

AUTO-ENXERTO DE CRISTA ILÍACA ASSOCIADO À MEDULA ÓSSEA AUTÓGENA FRESCA NA UNIÃO VERTEBRAL DORSOLATERAL LOMBAR EM COELHOS¹

Alessandra Sayegh Arreguy Silva²
Ricardo Junqueira Del Carlo²
Damaris Rizzo²
Marlene Isabel V. Vilorio²
Paloma S. Arreguy Silva²
Fabrício Ferreira Pagani²

RESUMO

Este estudo avaliou a associação do auto-enxerto da crista ilíaca à medula óssea autógena fresca na artrodese dorsolateral das vértebras lombares L5-L6 em 36 coelhos, distribuídos em dois grupos. No Grupo 1 (G1), constituído de 12 coelhos, os processos transversos das vértebras lombares foram submetidos à descorticação bilateral. No Grupo 2 (G2), foram depositados sobre o processo transversal descorticado de 24 coelhos cerca de 2 g de auto-enxerto de crista ilíaca, associados a 2 ml de medula óssea fresca. Quatro animais do G1 e oito do G2 foram sacrificados às cinco, sete e nove semanas após o procedimento cirúrgico, permitindo a realização de análises por palpação, radiografias e histologia. Em quatro animais do G2, a cada semana de sacrifício, realizaram-se também testes biomecânicos no segmento operado. Nos animais do G1 o segmento operado apresentou mobilidade normal até a nona semana após a cirurgia, apresentando aos raios X e à análise histológica reação periosteal moderada nos processos transversos descorticados, sem evidências de formação óssea. No G2, desde as cinco semanas o segmento operado de todos os animais apresentava-se sólido à palpação. Radiograficamente, a formação de ponte óssea evoluiu com as semanas de tratamento até atingir 75% dos animais operados às nove semanas. Microscopicamente, houve precocidade na formação endocondral, observada desde a quinta semana após a cirurgia. O teste biomecânico demonstrou que as vértebras tratadas apresentaram diferença significativa entre a força ao ponto de ruptura e a força ao limite de elasticidade, quando comparadas com as vértebras adjacentes. Contudo, não houve diferença entre as semanas.

¹ Aceito para publicação em 15/05/2004

² Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. 36.570-000 Viçosa, MG.
E-mail: ricarlo@ufv.br

A medula óssea autógena fresca constitui uma opção para o aumento nas taxas de união, favorecendo formação óssea precoce e aumento da quantidade de osso formado.

Palavras-chave: artródese espinhal, auto-enxerto, medula óssea.

ABSTRACT

ILIAC CREST BONE GRAFT WITH AUTOLOGOUS FRESH BONE MARROW IN A RABBIT LUMBAR DORSOLATERAL SPINE

rabbits, distributed into two groups. In group 1 (G1), constituted of twelve rabbits, the vertebral lumbar transverse processes were submitted to bilateral decortification. In group 2 (G2), 2 g of iliac crest bone graft combined with 2 mL of fresh bone marrow were deposited on the decortified transverse process of 24 rabbits. Four G1 animals and eight G2 animals were sacrificed at five, seven and nine weeks after surgical procedure, allowing palpation, x-ray and microscopic analyses. The G2 animals (at every sacrifice week) also undertook biomechanical tests of the operated segment. The G1 animals' operated segment presented normal mobility until the ninth week after surgery, presenting X ray and microscopic periosteal reaction in the transverse decortified processes. There were no evidences of bony formation in G1. In G2, the operated segment of all the animals became solid to palpation, after five weeks. X ray analysis showed that bony bridge formation developed along the treatment weeks, reaching up to 75% on the 9th week. Microscopically, the analysis showed a precocious endochondral bone formation, observed since the fifth week after surgery, culminating in the ninth week in osteointegration and bony union. The biomechanics test demonstrated that the treated vertebrae presented significant difference between the rupture point force and elasticity limit force when compared with the adjacent vertebrae. However, there was no difference among the analyzed weeks. The results obtained in this work show that the autogenous bone marrow is an option to increase the union rates, favoring precocious bony formation and increasing the amount of formed bone.

Key words: spinal arthrodesis, autograft, bone marrow.

INTRODUÇÃO

Em humanos, a união vertebral dorsolateral lombar é o principal método de tratamento cirúrgico para a correção de instabilidade mecânica de um segmento da coluna vertebral acometido por patologias dolorosas como hérnias de disco, escoliose, estenose e doenças degenerativas e traumáticas (5).

O enxerto de osso autógeno da crista ilíaca consiste na técnica-padrão para a realização da artrodese dorsolateral lombar. Apesar dos bons resultados, é substancial a morbidade no sítio doador, devido à coleta de grandes quantidades de osso esponjoso, com o objetivo de aumentar a eficiência de união (2). Além disso, a não-união pode

acometer até 50% dos pacientes operados (7). Como resultado, substitutos para o auto-enxerto da crista ilíaca têm recebido atenção nos últimos anos (2).

A capacidade osteogênica das células derivadas da medula óssea autógena e o efeito osteoindutor *in vitro* e *in vivo* têm sido demonstrados (5, 9, 11). Sua coleta é procedimento seguro, com conseqüências desprezíveis a curto e longo prazo (1). Além disso, a medula pode oferecer grande concentração de fatores que estimulam e aumentam a produção óssea e conseqüentemente, a taxa de união (8).

De acordo com análises por tomografia computadorizada em coelhos submetidos à artrodese espinal, o volume ósseo local dos animais que receberam o enxerto de medula óssea associado ao auto-enxerto da crista ilíaca foi 30% maior, em comparação àqueles em que foi utilizado apenas o auto-enxerto da crista ilíaca (5).

Este trabalho tem como objetivo avaliar a capacidade de união vertebral, o índice de união na região da enxertia, a força e a resistência biomecânica da união, após utilização do auto-enxerto da crista ilíaca associado à medula óssea autógena fresca, na união vertebral dorsolateral lombar em coelhos, servindo de modelo experimental tanto para a medicina humana quanto veterinária.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 36 coelhos da raça Nova Zelândia Branca, com peso médio de 3,0 kg e idade de três meses, distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais. Nos 12 animais do Grupo 1 (G1), realizou-se somente a descortificação bilateral dos processos transversos das vértebras lombares L5-L6, e cada um dos 24 coelhos do G2 receberam, sobre os processos transversos descorticados, cerca de 2 g de auto-enxerto da crista ilíaca associados a 2 ml de medula óssea autógena fresca. Os animais foram identificados, alojados em gaiolas individuais e receberam ração comercial, água e feno.

O protocolo anestésico consistiu de medicação pré-anestésica com acepromazina (0,1 mg/kg, IV) e anestesia geral dissociativa com tiletamina-zolazepam (20 mg/kg, IV). Na linha de incisão foi administrado 0,75 mL de lidocaína, assim como na musculatura lombar das vértebras L5-L6 (0,5 mL de cada lado). A analgesia pós-operatória foi mantida com morfina oral (0,4 mg/kg) a cada seis horas, nos três dias seguintes ao procedimento cirúrgico. Cada coelho recebeu, ainda, ceftiofur sódico (5 mg/kg, IM) no pré-operatório e 24 e 48 horas após o procedimento cirúrgico.

Após a anestesia geral, os animais foram posicionados em decúbito ventral, com os membros pélvicos estendidos cranialmente. Foi realizada

incisão de pele de 5 cm de extensão, seguida de duas incisões paralelas na fáscia paramediana. Os músculos multífidus e longísimos foram identificados e divulsionados permitindo a exposição dos processos transversos das vértebras lombares L₅-L₆. Com o osteótomo, seus processos transversos foram descorticados até que fosse visualizada a região medular, bilateralmente, nos animais de G1 e G2.

A medula óssea autógena fresca foi coletada, durante o transoperatório, através de uma agulha de punção medular (Komiyashiki, calibre 12) inserida na crista ilíaca de todos os animais do G2. A agulha foi rotacionada até a cavidade medular, o mandril foi removido da agulha, e uma seringa esterilizada de 20 mL contendo 150 UI de heparina foi acoplada, permitindo a aspiração de 2,0 mL de medula.

O auto-enxerto foi coletado logo após a coleta da medula, através de incisão sobre a crista ilíaca, divulsionamento da musculatura adjacente e exposição óssea. Com uma goiva, foram coletados aproximadamente 2 g de osso córtico-esponjoso, que foram fragmentados e implantados juntamente com os 2 ml de medula óssea, sobre os processos transversos previamente descorticados. A musculatura divulsionada e a fáscia foram suturadas bilateralmente com catagute 4-0, com padrão de sutura do tipo Reverdin, e a pele aproximada com mononáilon 3-0, em sutura simples contínua.

Quatro coelhos do G1 e oito do G2 foram sacrificados, com sobredosagem anestésica (pentobarbital sódico), às cinco, sete e nove semanas após os procedimentos cirúrgicos, permitindo avaliações radiográficas, macro e microscópicas e testes biomecânicos.

As radiografias da coluna lombar foram realizadas na incidência dorsoventral, em todos os animais, imediatamente após o procedimento cirúrgico e ao momento do sacrifício. As análises foram baseadas na presença de massa óssea uni ou bilateralmente, caracterizando união a existência de massa óssea intertransversa bilateral sem radioluscência.

Após o sacrifício, a coluna lombar de todos os animais foi removida em bloco, sendo realizados movimentos de flexão e extensão entre L₄-L₅, L₅-L₆ e L₆-L₇, permitindo classificar como união vertebral, os segmentos L₅-L₆ sólidos.

A avaliação histológica foi realizada em todos os animais do G1 e em 12 do G2, quatro a cada semana de sacrifício. O material que unia os espaços interlaminares foi analisado com base no tipo de tecido predominante.

A avaliação da resistência à tração foi realizada em 12 animais do G2, quatro a cada semana de sacrifício, escolhidos de forma aleatória. Imediatamente antes do teste, todo o tecido muscular remanescente, os discos intervertebrais e os processos articulares foram removidos com o auxílio de um bisturi, mantendo o material de união interlaminar e a

membrana intertransversa conectados às duas vértebras unidas. Posteriormente, os corpos vertebrais de L₅ e L₆ foram perfurados perpendicularmente com pinos de aço de 3,2 mm de diâmetro e 12 cm de comprimento, posicionados paralelamente entre si, e um sistema composto de correntes foi acoplado aos pinos e ao aparelho de tração. A carga de tração foi aplicada seqüencialmente ao deslocamento, sendo os resultados registrados em Newtons, e os dados do deslocamento em milímetros. O mesmo teste foi realizado nas vértebras L₃ e L₄, constituindo o controle.

O teste foi realizado no Laboratório de Papel e Celulose (LPC) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), utilizando-se um equipamento Instron, modelo 4204, e as propriedades avaliadas foram: força máxima ao ponto de ruptura (força necessária para romper totalmente o corpo de prova, expressa em Newton ou um de seus múltiplos); força ao limite de elasticidade (força absorvida pelo corpo de prova no limite máximo de elasticidade, ou seja, até esta força o corpo de prova ainda possui capacidade de retornar à estrutura original, sem sofrer deformação, expressa em Newtons) e rigidez (habilidade do corpo de prova em resistir às deformações, em razão das tensões aplicadas, expressa em N/cm).

Também foram calculados os índices de união: força máxima nas vértebras que receberam enxerto (L₅ e L₆) pela força máxima do controle (L₃ e L₄); força ao limite de elasticidade pela força ao limite de elasticidade do controle; e razão da rigidez pela rigidez do controle.

Os dados radiográficos visando à união nos dois grupos, a avaliação por palpação e os dados histológicos foram analisados de forma descritiva, comparando-os e avaliando evidências de artrodese. Os resultados do teste de resistência à tração foram avaliados pelo teste t de Student, para comparação entre duas médias de amostras aleatórias independentes ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dois animais do G2 (8,3%) morreram imediatamente após o procedimento cirúrgico, com hemorragia e edema no local de coleta do enxerto, e outros dois apresentaram automutilação no período pós-operatório, como manifestação à dor no local de coleta do auto-enxerto córtico-esponjoso.

Na avaliação por palpação (Quadro 1), realizada à época dos sacrifícios, desde as cinco semanas o segmento operado de todos os animais do G2 apresentou-se sólido, correspondendo à união vertebral, e o tipo de tecido que preencheu o leito de enxertia demonstrou aspecto de osso. Nos segmentos adjacentes ao operado e naqueles descorticados dos

oito animais do grupo-controle (G1), a mobilidade permaneceu normal até nove semanas após a cirurgia.

QUADRO 1 - Resultado da palpação manual (PM) e da avaliação radiográfica (AR) do segmento L ₅ -L ₆ , de acordo com o tempo pós-operatório, nos animais do Grupo 2						
Características	5 semanas		7 semanas		9 semanas	
	PM	AR	PM	AR	PM	AR
Total de animais	7	7	7	7	8	8
União	7/7	4/7	7/7	4/7	8/8	6/8
Não-união	0/7	3/7	0/7	3/7	0/8	2/8
% de União	100,0	57,0	100,0	57,0	100	75,0
% de Não-união	0,0	43,0	0,0	43,0	0	25,0

Segundo Connolly (3), a medula óssea fresca aumenta a taxa de formação óssea em defeitos de ossos longos, quando associada a enxertos ósseos, e nos casos em que a quantidade de auto-enxerto é inadequada, a adição de medula óssea autógena pode aumentar a formação óssea e o sucesso da união (8). Neste trabalho, foi observada precocidade de formação óssea, cinco semanas após o procedimento cirúrgico.

A medula óssea acrescentou ao auto-enxerto células multipotenciais capazes de proliferação e diferenciação em células osteogênicas (5). Houve semelhança de resultados eficientes de artrodese quando foram comparados os deste trabalho com os observados por Boden et al. (2), corresponderam a 60% dos animais operados, com o enxerto de crista ilíaca usado de forma isolada, e foram substancialmente superiores aos 25% encontrados por Curylo et al. (5).

Estudos demonstraram, *in vitro e in vivo*, o potencial osteogênico derivado de células medulares (1, 3, 4). Pode-se inferir que as células na medula propiciaram a união vertebral, facilitando a integração dos fragmentos do enxerto e, segundo Curylo et al. (5), quando aumentaram a quantidade de osso produzido. A adição da medula providenciou maior concentração de fatores bioativos que estimularam as células no enxerto ósseo a produzir osso.

A coleta da medula óssea foi procedimento simples e seguro, e a heparinização das seringas foi importante para evitar a coagulação das amostras e a necessidade de nova coleta, em concordância com Barros et al. (1) e Curylo et al. (5).

A análise radiográfica dos animais do G2 demonstrou que, às cinco e sete semanas, quatro animais (57%) apresentaram radiopacidade na área

de enxertia unindo dois processos transversos bilateralmente, considerados união, e às nove semanas seis animais (75%) apresentaram estas evidências de união (Quadro 1 e Figura 2). Nos animais do G1, foi observada apenas reação periosteal nos processos transversos descorticados.

Na análise histológica, nos animais do G1, foi observada discreta proliferação periosteal nos processos transversos descorticados, formação óssea, com grande número de trabéculas ósseas, osso imaturo e pequeno número de ilhas cartilaginosas, caracterizando precocidade na formação óssea. O tipo de formação óssea predominante foi a endocondral, com o tecido cartilaginoso sendo rapidamente substituído por tecido ósseo. Às sete (Figura 1) e nove semanas foram observados vasos sanguíneos e formação de tecidos condróide e ósseo imaturo, evidenciando osteointegração e união óssea, com trabéculas formando pontes ósseas entre dois processos transversos adjacentes.

A precocidade da união vertebral, advinda da associação do auto-enxerto de crista ilíaca com medula óssea fresca, na coluna lombar, é relevante porque a coluna é um ambiente hostil para a artrodese, pois está constantemente sendo submetida a cargas axiais e torsionais.

A vascularização e os tecidos condróide e ósseo, no centro da região de enxertia, coincidem com os verificados por Wilson et al. (10), que afirmaram que a incorporação do enxerto ósseo está diretamente relacionada à vascularização e presença de material osteogênico no local.

Nas semanas seguintes ao sacrifício, a ossificação endocondral ocorreu predominantemente a partir da vascularização para a região do enxerto que progrediu dos processos transversos descorticados, fornecendo nutrientes, concordando com Frenkel et al. (6).

A incoerência entre os dados radiográficos e de palpação (Quadro 1) pode ser explicada pelos resultados histológicos. Houve casos em que animais, radiograficamente, foram considerados “não-união”, mas, à palpação, a área operada encontrava-se firme e sem mobilidade, sendo considerados “união” clínica. Nestes, histologicamente, as áreas radiolucidas foram representadas por tecido condróide e formação óssea imatura, significando que nem sempre os resultados radiográficos refletiram a condição clínica real do paciente.

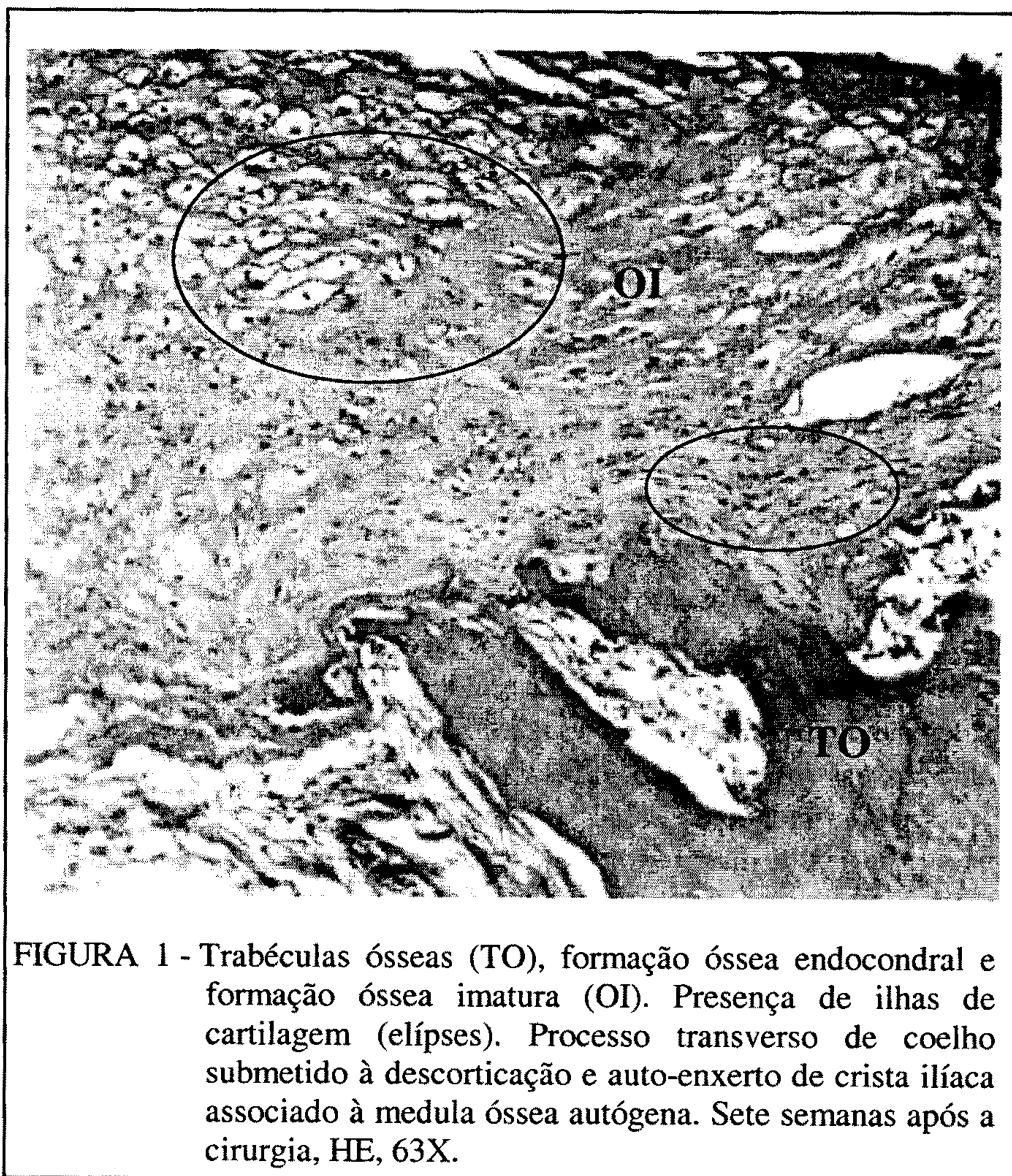


FIGURA 1 - Trabéculas ósseas (TO), formação óssea endocondral e formação óssea imatura (OI). Presença de ilhas de cartilagem (elípses). Processo transversal de coelho submetido à descorticação e auto-enxerto de crista ilíaca associado à medula óssea autógena. Sete semanas após a cirurgia, HE, 63X.

Os resultados dos testes biomecânicos e dos índices de fusão estão no Quadro 2. Na avaliação biomecânica da união lombar, os índices com resultado maior que 1 corresponderam à união. Quanto maior o índice, maior a eficiência da união.

O teste de resistência à tração demonstrou que as vértebras tratadas com o auto-enxerto associado à 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), à exceção da força limite às sete semanas. Contudo, não houve diferença significativa entre as semanas. Pode-se inferir que a precocidade de formação óssea induzida pela medula não permitiu comportamento diferente entre as semanas, durante os testes.

QUADRO 2 - Médias dos resultados dos testes de resistência à tração realizados nas vértebras L ₅ -L ₆ , tratadas (VT), em relação às vértebras L ₃ -L ₄ , não-tratadas (NT), de acordo com o tempo									
Testes de tração									
Semanas	Força máxima		In-dice	Força limite		In-dice	Rigidez		In-dice
	VT	NT	T/N	VT	NT	T/N	VT	NT	T/N
Cinco	298,6 ^{a#}	220,6 ^{b*}	1,3	167,3 ^{c+}	130,4 ^{e-}	1,3	744,3 ^{g=}	592,6 ^{i\$}	1,2
Sete	305,1 ^{a#}	242,9 ^{b*}	1,2	155,5 ^{c+}	131,0 ^{e-}	1,2	785,9 ^{g=}	672,5 ^{j\$}	1,1
Nove	329,0 ^{a#}	240,2 ^{b*}	1,3	228,2 ^{d+}	225,9 ^{f+}	1,0	862,2 ^{h=}	715,3 ^{j\$}	1,2

Em cada variável, médias seguidas pela mesma letra (na coluna) ou símbolo (na linha) não diferem entre si (P < 0,05).

O índice de rigidez também mostrou diferença entre as vértebras L₅ e L₆, comparadas com L₃ e L₄; o maior indicou que as vértebras que receberam o auto-enxerto ósseo e a medula suportaram determinada força e deformaram menos que as vértebras-controle submetidas à mesma força, à exceção das sete semanas. Em relação à 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.

O índice de rigidez menor ou igual a 1 indica que não houve ganho ou aumento da resistência deste material, ao contrário daqueles maiores que 1. No total, à exceção da sétima semana, em todas as outras os segmentos tratados mostraram maior resistência biomecânica, quando comparados aos não-tratados. Quanto maior o número, maior a diferença entre os segmentos tratados e os não-tratados, indicando que o tecido ósseo predominantemente encontrado nos segmentos tratados foi o responsável pela maior resistência, em comparação aos segmentos-controle. Quanto aos índices de força limite e rigidez 1,0 e 0,9, eles representaram os casos de não-união descritos pela literatura (2, 5), mesmo com a utilização de procedimentos de enxertia.

Foi observada correlação entre os testes de resistência à tração, resistência e rigidez e a palpação manual, massa sólida estável, evidenciando união vertebral. A falta de correlação entre a avaliação radiográfica e os resultados biomecânicos demonstram que a radiografia não deve ser utilizada como critério único de análise.

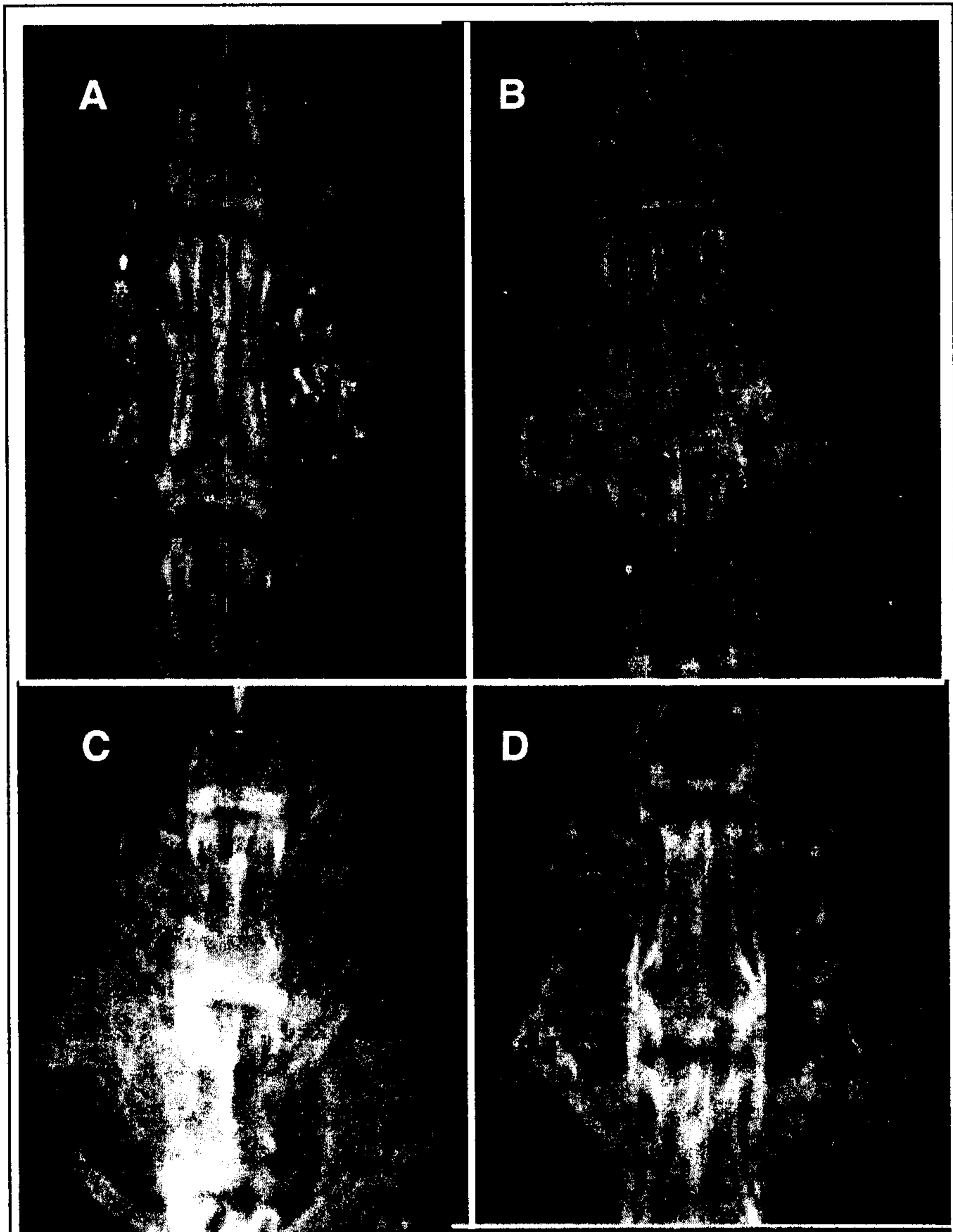


FIGURA 2 - Aspectos radiográficos da área de enxertia: (A) após a cirurgia, (B) às cinco semanas, (C) às sete e (D) às nove (união óssea bilateral). Coelhos diferentes submetidos a descorticação do processo transversos de L₅ e L₆ e auto-enxerto de crista ilíaca associado à medula óssea autógena.

CONCLUSÃO

1) A medula óssea autógena fresca constitui uma opção para o aumento das taxas de artrodese vertebral, de forma precoce, segura e econômica, conforme demonstrado experimentalmente em coelhos.

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG, pelo financiamento, e ao CNPq, pela concessão de bolsa de produtividade em pesquisa ao coordenador do projeto.

REFERÊNCIAS

1. BARROS, S.V.G.; DEL CARLO, R.J. & VARGAS, M.I. Auto-enxerto percutâneo de medula óssea em coelhos. I Coleta, preparo e aplicação. *Ciência Rural*, 31(6):1013-18, 2001.
2. 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(4):412-20, 1995.
3. CONNOLLY, J.F. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 313:8-18, 1995.
4. CONNOLLY, J.F.; GUSE, R. & TIEDEMAN, J. Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunions. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 266:259-70, 1991.
5. CURYLO, L.J.; JOHNSTONE, B. & PETERSILGE, C.A. Augmentation of spinal arthrodesis with autologous bone marrow in a rabbit posterolateral spine fusion model. *Spine*, 24(5):434-39, 1999.
6. FRENKEL, S.R.; MOSKOVICH R. & SPIVAK J. Demineralized bone matrix. *Spine*, 18(12):1634-39, 1993.
7. LORENZ, M.; ZINDRICK, M. & SCHWAEGLER, P.A. Comparison of single level fusions with and without Hardware. *Spine*, 16 (suppl.):455-58, 1991.
8. LUKASZ, J.C ; JOHNSTONE, B. & PETERSILGE, C.A. Augmentation of spinal arthrodesis with autologous bone marrow in a rabbit posterolateral spine fusion model. *Spine*, 24(5):434-39, 1999.
9. URIST, M.R.; SILVERMAN, B.F. & BURNING, K. The bone induction principle. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 53:243-83, 1967.
10. WILSON, J.W.; RHINELANDER, F.W. & STEWART, C.L. Vascularization of cancellous chip bone grafts. *American Journal Veterinary Research*, 46(3):1691-99, 1985.
11. WITTBGER, J.; PALMER, B. & ROHLIM, M. Osteogenic activity in composite grafts of demineralized compact bone and marrow. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 173:229-38, 1983.