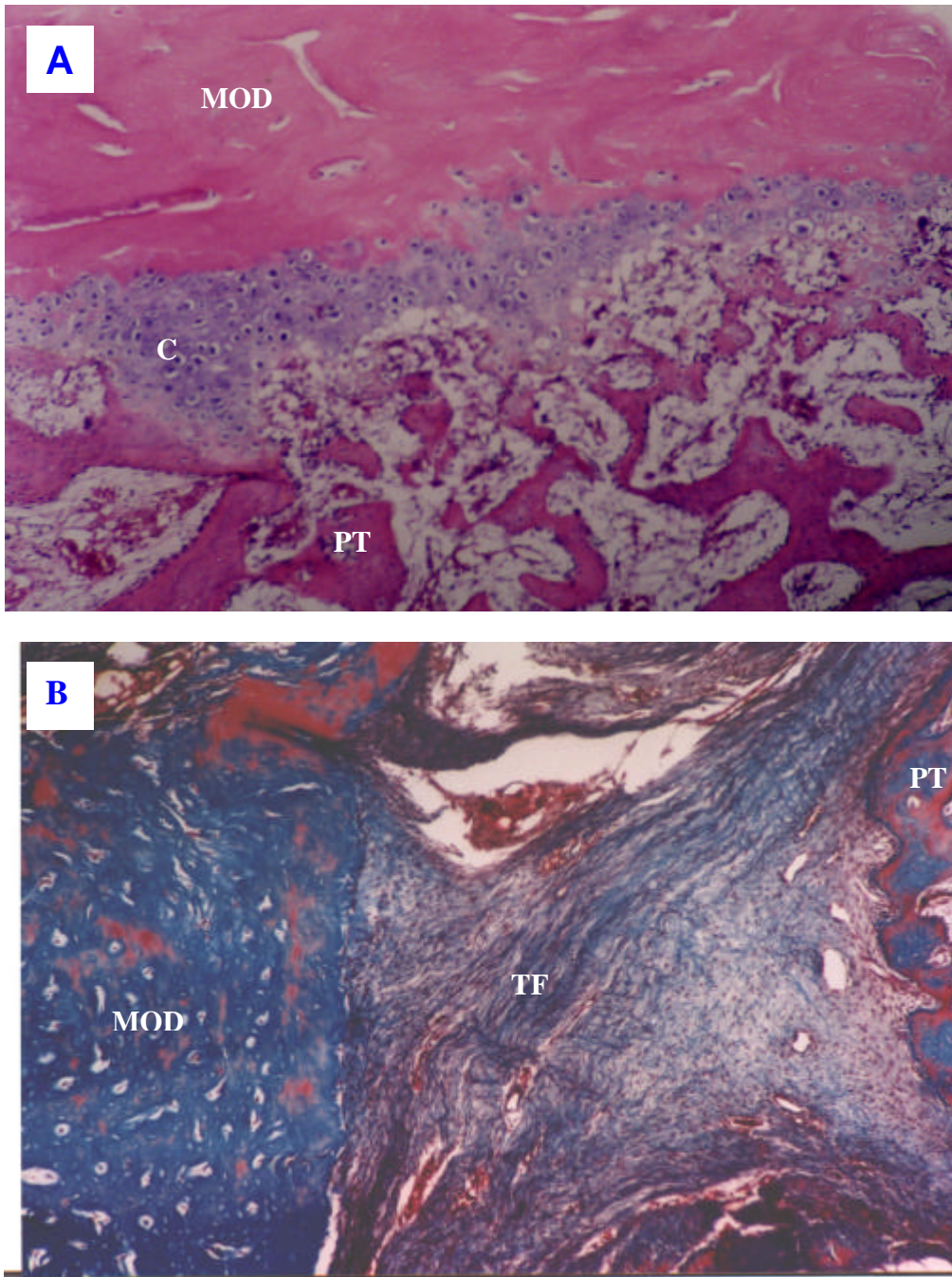


Figura 6. A. Fotomicrografia da região de enxertia as 7 semanas após cirurgia. Matriz óssea homóloga desmineralizada (MOD) sendo reabsorvida e substituída por tecido cartilaginoso (C) a partir do processo transverso previamente descortificado (PT). H & E. 63 X. B. Fotomicrografia da região de enxertia às 9 semanas após a cirurgia. Matriz óssea desmineralizada (MOD) sendo reabsorvida e substituída por tecido conjuntivo fibroso (TF). Processo transverso (PT). Tricrômico de Masson. 63 X.

4.0 - MATRIZ ÓSSEA HOMÓLOGA DESMINERALIZADA ASSOCIADA À MEDULA ÓSSEA AUTÓGENA FRESCA NA UNIÃO VERTEBRAL DORSOLATERAL LOMBAR EM COELHOS.

RESUMO

O presente estudo avaliou o comportamento da matriz óssea homóloga desmineralizada (MOD) associada à medula óssea autógena fresca (MO) na união vertebral dorsolateral lombar em vinte e quatro coelhos da raça Nova Zelândia Branco (grupo 1), depositada sobre os processos transversos de L₅-L₆ previamente descortificados. Em outros nove coelhos, grupo controle (grupo 2) foi realizado apenas a descortificação dos processos transversos. Oito animais do grupo 1 e três do grupo 2 sofreram eutanásia às 5, 7 e 9 semanas após a cirurgia e foram submetidos a avaliações radiográfica, histológica, por palpação e teste biomecânico (apenas grupo 1). No grupo controle, nas diferentes avaliações, foi observado insignificante reação periosteal local, sem união. No grupo 1, às 5 semanas, 87,5 % dos animais apresentaram união à palpação, seguido por 75 e 100 % às 7 e 9 semanas, respectivamente. As análises radiográficas demonstraram um índice de união de 50 % às 5 semanas; 62 %, às 7 semanas e 75 % às 9 semanas. Na avaliação histológica, às 5 semanas havia características de osteointegração da MOD com os processos transversos, de onde partiram os vasos sanguíneos que penetraram a matriz e, a presença de ilhas de cartilagem no centro do enxerto. Nas semanas seguintes a ossificação endocondral evoluiu e a MOD foi substituída em quase sua totalidade por tecido ósseo trabecular, formando uma ponte de osso maduro entre e sobre os processos transversos adjacentes. O teste biomecânico demonstrou diferença significativa ($p < 0,05$), referente à força e resistência, entre os segmentos operados e os adjacentes. Os resultados do presente trabalho demonstraram a formação de um tecido de união homogêneo em toda extensão do enxerto, cuja vascularização originou-se a partir dos processos transversos descortificados. Além da ação osteoindutora sobre as células tronco da medula óssea, a matriz foi responsável pela deposição óssea de forma organizada e restrita ao ambiente, atuando como arcabouço osteocondutor. Os resultados permitiram concluir que a associação destes compostos pode ser utilizada com sucesso como agente união lombar.

Unitermos – união vertebral; matriz óssea homóloga desmineralizada; medula óssea.

ABSTRACT

HOMOLOGOUS DEMINERALIZED BONE MATRIX ASSOCIATED TO AUTOLOGOUS BONE MARROW IN A RABBIT DORSOLATERAL LUMBAR VERTEBRAL UNION.

The present study evaluated the behavior of demineralized bone matrix (DBM) associated to autogenous bone marrow in the dorsolateral lumbar vertebral union in twenty-four New Zealand white rabbits (group 1). This association was deposited over L₅-L₆ transverses processes previously decorticated. In the other nine rabbits, control group (group 2), only the decortication of the transverses processes was made. Eight animals from group 1 and two animals from group 2 were killed at 5, 7 and 9 weeks after surgery and underwent to radiographic, microscopic, manual palpation and biomechanical (only group 1) evaluations. In the control group, in all evaluations made, it was observed only a minimum periosteal reaction without union. In the group 1, at 5 weeks, the union rate on manual palpation was 87,5 %, followed by 75 and 100 % at 7 and 9 weeks, respectively. The radiographics analysis demonstrated a union rate of 50 % at 5 weeks; 62 %, at 7 weeks and 75 % at 9 weeks. Microscopic evaluation, at 5 weeks, showed incorporation between DBM and the transverses processes, site where the majority of the blood vessels came from toward the graft. It was observed the presence of cartilaginous tissue in the graft center. In the follows weeks the endochondral ossification continues and the DBM was almost entirely substituted by trabecular bone tissue, forming a mature bone bridge between and over the adjacent transverses processes. The biomechanical test showed a significant difference ($p < 0,05$) referred to force and resistance between the operated and adjacent segments. The presented results demonstrated the formation of a homogeneous union mass in all graft extension and the vascularization coming from the decorticated transverses processes. Besides the osteoinductive actions over the stem cells, the matrix was responsible from the organized and restricted bone deposition to local environment, acting as osteoconductive scaffold. The results permit conclude that the association of these compounds may be used with success as a promoter agent of dorsolateral lumbar vertebral union.

Key words: vertebral union, demineralized homologous bone matrix, bone marrow.

INTRODUÇÃO

O método padrão de fusão posterolateral lombar utiliza o autoenxerto da crista ilíaca ^(1,2), sendo que os riscos relacionados a este tipo de procedimento incluem a não-união, que pode variar de 10 a 50% ^(2,3), requerendo uma nova cirurgia; quantidade insuficiente de material disponível; além de relatos de pacientes humanos com parestesia no local de coleta, até 3 anos após a cirurgia ⁽⁴⁾.

O aloenxerto de matriz óssea desmineralizada (MOD) pode ser utilizado como alternativa para autoenxerto ósseo no intuito de eliminar complicações relacionadas com o sítio doador ^(3,5,6). Porém, relatos demonstram que seu baixo potencial osteogênico, alto índice de reabsorção e pouca revascularização podem limitar sua eficácia ⁽⁷⁾.

A medula óssea é constituída por células primordiais indiferenciadas “células tronco” que possuem o potencial de se diferenciarem em células da linhagem óssea ⁽⁸⁾. Curylo et al. ⁽²⁾ e Frenkel et al. ⁽⁹⁾ demonstraram que a adição da medula óssea pode aumentar a quantidade de osso formado e conseqüentemente o sucesso da união.

A MOD apresenta a habilidade de aderir e fornecer moléculas bioativas (BMP) associadas à presença de células osteoprogenitoras no local de enxertia, assim como aos fatores bioativos provenientes da medula óssea autógena fresca, ampliam o seu potencial osteoindutor ^(8,10).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade da matriz óssea homóloga desmineralizada associada à medula óssea autógena fresca de promover a união vertebral dorsolateral lombar em coelhos.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 33 coelhos, clinicamente saudáveis, adulto-jovens (8 semanas), da raça Nova Zelândia Branca, com peso médio de 3 Kg, mantidos em gaiolas individuais no Biotério do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e alimentados com ração comercial, feno e água.

Os animais foram separados aleatoriamente em dois grupos experimentais. O grupo 1 (G1) foi composto por vinte e quatro coelhos que receberam aloenxerto de matriz óssea desmineralizada associada à medula óssea autógena fresca sobre os processos transversos descortificados das vértebras lombares cinco e seis (L₅ e L₆) bilateralmente. O grupo 2 (G2) constituído por nove coelhos, cujos processos transversos das vértebras lombares (L₅ e L₆) foram apenas descortificados, foi utilizado como controle. Oito coelhos do G1 e três coelhos do G2 foram submetidos à eutanásia às 5, 7 e 9 semanas após os procedimentos cirúrgicos.

A matriz óssea desmineralizada foi coletada a partir da diáfise de fêmur de outros coelhos da mesma raça e porte, sacrificados com sobredosagem anestésica (tiopental sódico⁹). Após a remoção de todo tecido mole, com auxílio de bisturi, as diáfises foram desmineralizadas por imersão em ácido hidrocloreídrico 0,6N por 24 a 48 horas em temperatura ambiente. O ácido foi trocado a cada 24 horas e o osso foi considerado desmineralizado quando se apresentou flexível e transparente, sendo estocado em álcool 70% à temperatura ambiente. No momento da cirurgia os ossos foram cortados em seu eixo longitudinal e em segmentos de aproximadamente 0,5 cm de largura por 2,0 cm de comprimento.

Cada coelho recebeu como medicação pré-anestésica acepromazina¹⁰ na dose de 0,1 mg/kg por via intravenosa seguida de anestesia dissociativa com tiletamina-zolazepam¹⁰ completando com infiltrado de anestésico local¹¹ na dose de 0,75 ml, no local da incisão.

⁹ Thionembutal® 0,5 g, Abbott Laboratories.

¹⁰ Aceprom 1%, Univet S/A Indústria Veterinária.

¹¹ Anestésico Bravet (Lidocaína 2%).

Antibioticoterapia foi realizada com ceftiofur sódico¹² na dose de 5mg/Kg por via intramuscular, no período pré-operatório e 24 e 48 horas após o procedimento cirúrgico.

Os animais foram posicionados em decúbito ventral, com os membros pélvicos flexionados cranialmente. O procedimento iniciou-se com uma incisão de pele na linha média dorsal lombar, de aproximadamente 5 cm de extensão, tendo como referencia os processos transversos de L₅ e L₆. Bilateralmente, foi realizada uma incisão na fáscia paramediana após a aplicação de 0,5 mL de lidocaína. Os músculos multífidos e longíssimos foram identificados e o plano entre eles foi divulsionado permitindo a exposição dos processos transversos de L₅ e L₆ e da membrana intertransversa (Figura 1 A). Com o auxílio de um osteótomo, a face dorsal destes processos, de ambos os lados, foi descortificada (Figura 1 B) até que fosse visualizada a região óssea medular. Então, a MOD foi depositada sobre eles (Figura 1 C).

A medula óssea autógena foi obtida durante o período trans-cirúrgico, pela aspiração através de agulha para punção medular (calibre 16), acoplada a uma seringa estéril de 20 mL, heparinizada¹³, inserida na crista ilíaca posterior até a cavidade medular, segundo técnica descrita por Barros⁽¹⁸⁾. Imediatamente após a coleta, 2 mL de medula integral foram colocados, bilateralmente, no local de enxertia, sobre toda a extensão da matriz óssea desmineralizada.

Após a realização dos procedimentos, a fáscia paramediana e o tecido subcutâneo foram suturados com fio absorvível¹⁴ 4-0, com padrão de sutura do tipo Reverdin e a pele aproximada com fio não absorvível¹⁵ 4-0, em sutura simples contínua. A analgesia pós-operatória foi obtida com morfina¹⁶ oral (0,4 mg/kg) a cada seis horas durante os três primeiros dias após o procedimento cirúrgico.

As avaliações radiográficas foram efetuadas em todos os animais imediatamente após o procedimento cirúrgico e à época da eutanásia, na incidência dorso-ventral. Foi analisado quanto à presença de tecido ósseo uni ou bilateral atribuindo-lhes escores. Os escores 0: para aqueles que apresentaram ausência de tecido ósseo bilateral; 1: para presença de tecido ósseo unilateral; 2: tecido ósseo com radioluscência bilateralmente, 3:

¹² Excenel, Rhodia-Mérieux Veterinária Ltda.

¹³ Liquemine®, Roche.

¹⁴ Catgut Cromado 3-0. Cirumédica LTDA.

¹⁵ Nylon Monofilamento Preto 4-0. Cirumédica LTDA.

¹⁶ Dimorf® Solução Oral, Cristália LTDA.

tecido ósseo bilateral com radioluscência unilateral e, 4: tecido ósseo intertransverso bilateral sem radioluscência, único escore caracterizando fusão.

Após a eutanásia, a coluna vertebral lombar foi removida e os segmentos entre L₅ e L₆ de todos os animais foram palpados, assim com os segmentos adjacentes, proximal e distal. Foram considerados sólidos se observado firmeza à movimentação, ou não-sólido. Os níveis graduados como sólidos foram considerados união.

A avaliação histológica foi realizada em doze animais do Grupo 1, quatro a cada época de eutanásia e em nove animais do Grupo 2, três a cada eutanásia. Os cortes histológicos foram corados com Hematoxilina-Eosina e Tricrômico de Masson sendo analisados quanto à presença de tecido cartilaginoso, osteóide, maturidade óssea e presença de tecido fibroso na região do enxerto e dos processos transversos das vértebras adjacentes, bilateralmente. O tecido de união sobre os espaços interlaminares e interface com os processos transversos foram os segmentos de maior interesse.

A avaliação da resistência biomecânica foi realizada entre as vértebras L₅ e L₆, em 12 animais restantes do G1, sendo 4 animais a cada momento de eutanásia. Imediatamente antes do teste biomecânico todo o tecido muscular remanescente foi removido com auxílio de um bisturi, assim como o disco intervertebral e as facetas articulares dos processos articulares. O tecido de união e a membrana intertransversa permaneceram conectadas às duas vértebras unidas.

O teste de tensão uniaxial¹ foi realizado no Laboratório de Papel e Celulose da UFV, em sala climatizada com umidade relativa do ar de 50% e temperatura de 23 °C. A leitura dos valores das forças aplicadas foi realizada com a utilização de célula de carga e a determinação das deformações foi feita através do deslocamento da barra de tracionamento do equipamento, ambos conectados através de um sistema de aquisição de dados controlados por computador, o qual permitiu o controle automatizado do sistema responsável pela coleta de dados e derivação das propriedades analisadas.

Os corpos vertebrais das vértebras L₅ e L₆ foram perfurados perpendicularmente com pinos de aço de aproximadamente 3,2 mm de diâmetro e 12 cm de comprimento. Um sistema composto de correntes foi acoplado aos pinos e à máquina. A carga foi aplicada

¹ O teste de resistência à tração foi realizado em equipamento do tipo Instron modelo 4204 com sistema computadorizado de aquisição, análise e saída de dados, com distância entre garras de 100mm, velocidade de teste de 25mm/min e capacidade da cédula de garra de 1000N; distância entre garras de 100 mm.

seqüencialmente ao deslocamento e seus valores registrados em Newton e milímetros, respectivamente. A carga foi aplicada nas regiões cranial e caudal dos corpos vertebrais adjacentes até que ocorresse a fratura, sendo registrados seus valores. O par de vértebras adjacentes, em cada coelho, foi analisado de maneira idêntica. Isto foi feito para obter um controle interno no intuito minimizar a variação biológica entre os animais.

As propriedades avaliadas no decorrer dos testes de tração foram:

- Força ao ponto de ruptura: força máxima necessária para romper totalmente o corpo de prova, expressa em Newton;
- Força ao limite de elasticidade: força máxima sobre o corpo de prova, acima da qual é necessária para deformá-lo permanentemente, não retornando à sua forma original (deformação inelástica), expressa em Newton;
- Índice de rigidez: expressa habilidade do corpo de prova em resistir as deformações em função das tensões aplicadas, expressa em N/cm;
- Índice de união:
 - Força ao ponto de ruptura do segmento de união / força ao ponto de ruptura do controle;
 - Força ao limite de elasticidade do segmento de união / força ao limite de elasticidade do segmento controle;
 - Índice de rigidez do segmento de união / índice de rigidez controle;

Os escores radiográficos para a presença de união nos dois grupos, avaliações por palpação manual assim como os dados histológicos foram analisados de forma descritiva. Os resultados do teste de resistência biomecânica foram comparados por análise de variância.

RESULTADOS

Todos os animais toleraram bem o procedimento cirúrgico, iniciando movimentos de deambulação imediatamente após a recuperação anestésica e locomovendo-se normalmente no dia seguinte à cirurgia. Todas as feridas cirúrgicas curaram sem complicações ou sinais de infecção.

Em dois animais do grupo 1, que sofreram eutanásia às sete semanas, foi observado abscesso unilateral, próximo à região da enxertia, mas não envolvendo a tecido de união. Nestes casos, a MOD encontrava-se intacta e não aderida aos processos transversos. Não foi observado qualquer sinal sistêmico de infecção.

Durante a palpação os segmentos não unidos, adjacentes ao operado, apresentaram mobilidade em todos os momentos de sacrifício, bem como os segmentos descortificados dos nove animais do grupo controle, não revelando sinais de união. Os segmentos que receberam a MOD associada à medula óssea, às cinco semanas apresentaram índice de união de 87,5% (7 dentre 8 animais), às sete semanas de 75% (6 dentre 8 animais) e às nove, apresentaram união em 100% dos animais (Quadro 1; Figura 2).

À análise radiográfica do grupo 1, às cinco semanas, quatro animais (50%) apresentaram radiopacidade na área de enxertia unindo dois processos transversos bilateralmente, considerados união. Às sete semanas cinco animais (62%) apresentaram união, e às nove semanas seis animais (75%) apresentaram evidências de união (Quadro 1, Figuras 3 e 4).

No grupo 2, nos três momentos avaliados, houve apenas mínima reação periosteal sobre os processos transversos, observado histológica e radiograficamente (Figura 4A).

Histologicamente, às cinco semanas foram observadas no grupo 1, características de osteointegração da MOD com os processos transversos, com a matriz sendo penetrada por vasos sanguíneos e formação tecido condróide na interface seguida por crescimento ósseo endocondral. Houve também a formação de tecido condróide no centro do enxerto, coincidente com o local de deposição da medula óssea autógena fresca (Figura 5).

Às sete semanas a matriz continuou a ser gradativamente reabsorvida e substituída por tecido condróide em toda sua extensão, principalmente a partir dos processos

transversos. Foi observada presença de ilhas cartilaginosas no centro do enxerto, ocorrendo também ossificação endocondral e formação de osso imaturo (Figura 6).

Às nove semanas, o processo de ossificação endocondral continuou a evoluir e a MOD foi substituída em quase sua totalidade por tecido ósseo, com trabéculas formando ponte de osso maduro entre dois processos transversos adjacentes (Figura 7).

Os resultados do teste biomecânico analisando a força ao ponto de ruptura, força ao limite de elasticidade (Newton) e o índice de rigidez (N/cm) demonstraram uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre as vértebras tratadas com MOD e medula óssea e as vértebras controle. Porém, dentre as semanas analisadas esta diferença não foi significativa (Quadros 1, 2 e 3).

DISCUSSÃO

A coluna vertebral dorsolateral consiste em um ambiente desafiador para a formação óssea, diferente do que acontece com ossos longos. Isto faz com que materiais que apresentam resultados satisfatórios em defeitos ósseos passem a não se comportar da mesma forma na união vertebral dorsolateral lombar ⁽⁴⁾. A utilização de apenas a matriz óssea desmineralizada na união vertebral não demonstrou resultados satisfatórios e poucos estudos foram realizados em relação à utilização da medula óssea na união vertebral ^(2,7). A associação destes compostos demonstrou ser uma opção exequível e de baixo custo ^(10,11).

A pseudoartrose permanece um problema de difícil solução e elevado custo quando a crista ilíaca é utilizada na união vertebral em humanos ^(2,3,12,13). Tal condição requer, na maioria das vezes, um segundo procedimento cirúrgico, o que aumenta a morbidade do paciente. Este estudo analisou a possibilidade da utilização da matriz óssea homóloga desmineralizada associada à medula óssea autógena fresca como substituto para o autoenxerto da crista ilíaca, pois em diversos estudos ficou evidenciada uma resposta sinérgica em defeitos de ossos longos ou pseudoartroses, além de se traduzir em pequena morbidade do sítio doador ^(9,14,15).

Da mesma forma como foi observado por outros autores (10,11), a coleta da medula óssea foi um procedimento simples e de baixo custo. A morbidade após o procedimento foi pequena, os animais não manifestaram sinais de dor no sítio de punção.

As análises radiográficas demonstraram um aumento gradativo da radiopacidade da região do enxerto no decorrer do período pós-operatório. O tecido de união apresentou, desde as cinco semanas, homogeneidade em toda sua extensão, que pode ser atribuída à ação da medula óssea distribuída ao longo da matriz desmineralizada. Também a MOD foi responsável pela deposição óssea de forma organizada e restrita ao ambiente, atuando como arcabouço osteocondutor.

A diminuição do índice de união na sétima semana de sacrifício, reduzindo de 87,5% para 75% coincide com a presença de abscesso unilateral encontrado em dois animais deste grupo, o que levou a não incorporação do enxerto.

A incongruência entre os dados radiográficos e de palpação pode ser explicada pelos resultados histológicos. Houve casos em que animais receberam escore radiográfico 3, cujas áreas radiolúcidas presentes na radiografia, histologicamente foram representadas por ilhas de cartilagem. Estes animais, radiograficamente, foram considerados “não-união”, mas à palpação a área operada se encontrava firme e sem mobilidade, sendo considerados “união”. Isto significa que nem sempre os achados radiográficos refletem a condição clínica real do paciente.

A vascularização e as ilhas de tecido condróide no centro da região de enxertia (figura 5, B), à quinta semana após a cirurgia, coincidem com os achados de Wilson et al. ⁽¹¹⁾, que afirmaram que a incorporação do enxerto ósseo está diretamente relacionada à vascularização e presença de material osteogênico no local. Nas semanas seguintes de sacrifício a ossificação se deu de forma endocondral, predominantemente a partir dos processos transversos, que atuaram fornecendo nutrientes a partir das áreas descortificadas.

Concordando com Frenkel et. al ⁽⁹⁾ a descortificação dos processos transversos estimula a união vertebral. A vascularização para a região do enxerto progrediu dos processos transversos descortificados e na interface a ossificação endocondral gradativamente substituiu a matriz reabsorvida. Porém, nos animais submetidos somente a descortificação ocorreu apenas reação periosteal, observada à histologia e em avaliações radiográficas. Estes achados confirmam que a descortificação foi procedimento essencial para ocorrência da integração do enxerto ⁽¹⁶⁾.

Para Wittbjer et al ⁽¹⁷⁾ e Barros ⁽¹⁸⁾ as células medulares associadas ao enxerto ósseo desmineralizado influenciam a osteogênese somente nos estágios iniciais de cura, adiantando o processo. Nesta pesquisa, na nona semana, foi observada área de osso trabecular maduro comunicando-se com a região receptora dos processos transversos descortificados durante a cirurgia.

Estudos ^(5,6) citam que a quantidade de proteína morfogenética óssea (BMPs) liberada a partir da desmineralização não é suficiente para intensificar a formação óssea na coluna vertebral. Contudo, no presente estudo a adição da medula óssea pareceu incrementar a propriedade osteoindutora da matriz desmineralizada como é relatado por outros autores ^(9,10,12,18). A medula óssea além de fornecer células osteoprogenitoras também

fornece fatores de crescimento que se somam à atividade osteoindutora, determinada pela BMP presente na MOD ⁽¹⁹⁾.

O teste biomecânico demonstrou que as vértebras tratadas com a MOD e medula óssea apresentaram diferença significativa entre a força ao ponto de ruptura e força ao limite de elasticidade quando comparadas com as vértebras adjacentes, utilizadas como controle (Quadro 1). Contudo, não houve diferença significativa entre as semanas analisadas.

O índice de rigidez também mostrou diferença significativa entre as vértebras tratadas e o controle ($p < 0,05$). O maior índice de rigidez indica que as vértebras que receberam o enxerto ósseo e medula suportaram uma determinada força e deformaram menos que as vértebras controle submetidas à mesma força. Para a coluna vertebral que está submetida a forças deformantes, constantemente, quanto maior o índice de rigidez da massa óssea, maior a estabilidade do segmento e conseqüente sucesso da união vertebral e resolução da sintomatologia dolorosa.

A média das propriedades mecânicas do sitio de união a cada semana (Quadro 2) foi determinada com base nos valores de índice de união de cada animal. Cada média, em relação à força ao ponto de ruptura, força ao limite de elasticidade e ao índice de rigidez que apresenta seu valor menor ou igual a 1 indica que não houve ganho ou aumento da resistência deste material ao contrário daqueles que obtém valores maior que 1. No total, em todas as semanas, os segmentos tratados mostraram maior resistência biomecânica quando comparados aos segmentos não tratados. Quanto maior o número, maior a diferença entre os segmentos tratados dos não tratados. Isto indica que o tecido ósseo que foi predominantemente encontrado nos segmentos tratados foi o responsável pela sua maior resistência em comparação aos segmentos controle.

Boden et al ⁽¹²⁾ realizaram testes biomecânicos com o mesmo protocolo, porém utilizaram o autoenxerto da crista ilíaca e obtiveram resultados semelhantes ao encontrado pelo presente experimento. Estes autores determinaram, em coelhos, uma média do índice de força ao ponto de ruptura igual a $1,78 \pm 0,13$, dez semanas após a cirurgia enquanto que a média de todos os animais tratados com MOD e medula óssea apresentaram valores bem próximos, $1,78 \pm 0,23$. Índices relativos que apresentaram valores igual a 1, indicam que não houve diferença entre os segmentos tratados e adjacentes e quanto mais alto foi este

valor, maior a diferença. Presume-se, portanto que o tecido formado pelo enxerto ósseo de MOD associado à medula óssea apresentou um comportamento físico semelhante ao demonstrado pelo tecido formado pelo autoenxerto da crista ilíaca.

CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho demonstraram que a deposição de matriz óssea homóloga desmineralizada associada à medula óssea autógena fresca sobre processos transversos das vértebras lombares 5 e 6 determina massa de união homogênea em toda sua extensão, cuja vascularização origina-se nos processos transversos descortificados e, na interface osso/enxerto a ossificação endocondral gradativamente substitui a matriz. Além da ação osteoindutora sobre as células tronco da medula óssea, a matriz é responsável pela deposição óssea de forma organizada e restrita ao ambiente, atuando como arcabouço osteocondutor. O enxerto ósseo de MOD associado à medula óssea permite a formação de um tecido ósseo que confere ao segmento operado maior resistência mecânica em comparação aos segmentos adjacentes. Os resultados permitem concluir que a associação destes compostos pode ser utilizada com sucesso como agente promotor da união vertebral dorsolateral lombar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Feighan J.E., Stevenson S., Emery S.E.: Biologic and Biomechanic Evaluation of Posterior Lumbar Fusion in the Rabbit – The Effect of Fixation Rigidity. *Spine*.20: 1561-1567, 1995.
2. Curylo L.J., Johnstone B., Petersilge C. A., Janicki J. A., Yoo J.U.: Augmentation of Spinal Arthrodesis With Autologous Bone Marrow in a Rabbit Posterolateral Spine Fusion Model. *Spine*. 24: 434-49, 1999.
3. Cook S. D., Dalton J. E., Prewett A. B., Whitecloud III, T. S. *In Vivo* Evaluation of Demineralized Bone Matrix as a Bone Graft Substitute for Posterior Spinal Fusion. *Spine*. 20: 877-886, 1995.
4. Martin G. J., Boden S. D., Titus L., Scarborough N. L.: New Formulation of Demineralized Bone Matrix as a More Effective Graft Alternative in Experimental Posterolateral Lumbar Spine Arthrodesis. *Spine*. 24: 637-645, 1999.
5. Guizzard S., Silvestre M. D., Scandroglio R., Ruggeri A., Savini R.: Implants of Heterologous Demineralized Bone Matrix for Induction of Posterior Spinal Fusion in Rats. *Spine*. 17: 701-707, 1992.
6. Morone, M. A.; Boden, S. D. Experimental Posterolateral Lumbar Spinal Fusion With a Demineralized Bone Matrix Gel. *Spine*. 23: 159-167, 1998.
7. Damien C. J., Parsons J. R.: Bone graft and bone graft substitutes. A review of current technology and application. *Journal of Applied Biomaterials*. 2:187-208, 1991.
8. Helm G. A., Dayoub H., Jane J.: A. Bone graft substitutes for the promotion of spinal arthrodesis. *Neurosurg. Focus*. 10: 1-5, 2001.
9. Frenkel S. R., Moskovich R., Spivak J., Zhang Z., Prewett A. B.: Demineralized Bone Matrix. *Spine*. 18: 1634-39, 1993.
10. Maddox E., Zhan M., Mundy G. R., Drohan W. N., Burgess W. H.: Optimizing human demineralized bone matrix for clinical application. *Tissue Eng*. 6: 441-448, 2000.

11. Wilson J. W., Rhinelander F. W., Stewart C. L.: Vascularization of cancellous chip bone grafts. *Am J Vet Res.* 46: 1691-1699, 1985.
12. Boden S. D., Schimandle J. H., Hutton W. C.: An Experimental Lumbar Intertransverse Process Spinal Fusion Model. Radiographic, Histologic, and Biomechanical Healing Characteristics. *Spine.* 20: 412-423, 1995.
13. Grauer, N. J.; Patel, T. C.; Erulkar, J. S.; Troiano, N. W.; Panjabi, M. M.; Friedlaender, G. E. 2000 Young Investigator Research Award Winner. Evaluation of OP-1 as a Graft Substitute for Intertransverse Process Lumbar Fusion. *Spine,* 26: 127-133, 2001.
14. Tiedeman, J. J., Garvin, K. L., Kile, T. A., Connolly, J. F.: The role of a composite, demineralized bone matrix and bone marrow in the treatment of osseous defects. *Orthopedics.* 18: 1153-1158, 1995.
15. Gebhart M., Lane J.: A radiographical and biomechanical study of demineralized bone matrix implanted into a bone defect of rat femurs with and without bone marrow. *Acta Orthop Belg.* 57: 130-143, 1991.
16. Ishikawa S., Shin H. D., Bowen J. R., Cummings R. J.: Is It Necessary to Decorticate Segmentally Instrumented Spine to Achieve Fusion? *Spine.* 19: 1686-1690, 1994.
17. Wittbjer J., Palmer B., Rohlin M., Thorngren K.: Osteogenetic Activity in Composite Grafts of Demineralized Compact Bone and Marrow. *Clinical Orthopedics and Related Research.* 173: 229-38, 1983.
18. Barros S. V. S. G., Del Carlo R. J., Vilorio M. I., Galvão S. R., Filho A. M.: Oliveira D. R. Auto-enxerto percutâneo de medula óssea em coelhos. II. Reparação de Falhas Segmentares Produzidas no Rádio de Coelhos. *Ciência Rural.* 23: 1013-1018, 2001.
19. Kalfas I. H.: Principles of bone healing. *Neurosurg. Focus.* 10: 1-4, 2001.

Quadro 1. Resultado dos testes biomecânicos realizados na área de enxertia (vértebras tratadas) e nos processos transversos adjacentes (vértebras controle). Resultados dos testes por palpação manual e radiográfico. Semanas 5, 7 e 9

ANIMAL	SEMANAS	RADIOGRAFIA	PALPAÇÃO	Teste Biomecânico					
				Vértebras tratadas			Vértebras Controle		
				Força Máxima	Força Limite*	Índice de Rigidez	Força Máxima	Força Limite*	Índice de Rigidez
01	5	F (3)	F	-	-	-	-	-	-
02	5	F (3)	F	-	-	-	-	-	-
03	5	NF (2)	F	-	-	-	-	-	-
04	5	NF (3)	F	-	-	-	-	-	-
05	5	NF (2)	F	325,8	202,65	1013,25	187,5	32,55	101,71
06	5	F (4)	F	322,5	201,75	775,96	282,1	33,24	85,23
07	5	NF (2)	NF	260,4	238,39	744,98	129,3	11,295	125,5
08	5	F (4)	F	330	219,9	1099,5	130,5	124,65	415,5
09	7	F (4)	F	-	-	-	-	-	-
10	7	F (4)	F	-	-	-	-	-	-
11	7	NF (3)	NF	-	-	-	-	-	-
12	7	F (4)	F	-	-	-	-	-	-
13	7	F (4)	F	342,3	213,9	972,27	180,4	140,02	388,9
14	7	NF (2)	NF	301,6	222,94	796,23	206,3	133,95	326,70
15	7	NF (3)	F	330,9	190,77	733,73	197,3	178,90	662,61
16	7	F (4)	F	431,1	238,53	1084,22	229,9	156,72	602,76
17	9	F (4)	F	-	-	-	-	-	-
18	9	F (4)	F	-	-	-	-	-	-
19	9	F (4)	F	-	-	-	-	-	-
20	9	NF (3)	F	-	-	-	-	-	-
21	9	NF (3)	F	330,5	221,09	981,34	189,4	146,58	395,14
22	9	F (4)	F	319,5	223,09	531,17	220,5	195,43	574,80
23	9	F (4)	F	359,6	207,91	693,05	194,2	145,87	858,08
24	9	F(4)	F	367	#	#	202,7	#	#

F = fusão sólida; **NF** = não fusão. Escore radiográfico em parênteses.

Força máxima (N);

* Força ao limite de elasticidade (N);

Índice de rigidez (N/cm);

- animais submetidos à análise histológica.

valores não calculados devido a erro experimental.

Quadro 2. Propriedades Mecânicas da União Vertebral Dorsolateral Lombar com a utilização da Matriz Óssea Desmineralizada associada a Medula Óssea Autóloga Fresca.

Tempo (semanas)	Número de animais	Força máxima relativa*	Força ao limite de elasticidade relativa*	Índice de rigidez relativa*
5	4	1,90±0,44	8,79±6,15	6,91±206
7	4	1,72±0,15	1,44±0,19	1,96±0,50
9	4	1,71±0,13	0,82±0,46	0,70±0,35
Total	12			
		1,78±0,23	3,68±3,72	3,19±0,56

* Dados expressos pela razão entre os resultados dos níveis tratados pelo controles.

Quadro 3. Análise de variância da força ao ponto de ruptura (a) e força ao limite de elasticidade (b):

a.

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signifi.
Vértebras tratadas (VT)	1	120572.6	120572.6	70.771	0.00000
Semanas de sacrifício	2	4245.498	2122.749	1.246	0.31132
VT X Semanas	2	175.0158	87.50792	0,051	*****
Resíduo	18	30666.70	1703.706		

Coefficiente de variação = 15.524

b.

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signifi.
Vértebras tratadas (VT)	1	52486.23	52486.23	72.775	0.00000
Semanas de sacrifício	2	3876.296	1938.148	2.687	0.09522
VT X Semanas	2	147.3690	73.68448	0.102	*****
Resíduo	18	12981.85	721.2137		

Coefficiente de variação = 15.390

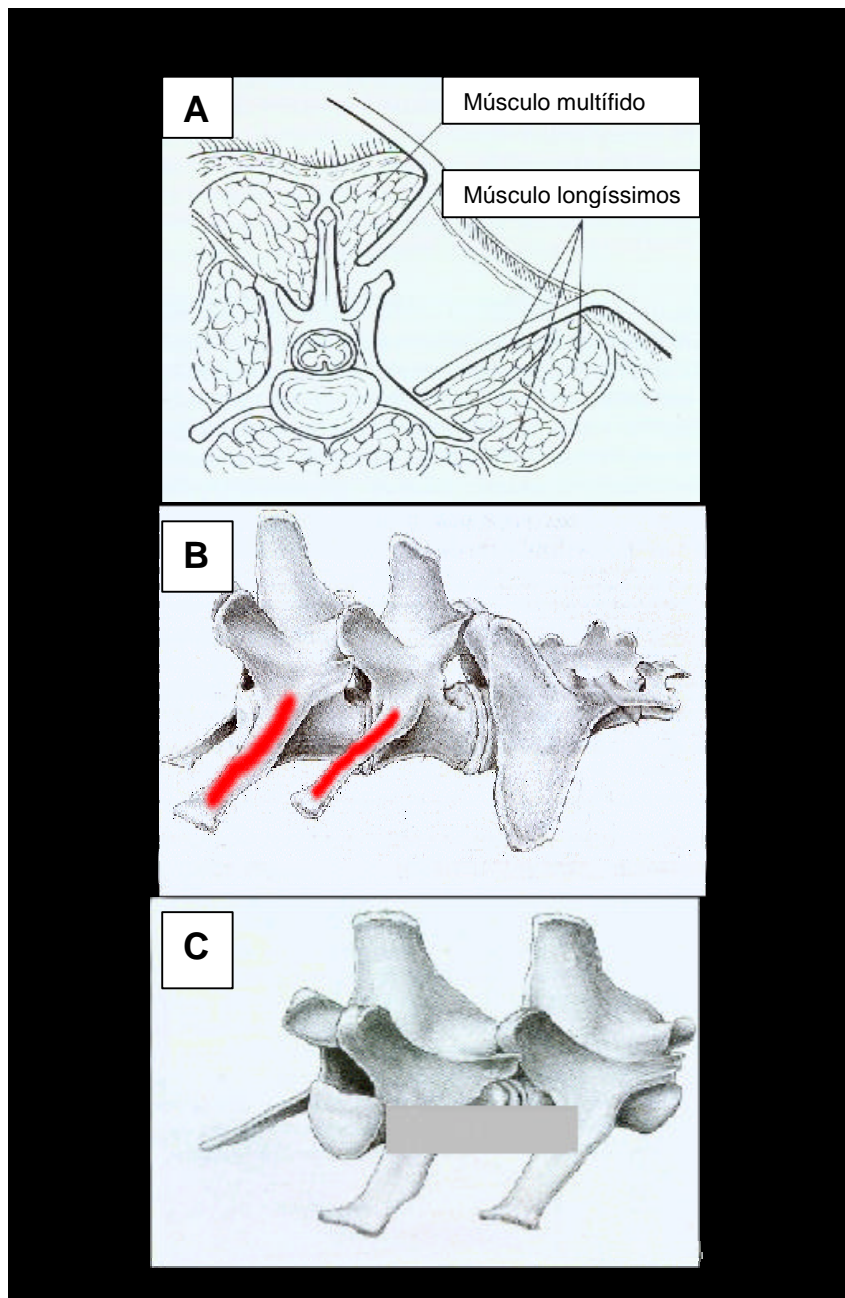


Figura 1. A. acesso cirúrgico ao processo transversal lombar. B. local de descortificação dos processos transversos (destaque em vermelho). C. deposição da matriz óssea homóloga desmineralizada sobre os processos transversos de L₅-L₆

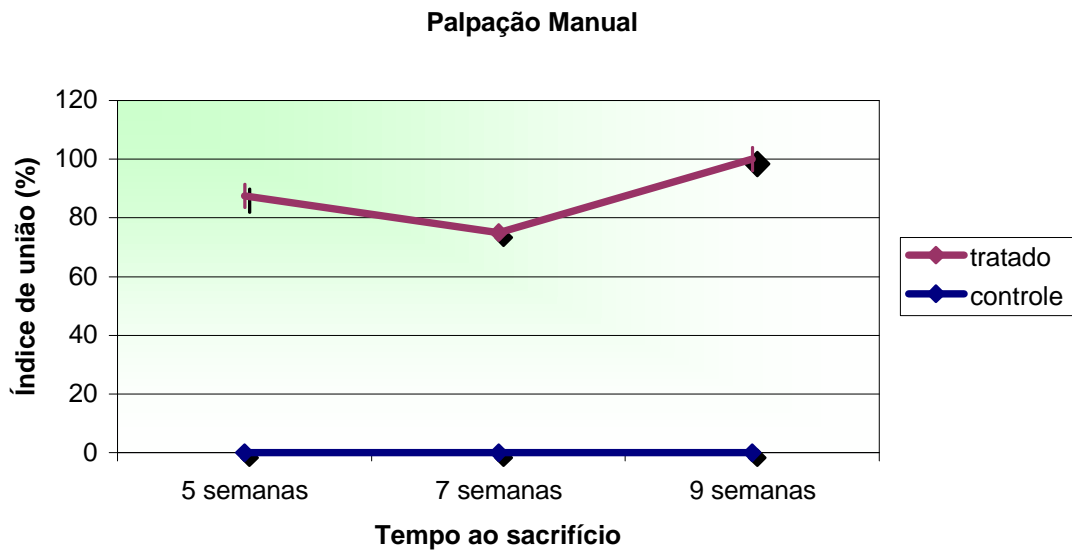


Figura 2 - Representação gráfica da porcentagem do índice de união durante palpação manual dos animais tratados com matriz óssea desmineralizada associada à medula óssea autógena e controle, em relação às diferentes semanas de sacrifício.

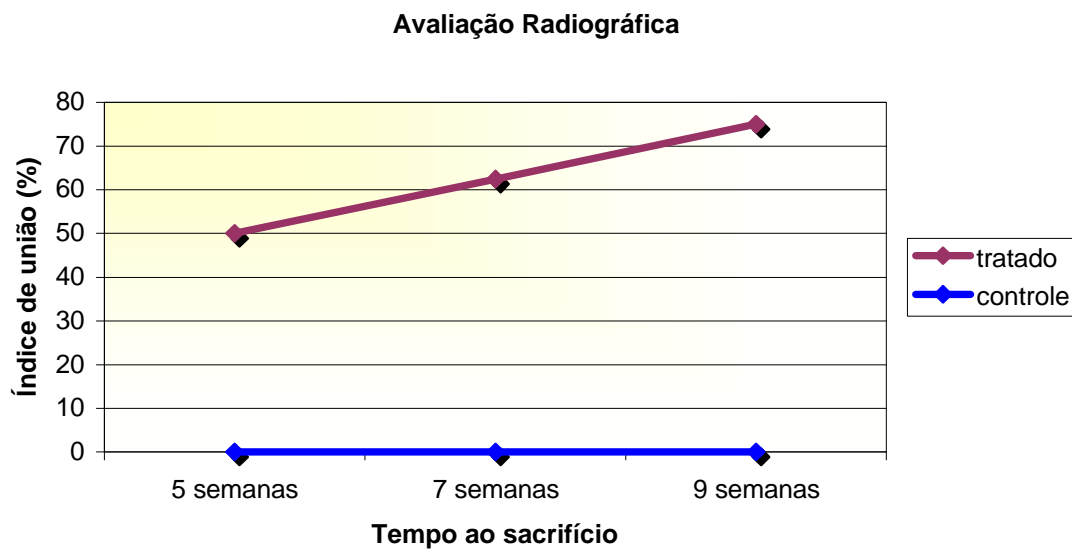


Figura 3 - Representação gráfica da porcentagem do índice de união radiográfica dos animais tratados com matriz óssea desmineralizada associada à medula óssea autógena e controle em relação às diferentes semanas de sacrifício.

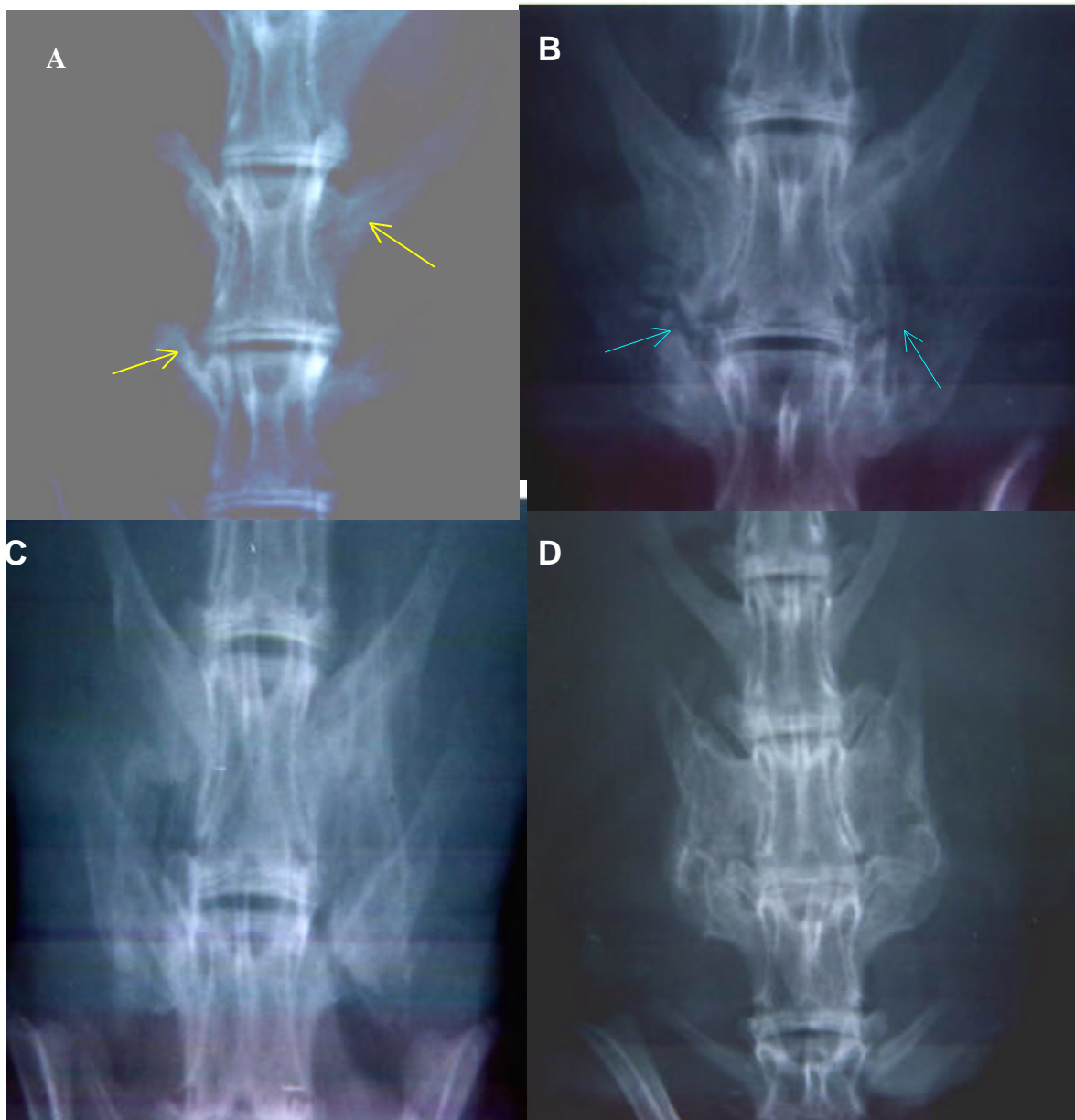


Figura 4. Aspecto radiográfico após a cirurgia. **(A)** às 9 semanas após a descortificação dos processos transversos sem a adição de enxerto. Reação periosteal (setas). **(B)** às 5 semanas após enxertia com matriz óssea homóloga desmineralizada (MOD) associada à medula óssea autógena fresca (MO). Presença de áreas radiolúcidas (setas) não formando ponte óssea entre dois processos transversos adjacentes bilateralmente, escore 2 (não fusão). **(C)** às 7 semanas após cirurgia, escore 4 (fusão). **(D)** às 9 semanas após a cirurgia, escore 4 (fusão).

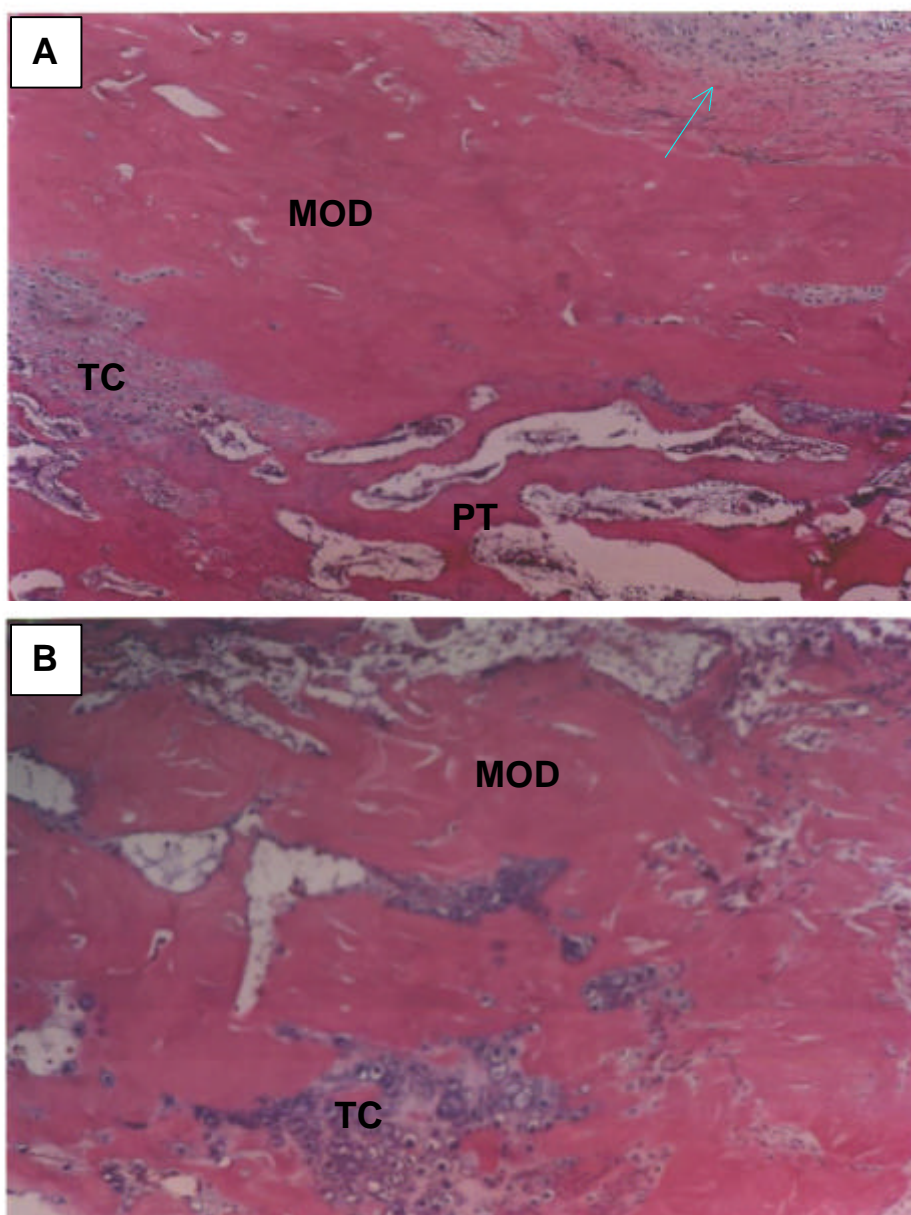


Figura 5. Fotomicrografia da região de enxertia, às 5 semanas após a cirurgia. **A.** Integração do enxerto ao processo transversal (PT). Matriz óssea desmineralizada (MOD) sendo reabsorvida e substituída por tecido condróide (TC). Formação de tecido condróide (seta) no centro da MOD. H & E. 63 X. **B.** Região central do enxerto. MOD e presença de ilhas de cartilagem (TC). H & E. 63 X.

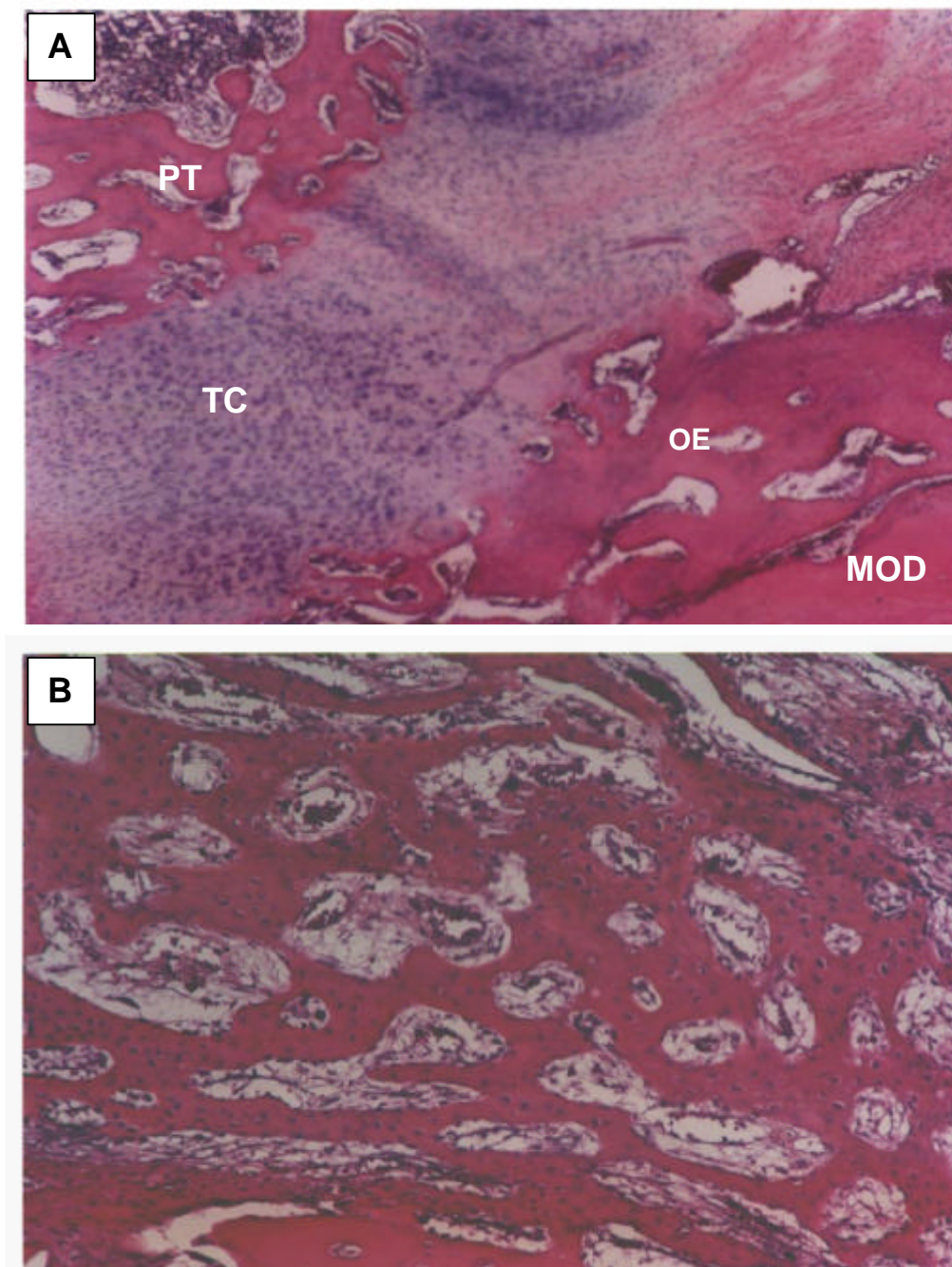


Figura 6. Fotomicrografia da região de enxertia às 7 semanas após a cirurgia. A. Ossificação endocondral (OE) substituindo a matriz óssea desmineralizada (MOD). Tecido condróide (TC) e Processo transversos (PT). H & E. 63 X. B. Região central do enxerto substituída predominantemente por tecido ósseo (TO). H & E. 63 X.

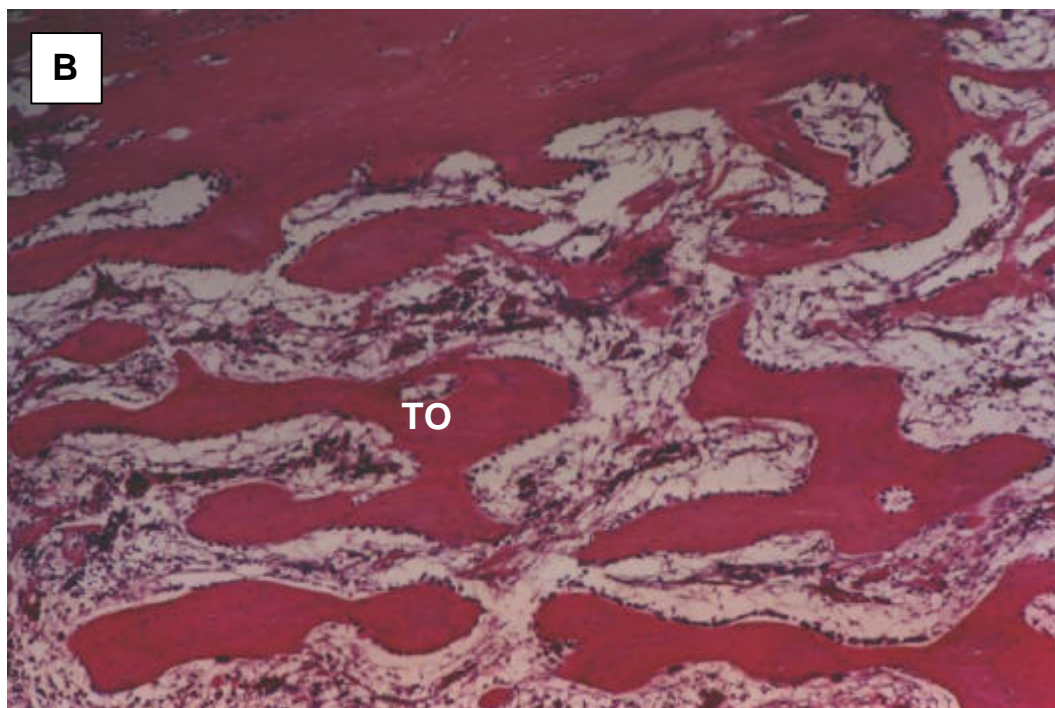
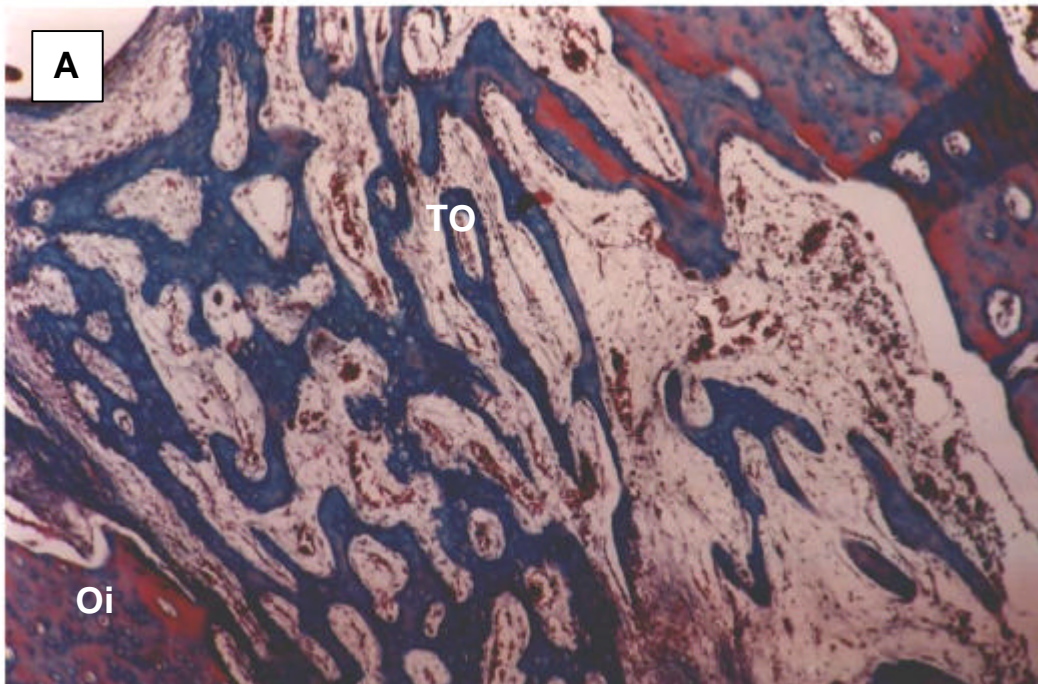


Figura 7. Fotomicrografia da região de enxertia às 9 semanas após a cirurgia. **A.** Região central do enxerto substituída predominantemente por tecido ósseo trabecular (TO) e tecido ósseo imaturo (Oi). Tricrômico de Masson. 63 X. **B.** Região central do enxerto substituída predominantemente por tecido ósseo trabecular (TO) H & E. 63 X.

5.0 – CONCLUSÕES GERAIS

Com os resultados do presente estudo foi possível concluir que a matriz óssea homóloga desmineralizada utilizada isoladamente serve como arcabouço para a formação óssea. Contudo, o baixo índice de união torna-a ineficaz na formação de uma união vertebral dorsolateral lombar. Por outro lado, sua associação com a medula óssea autógena fresca demonstrou a formação de uma massa de união homogênea em toda a extensão do enxerto. Além da ação osteoindutora sobre as células tronco da medula óssea, a matriz é responsável pela deposição óssea de forma organizada e restrita ao ambiente. Portanto, a associação destes compostos pode ser utilizada com sucesso como agente promotor da união vertebral dorsolateral lombar.