

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**VÉRTEBRA COCCÍGEA COMO ALTERNATIVA A  
AUTOENXERTOS CORTICOESPONJOSOS  
TRADICIONAIS - ANÁLISE DE RESISTÊNCIA E  
ESTRUTURA**

**TESE DE DOUTORADO**

**Gabriele Maria Callegaro Serafini**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2015**

**VÉRTEBRA COCCÍGEA COMO ALTERNATIVA A  
AUTOENXERTOS CORTICOESPONJOSOS TRADICIONAIS -  
ANÁLISE DE RESISTÊNCIA E ESTRUTURA**

Por

**Gabriele Maria Callegaro Serafini**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Cirurgia e Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do Grau de  
**Doutora em Medicina Veterinária**

Orientador: Prof. Dr. Ney Luis Pippi

Santa Maria, RS, Brasil  
2015

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**


A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado

**VÉRTEBRA COCCÍGEA COMO ALTERNATIVA A  
AUTOENXERTOS CORTICOESPONJOSOS TRADICIONAIS -  
ANÁLISE DE RESISTÊNCIA E ESTRUTURA**

elaborada por  
**Gabriele Maria Callegaro Serafini**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutora em Medicina Veterinária**

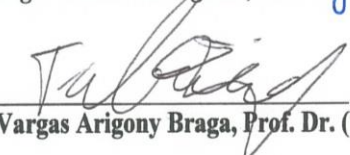
**Comissão Examinadora:**

  
\_\_\_\_\_  
**Ney Luis Pippi, Prof. Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
**Maurício Veloso Brun, Prof. Dr. (UFSM)**

  
\_\_\_\_\_  
**Daniel Curvello de Mendonça Müller, Prof. Dr. (UFSM)**

  
\_\_\_\_\_  
**Eduardo Santiago Ventura de Aguiar, Prof. Dr. (UFPEL)**

  
\_\_\_\_\_  
**Fabrício de Vargas Arigony Braga, Prof. Dr. (UFPEL)**

Santa Maria, 02 de outubro de 2015

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família pelo apoio constante.

À estagiária Roberta Libardoni e ao colega Renato Libardoni pelo auxílio nas coletas das amostras, pela amizade e dedicação.

Ao meu orientador Ney Luis Pippi pela oportunidade em ser sua orientada, apoio às minhas escolhas e atenção despendida. Sempre será exemplo de sabedoria, competência e dedicação dentro da Medicina Veterinária.

Ao meu co-orientador Daniel Müller pela amizade, conselhos e ensinamentos passados ao longo da minha formação.

Ao professor Maurício Veloso Brun pela boa vontade em ajudar nas dúvidas encontradas durante este período.

À Bruna Portolan pelo auxílio na análise estatística.

Aos estagiários e pós-graduandos do setor de Patologia Veterinária da instituição pela disposição e comprometimento.

Aos colegas do Laboratório de Cirurgia Experimental pela amizade e ótima convivência que tivemos no decorrer desses anos.

Ao professor Carlos Jesus Haygert pela disponibilidade na realização do exame de tomografia computadorizada.

Ao professor Carlos Roberto Cauduro por viabilizar os ensaios biomecânicos e ao seu estagiário Igor Zanella pelo comprometimento e operação da máquina durante os ensaios.

## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### VÉRTEBRA COCCÍGEA COMO ALTERNATIVA A AUTOENXERTOS CORTICOESPONJOSOS TRADICIONAIS - ANÁLISE DE RESISTÊNCIA E ESTRUTURA

AUTORA: GABRIELE MARIA CALLEGARO SERAFINI  
ORIENTADOR: NEY LUIS PIPPI  
Santa Maria, 02 de outubro de 2015.

Fraturas com perda de segmento ósseo total muitas vezes requerem o uso de enxerto para preencher o defeito e restaurar o comprimento normal do osso acometido. Entretanto, a indisponibilidade de banco de ossos e a presença de autoenxertos com dimensões insuficientes são contratempos temidos na escolha deste recurso. Devido a isso, este trabalho teve como objetivo investigar as características estruturais da vértebra coccígea sugerindo-a como uma alternativa de autoenxerto corticoesponjoso de segmento ósseo total. Para tal, foram utilizados oito cães *ex vivo*, sendo cada cão doador de duas amostras de cada um dos seguintes grupos de enxertos ósseos: porção crânio-dorsal da asa do ílio direita e esquerda (grupo A), fragmento da 10ª costela direita e esquerda (grupo C), 4ª e 5ª vértebras coccígeas (grupo Co) e porção diafisária da tíbia direita e esquerda (grupo T), resultando em 16 amostras por grupo. Tais enxertos foram submetidos a exame de tomografia computadorizada para mensuração de osso esponjoso, osso cortical e espessura óssea e teste biomecânico para avaliação da resistência. As vértebras coccígeas apresentaram características desejáveis em um enxerto corticoesponjoso de segmento ósseo total, pois apresentaram significativa camada de osso esponjoso, elevada resistência compressiva e adequada espessura óssea.

**Palavras-chave:** fraturas, enxerto, cicatrização, ortopedia, cães.

## **ABSTRACT**

Doctoral Thesis  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria

### **Coccygeal vertebra as an alternative to tradicional cortical-cancellous autograft - resistance and structure analysis**

**AUTHOR: GABRIELE MARIA CALLEGARO SERAFINI**

**ADVISER: NEY LUIS PIPPI**

Santa Maria, october 02, 2015.

Fractures with loss of total bone segment often require the use of the graft to fill the defect and restore the normal length of the affected bone. However, the unavailability of bone bank and the presence of autografts with insufficient dimensions are one of the biggest issues in choosing this technique. Because of this, this study aimed to investigate the structural characteristics of coccygeal vertebra suggesting it as an alternative of cortical-cancellous autograft of total bone segment. To this end, eight *ex vivo* dogs were used, with each dog donor of two samples of each bone grafts following groups: cranial-dorsal portion of the right and left iliac crest (Group A), 10<sup>th</sup> fragment of the right and left ribs (Group C), 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> coccygeal vertebrae (Group Co) and diaphyseal portion of the right and left tibia (Group T), resulting in 16 samples per group. Such grafts underwent computed tomography for measurement of cancellous bone, cortical bone and bone thickness and biomechanical test to evaluate the resistance. The coccygeal vertebrae showed desirable characteristics in a cortical-cancellous graft of total bone segment, because it presented significant cancellous bone amount, high compressive strength and adequate bone thickness.

**Keywords:** fracture, graft, healing, orthopedics, dogs.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2

**Figura 1** - CTM derivadas do tecido adiposo de coelhos. (A) ADSCs da bolsa adiposa interescapular aos 21 dias de cultivo em laboratório. (B) ADSCs do tecido adiposo perirrenal aos 21 dias de cultivo .....48

### CAPÍTULO 3

**Figura 1** - A – Segmentos ósseos posicionados para exame de tomografia computadorizada. B – Secção transversal de cada segmento ósseo. Observar contorno em tom rosa demonstrando a espessura do osso cortical; e em tom azulado a de osso esponjoso (exceto na tíbia). C – Demonstração da mensuração da espessura de osso cortical em quatro pontos distintos e de osso esponjoso em duas direções. D – Asa do ílio apresentando-se com aproximadamente 75% da área de uma coroa circular, correspondente a área de osso cortical .....64

### DISCUSSÃO

**Figura 1** – Demonstração da aposição da vértebra coccígea com o rádio de um mesmo cão. A aposição entre essas extremidades ósseas é próxima de 100% (A). Demonstração da aposição da vértebra coccígea com a tíbia de um mesmo cão. A aposição entre essas extremidades ósseas é próxima de 70% (B) .....70

**Figura 2** – Gráfico da força x deformação, após ensaio biomecânico, da tíbia, costela, vértebra coccígea e asa do ílio, respectivamente. Observar que no gráfico da vértebra coccígea e da asa do ílio, que possuem valores superiores de osso esponjoso, o patamar do pico de força é mantido por mais tempo até iniciar o declínio. Tal evento deve-se à porosidade do osso esponjoso, pois após atingir o ponto de queiscência, as trabéculas ósseas vão sofrendo fratura e colapso de forma gradativa .....71

## LISTA DE APÊNDICES

**Apêndice A** - Percentual de osso esponjoso e osso cortical de cada segmento ósseo. A letra “D” refere-se aos segmentos do lado direito do cão e da 4ª vértebra coccígea e a letra “E” refere-se aos segmentos do lado esquerdo do cão e da 5ª vértebra coccígea ..... 77

**Apêndice B** - Valores do ensaio biomecânico de cada segmento ósseo. A letra “D” refere-se aos segmentos do lado direito do cão e da 4ª vértebra coccígea e a letra “E” refere-se aos segmentos do lado esquerdo do cão e da 5ª vértebra coccígea ..... 78



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	10
1.1 Justificativa .....	15
1.2 Objetivos .....	15
1.2.1 Geral .....	15
1.2.2 Específicos .....	16
<b>2 CAPÍTULO 1 – ATUALIDADES EM ENXERTIA ÓSSEA – REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	Erro! Indicador não definido.7
<b>3 CAPÍTULO 2 - CÉLULAS-TRONCO ADULTAS NA CICATRIZAÇÃO DE FRATURAS E ENXERTOS ÓSSEOS</b> .....	29
<b>4 CAPÍTULO 3 - VÉRTEBRA COCCÍGEA COMO ALTERNATIVA A AUTOENXERTIA ÓSSEA TRADICIONAL - AVALIAÇÃO TOMOGRÁFICA E BIOMECÂNICA EM CÃES <i>EX VIVOS</i></b> .....	49
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	65
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	72
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	73
<b>8 APÊNDICES</b> .....	77

# 1. INTRODUÇÃO

Muitos tratamentos ortopédicos têm sido beneficiados significativamente com o uso de enxertos ósseos. Devido a suas características e possibilidades de aplicação, representam um dos mais duradouros métodos de abordagem reconstrutiva do sistema musculoesquelético, estando entre os procedimentos mais utilizados em fraturas (CASTANIA, 2002).

Uma das grandes vantagens dos enxertos ósseos é a sua versatilidade, pois podem ser adquiridos na forma esponjosa, cortical e corticoesponjosa, assim como sua obtenção pode se dar através do próprio animal, de outro da mesma espécie ou de uma espécie diferente (SANTOS e RAHAL, 2004). Cada tipo de enxerto apresenta características e funções próprias, podendo ser escolhido conforme a necessidade de cada situação (MILLIS e MARTINEZ, 2007).

De modo geral, os enxertos esponjosos são utilizados como autoenxertos frescos (PIERMATTEI, et al., 2009) e são excelentes adjuvantes da cicatrização, pois apresentam capacidade de osteogênese, osteoindução e osteocondução. Em função disso, são indicados para tratamento de união retardada e a não união óssea, preenchimento de defeitos corticais e artrodeses (SANTOS e RAHAL, 2004).

Os enxertos corticais, geralmente, são utilizados como aloenxertos conservados (PIERMATTEI et al., 2009) ou alternativamente, como autoenxertos quando coletado um segmento ulnar (DENNY e BUTTERWORTH, 2006a). Sua principal função é a osteocondução e suporte estrutural, sendo a osteoindução possível se técnicas de preparação preservarem as proteínas morfogenéticas ósseas ou outros fatores de crescimento derivados do osso cortical (MILLIS e MARTINEZ, 2007). Dessa forma, são indicados para a substituição de segmentos ósseos totais (JOHNSON, 2008), como em fraturas com segmento ósseo comprometido, não união atrófica e após remoção de neoplasia óssea para preservação do membro (PIERMATTEI et al., 2009).

Os enxertos corticoesponjosos envolvem a combinação de ambos os enxertos relatados (PIERMATTEI et al., 2009), pois apresentam ação osteogênica, osteocondutiva, osteoindutiva (BAUER e MUSCHLER, 2000) e suporte estrutural (DENNY e BUTTERWORTH, 2006a). As costelas e a porção craniodorsal da espinha ilíaca são os locais doadores mais comuns, podendo ser utilizados como autoenxertos a fresco ou como aloenxertos conservados (PIERMATTEI et al., 2009).

Devido a estrutura anatômica da costela, ela oferece a vantagem de ser utilizada em falhas de sínfise mandibular (GOMES, 2008) e rinoplastias (SANTOS JÚNIOR et al., 2008). A asa do ílio pode ser utilizada em forma de lascas no interior das articulações para auxiliar na estabilização em artrodeses, assim como em forma de bloco para preenchimento de defeitos corticais (STEVENSON, 1996), como em falhas mandibulares (GOMES, 2008). Entretanto, devido ao formato curvado tanto da costela quanto da asa do ílio a aplicação das mesmas não é recomendada em sítios receptores que suportem peso (YEH et al., 1991).

A incorporação dos autoenxertos esponjosos é rápida e completa, pois a revascularização é bastante precoce e a osteogênese muito ativa. Entretanto, na incorporação dos enxertos corticais são necessários vários meses ou anos e quanto maior forem suas dimensões, mais incompleta será a incorporação (DIAS et al., 2008).

Dessa forma, a cicatrização de um enxerto ósseo cortical passa por um período crítico durante a incorporação, pois o enxerto é gradativamente absorvido para posterior formação de osso novo, tornando-se fraco e vulnerável à ruptura (MILLIS e MARTINEZ, 2007). Nesse sentido, lançar mão de adjuvantes que acelerem o processo de cicatrização para diminuir o risco de fratura é extremamente benéfico. Com isso, a aplicação de células-tronco mesenquimais (CTM) em enxertos ósseos vem sendo utilizada justamente com esse intuito, pois além de sua capacidade em se diferenciar em células ósseas, também são capazes de recrutar fatores de crescimento (FCs) ao foco de fratura, estimulando, assim, o recrutamento adicional de outras CTM presentes no tecido ósseo e potencializando o processo de reparo ósseo (PAGLIOSA e ALVES, 2007).

Os ossos longos são submetidos a forças que podem ser fisiológicas ou não. As fisiológicas são produzidas pela sustentação do peso, atividade física e contração muscular. De modo geral, não excedem o limite de resistência óssea e por isso não determinam fraturas, exceto em casos excepcionais. Já as forças não fisiológicas são geradas durante atropelamentos ou quedas, por exemplo. Facilmente excedem a resistência limite do osso, levando a fraturas. Essas forças são divididas em quatro tipos básicos (compressão, flexão, tensão e torção) que afetam o osso de maneira diferente, desenvolvendo cada uma delas um padrão de fratura característico (HULSE e HYMAN, 2007).

As forças compressivas são aplicadas axialmente aos ossos, resultando em fraturas oblíquas. A flexão provoca forças de tensão em um lado do osso e de compressão no lado oposto. Dependendo da intensidade da carga axial coincidente com a força de flexão, a fratura inicia com uma fissura transversa no lado de tensão e se propaga como fratura oblíqua no lado de compressão. As forças de torção resultam em uma fratura em espiral e a força de tensão

resulta em fratura transversa, mais frequentemente como uma fratura por avulsão de uma porção do osso onde um tendão ou ligamento está inserido (JOHNSON, 2008).

A velocidade da força também determina o tipo de fratura e a gravidade de lesões nos tecidos moles. As forças de baixa velocidade, ou de aplicação de carga, resultam em fraturas únicas com pouca energia dissipada para os tecidos moles. No entanto, as forças de alta velocidade resultam em fraturas cominutivas com a propagação de alta energia dissipada através da fratura e lesão nos tecidos moles adjacentes. A aplicação repetitiva de cargas pode resultar em fraturas por estresse, em que as taxas de lesão óssea superam a resposta de produção de tecido ósseo (JOHNSON, 2008).

Em situações clínicas, geralmente, essas forças apresentam-se combinadas, sendo importante reconhecer quais delas são predominantes para determinar um plano apropriado de tratamento (DENNY e BUTTERWORTH, 2006b). Quando a força é aplicada a um objeto, este se deforma com relação ao seu estado original. A resposta mecânica do objeto a esta força pode ser quantitativamente avaliada pela obtenção da curva de força-deformação ou carga-deformação. Quando a aplicação da carga é de tal ordem, que quando removida o objeto reassume sua posição e conformação originais, chama-se deformação elástica. Se uma carga for aplicada até o ponto em que o objeto não é mais capaz de reverter à sua forma original, este é o ponto de quiescência. Já quando a carga vai além desse ponto e o objeto sofre deformação permanente esta é chamada de deformação plástica. Finalmente, com continuidade da aplicação da carga na região plástica tem-se o ponto de fratura (SCHWARZ, 1996).

A deformação do osso durante a locomoção varia de 0,04-0,3%, raramente excedendo 0,1%. No entanto, o comportamento das fraturas depende em grande parte das propriedades materiais do tecido ósseo, que podem ser influenciadas por diferentes fatores, como a densidade óssea, a orientação das fibras colágenas, a porosidade, o conteúdo mineral, a idade do animal e a sua conformação anatômica (DALMOLIN et al., 2013).

Os testes biomecânicos têm se tornado cada vez mais comuns na avaliação da rigidez dos segmentos ósseos (SALBEGO, 2010). Tais ensaios têm a finalidade de determinar as propriedades estruturais dos diversos tipos de materiais. Basicamente, podem ser divididos em ensaios destrutivos e não-destrutivos. O primeiro promove a ruptura ou a inutilização do material e, nessa categoria, estão incluídos os testes de tração, impacto, torção, compressão, flexão e fadiga. Os ensaios não destrutivos incluem os testes de ultrassom, *magnoflux*, radiografias e outros que podem determinar as propriedades físicas ou mecânicas do material analisado (SOUZA, 1974).

O tipo de ensaio biomecânico empregado depende do tipo de material a ser utilizado, da finalidade a que se destina, dos tipos de esforços aos quais será submetido e das propriedades mecânicas a serem medidas. No caso dos enxertos ósseos, um dos testes mais importantes a ser realizado é o de compressão axial (CASTANIA, 2002).

Sob carga compressiva, um objeto tende a encurtar e seu diâmetro a aumentar. As fraturas produzidas por carga puramente compressiva são ocasionalmente observadas como fraturas impactadas da região metafisária dos ossos longos, parcialmente em animais imaturos e nas vértebras (SCHWARZ, 1996).

Em termos de resistência biomecânica entre o osso cortical e osso esponjoso, salienta-se que a porosidade relativa e as dimensões estruturais de cada um são as diferenças mais importantes. Enquanto o osso cortical tem de 5 a 30% de porosidade, o esponjoso varia de 30 a 90% (HULSE e HYMAN, 2007). Tal característica, confere ao osso cortical maior rigidez, e como resultado suporta maior pressão que o osso esponjoso antes da fratura (SCHWARZ, 1996).

Muitos estudos já foram realizados, nos quais os testes de compressão auxiliaram na análise de resultados. Ente eles, o de França et al. (2002), em que os autores analisaram a segurança e a resistência mecânica de 30 corpos vertebrais, de cadáveres humanos, submetidos à vertebroplastia. Após a densitometria óssea, foram distribuídos em dois grupos A e B. Os do grupo A foram comprimidos até o segundo pico de força (Gráfico Força por Deformação), enquanto os do grupo B, até o primeiro. Injetou-se cimento acrílico no corpo vertebral por via transpedicular, observando-se seu extravasamento e a temperatura do corpo vertebral. Testou-se a resistência e comparou-se com a da própria vértebra quando íntegra. A utilização dessa técnica traz riscos às estruturas próximas, devido ao extravasamento do cimento. Quanto à temperatura, ela é segura, desde que não ocorra o extravasamento. A resistência da vértebra, após o procedimento, depende do grau do achatamento inicial. Aquelas que tiveram achatamento menor apresentaram resistência maior.

Duarte e Schaeffer (2000) realizaram testes de compressão em côndilos femorais bovinos congelados e liofilizados visando verificar se a forma de estocagem altera a resistência de tais enxertos. O grupo I foi composto por cilindros de osso liofilizado e reidratado durante uma hora e meia antes do ensaio, o grupo II foi composto por cilindros de osso congelado e posteriormente descongelado durante uma hora, e o grupo III foi composto por cilindros de osso liofilizado e reidratado no momento do ensaio. Os autores não encontraram diferença estatisticamente significativa tanto na resistência à compressão quanto na deformação.

A tomografia computadorizada (TC) é um método de diagnóstico por imagem que utiliza a radiação x e permite obter a reprodução de uma secção do corpo humano em quaisquer uns dos três planos do espaço, diferentemente das radiografias convencionais, que projetam em um só plano todas as estruturas atravessadas pelos raios-x (GARIB et al., 2007).

A TC é constituída pelo portal, também chamado de "Gantry", que é a parte do aparelho onde estão o cabeçote e os detectores de raios-x; pela mesa, na qual posiciona-se o paciente; e pelo computador, que armazena os dados coletados pelos detectores. A imagem é formada a partir dos raios-x que saem do cabeçote e são captadas pelos detectores que estão localizados do lado oposto. O cabeçote e o detector estão conectados mecanicamente, e se movem de forma sincronizada. Quando ambos fazem uma translação ou rotação em torno do paciente, as estruturas internas do corpo atenuam o feixe de raios-x de acordo com a densidade e número atômico de cada tecido e a intensidade da radiação captada pelos detectores varia de acordo com esse padrão, formando uma lista de intensidades para cada corte tomográfico. Este processo é denominado de varredura e é repetido numerosas vezes, gerando uma grande quantidade de dados que são armazenados no computador (BITTAR, 2002).

Por meio de programas específicos ela é capaz de gerar imagens tridimensionais e com cortes específicos produz imagens de tamanho real do comprimento e da espessura do rebordo ósseo residual, relacionando-os com as estruturas anatômicas críticas (AJZEN et al., 2005).

Na implantodontia, por exemplo, os enxertos ósseos são comumente utilizados para o aumento da espessura óssea em maxilas edêntulas. Como esses enxertos possuem morfologia irregular, a utilização da TC torna-se bastante pertinente na avaliação precisa do volume, pois quando são realizados cortes axiais consecutivos, a área de cada corte pode ser facilmente medida e por não existir sobreposição, o volume de cada enxerto pode ser determinado com exatidão (BITTAR, 2002).

Com o objetivo de comparar a precisão de medidas feitas em radiografias panorâmicas com as de TC, Tal e Moses (1991) realizaram medidas verticais da crista do osso alveolar até a borda superior do canal alveolar inferior em dez pacientes. Observou-se que a TC tem uma precisão maior com valores menores e mais próximos do real, entretanto, a radiografia panorâmica é suficientemente precisa para fins clínicos de rotina. A vantagem adicional da TC está no planejamento pré-cirúrgico, uma vez que a mesma revela a dimensão horizontal e forma da mandíbula, e da topografia e localização vestibulo-lingual do canal alveolar inferior.

## **1.1 Justificativa**

Na rotina cirúrgica, sabe-se que a perda de um segmento ósseo total, seja por ressecção de massa tumoral, fragmentação de fratura ou não união, é um problema comumente enfrentado pelo ortopedista veterinário, o qual lança mão do uso de enxertos ósseos corticais ou corticoesponjosos para reconstrução do defeito. Entretanto, muitos centros cirúrgicos não dispõem de banco de ossos viáveis para permitir essa situação, restando como opção o uso de autoenxertos.

Como observado pela presente revisão, entre os autoenxertos corticoesponjosos mais comuns em ortopedia veterinária encontram-se a costela e a asa do ílio. No entanto, devido as características morfológicas desses enxertos, eles não são muito apropriados para substituição de segmento ósseo total de osso longo. Muitas vezes a espessura ou o comprimento do material coletado não é abundante para sanar o defeito. Também, para a sua obtenção se faz necessária a osteotomia, causando maior traumatismo iatrogênico no paciente.

Outro aspecto observado com o uso de enxertos corticais ou corticoesponjosos é o tempo elevado de incorporação óssea, o qual pode levar meses a anos. Durante esse processo, corre-se o risco de infecção local, afrouxamento do método de imobilização, má união e não união, comprometendo a cicatrização.

Diante das questões abordadas, pretendeu-se com esta tese, contribuir na solução de alguns problemas inerentes ao uso de enxertos ósseos. Para isso, a vértebra coccígea foi proposta como uma alternativa de autoenxerto de segmento ósseo total, partindo-se do pressuposto que esse osso é de fácil obtenção e possui características estruturais compatíveis com a de um bom enxerto ósseo.

Paralelamente, revisou-se trabalhos realizados com a associação de células-tronco em enxertos ósseos com o intuito de investigar se tal associação contribui de forma significativa a incorporação óssea e minimiza as complicações decorrentes desse tipo de enxertia.

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo Geral**

- Avaliar a vértebra coccígea como alternativa aos autoenxertos corticoesponjosos tradicionais em defeitos ósseos de cães.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Comparar a resistência dos seguintes enxertos ósseos de cães: porção crânio-dorsal da asa do ílio, porção do terço proximal da 10<sup>a</sup> costela, 4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> vértebras coccígeas e porção diafisária da tíbia;

- Comparar o percentual de osso esponjoso e osso cortical dos seguintes enxertos ósseos de cães: porção crânio-dorsal da asa do ílio, porção do terço proximal da 10<sup>a</sup> costela, 4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> vértebras coccígeas e porção diafisária da tíbia;

- Analisar a espessura e formato dos seguintes enxertos ósseos de cães: porção crânio-dorsal da asa do ílio, porção do terço proximal da 10<sup>a</sup> costela, 4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> vértebras coccígeas e porção diafisária da tíbia.



## **2. CAPÍTULO 1**

### **ATUALIDADES EM ENXERTIA ÓSSEA – REVISÃO DE LITERATURA**

**Gabriele Maria Callegaro Serafini, Ney Luis Pippi**

(Artigo aceito para publicação – Revista Medvep)

## **Atualidades em enxertia óssea – revisão de literatura**

### **Updates on grafting bones – literature review**

**Gabriele Maria Callegaro Serafini, Ney Luis Pippi**

#### **Resumo**

Animais fraturados são frequentemente atendidos na rotina clínico-cirúrgica veterinária. Muitas vezes, essas fraturas são complexas e apresentam dificuldade na cicatrização, como nos casos de perda de segmento ósseo, não união e união retardada. Nesse contexto, os enxertos ósseos ganham papel de destaque como adjuvantes na cicatrização e preservação de um membro. Com o objetivo de auxiliar ao cirurgião na escolha do enxerto mais apropriado para cada tipo de situação, serão discutidas, nessa revisão, as características gerais dos enxertos ósseos, opções de coleta e armazenamento, formas de aplicação e seus benefícios relativos a cada indicação.

**Palavras-chave:** implante ósseo, fraturas, cicatrização

#### **Abstract**

Fractured animals are often treated at veterinary clinical and surgical routine. Often these fractures are complex and have difficulty in healing, as in cases of loss of bone segment, non-union and delayed union. In this context, bone grafts are highlighted role as aids in healing and preservation of a limb. Aiming to assist the surgeon in choosing the most suitable graft for each type of situation will be discussed in this review, the general characteristics of bone grafts, collection and storage options, application forms and its benefits for each indication.

**Keywords:** bone implant, fractures, healing

## **Introdução**

A enxertia óssea é parte fundamental do tratamento cirúrgico de muitas condições ortopédicas (1), pois conforme as funções biológicas exigidas, os enxertos ósseos podem apresentar capacidade de osteogênese, osteoindução, osteocondução e suporte estrutural (2). Dessa forma, podem ser utilizados tanto como adjuvantes no tratamento de fraturas, perdas e defeitos ósseos, como na indução de artrodeses (3). Além disso, dependendo do tipo, o enxerto ósseo pode realizar uma ou mais funções, sendo que a escolha de um tipo específico vai depender das necessidades requeridas (1). Devido a sua importância e facilidade de utilização, essa revisão tem por objetivo trazer as características gerais dos enxertos ósseos, opções de coleta e armazenamento, formas de aplicação e benefícios para cada situação.

## **Revisão bibliográfica**

O termo enxerto se refere à aplicação de tecido viável, como os frescos ou cultivados, enquanto implante refere-se a materiais de origem sintética ou biológica não viável. Entretanto, na literatura científica, por ser consagrado pelo uso, o termo enxerto também é aplicado para descrever os materiais de origem biológica desvascularizados e sem viabilidade celular (4).

Seu histórico de sucesso na ortopedia veterinária (2), ancora-se na sua biocompatibilidade, fácil aquisição, acondicionamento e aplicação. É o método de eleição na reposição de perdas e falhas ósseas em fraturas e ressecções amplas e no preenchimento de espaços gerados por defeitos corticais, como nas fraturas multifragmentares (5).

Um enxerto ósseo ideal oferece células osteogênicas capazes de produzirem osso novo, além de apresentar fatores que induzam as células mesenquimais

indiferenciadas a se transformarem em células ósseas. Oferece ainda matriz osteocondutora, a qual atua como estrutura para o crescimento ósseo interno e suporte estrutural para a estrutura óssea. Alguns tipos de enxertos ósseos, podem realizar funções variadas, condicionados pela necessidade (1).

De acordo com sua origem, os enxertos ósseos podem ser classificados em: autógeno ou autoenxerto, quando envolve a transferência de tecido de um local para outro no mesmo animal (2,6); alógenos (7) ou aloenxertos, quando há a transferência de tecido de um animal para outro da mesma espécie e xenoenxerto, quando ocorre a transferência de tecidos de um animal para outro de espécie diferente (2, 6).

Quanto à morfologia, podem ser separados em esponjosos, corticais ou corticoesponjosos. O enxerto esponjoso constitui-se de finas trabéculas separadas por grandes espaços preenchidos por células hematopoiéticas, que facilitam a migração de vasos, células e deposição de tecido ósseo, mas não proporcionam suporte mecânico (8). Contudo, é considerado o enxerto de eleição pela sua rápida incorporação no local receptor com suas propriedades osteogênicas e osteoindutivas, além da propriedade osteocondutora oriunda das trabéculas ósseas transplantadas (7). Considerando a transferência de osteócitos, osteoblastos e outras células viáveis, a osteogênese se dá de forma mais rápida e intensa (9).

Os enxertos esponjosos geralmente são utilizados como autoenxertos frescos (6), sendo colhidos da metáfise de qualquer osso longo ou ossos chatos, como a asa do ílio. Em cães, por exemplo, obtém-se volume satisfatório quando a colheita se dá na região proximal do úmero e da tíbia e distal do fêmur ou porção craniodorsal da asa do ílio (3). Já em gatos, o volume é mais satisfatoriamente obtido na asa do ílio (2).

Os enxertos esponjosos estão indicados principalmente em situações adversas, como união retardada e não união óssea. São utilizados também no preenchimento de defeitos corticais após curetagem ou excisão de cisto ósseo ou neoplasmas, nas perdas ósseas segmentares traumáticas, artrodeses, fusões vertebrais, associações com enxertos corticais e até mesmo no tratamento de osteomielite (3).

Em contrapartida, os enxertos corticais são obtidos da diáfise dos ossos longos e, geralmente, utilizados como aloenxertos preservados (6). Alternativamente, quando se deseja um autoenxerto cortical, pode-se remover grande segmento ulnar, sem acarretar problemas à função do membro doador (2).

Enxertos corticais são formados por lâminas justapostas, mineralizadas, dispostas concentricamente em volta dos canais de Havers (8). As principais funções do enxerto cortical são osteocondução e suporte estrutural, entretanto a osteoindução também é possível se a técnica de preparação utilizada preservar as proteínas morfogenéticas ósseas e outros fatores de crescimento derivados do osso cortical (1).

A invasão vascular e a osteocondução ocorrem muito mais lentamente nos enxertos corticais, porém esses garantem a vantagem de promover estabilidade imediata à região, (6) podendo ser utilizados na não união atrófica e após a exereses de neoplasmas ósseos (7). Em casos de fraturas diafisárias cominutivas que não se prestam para reconstrução anatômica, também está indicada a substituição dos fragmentos pelo enxerto cortical. Entretanto, com o conceito de osteossíntese biológica, onde se preconiza a mínima interferência no ambiente da fratura, esse procedimento vem sendo discutido entre ortopedistas (6). Os aloenxertos corticais são contraindicados em fraturas abertas ou em áreas com infecção presente, devido sua

lenta capacidade de vascularização. Casos onde a fixação interna rígida não é possível, essa enxertia também deve ser evitada (1).

Os enxertos corticoesponjosos envolvem a combinação de ambos os enxertos já relatados (6). São considerados o padrão ouro da enxertia óssea (10), pois quando implantados no hospedeiro, apresentam ação osteogênica, osteocondutiva e osteoindutiva (11), além de suporte estrutural (2). As costelas e a porção craniodorsal da espinha ilíaca são os locais doadores mais comuns, podendo ser utilizados como autoenxertos a fresco ou como aloenxertos conservados (6). Ainda considerando os tipos, existem os enxertos vascularizados, quando se transfere um segmento ósseo com seu pedículo vascular, o qual é anastomosado por técnica microvascular à artéria e veia próximas ao defeito (3).

Vários são os métodos de conservação de ossos com a finalidade de emprego para enxertia. Dentre eles, têm-se a liofilização, manutenção em glicerina, óxido de etileno, açúcar, mel ou sal. Entretanto, o congelamento a  $-18^{\circ}\text{C}$  ou menos (6) é o método de escolha para preservação de aloenxertos, já que tal processo reduz o potencial imunogênico, preserva as propriedades biomecânicas e de osteoindução. Além de inibir o crescimento bacteriano, os enxertos congelados mantêm a integridade da matriz óssea e permanecem em boas condições para serem posteriormente transplantados (5).

Com relação a resistência dos implantes após serem conservados por diferentes métodos, as pesquisas mostram resultados variáveis. Melo Filho, et al. (12) compararam a resistência mecânica de placas ósseas produzidas a partir de osso cortical bovino, conservadas em glicerina a 98%, solução salina a 150%, solução de açúcar a 300%, líquido de Dakin, congelamento em  $\text{N}_2\text{L}$  a  $-196^{\circ}\text{C}$  ou esterilizadas em óxido de etileno. Após reidratação em solução de cloreto de sódio a 0,9% por seis

horas, tais placas foram submetidas a ensaios mecânicos de tração, compressão, flexão e torção. Os autores não observaram diferença significativa da resistência ao ponto de ruptura entre as placas conservadas nos diferentes meios, congeladas-descongeladas ou esterilizadas.

Também não foi encontrada diferença significativa no estudo de Duarte, Schaeffer (13), em que os autores compararam a força compressiva de ossos bovinos após estocagem por congelamento ou liofilização. Entretanto, Amendola et al. (14) quando compararam a resistência compressiva axial de diáfises femorais caninas a fresco, conservadas por 30 dias em glicerina a 98% ou em mel (sendo as duas últimas reidratadas antes da avaliação), verificaram maior resistência nos ossos conservados em glicerina, seguida dos ossos conservados em mel, sendo mais frágeis aqueles testados a fresco. Contrariamente, Lucas et al. (15) compararam a força compressiva de ossos inteiros conservados em glicerina, mel ou congelamento, sem reidratação e observaram que os conservados em mel foram mais resistentes.

No que se refere a reidratação dos implantes ósseos após a conservação, embora alguns trabalhos não tenham observado diferença significativa na resistência de ossos reidratados e não reidratados (16), Salbego, Raiser (17) recomendam a reidratação por um período de seis horas, para que os implantes voltem a apresentar características mecânicas semelhantes às de ossos frescos. Tal procedimento tem sido feito com solução de cloreto de sódio 0,9% e com resultados bem-sucedidos (14).

O sucesso no transplante ósseo envolve vários aspectos, entre eles a vitalidade do tecido receptor e a ausência de necrose do enxerto (8). Quando se transplanta um enxerto esponjoso autógeno fresco, estima-se que no máximo 10% das células sobrevivam (6), entretanto, tal percentual já é o suficiente para auxiliar no processo cicatricial (11).

A cicatrização ou pega do enxerto ao osso hospedeiro, envolve o processo de consolidação, o qual trata-se da fusão e incorporação do segmento transplantado, com progressiva substituição do primeiro pelo segundo (11).

Inicialmente, em qualquer tipo de enxerto, ocorre a formação de hematoma e reação inflamatória, liberando citocinas e fatores de crescimento ósseo, tal qual na cicatrização de fraturas. Posteriormente, forma-se tecido fibrovascular, que infiltra o hematoma e o enxerto promovendo estabilidade gradual. Os estágios a seguir diferenciam-se conforme o tipo de enxerto aplicado (4).

A revascularização dos autoenxertos esponjosos tem início em apenas dois dias após a enxertia e se completa dentro de duas semanas. As células osteogênicas transplantadas ou as células mesenquimais indiferenciadas tornam-se osteoblastos ativos, secretando osteoide no implante. Este osteoide é mineralizado e forma um novo osso hospedeiro nos locais de fratura, incorporando o enxerto ao osso do receptor. Por fim, os centros necróticos do osso esponjoso são reabsorvidos por osteoclastos e o enxerto é totalmente repostado pelo receptor. O novo osso trabecular é remodelado em osso cortical como resposta ao ambiente mecânico (18).

No caso dos aloenxertos esponjosos conservados, o tempo de incorporação é mais demorado e o resultado é ligeiramente menos completo devido ao processo reacional mais intenso, além do fato das células do enxerto estarem mortas (4).

Nos enxertos corticais, sejam eles autógenos ou alógenos, a incorporação é mais longa e mais incompleta do que a do enxerto esponjoso. São necessários vários meses ou anos para a incorporação deste tipo de enxerto, sendo que quanto maior forem suas dimensões, mais incompleta será a incorporação (4).

A medida que o osso cortical é penetrado por novos vasos, o osso do doador é reabsorvido e substituído pelo novo osso do hospedeiro. Quando o tecido ósseo do



doador é reabsorvido, a proteína morfogenética óssea pode ser liberada, o que estimula a diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos. Durante a fase de reabsorção, o enxerto encontra-se mais fraco que o osso hospedeiro ou o enxerto não remodelado. Esse processo ocorre vagarosamente e o osso doador nunca é completamente substituído em alguns pacientes (1).

Ao fim de algum tempo, os aloenxertos podem apresentar sinais de fadiga mecânica. Para minimizar esta complicação, é necessário aplicar material de osteossíntese para reforçar a estabilidade mecânica. Recomenda-se também o uso associado de autoenxerto esponjoso na junção entre o aloenxerto cortical e o osso cortical do paciente, acelerando o processo de consolidação óssea (4).

## **Conclusão**

Devido as características inerentes aos enxertos ósseos, como osteogênese, osteoindução, osteocondução e suporte estrutural, fraturas com perda de segmento ósseo total, falhas corticais, não-uniões e uniões retardadas são altamente beneficiadas com o seu uso. Este recurso, quando bem conduzido, garante preservação de um membro gravemente ferido e precocidade cicatricial.

## **Referências bibliográficas**

- 1 - Millis DL, Martinez SA. Enxertos ósseos. In: Slatter D. Manual de Cirurgia de Pequenos Animais. 3 ed. Barueri: Manole, 2007. p. 1875-1891.
- 2 - Denny HR, Butterworth SJ. Enxertos ósseos. In: \_\_\_\_\_. Cirurgia Ortopédica em Cães e Gatos. 4 ed. São Paulo: Roca, 2006. p.14-18.

3 – Santos FC, Rahal SC. Enxerto ósseo esponjoso autólogo em pequenos animais. Cienc. Rural, 2004; 34(6):1969-1975.

4 – Dias RMF, Carvalhais P, Matos P, Judas F. Aloenxertos ósseos na osteossíntese de fracturas traumáticas. Rev. Port. Ortop.Traum. 2008; 16:31-42.

5 – Drago MA. Placa de osso bovino na osteossíntese de tíbia de coelhos: avaliação biomecânica *ex vivo* [Dissertação online]. Espírito Santo: Universidade Federal do Espírito Santo; 2011[citado 2015 jul 08]. Disponível em: URL: [http://portais4.ufes.br/posgrad/teses/tese\\_5256\\_.pdf](http://portais4.ufes.br/posgrad/teses/tese_5256_.pdf).

6 – Piermattei DL, Flo GL, Decamp CE. Enxertos ósseos. In:\_\_\_\_\_. Ortopedia e Tratamento de Fraturas de Pequenos Animais. 4 ed. São Paulo: Manole, 2009. p.180-188.

7 – Dias MIR, Sousa CMP, Carvalho PMP, Lempek MR, Viegas CAA, Azevedo JMT. Enxertos e substitutos ósseos em cirurgia ortopédica reconstrutiva nos animais de companhia - uma breve revisão. RBMV, 2013; 35(4):339-350.

8 – Castania VA. Enxerto córtico-esponjoso homogêneo processado quimicamente e esterilizado em óxido de etileno em cães [Dissertação online]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2002[citado 2015 jul 08]. Disponível em: URL: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/82/82131/tde-07012003-092038/pt-br.php>

9 – Ferreira MP. Comparação de enxerto ósseo cortical autógeno e implante ósseo cortical alógeno liofilizado, congelado a -70°C ou conservado no mel na substituição de segmento diafisário do fêmur de gatos domésticos [Dissertação de mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2008.

10 – Portinho CP. Reconstrução óssea de calota craniana com enxerto com células-tronco mesenquimais: estudo experimental (Dissertação online). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2006[citado 2015 jul 08]. Disponível em: URL:

<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/8962/000592230.pdf?sequence=1>

11 – Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. Clin Orthop and Relat Res. 2000; 371:10-27.

12 – Melo Filho EV, Lúcia RMD, Salgado AEP, Miranda FB, Drago MA, Taffarel MO et al. Mecânica e microbiologia de placas produzidas a partir de osso cortical bovino, conservadas em diferentes meios. Cienc. Rural, 2011; 41(4):660-666.

13 – Duarte LS, Schaeffer L. Compressão de ossos bovinos congelados e liofilizados. Rev. Bras. Eng. Biom. 2000; 16(2):89-93.

14 – Amendola GF, Raiser AG, Soares JMD, Beckmann DV. Aspectos biomecânicos compressivos de diáfises femorais caninas conservadas em glicerina a 98% ou em mel. Cienc. Rural, 2008; 38(5):1341-1345.

15 – LUCAS, S.S. Avaliação biomecânica de três métodos de conservação de ossos para enxerto. In: SEMINÁRIO INTERESTADUAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO; MOSTRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNICRUZ, 4., 2001, Cruz Alta, RS. Anais... Cruz Alta: UNICRUZ, 2001.

16 – Macedo CAS, Galia CA, Silva ALB, César PC, Sanches PRS, Duarte LS et al. Comparação da resistência à compressão do osso bovino congelado e liofilizado. Rev. Bras. Ortop. 1999; 34(9/10):529-534.

17 – SALBEGO, F.Z. RAISER, A.G. Teste de resistência biomecânica de implantes ósseos corticais conservados em glicerina a 98% e submetidos a diferentes tempos de reidratação. In: CONGRESSO DO COLÉGIO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA, 7., 2006, Santos, SP. Anais... Belo Horizonte: Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2006. V.58, supl, p.77-78, 2006.

18 - Johnson AL. Fundamentos da cirurgia ortopédica e manejo de fraturas. In: Fossum TW. Cirurgia de Pequenos Animais. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 930-1014.

### **3. CAPÍTULO 2**

## **CÉLULAS-TRONCO ADULTAS NA CICATRIZAÇÃO DE FRATURAS E ENXERTOS ÓSSEOS**

**Gabriele Maria Callegaro Serafini, Ney Luis Pippi**

(Artigo submetido para publicação – Revista Semina)

## **Células-tronco adultas na cicatrização de fraturas e enxertos ósseos**

Adult stem cells in the healing of fractures and bone grafts

### **Resumo**

Os acidentes traumáticos que resultam em fraturas e comprometimento de um segmento ósseo têm alta prevalência na rotina cirúrgica veterinária. Para tal situação, muitas vezes é indicado o uso de enxertos ósseos para preservar e restaurar o comprimento do membro acometido. Entretanto, o tempo de recuperação desses animais costuma ser prolongado e com risco de complicações durante a incorporação dos enxertos. Nesse sentido, as células-tronco (CT) vêm demonstrando ser uma nova opção dos ortopedistas devido a sua capacidade em fornecer células osteoprogenitoras e de incrementar o efeito osteoindutor, minimizam o tempo de cicatrização e proporcionam maior eficiência ao processo reparador. Com isso, a presente revisão objetiva trazer as características das células-tronco, suas aplicações atuais na cicatrização de fraturas e, especialmente, sua contribuição na consolidação de enxertos ósseos.

**Palavras-chave:** células-tronco mesenquimais, implante ósseo, reparação óssea, terapia celular.

### **Abstract**

Traumatic accidents that result in fractures and commitment of a bone segment have a high prevalence in veterinary surgical routine. For such situation, it is often indicated the use of bone grafts to preserve and restore the length of the affected limb. However, the recovery time of these animals tends to be prolonged, increasing the risk of complications during incorporation of the graft. In this sense, the stem cells (SC) are proving to be a new option for orthopedic surgeons due to their ability to supply osteoprogenitor and to increase the osteoinductive effect, minimize healing time and provide greater efficiency to the reparative process. Thus, the present review aims to bring the characteristics of stem cells, their current applications in the healing of fractures and especially its contribution to the consolidation of bone grafts.

**Key words:** bone graft, bone repair, cell therapy, mesenchymal stem cells.

### **Introdução**

O princípio da terapia celular consiste em reparar tecidos ou órgãos danificados com a substituição das células não funcionais por células normais. As CT presentes no organismo, de forma

natural, exercem essa função, entretanto, quando as lesões são mais extensas, as CT não são capazes de corrigi-las e a doença se estabelece. Nessas situações, a terapia celular com estas células tem como objetivo potencializar o mecanismo natural de correção, concentrando as mesmas no local da lesão para que possam agir mais eficientemente (NARDI, 2007).

Com os avanços na medicina, hoje é possível coletar, cultivar e reinfundir as células-tronco com finalidade terapêutica, formando diversos tecidos desde ósseo, hepático, neural ou adiposo (CRISTANTE; NARAZAKI, 2011). As células-tronco adultas tem sido isoladas e caracterizadas em diferentes tecidos do corpo, como medula óssea (MO), cordão umbilical, encéfalo, epitélio, polpa dentária e, mais recentemente, tecido adiposo (YARAK; OKAMOTO, 2010).

Dentre as opções da terapia celular como adjuvante à cicatrização óssea, tem sido preconizada a utilização de células-tronco, sobretudo as células-tronco mesenquimais (CTM) por apresentarem maior plasticidade e biodisponibilidade que as demais CT adultas. Espera-se que estas células, sob condições patológicas, auxiliem o organismo a superar a falta de fonte osteoprogenitora, das demais células comprometidas com a reparação e de fatores solúveis para o recrutamento de novos tipos celulares (MONTEIRO et al., 2008).

Em certos tipos de fraturas, os enxertos ósseos, muitas vezes são indicados para substituição de um segmento ósseo total (GONÇALVEZ, 2010). Dependendo do tipo de enxerto escolhido, sua função principal será de suporte mecânico e osteocondução. Dessa forma, o tempo de incorporação é demorado e com risco de complicações (MILLIS; MARTINEZ, 2007).

Nesse âmbito, as CTM são atualmente muito pesquisadas como alternativa terapêutica em enxertos ósseos, devido a sua alta capacidade de osteoindução, ou seja, de diferenciação em células osteogênicas, sendo a sua eficácia comprovada na recuperação óssea (PAGLIOSA; ALVEZ 2007). A presente revisão objetiva descrever as características das células-tronco, suas aplicações atuais na cicatrização de fraturas, e enfatizar, sua contribuição na consolidação de enxertos ósseos.

## **Enxertos ósseos**

Os enxertos ósseos têm sido utilizados na medicina veterinária desde muitos anos (JOHNSON, 2008). Sua versatilidade, biocompatibilidade e fácil aplicação são características que os tornam essenciais em diversas aplicações clínicas (DRAGO, 2011). Dependendo do tipo de enxerto, eles podem apresentar capacidade de osteogênese, osteoindução, osteocondução e de suporte estrutural, ficando a critério do ortopedista a escolha por determinada enxertia de acordo com a função requerida (JOHNSON, 2008; MILLIS; MARTINEZ, 2007).

Os autoenxertos esponjosos são altamente celulares, mas mecanicamente fracos. Dessa forma, são recomendados quando se deseja rápida formação óssea, como no preenchimento de defeitos corticais, especialmente de animais adultos ou idosos, uniões retardadas ou não uniões, artrodeses e até

mesmo para promover a formação óssea em fraturas infectadas. Já os enxertos corticais oferecem apoio mecânico excelente e são osteocondutores, porém, estimulam pouca resposta osteogênica. Sendo assim, são indicados para a substituição de segmentos ósseos totais (JOHNSON, 2008), como em fraturas com segmento ósseo comprometido, não união atrófica e após remoção de neoplasia óssea para preservação do membro (PIERMATTEI et al., 2009).

O início da incorporação de um enxerto ósseo é muito semelhante a cicatrização de uma fratura, pois ocorre a formação de hematoma e reação inflamatória com liberação de citocinas e fatores de crescimento ósseo. Posteriormente, forma-se um tecido fibrovascular que infiltra o hematoma e o enxerto, sendo os estágios subsequentes variáveis conforme o tipo de enxerto (DIAS et al., 2008; DIAS et al., 2013).

A incorporação dos autoenxertos esponjosos é a mais rápida e completa, pois a revascularização é bastante precoce e a osteogênese muito ativa. Entretanto, na incorporação dos enxertos corticais são necessários vários meses ou anos e quanto maior forem suas dimensões, mais incompleta será a incorporação (DIAS et al., 2008).

É importante observar que ao contrário do que acontece nos enxertos esponjosos, a incorporação dos enxertos corticais inicia, primeiramente, mais por parte dos osteoclastos do que dos osteoblastos (STEVENSON, 1996). Dessa forma, o aloenxerto ósseo cortical é revascularizado, reabsorvido e substituído pelo tecido do hospedeiro lentamente, com o enxerto atuando como um suporte para a formação de osso novo. Durante essa fase de reabsorção os enxertos encontram-se enfraquecidos e predispostos a falha catastrófica (MILLIS; MARTINEZ, 2007). Sua resistência pode ser apenas de 50% a 60% da original em, aproximadamente, 12 meses após o transplante e, por vezes, apenas recuperada dois a três anos após a enxertia (DIAS et al., 2013).

### **Características das células-tronco (CT)**

As células-tronco distinguem-se de outras células do organismo, por serem indiferenciadas ou não especializadas e por terem a capacidade de gerar não apenas novas CT, mas também, sob certas condições fisiológicas e experimentais, células especializadas com diferentes funções (YARAK; OKAMOTO, 2010).

As CT podem ser divididas quanto a sua natureza em embrionárias ou adultas. As embrionárias são encontradas na massa celular interna do blastocisto (embrião). Tais células quando separadas e colocadas em condições apropriadas são capazes de originar qualquer um dos múltiplos tipos celulares de um indivíduo. Como elas são capazes de formar um organismo completo, são chamadas de pluripotentes (NARDI, 2007).

As CT adultas são encontradas em qualquer indivíduo após a fase de blastocisto (NARDI, 2007). Diversos tecidos (ou talvez todos) possuem células-tronco, que constituem uma reserva da qual o



organismo utiliza para substituir as células que morreram por apoptose ou lesões por ferimentos ou doenças. Assim, são bem conhecidas as CT da pele, mucosa intestinal, epitélio olfativo, cérebro, fígado, gordura, córnea, retina, polpa dentária e músculos (ZAGO; COVAS, 2004). Em geral, as CT adultas são pouco frequentes e sua identificação é difícil, pois não apresentam características morfológicas ou outras que a distingam das demais células daquele órgão (NARDI, 2007).

Tanto as CT embrionárias quanto as adultas possuem capacidade de autorrenovação e de diferenciação em múltiplos tipos celulares. O microambiente (nicho) é responsável pelos mecanismos celulares que regulam o equilíbrio entre a autorrenovação e a diferenciação entre as células-tronco. O nicho é importante na proteção e perpetuação da capacidade de renovação e na manutenção do estado indiferenciado, pois ele pode sinalizar para uma especificidade celular em um determinado momento, de acordo com o contexto tecidual (FUCHS et al., 2004).

Alguns tipos de CT adultas, apresentam diferentes graus de plasticidade, desde muito baixos como as CT epiteliais, até muito altos como as CTM. A capacidade que as CTM possuem de originar tipos celulares mais variados, as tornam muito interessantes para a utilização em terapia celular (NARDI, 2007).

Os mecanismos de plasticidade das CTM ainda não são completamente compreendidos. Há duas teorias propostas para sua capacidade de diferenciação. Um deles é a transdiferenciação em que a célula alteraria sua expressão gênica para a de uma linhagem celular totalmente diferente, originando tipos celulares distintos. A transdiferenciação pode ocorrer de forma direta, quando a célula altera seu citoesqueleto e sua síntese protéica para rediferenciar-se em outro tipo celular específico, ou indireta, quando desdiferencia-se em uma célula-tronco mais primitiva para, posteriormente, rediferenciar-se em outro tipo celular. A outra teoria proposta é a diferenciação celular pela fusão. Através dessa teoria as CTM seriam capazes de fusionar-se a uma célula adulta-alvo, assumindo o padrão de expressão gênica da célula adulta a qual se uniu. Além disso, as CTM secretam uma grande variedade de quimiocinas, além de expressar receptores para citocinas e fatores de crescimento. Dessa forma, tais células interagem com as células residentes (nicho) e podem induzi-las, por mecanismo parácrino, a se diferenciar em linhagens celulares distintas, de acordo com essa sinalização (MONTEIRO et al., 2010).

Tanto as CT embrionárias como as adultas são fontes potenciais para aplicações futuras. Entretanto, por questões éticas, a utilização clínica das CT embrionárias é proibida, pois para sua coleta o embrião deve ser posteriormente destruído e uma vez que se considere o embrião já sendo um ser humano, a aquisição dessas células seria considerada abortiva (PORTINHO, 2006).

Diante disso, estudos vem sendo realizados com o objetivo de induzir a característica de pluripotência nas CT adultas. Para tanto, pesquisadores conseguiram ampliar o potencial de diferenciação dessas células, por meio da transferência nuclear somática e reprogramação genética de células somáticas ao estado embrionário, mediante a introdução de genes determinantes de plenipotência (OCT-4, SOX-2, KLF-4, cMYC). Essas células são denominadas células-tronco pluripotentes induzidas

ou IP cells e possuem uma capacidade maior de plasticidade que as CT adultas encontradas no organismo (YARAK; OKAMOTO, 2010).

### **Células-tronco mononucleares e células-tronco mesenquimais**

As CT adultas podem ser obtidas através de medula óssea (MO), sangue periférico, cordão umbilical, fígado fetal, tecido neural ou outros diversos tecidos mesenquimais do indivíduo adulto, tais como sinóvia, periósteo, tecido muscular ou tecido adiposo (CRISTANTE; NARAZAKI, 2011).

Por muitos anos, a MO foi considerada a principal fonte de células-tronco para aplicações com terapia celular (PINTO FILHO et al., 2013). As células da MO podem sofrer dois processos de diferenciação: as células mononucleares (indiferenciadas) e as multinucleares. Dentre as células mononucleares, existem as hematopoiéticas, que originarão células do sangue (linfócitos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos, células vermelhas e plaquetas) e as mesenquimais, que poderão originar miócitos, hepatócitos, osteócitos, adipócitos, condrócitos e estromais (GUARITA-SOUZA, 2005), sendo que as CTM representam uma pequena fração, 0,001-0,01% da população total de células nucleadas da MO (BERTINE; ARAUJO, 2009).

Uma vez obtido o material da medula óssea, este pode ser reaplicado imediatamente no paciente, pode ser centrifugado para obtenção da fração de células mononucleares ou sofrer expansão desta em laboratório de cultura celular. Todas as aplicações são benéficas, mas no momento que se aplica apenas o material recém coletado da MO, a concentração de células-tronco mononucleares é muito baixa (SALBEGO, 2010), pois nesse material também terão as células maduras do sangue, linfócitos, fragmentos de estroma e gordura (GOMES, 2008). Para aprimorar o tratamento, a outra opção é centrifugar o material coletado para obter apenas a fração mononuclear, ou seja CT hematopoiéticas e mesenquimais juntas, sendo que essa opção tem trazido resultados mais promissores que a primeira. Por fim, a opção que tem demonstrado resultados ainda melhores é utilizar as CTM expandidas em cultura, pois através desse procedimento é possível obter apenas a linhagem desejada de células em uma concentração maior (SALBEGO, 2010).

Muitas vezes o emprego de CT mononucleares acaba sendo o escolhido devido a simplicidade do procedimento, necessitar de menor aparato técnico, possibilidade imediata de implantação da fração celular ao paciente, menor custo, método minimamente invasivo e não requerimento de imunossupressão do paciente (LUCARELLI et al., 2004). Entretanto, é importante atentar-se ao volume de células processadas para o transplante, pois sua função será de suprir a deficiência na quantidade e/ou atividade destas células no local de interesse. Assim, o número deve ser maior ou igual  $2 \times 10^6$  a  $2 \times 10^8$  células mononucleares da MO por  $\text{kg}^{-1}$  do receptor (SALBEGO, 2010).

Na cicatrização óssea diversos estudos relatam a utilização das CTM alógenas e autógenas. Usualmente, nesses estudos, utiliza-se desde a fração mononuclear da MO, que contém apenas pequenas

quantidades de CTM, até a cultura expandida de CTM obtidas de diversos órgãos. Ambas, podem ser aplicadas no local da lesão, isoladamente ou combinadas com substitutos ósseos e biomateriais ou por infusão intravenosa (MONTEIRO et al., 2008).

Do mesmo modo pode ser o emprego das células-tronco do tecido adiposo, em que pode ser aplicada a fração vascular estromal (FVE) - (BARBOSA, 2013), que contém uma população heterogênea de células, incluindo células sanguíneas circulantes, fibroblastos, periócitos e células endoteliais, além das CT adultas (YARAK; OKAMOTO, 2010) ou a FVE pode ser expandida em cultura para obtenção das CTM (ROSA, 2012).

Embora a forma de coleta de CTM favoreça seu uso autógeno, a possibilidade de tratamento alógeno permite a criação de bancos de CTM, ampliando as possibilidades terapêuticas. Pacientes em estados mórbidos desfavoráveis poderiam fazer uso de culturas celulares já estabelecidas (MONTEIRO et al., 2008). No Laboratório de Terapia Celular (LATECER) da nossa instituição, estamos realizando culturas celulares de CTM derivadas do tecido adiposo (ADSCs) - (Figura 1) e posterior aplicação em animais, de maneira alogênica, obtendo bons resultados terapêuticos e não observando reações de rejeição pelos animais receptores do enxerto celular.

De todas as formas de células-tronco adultas estudadas até o presente, as CTM são aquelas que podem ser derivadas de um maior número de fontes diversas e ao mesmo tempo têm a mais ampla capacidade de diferenciação (ZAGO; COVAS, 2004). A origem embrionária dessas células é a mesodermal, elas surgem a partir de células mesenquimais que dão origem a tecidos conjuntivos, como ossos, cartilagens, gordura, bem como o sistema vascular e hematopoiético (MAIA et al., 2013). Portanto, podem ser encontradas em pequenas quantidades em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos, incluindo a MO, o tecido adiposo, o periósteo, o tecido muscular e os órgãos parenquimatosos (PINTO FILHO et al., 2013). Independentemente da fonte de obtenção, os estudos biológicos mostram grande similaridade entre essas células (BERTINE; ARAUJO, 2009).

Para uma população de células ser classificada como CTM é necessário que elas sejam capazes de se aderir ao plástico quando cultivadas; que as expressões de CD105, CD73 e CD90 estejam presentes, e que CD34, CD45, CD14, ou CD11b, CD79, ou CD19 e HLA-DR não sejam expressos em mais de 95% das células em cultura (BYDLOWSKI et al., 2009); e que essas células sejam capazes de se diferenciar e dar origem a osteoblastos, condroblastos, hepatócitos, neurônios, células epiteliais, renais e cardíacas, dentre outras (PINTO FILHO et al., 2013). Sua alta plasticidade fornece perspectivas terapêuticas promissoras, tornando-se foco de pesquisas em todo o mundo (MONTEIRO et al., 2008).

Atualmente, o tecido adiposo vem ganhando notoriedade como sendo uma alternativa para a obtenção de CTM, pois além de ser facilmente coletado, em locais pouco doloridos e em grandes quantidades, estudos mostraram igual capacidade de diferenciação em tecidos de origem mesodérmica quando comparadas às CTM da MO. Nesse sentido, o tecido adiposo ganha alguma vantagem, visto que a coleta na MO é dolorida e oferece baixo rendimento das células colhidas (MIZUNO, 2009). No

momento, o tecido adiposo tem sido o mais explorado na colheita de ADSCs no LATECER da instituição.

O emprego das ADSCs tem sido cogitado no tratamento de doenças crônicas degenerativas, como na distrofia muscular ligada ao cromossoma X de camundongos, além de ser promissora para os tratamentos cirúrgicos reconstrutivos, de origem traumática ou não, como nas lipoatrofias congênitas ou adquiridas (YARAK; OKAMOTO, 2010). Em equinos, muitos estudos já demonstraram sua ação benéfica no tratamento em tendinite e enfermidades articulares (MAIA et al., 2013).

Treichel et al. (2011) avaliaram o transplante da fração total de células mononucleares da medula óssea e da fração vascular estromal do tecido adiposo, associado ao uso da membrana celulósica, em feridas cutâneas de coelhos. O grupo A não recebeu nenhum tratamento, o grupo B recebeu apenas membrana celulósica e os grupos C e D, além da membrana, também foram submetidos a transplante autólogo da fração total de células mononucleares ou da fração vascular estromal. Ao final do período de avaliação, os três grupos tratados apresentaram diferença estatística significativa da área da ferida em relação ao grupo controle. O grupo que recebeu a fração vascular estromal do tecido adiposo apresentou o menor tempo de cicatrização da ferida.

Ribeiro (2013) analisou a capacidade de sobrevivência das ADSCs humanas no modelo de avulsão de raiz ventral de medulas de ratos, bem como sua capacidade de neuroproteção dos motoneurônios lesionados e sua competência de imunossupressão no período de duas semanas pós-lesão. Observou-se que o tratamento com as ADSCs teve efeito neuroprotetor, pois houve aumento significativo de sobrevivência neuronal, além de promoverem a estabilidade sináptica. As células humanas também tiveram ação imunomodulatória, reduzindo a artrogliose reativa e ativação microglial. Além disso, também inibiram a atividade de linfócitos T. O autor concluiu que no modelo testado a ação das células tronco mesenquimais humanas foi similar ao observado em transplantes alogênicos em modelos animais. O efeito imunossupressor das ADSCs também pôde ser observado em experimentos em nosso laboratório, em transplantes de órgãos, verificando-se o impedimento da rejeição ao mesmos e as próprias células alogênicas.

### **Atuação e identificação das células-tronco mesenquimais**

As CTM possuem comportamento migratório, ou seja, são capazes de chegar até o local enfermo após a aplicação por vias intravenosa, intralesional ou perilesional. As citocinas liberadas nos locais de inflamação ou lesão promovem a sinalização química para orientar a migração das células implantadas. Essas células migram seletivamente para áreas de lesão, inflamação e tumores, estando envolvidas na reparação tecidual e formação do estroma associado ao tumor. As CTM são capazes de autorregular os fatores da cascata da inflamação, incluindo as citocinas pró-inflamatórias interleucinas-1 $\beta$ , fator de necrose tumoral- $\alpha$  e interferon- $\gamma$ . Estes efeitos anti-inflamatórios podem ter influências profundas no

ambiente tecidual local e igualmente influenciar a habilidade de investigadores em utilizar células-tronco alogênicas sem induzir uma resposta imune do hospedeiro (MAIA et al., 2013).

Além disso, essas células também secretam fatores de crescimento que promovem a efetiva revascularização tecidual, além de apresentarem efeito antiapoptótico, importante na restauração e manutenção da função tecidual. Estudos revelaram que as células-tronco progenitoras, particularmente as derivadas da medula óssea, promovem reparação tecidual mediante secreção de fatores que aumentam a regeneração das células lesadas, além de estimularem a proliferação e diferenciação de células-tronco endógenas em diversos tecidos e reduzirem as reações inflamatórias e imunes (MAIA et al., 2013).

Marcadores de superfície celular são moléculas bioativas embebidas ou apostas a superfície externa de todas as células. Estas moléculas funcionam como receptores, possibilitando que as células se comuniquem umas com as outras ou se liguem especificamente a determinadas estruturas biológicas ou celulares. Estas moléculas que refletem a função celular podem também ser utilizadas para efeito de marcação e identificação de tipos celulares particulares, incluindo as células-tronco. A designação “Cluster of differentiation” (CD) refere-se aos marcadores de superfície celular utilizados para caracterizar tipos celulares. Até o momento nenhum marcador CD foi encontrado para identificar definitivamente as CTM, sendo necessário uma combinação de marcadores para caracterização de uma população homogênea (MAIA, et al., 2013).

A expressão variável de muitos dos marcadores de linhagem pode ser devida não somente aos diferentes métodos de isolamento celular e características da cultura, mas também à variação na origem do tecido e às diferentes espécies (BYDLOWSKI et al., 2009). A falta de um marcador específico que defina as CTM valoriza sua identificação com base na constatação de um conjunto de marcadores de superfície e em sua capacidade de diferenciação em adipócitos, condrócitos e osteócitos (BERTINE; ARAUJO, 2009).

As CTM na presença de beta-glicerol fosfato, ácido ascórbico, dexametasona e soro fetal bovino adquirem a morfologia de osteoblastos. A diferenciação condrogênica necessita que as CTM sejam cultivadas em ambiente tridimensional e em meio com baixas concentrações de soro bovino fetal e na presença de TGF- $\alpha$ . A diferenciação adipogênica requer uma monocamada celular cultivada em presença de isobutilmetilxantina. Para diferenciação em miócitos é imprescindível a presença de 5-azacitidina (BERTINE; ARAUJO, 2009).

As CTM são capazes de se diferenciar também em células vasculares ou contribuir para a formação de vasos sanguíneos no indivíduo adulto. Foi relatado que as CTM, após a injeção direta no coração, têm a capacidade de se diferenciar em células com fenótipos endotelial, cardiomiócitos, pericitos vasculares e células musculares lisas. Como visto acima, as CTM podem se diferenciar em células de vários tecidos, embora os mecanismos que participam desses processos não sejam totalmente conhecidos (BERTINE; ARAUJO, 2009).

## **Células-tronco como adjuvante na cicatrização de fraturas**

A cicatrização óssea possui três fases: inflamação, na qual existe a infiltração de leucócitos que determinam a quimiotaxia de células mesenquimais e fibroblastos que se diferenciarão em osteoblastos; reparação, na qual temos a formação de um calo mole (tecido conjuntivo frouxo-fibroblastos) e, em seguida, o calo duro (tecido ósseo imaturo); e por fim remodelação, na qual se forma o tecido ósseo maduro (CRISTANTE; NARAZAKI, 2011).

A base do osso em formação e em reparo são as CTM, que respondem e produzem citocinas regenerativas, replicam e se diferenciam, formam a matriz estrutural e respondem à demanda mecânica para restaurar as funções do esqueleto (KRAUS; KIRKER-HEAD, 2006).

Fatores de crescimento (FC) locais e sistêmicos estimulam as CTM a migrarem para o foco de fratura e através da osteoindução, a se diferenciarem em condroblastos e osteoblastos e com isso, formar o calo ósseo. Os peptídios BMPs e TGF- $\beta$  são os principais fatores de crescimento responsáveis pelo recrutamento e diferenciação das CTM para a formação do calo duro e posterior formação de osso lamelar durante a fase de remodelamento (PAGLIOSA; ALVEZ, 2007).

Dentre as opções de terapia celular como adjuvante à cicatrização óssea tem sido preconizada a utilização de CTM por apresentarem maior plasticidade e biodisponibilidade que as demais CT adultas (MONTEIRO et al., 2008). Defeitos ósseos em modelos experimentais tratados com CTM têm demonstrado que ambientes biológicos e mecânicos favoráveis resultam em proliferação e diferenciação de CTM em osteoblastos e condrócitos, e que a presença de células-tronco em defeitos ósseos experimentais diminui o tempo de cicatrização do defeito (KRAUS; KIRKER-HEAD, 2006).

Oliveira et al. (2010) criaram defeitos tibiais em cães e trataram de três diferentes maneiras: esponja de gelatina embebida em solução fisiológica (G1), esponja de gelatina embebida com aspirado de MO processado (G2) e esponja de gelatina embebida com aspirado de MO processado e proteína óssea morfogenética (rhBMP-2) (G3). A cicatrização foi avaliada por estudos radiográficos, e a presença de CT mononucleares foi identificada por meio de marcadores nanocristais Qtracker, em microscopia com luz fluorescente, uma semana após a intervenção cirúrgica. Entre as células identificadas pelo marcador, foram encontradas células da linhagem óssea e as avaliações radiográficas demonstram crescimento ósseo acelerado nos animais de G2 e G3. Houve diferenças significativas entre o G1 e G3 em todos os tempos estudados, e entre G1 e G2 nos tempos de 30 e 45 dias. Os autores concluíram que as CT mononucleares adultas suplementadas ou não com rhBMP-2 é uma alternativa favorável ao crescimento ósseo em defeitos experimentais agudos de tibia de cães.

Barbosa et al. (2014) avaliaram a padronização de técnicas e o teste da associação do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e das CT mononucleares. Para tal, foram realizados defeitos tibiais de cães, em um estudo piloto, os quais foram preenchidos com seis diferentes tratamentos. No cão I, a falha foi preenchida com solução fisiológica; no II, com PRP; no III, com a fração total das células mononucleares (FTCM); no IV, com a FVE; no V, com o PRP associado à FTCM; no VI, com a associação PRP e FVE.

Foram realizadas avaliações clínicas, dos graus de claudicação, radiografias, perimetria da coxa, biomecânica e biópsias. A FTCM obteve contagem e viabilidade média de  $2,0 \times 10^8$  células e 90%, respectivamente, enquanto a FVE obteve  $3 \times 10^6$  células e 50%. O PRP concentrou, em média, sete vezes o número inicial de plaquetas do sangue total, de  $250.000 \mu\text{l}^{-1}$  plaquetas no sangue total para  $1.750.000 \mu\text{l}^{-1}$  plaquetas no PRP. Os autores obtiveram padronização adequada de técnicas, possibilitando o teste da associação entre as células-tronco mononucleares e o PRP, assim como seu uso isolado, no reparo de falhas ósseas corticais, indicando a possibilidade da associação FTCM e PRP ser o melhor tratamento.

Após o estudo piloto Barbosa (2013) seguiu a mesma metodologia empregada e aplicou em um maior número de cães. A autora concluiu que a associação entre CT mononucleares e PRP é de fato um tratamento eficiente, sendo responsável por uma neoangiogênese precoce, osteogênese acelerada, com melhor qualidade do osso neoformado, e intensa densidade osteoblástica.

Vaz (2006) aplicou um centrifugado osteogênico da MO em fraturas experimentais de fíbulas de coelhos e observou um aumento médio na densidade mineral óssea dos calos de 40,3% e da quantidade relativa de tecido ósseo em 9,4%, sem aumento significativo nas quantidades relativas de cartilagem ou fibrose. O autor considera que o centrifugado favoreceu a consolidação óssea com melhora qualitativa do calo ósseo.

Kraus e Kirker-Head (2006) realizaram um defeito de segmento total de 21 mm no fêmur de cães e fixaram com placa de modo a criar um modelo de não união óssea. Após 15 dias da criação do defeito, CTM autólogas da MO foram colhidas, isoladas e cultivadas e associadas a um cilindro de hidroxiapatita e implantadas no fêmur. Houve estímulo de formação óssea, com obtenção de osso novo na área adjacente ao implante, infiltrando-se no osso receptor.

Barros et al. (2001) trataram falhas de segmento total do rádio de coelhos com MO integral ou MO centrifugada aplicadas por via percutânea. A aplicação por essa via se mostrou um método simples, com mínimo trauma aos tecidos, não introduzindo tecido desvitalizado e, desta forma, reduzindo o risco de infecção e de interferência na reparação óssea. A avaliação radiográfica dos membros operados, realizadas no dia da enxertia e uma semana após, demonstrou a eficiência da aplicação da MO e sua atuação na formação de osso.

Shang et al. (2001) investigaram o potencial de cicatrização do alginato de cálcio associado as CTM da medula óssea cultivadas e diferenciadas em células osteogênicas em defeitos ósseos cranianos em ovelhas. Após seis semanas, observou-se crescimento ósseo considerável no grupo em que foram utilizadas CTM em comparação com o grupo controle, o qual recebeu apenas alginato de cálcio. Após 18 semanas houve reparação quase completa do grupo experimental quando avaliada pela tomografia computadorizada.

### **Contribuição das células-tronco na cicatrização de enxertos ósseos**

Como a cicatrização de um enxerto ósseo cortical passa por um período crítico durante a incorporação, em que o enxerto é gradativamente absorvido para posterior formação de osso novo, tornando-se fraco e vulnerável à ruptura (MILLIS; MARTINEZ, 2007), um dos recursos utilizados pelo ortopedista para evitar complicações é a aplicação de material de osteossíntese que reforce a estabilidade das interfaces receptor-enxerto (DIAS et al., 2008). Mas além disso, a utilização de adjuvantes que acelerem o processo de cicatrização para diminuir o risco de fratura é extremamente bem-vindo. A aplicação de CTM em enxertos ósseos vem sendo utilizada justamente com esse intuito, pois além de sua capacidade em se diferenciar em células ósseas, também são capazes de recrutar FCs ao foco de fratura, estimulando, assim, o recrutamento adicional de outras CTM presentes no tecido ósseo e potencializando o processo de reparo ósseo (PAGLIOSA; ALVES, 2007). Estes autores comentam que não há dúvidas de seus benefícios, sendo a MO como principal fonte de obtenção para uso em enxertos ósseos.

Del Carlo et al. (2007) compararam a consolidação de aloenxertos ósseos corticais de cães associados a diferentes adjuvantes. No grupo 1 (controle) somente o aloenxerto foi colocado na falha tibial. No grupo 2 preencheu-se as interfaces enxerto-hospedeiro apenas com autoenxerto esponjoso. No grupo 3 associou-se ao autoenxerto esponjoso, a proteína óssea morfogenética (BMP) e por fim no grupo 4, associou-se CT da MO com BMP. A precocidade da radiopacidade no enxerto e a completa integração das interfaces foram verificadas em maior intensidade nos grupos 4, 3, 2 e 1, respectivamente. Microscopicamente, a maior formação de osso deu-se, pela ordem nos grupos 4, 2, 3 e 1. Os autores concluíram que o grupo apresentando associação das CT da MO com a BMP contribuíram para a precocidade da formação óssea, determinando osteogênese e osteoindução nas interfaces, respectivamente.

Gomes (2008) avaliou a cicatrização óssea do autoenxerto da crista ilíaca associada a terapia celular da MO. Defeitos ósseos foram criados na mandíbula de coelhos, sendo o grupo controle tratado apenas com o autoenxerto da crista ilíaca e o grupo experimental com o autoenxerto associado as células mononucleares da MO autógena do fêmur. Pela análise radiográfica, observou-se aumento gradativo da densidade óssea com 85,71% dos animais do grupo experimental e 42,85% do grupo controle apresentando formação de ponte óssea 28 dias após a cirurgia. Na análise histopatológica, aos 15 dias, os enxertos eram facilmente visualizados e a atividade das células fagocitárias era intensa. Já aos 30 dias, a sua visualização era mais difícil e, quando possível, apenas um resquício era notado. Com base nos resultados obtidos os autores sugerem que a adição de células mononucleares da MO favorece a cicatrização do autoenxerto em defeitos mandibulares de coelhos.

Salbego (2010) não obteve consolidação esperada nas interfaces enxerto-hospedeiro aos 90 dias de pós-operatório, nem observou diferença clínica, e radiográfica nos grupos tratados com auto ou aloenxertos corticais associados ou não a CT da MO. O autor comenta que não se pode afirmar que a



terapia celular não tenha sido um bom adjuvante, pois os cães tiveram restrição na deposição de carga no foco de fratura, proveniente do reduzido exercício pós-operatório e isso pode ter influenciado diretamente no resultado da consolidação, uma vez que o efeito de compressão axial atua como importante adjuvante na união dos segmentos ósseos.

Oliveira (2008), submeteu coelhos a enxertia osteocondral alógena conservada em glicerina a 98%. Aos 45 dias de pós-operatório, o grupo no qual foi associado células mononucleares da MO e BMP ao enxerto apresentou melhores resultados quanto a formação de cartilagem hialina entre o enxerto e leito receptor quando comparado ao grupo controle que só recebeu a enxertia. A aplicação intra-articular de células mononucleares da MO associada a BMP estimulou a osteointegração do enxerto osteocondral alógeno, mas sem regeneração completa da cartilagem.

Em um estudo semelhante, Souza (2009), também submeteu coelhos a enxertia osteocondral alógena, entretanto, no grupo tratado aplicou apenas CT da MO por via intra-articular associado ao enxerto. Aos 45 e 90 dias de pós-operatório, 75% dos animais do grupo controle (tratado apenas com o enxerto) apresentaram cápsula articular espessa e em 41,66% aderida aos tecidos adjacentes. O enxerto encontrava-se osteointegrado em 33,33% e 58,33% com alterações ósseas. Já no grupo tratado, o enxerto aderiu-se ao leito receptor, sendo que em 91,66% não foi observado processo de degeneração, e em 58,33% notou-se ossificação endocondral junto ao osso subcondral com consolidação óssea. Mais uma vez, a associação de enxertos ósseos com células-tronco mostrou resultados superiores com estimulação de fibrocartilagem e cartilagem hialina com integração do implante no leito receptor.

Prata (2010), quantificou histomorfometricamente a reparação do osso alveolar de ratos após a enxertia de uma associação de osso autógeno e/ou osso bovino composto, associados a CTM da MO. Os resultados sugeriram que quando associou-se as CTM aos enxertos ósseos acelerou-se a neoformação óssea, principalmente quando associadas ao osso autógeno.

Li; Li (2005) utilizaram CTM da medula óssea cultivadas e diferenciadas em osteoblastos, associadas a enxerto ósseo alógeno desmineralizado no preenchimento de falha mandibular de coelhos. No decorrer das semanas, exames radiográficos foram realizados para avaliação da cicatrização, sendo que na décima segunda semana dificilmente se observava a falha no grupo experimental, o qual apresentava densidade semelhante ao do osso mandibular do coelho. Já no grupo controle, na porção abaixo da falha ainda era possível observar regiões radiolúcidas.

Muitas pesquisas em que se associam as CTM a enxertos ósseos, realizam tal procedimento durante o transoperatório, no entanto, uma possibilidade para essa associação é o método de co-cultivo que também tem-se apresentado como uma boa proposta. Gonçalves (2010) analisou “in vitro” a integração entre CTM co-cultivadas com fragmentos de ossos liofilizados (FOLs) através de dois métodos de cultivo: co-cultivo convencional e co-cultivo rotatório. A técnica de crescimento celular no FOL em estufa rotatória possibilitou maior adesão e proliferação celular no enxerto quando comparada ao cultivo convencional, demonstrando que essa alternativa de cultivo provavelmente aumenta a eficiência de terapia celular associada a enxertos ósseos.

Portinho (2006) realizou defeitos na calota craniana de camundongos, sendo que no grupo 1 reconstruiu-se a mesma com osso liofilizado bovino e CTM e no grupo 2 apenas osso liofilizado. O osso liofilizado do grupo 1 era deixado na placa de cultivo 24 horas antes do procedimento. Houve diferença significativa entre os grupos, sendo que do ponto de vista de regeneração histológica, os enxertos contendo CTM indiferenciadas apresentaram resultados melhores, quando comparados àqueles sem combinação com células. O autor concluiu que o emprego de CTM pode significar uma melhoria na qualidade dos enxertos ósseos e uma otimização no tempo para a integração desses enxertos.

### **Considerações finais**

A maioria dos estudos realizados até o momento tem mostrado resultados promissores no que se refere a aplicação de células-tronco adultas na cicatrização de fraturas e de enxertos ósseos. Graças ao seu potencial osteogênico o tempo de cicatrização diminui e isso reflete em um menor risco de complicações no período pós-operatório, como não união e enfraquecimento do enxerto, com posterior fratura.

A obtenção de células-tronco a partir do tecido adiposo é uma alternativa à medula óssea com algumas vantagens, como a facilidade de coleta, abundância de conteúdo e menor processo doloroso. Nos anos de 2007 a 2010 foram utilizados no LATECER fração celular mononuclear da MO e FVE do tecido adiposo, porém, a partir de 2011 iniciaram-se as pesquisas utilizando células cultivadas de tecidos que oferecem menor morbidade na colheita, como tecido adiposo e polpa dentária.

A possibilidade de utilizar tanto as frações totais das células-tronco dos tecidos, quanto a sua expansão em cultura e diferenciação permitem sua aplicação de acordo com a realidade de cada centro cirúrgico, sendo que independente do processamento realizado, a cicatrização poderá ser beneficiada.

### **Referências**

BARBOSA, A.L.T. *Células mononucleares originárias da medula óssea e do tecido adiposo associadas ao plasma rico em plaquetas na cicatrização óssea em cães*. 2013. 198f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. Disponível em: <http://w3.ufsm.br/ppgm/imagens/teses%202013%202/Anna%20Laeticia%20Barbosa.pdf>. Acesso em: 29 mar. 2015.

BARBOSA, A.L.T.; SCHOSSLER, J.E.W.; RAISER, A.G.; SERAFINI, G.M.C.; TREICHEL, T.L.E.; LIBARDONI, R.N.; MARCONATO, F.; SILVEIRA, M.C.; GRAÇA, D.L.; MARTINS, D.B.;

ZANETTI, R.M.; LOPES, S.T.A. Células-tronco mononucleares associadas ao plasma rico em plaquetas na consolidação de falha óssea no cão. Estudo piloto. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 66, n. 6, p. 1718-1726, 2014.

BARROS, S.V.S.G.; DEL CARLO, R.J.; VARGAS, M.I.; GALVÃO, S.R.; FILHO, A.M. Auto-enxerto percutâneo de medula óssea em coelhos.I. Coleta, preparo e aplicação. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 31, n. 6, p. 1013-1018, 2001.

BERTINE, M.A.H.; ARAUJO, F.S. Biologia e uso clínico das células-tronco mesenquimais: uma revisão concisa. *Investigação*, Franca, v. 9, n. 2/3, p. 105–110, 2009.

BYDLOWSKI, S. P.; DEBES, A.A.; MASELLI, L.M.F.; JANZ, F.L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, São Paulo, v. 31, suplemento 1, p. 25-35, 2009.

CRISTANTE, A.F.; NARAZAKI, D.K. Avanços no uso de células-tronco em ortopedia. *Revista Brasileira de Ortopedia*, São Paulo, v. 46, n. 4, p. 359-367, 2011.

DEL CARLO, R.J.; PINHEIRO, L.C.P.; MONTEIRO, B.S.; SILVA, P.S.A.; VIANA, V.W. Integração de aloenxertos ósseos corticais associados ou não a células-tronco da medula óssea, proteína óssea morfogenética (BMP) e autoenxerto esponjoso em cães. *Veterinária e Zootecnia*, Botucatu, v. 14, n. 2, p. 204-215, 2007.

DIAS, M.I.R.; SOUZA, C.M.P.; CARVALHO, P.M.P.; LEMPEK, M.R.; VIEGAS, C.A.A.; AZEVEDO, J.M.T. Enxertos e substitutos ósseos em cirurgia ortopédica reconstrutiva nos animais de companhia - uma breve revisão. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, Rio de Janeiro, v. 35, n. 4, p. 339-350, 2013.

DIAS, R.M.F.; CARVALHAIS, P.; MATOS, P.; JUDAS, F. Aloenxertos ósseos na osteossíntese de fracturas traumáticas. *Revista Portuguesa de Ortopedia e Traumatologia*, Lisboa, v. 16, p. 31-42, 2008.

DRAGO, M.A. *Placa de osso bovino na osteossíntese de tíbia de coelhos: avaliação biomecânica ex vivo*. 2011. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES. Disponível em: <[http://portais4.ufes.br/posgrad/teses/tese\\_5256\\_.pdf](http://portais4.ufes.br/posgrad/teses/tese_5256_.pdf)>. Acesso em: 29 mar. 2015.

FUCHS, E.; TUMBAR, T.; GUASCH, G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*, New York, v.116, p.769-778, 2004.

GUARITA-SOUZA, L. C.; CARVALHO, K.A.T.; REBELATTO, C.; SENEGAGLIA, A.; HANSEN, P.; FURUTA, M.; MIYAGUE, N.; FRANCISCO, J.C.; OLANDOSKI, M.; WOITOWICZ, V.; SIMEONI, R.; FARIA-NETO, J.R.; BROFMAN, P.. A comparação entre o transplante de células tronco mononucleares e mesenquimais no infarto do miocárdio. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery*, São José do Rio Preto, v. 20, n. 3, p. 270-278, 2005.

GOMES, C. *Avaliação da cicatrização óssea em falha mandibular com auto-enxerto ósseo associado a suspensão celular de medula óssea autógena: estudo experimental*. 2008. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. Disponível em:

<[http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/14332/000665032.pdf?sequence=1&locale=pt\\_BR](http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/14332/000665032.pdf?sequence=1&locale=pt_BR)>. Acesso em: 29 mar. 2015.

GONÇALVEZ, F.C. *Associação de células-tronco mesenquimais e fragmentos ósseos liofilizados: desenvolvimento de um método alternativo de cultivo*. 2010. 38f. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas). Faculdade de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. Disponível em:

<<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/35308/000793776.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 29 mar. 2015.

JOHNSON A.L. Fundamentos da cirurgia ortopédica e manejo de fraturas. In: FOSSUM T.W. *Cirurgia de Pequenos Animais*. 3ªed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 930-1014.

KRAUS, K. H.; KIRKER-HEAD, C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Veterinary Surgery*, Philadelphia, v. 35, p. 232-242, 2006.

LI, Z.; LI, ZB. Repair of mandible defect with tissue engineering bone in rabbits. *ANZ Journal of Surgery*, Richmond, v. 75, p. 1017-1021, 2005.

LUCARELLI, E.; DONATI, D.; CENACCHI, A.; FORNASARI, P.M. Bone reconstruction of large defects using bone marrow derived autologous stem cells. *Transfusion and apheresis science*, Ottawa, v. 30, p. 169-174, 2004.

MAIA, L.; De VITA, B.; MORAES, C.N.; DESTRO, F.C.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; AMORIM, R.M. Considerações sobre a obtenção, processamento, caracterização e aplicação terapêutica das células-tronco mesenquimais em medicina equina. *Veterinária e Zootecnia*, Botucatu, v. 20, n. 3, p. 359-373, 2013.

MONTEIRO, B.S.; ARGÔLO-NETO, N.M.; DEL CARLO, R.J. Terapia celular em reparação óssea – aplicação clínica de células tronco mesenquimais. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, Recife, v. 11, suplemento 2, p. 95-100, 2008.

MONTEIRO, B.S.; ARGÔLO NETO, N.M.; DEL CARLO, R.J.; Células-tronco mesenquimais. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 40, n. 1, p. 238-245, 2010.

MILLIS, D.L.; MARTINEZ, S.A. Enxertos ósseos. In: SLATTER, D. *Manual de Cirurgia de Pequenos Animais*. 3 ed. Barueri: Manole, 2007. p. 1875-1891.

MIZUNO, H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: Ten years of research and a literature review. *Journal of Nippon Medical School*, Tokyo, v. 76, n. 2, p. 56-66, 2009.

NARDI, N.B. Células-tronco: fatos, ficção e futuro. *Genética na escola*, Ribeirão Preto, v. 2, n. 2, p. 25-29, 2007.

OLIVEIRA, B.J.N.A. *Enxerto osteocondral alógeno, associado à inoculação de células mononucleares da medula óssea e proteína morfogenética óssea no reparo do sulco troclear de coelhos*. 2008. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG. Disponível em: <<http://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/1873/1/EnxertoOsteocondralAlogeno.pdf>> Acesso em: 29 mar. 2015.

OLIVEIRA, G.K.; RAISER, A.G.; OLSSON, D.; SALBEGO, F.Z.; MARTINS, D.B.; DEZENGRINE, R.; SANTOS JÚNIOR, E.B.; RAPPETI, J.; TRINDADE, L.B.; TOGNOLI, G.K.; PIPPI, N.L.; SAUSEN, L. Células-tronco mononucleares autólogas e proteína óssea morfogenética na cicatrização de defeitos tibiais experimentalmente induzidos em cão. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 62, n. 1, p. 72-79, 2010.

PAGLIOSA, G.M.; ALVES, G.E.S. Considerações sobre obtenção e uso do plasma rico em plaquetas e das células mesenquimais indiferenciadas em enxertos ósseos. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 37, n. 4, p. 1202-1205, 2007.

PIERMATTEI, D.L.; FLO, G.L.; DECAMP, C.E. Enxertos ósseos. In: \_\_\_\_\_. *Ortopedia e Tratamento de Fraturas de Pequenos Animais*. 4ªed. São Paulo: Manole, 2009. p.180-188.

PINTO FILHO, S.T.L.; TREICHEL, T.L.E.; JUNIOR, J.S.A.; ROSA, M.B.; DALMOLIN, F.; BRUN, M.V.; KRAUSE, A.; PIPPI, N.L. Células-tronco mesenquimais adultas: Características e aplicações experimentais em animais. *Veterinária e Zootecnia*, Botucatu, v. 20, p. 49-59, 2013.

PORTINHO, C.P. *Reconstrução óssea de calota craniana com enxerto com células-tronco mesenquimais: estudo experimental*. 2006. 156 f. Dissertação (Mestrado em Medicina: Cirurgia). Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/8962/000592230.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 29 mar. 2015.

PRATA, C.A. *Avaliação da osteogênese em defeitos ósseos com utilização da engenharia tecidual óssea: uma comparação entre osso autógeno, substituto ósseo e células-tronco mesenquimais*. 2010. 118f. Tese (Doutor em Odontologia). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/58/58131/tde-17092010-100806/pt-br.php>>. Acesso em: 29 mar. 2015.

RIBEIRO, T.B. *Xenotransplante de células mesenquimais de tecido adiposo humano em modelo de lesão de raízes ventrais da medula espinal de rato*. 2013. 116f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Médica). Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000905950>>. Acesso em: 29 mar. 2015.

ROSA, M.B. *Células estromais mesenquimais indiferenciadas alogênicas, ultrassom terapêutico ou laser, no tratamento de feridas cutâneas de coelhos*. 2012. 60f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. Disponível em: <<http://w3.ufsm.br/ppgmv/images/dissertacoes2012/Mauricio%20Borges.pdf>>. Acesso em: 29 mar. 2015.

SALBEGO, F.Z. *Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado à inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea*. 2010. 211f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Federal de

Santa Maria, Santa Maria, RS. Disponível em:

<<http://w3.ufsm.br/ppgm/imagens/Fabiano%20Z.%20Salbego.pdf>>. Acesso em: 29 mar. 2015.

SHANG, Q.; WANG, Z.; LIU, W.; SHI, Y.; CUI, L.; CAO, Y. Tissue-engineered bone repair of sheep cranial defects with autologous bone marrow stromal cells. *The Journal of Craniofacial Surgery*, Philadelphia, v. 12, n. 6, p. 586-593, 2001.

SOUZA, L.A. *Enxerto osteocondral alógeno associado à inoculação de células mononucleares autólogas da medula óssea no reparo do sulco troclear de coelhos*. 2009. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG. Disponível em: <<http://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/1788/1/EnxertoOsteocondralAlogeno.pdf>>. Acesso em: 29 mar. 2015.

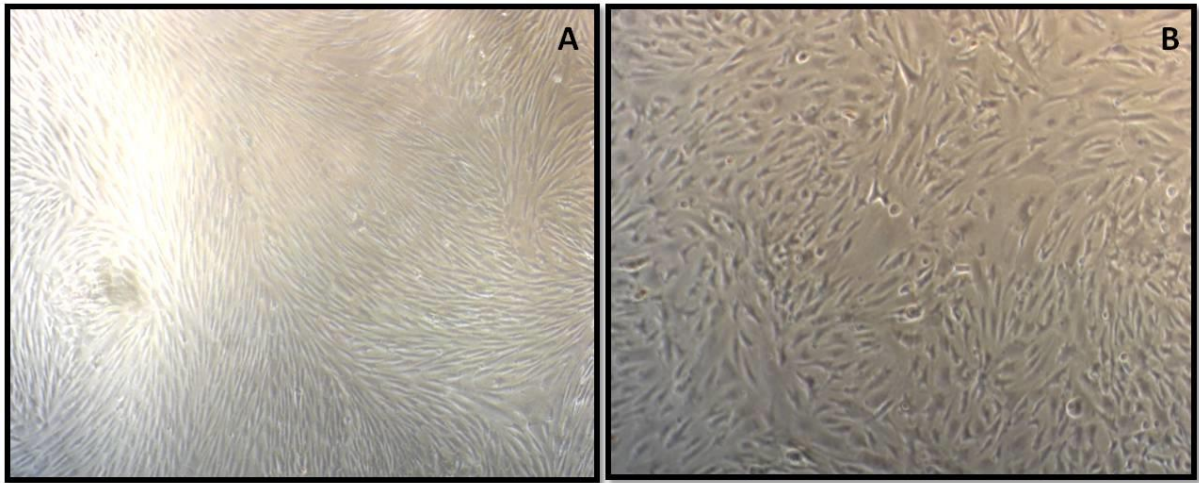
STEVENSON, S. Enxertia óssea. In: BOJRAB, M.J. *Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais*. 3ªed. São Paulo: Roca,1996. p. 758-819.

VAZ, C.E.S. *Avaliação do efeito de centrifugado osteogênico de medula óssea na consolidação de fratura: estudo experimental em coelhos*. 2006. 97f. Tese (Doutor em Ciências). Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo. São Paulo, SP. Disponível em:<<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5140/tde-24012007-134046/pt-br.php>>. Acesso em: 29 mar. 2015.

YARAK, S.; OKAMOTO, O.K. Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, Rio de Janeiro, v. 85, n. 5, p. 647-656, 2010.

ZAGO; COVAS. Pesquisa com células-tronco: aspectos científicos, éticos e sociais. In: Seminário Instituto Fernando Henrique Cardoso, 2004. São Paulo. Disponível em: <<http://www.ifhc.org.br/wp-content/uploads/apresentacoes/1936.pdf>>. Acesso em: 17 fev. 2015.

Figura 1. CTM derivadas do tecido adiposo de coelhos. (A) ADSCs da bolsa adiposa interescapular aos 21 dias de cultivo em laboratório. (B) ADSCs do tecido adiposo perirrenal aos 21 dias de cultivo.





## **4. CAPÍTULO 3**

# **VÉRTEBRA COCCÍGEA COMO ALTERNATIVA A AUTOENXERTIA ÓSSEA TRADICIONAL – AVALIAÇÃO TOMOGRÁFICA E BIOMECÂNICA EM CÃES *EX VIVO***

**Gabriele Maria Callegaro Serafini, Ney Luis Pippi**

(Artigo a ser submetido para publicação – Revista Ciência Rural)

**Vértebra coccígea como alternativa a autoenxertia óssea tradicional – Avaliação tomográfica e biomecânica em cães *ex vivo***

Coccygeal vertebra as an alternative to traditional autograft bone - tomography and biomechanical study in *ex vivo* dogs

Gabriele Maria Callegaro Serafini<sup>1</sup> Ney Luis Pippi<sup>1</sup>

**RESUMO**

A enxertia óssea é um recurso muito utilizado pelo ortopedista veterinário para reconstrução de membros acometidos por perda total de segmento ósseo cortical. Entretanto, a ausência de banco de ossos e a presença de autoenxertos com dimensões estruturais insuficientes são contratempos temidos na escolha deste recurso. Devido a isso, este trabalho teve como objetivo investigar as características estruturais da vértebra coccígea sugerindo-a como possível alternativa para autoenxertia óssea. Para tal, foram utilizados oito cães *ex vivos*, sendo cada cão doador de duas amostras de cada um dos seguintes grupos de enxertos ósseos: porção crânio-dorsal da asa do ílio direita e esquerda (grupo A), fragmento da 10<sup>a</sup> costela direita e esquerda (grupo C), 4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> vértebras coccígeas (grupo Co) e porção diafisária da tíbia direita e esquerda (grupo T), resultando em 16 amostras por grupo. Tais enxertos foram submetidos a exame de tomografia computadorizada para mensuração de osso esponjoso e osso cortical e teste biomecânico para avaliação da resistência. A vértebra coccígea ofereceu boa resistência óssea e apresentou elevado percentual de osso esponjoso, conferindo a ela, além de provável grande poder osteogênico, também de suporte estrutural.

**Palavras-chave:** ortopedia, falha óssea, enxerto corticoesponjoso.

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: gabrieleserafini@yahoo.com.br. \*Autor para correspondência.

## ABSTRACT

Bone grafting is a resource widely used by veterinary orthopedic surgeon for reconstruction of affected limbs for total loss of cortical bone segment. However, the absence of bone bank and the presence of autografts with insufficient structural dimensions are feared setbacks in choosing this resort. Because of this, this study aimed to investigate the structural characteristics of coccygeal vertebra suggesting it as an possible alternative to bone autograft. For this, were used eight, *ex vivos*, dogs, with each dog donor of two samples of each bone grafts following groups: cranial-dorsal portion of the right and left iliac crest (group A), 10<sup>th</sup> fragment of the right and left ribs (group C), 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> coccygeal vertebrae (group Co) and diaphyseal portion of the right and left tibia (group T), resulting in 16 samples per group. Such grafts underwent computed tomography for measurement of cancellous bone and cortical bone and biomechanical test to evaluate the resistance. The coccygeal vertebra offered good bone strength and showed high percentage of cancellous bone, conferring to it, in addition to probable large power osteogenic also structural support.

**Keywords:** orthopedics, bone loss, corticancellous graft.

## INTRODUÇÃO

O uso de enxertos ósseos é um procedimento bem sedimentado na ortopedia veterinária (DENNY & BUTTERWORTH, 2006), visto serem biocompatíveis, de fácil aplicação e acondicionamento. É o método de eleição na reposição de perdas ou falhas ósseas em fraturas e ressecções amplas, assim como no preenchimento de espaços gerados por defeitos corticais, como nas fraturas multifragmentares (DRAGO, 2011).

Um enxerto ósseo ideal oferece células osteogênicas que produzem osso novo, além de fatores osteoindutores, que induzem as células mesenquimais indiferenciadas a se diferenciarem em células ósseas. Oferece ainda, uma matriz osteocondutora, a qual atua como

estrutura para o crescimento interno de osso novo e suporte mecânico para a estrutura óssea. Dependendo do tipo de enxerto, ele pode realizar uma ou mais funções, sendo que a escolha por um ou outro vai depender das funções requeridas (MILLIS & MARTINEZ, 2007).

Os enxertos corticoesponjosos são considerados o “padrão ouro” da enxertia óssea (PORTINHO, 2006), pois quando implantados no hospedeiro, apresentam ação osteogênica, osteocondutiva e osteoindutiva (BAUER & MUSCHLER, 2000), além de suporte estrutural (DENNY & BUTTERWORTH, 2006). As costelas e a porção craniodorsal da espinha ílica são os locais doadores mais comuns, podendo ser utilizados como autoenxertos a fresco ou como aloenxertos conservados (PIERMATTEI et al., 2009).

Os enxertos costais podem ser utilizados no reparo das fraturas fragmentares e na substituição de defeitos segmentares, sendo a nona e a décima costelas as mais fáceis de coletar em decorrência da pouca musculatura subjacente (STEVENSON, 1996). Devido a sua anatomia curva, a costela oferece a vantagem de ser utilizada em falhas de sínfise mandibular, entretanto, a sua coleta acarreta o risco de lesão pleural e possíveis complicações no tratamento pós-operatório dessa lesão (GOMES, 2008).

A asa do ílio pode ser utilizada em forma de lascas no interior das articulações para auxiliar na estabilização em artrodeses, assim como em forma de bloco para preenchimento de defeitos corticais. O enxerto é esculpido para que se encaixe no defeito e deve-se fixá-lo rigidamente com parafusos de revestimento ou cerclagens (STEVENSON, 1996).

Tanto a asa do ílio como a costela apresentam características compatíveis com a de um enxerto ósseo corticoesponjoso, entretanto devido ao formato curvado de ambas não se recomenda suas aplicações em sítios receptores que suportem peso (YEH et al., 1991). Diante disso, despertou-se o interesse pela realização deste estudo, o qual tem por objetivo avaliar a resistência e características estruturais da vértebra coccígea, partindo-se da suposição de que

ela é de fácil obtenção, apresenta as características esperadas em um enxerto ósseo ideal e possui formato e diâmetro adequado para ser aplicada em defeitos ósseos de segmento total.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram obtidos do setor de Patologia Veterinária da instituição (UFSM), oito cães adultos, *ex vivos*, de ambos os sexos, de diferentes raças, com massa corporal média de 7,5 kg ( $\pm 2,02$  quilogramas) e idade média de 9,00 anos ( $\pm 3,87$  anos) e livres de doenças ou alterações ósseas. De cada cão coletou-se a porção crânio-dorsal da asa do ílio direita e esquerda (grupo A), porção do terço proximal da 10<sup>a</sup> costela direita e esquerda (grupo C), 4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> vértebras coccígeas (grupo Co) e porção diafisária da tíbia direita e esquerda (grupo T). Com isso, cada grupo foi composto por 16 amostras.

Foram removidos os tecidos moles e perióstio de todos os segmentos ósseos (enxertos), sendo que nas vértebras coccígeas, as apófises e o arco dorsal também foram seccionados, assim como os discos intervertebrais curetados, permanecendo o corpo da vértebra. De acordo com o comprimento da 4<sup>a</sup> vértebra coccígea de cada cão, foi determinado o mesmo comprimento dos outros segmentos ósseos do mesmo animal, a fim de que cada cão fornecesse sempre comprimentos iguais de cada segmento.

Nos segmentos das costelas, realizaram-se dois cortes transversais na região do terço proximal. Na asa do ílio, realizaram-se dois cortes dorsoventrais (um próximo à articulação sacro-ilíaca e outro mais cranial) e um corte ventral, no sentido craniocaudal, imediatamente abaixo da região mais espessa dessa porção, mimetizando o mesmo local de secção que se utilizaria esse enxerto na rotina. Na tíbia, mensurou-se o comprimento da mesma e a partir do seu ponto médio realizaram-se dois cortes transversais resultando em um segmento ósseo da região diafisária. Por fim, as extremidades da 5<sup>a</sup> coccígea foram seccionadas para deixar no mesmo comprimento da 4<sup>a</sup>. Posteriormente, os enxertos foram lavados em solução de NaCl

0,9% para remoção de pequenas sujidades, colocados em sacos plásticos vedados e congelados em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Após a obtenção do número suficiente de amostras, os enxertos ósseos foram transportados em caixa térmica para realização de tomografia computadorizada (Figura 1A) com cortes axiais de 0,625 mm de espessura e posteriormente devolvidos ao freezer até a realização dos ensaios biomecânicos.

A tomografia computadorizada teve por objetivo permitir a mensuração da proporção de osso esponjoso e osso cortical de cada enxerto. As imagens foram registradas no computador e processadas em uma estação de trabalho. A partir desse exame de imagem, obteve-se várias secções transversais de cada segmento ósseo, onde em cada secção foi possível observar um contorno composto por osso cortical; e um centro, composto por osso esponjoso (Figura 1B). Como a figura geométrica que melhor se assemelha a essas secções é o círculo, obteve-se a área total desse círculo e posteriormente a área central (correspondente a área de osso esponjoso). Por fim, ao subtrair-se a área total da área de osso esponjoso, obteve-se a área de osso cortical (correspondente a área de uma coroa circular em termos matemáticos).

Para a obtenção do valor do raio a ser empregado na fórmula da área, somou-se o valor da espessura de osso cortical com a metade do valor da espessura do osso esponjoso. Com o objetivo de diluir erro, mensurou-se a espessura de osso cortical em quatro pontos diferentes e dividiu-se por quatro para obter a média. Já, a espessura do osso esponjoso foi mensurada em duas direções diferentes e dividida por dois (Figura 1C). Com isso, o cálculo da média das espessuras de cada osso permitiu transformar o formato quase circular das secções desses ossos em um círculo perfeito, com área extremamente próxima ao formato original.

Além disso, sabendo-se que os segmentos ósseos não apresentam forma regular ao longo de todo o seu comprimento, em cada segmento ósseo realizou-se a área de três secções diferentes (duas delas mais próximas às extremidades e uma mais central) e suas médias

aritméticas foram obtidas. Diante dos valores das áreas de osso esponjoso e osso cortical, através de uma regra de três simples, calculou-se a porcentagem equivalente a cada tipo de osso.

Para o cálculo da asa do ílio, verificou-se por meio da observação de *pixels* que a quantidade de osso cortical é aproximadamente 75% da área de uma coroa circular. Diante disso, faz-se o cálculo da área da coroa circular considerando somente 75% desta (Figura 1D).

Através das imagens fornecidas pela tomografia computadorizada, mensurou-se o diâmetro de cada enxerto em três locais diferentes (próximo as duas extremidades e no centro). Em cada local, a espessura foi mensurada em duas direções: de 0 a 180° e de 90 a 270° e sua média obtida.

Após o período de 90 dias ( $\pm 5$  dias) de congelamento, cada segmento ósseo foi submetido ao ensaio biomecânico na máquina EMIC com capacidade de compressão/flexão de até 100kN e velocidade de 10 mm/minuto. Para isso, seis horas antes do ensaio, os segmentos foram retirados do freezer e submersos em solução de NaCl 0,9% para reidratação. Após esse procedimento, cada implante foi posicionado perpendicularmente à base da máquina para sofrer força compressiva até a ruptura. O momento da ruptura foi considerado como o valor da carga máxima registrada imediatamente antes do momento em que a amostra falhava em resistir à pressão exercida pela máquina. Tal momento também era observado por um pico máximo no gráfico seguido de um declínio. Para análise estatística da resistência biomecânica e percentual de osso esponjoso foi utilizada a análise de variância ANOVA e o teste de médias de Scott-Knott com  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Um dos cuidados a ser observado na escolha de um enxerto ósseo de segmento total, é o seu diâmetro, pois se espera que seja próximo ao do osso hospedeiro, promovendo aposição

quase completa (MILLIS & MARTINEZ, 2007). A média do diâmetro das extremidades e no centro dos enxertos foi, respectivamente, de 0,73 e 0,78 cm no grupo A; 0,59 e 0,57 cm no grupo Co; 0,38 e 0,38 cm no grupo C e 0,86 e 0,86 cm no grupo T. Tal medida foi tomada em três locais diferentes, pois observou-se que, especialmente, a vértebra coccígea não apresentava espessura uniforme ao longo do seu comprimento, sendo ligeiramente mais fina no centro e mais larga nas extremidades. Diante dos valores encontrados, pode-se considerá-la, sobre o ponto de vista estrutural, adequada para substituição de segmento ósseo total na tíbia, pois o diâmetro de sua extremidade aproximou-se de 70% da espessura tibial. Paralelamente, em um estudo de comparação de diâmetros ósseos, os autores desse trabalho concluíram que tanto o rádio quanto a ulna também são compatíveis com o diâmetro da vértebra coccígea autóloga, com aposição próxima de 100% entre as extremidades ósseas.

A autoenxertia de vértebras coccígeas vascularizadas (8<sup>a</sup>, 9<sup>a</sup> ou 10<sup>o</sup> vértebra) já foi descrita com sucesso em defeitos tibiais criados de cães. Entretanto, quando transferido sem anastomose vascular, não houve união óssea (YEH et al., 1991). Esse resultado sugere que de fato a revascularização imediata favorece a “pega” do enxerto, mas a estabilidade e contato ósseo são fundamentais. O fracasso do tratamento acima citado, foi atribuído pelos autores, ao diâmetro reduzido do enxerto transferido em relação a diáfise da tíbia, além da falta de fixação rígida. O não cumprimento dessas duas condições associada a falta de vascularização imediata, determinou o fracasso da enxertia óssea. Nesse sentido, o trabalho aqui apresentado, utilizou a auto enxertia da 4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> coccígeas, as quais apresentam diâmetro maior, aumentando a superfície de contato entre os fragmentos.

Em defeitos mandibulares o emprego das vértebras coccígeas também foi relatado com sucesso. YEH & HOU (1994), preencheram a falha mandibular de um cão com o enxerto autógeno vascularizado da 8<sup>a</sup> vértebra coccígea. Consideraram o sítio doador de baixa morbidade quando comparado aos outros locais de coleta, mas salientam que o comprimento



desse enxerto é limitado. Esse fato foi observado nas coccígeas aqui estudadas, pois o comprimento restrito variou de 0,81 a 1,22 cm. Entretanto, considera-se a possibilidade da utilização de vértebras associadas em conjunto, desde que se efetue a correta curetagem do disco intervertebral, evitando a interferência na consolidação entre esses implantes.

De forma semelhante, AGUIAR et al. (2007) também reconstruíram a mandíbula de um felino acometido por perda óssea, através da autoenxertia da 14<sup>a</sup> vértebra coccígea associada a gordura abdominal e imobilização com pinos de Steinmann. Doze meses após a reconstrução mandibular, os exames radiográficos revelaram união óssea completa.

Com relação a costela, observou-se nesse trabalho, que além de curva, sua espessura é delgada, fator que impede a mesma de ser utilizada como autoenxerto de segmento total de osso longo. Contrariamente, a asa do ílio ofereceu espessura compatível com a desejada, entretanto, como uma de suas extremidades é curva, deve-se seccioná-la para torná-la plana, para permitir a aposição com o osso hospedeiro e isso deixa seu comprimento limitado. Tanto as costelas quanto a asa do ílio, adequam-se melhor em defeitos mandibulares (LUNARDI et al., 2001, BRAGA-SILVA et al., 2005, GOMES, 2008, EL-DAHARAWY et al., 2010), fendas alveolares (MENDONÇA et al., 2011) e rinoplastias (SANTOS JÚNIOR et al., 2008).

A análise das propriedades mecânicas dos enxertos corticoesponjosos é recomendada, pois uma vez transplantados, são submetidos, principalmente, a esforços de compressão. Dessa forma, o teste de compressão axial é o mais indicado para testar resistência de um enxerto ósseo (CASTANIA, 2002). No presente estudo, a média de força necessária para produzir ruptura nos segmentos ósseos foi maior no grupo T ( $5.979,58 \pm 1.605,98\text{N}$ ), seguida do grupo A ( $748,51 \pm 352,17\text{N}$ ), grupo Co ( $632,31 \pm 215,22\text{N}$ ) e grupo C ( $565,35 \pm 272,95\text{N}$ ).

Esses valores foram analisados estatisticamente, tanto com relação a força de compressão entre os grupos, quanto com relação a resistência dos implantes por milímetro de

osso. Em ambas as análises, não houve diferença estatística entre os grupos da asa do fíio, coccígea e costela, mas sim da tíbia. Contudo, o grupo da tíbia proposto nesse trabalho teve a função de grupo controle, informando a resistência original do local receptor do enxerto. Dessa forma, sua superioridade biomecânica com relação aos enxertos corticoesponjosos era esperada, visto apresentar estrutura predominantemente cortical. Os ossos corticais apresentam apenas 5 a 30% de porosidade, ao contrário do osso esponjoso que pode chegar a 90% (HULSE; HYMAN, 2007). Essa característica, confere ao osso cortical maior resistência à deformação e como resultado suporta mais carga que o osso esponjoso antes de ocorrer a fratura (MOMIN et al., 2013).

Ainda embasado nas características de um bom segmento de enxerto, atenta-se para que não só a resistência é fato importante. Espera-se sim, que um enxerto corticoesponjoso possua uma quantidade de osso cortical capaz de garantir suporte estrutural, mas que haja osso esponjoso suficiente para fornecer células osteogênicas (MILLIS & MARTINEZ, 2007).

Entre os três enxertos estudados, não houve diferença quanto a resistência à compressão axial, mas sim em relação a quantidade de osso esponjoso. O segmento de asa do fíio apresentou 69% de sua estrutura composta por osso esponjoso, enquanto as coccígeas 42% e costelas 26%. Como já mencionado, o fragmento da tíbia, utilizado como controle, era constituído predominantemente por osso cortical, garantindo resistência estatisticamente superior aos demais segmentos.

A proporção elevada de osso esponjoso encontrada na vértebra coccígea revela sua grande capacidade osteogênica, a qual foi confirmada por MCDUFFEE & ANDERSON (2003), que pesquisaram o potencial osteogênico, através de cultura celular *in vitro*, de cinco sítios doadores em equinos: metáfise da tíbia, esterno, tuberosidade coxal, 4ª vértebra coccígea e perióstio da diáfise tibial. Os melhores rendimentos celulares foram da tuberosidade coxal, perióstio e a 4ª vértebra coccígea.

Cabe ressaltar a importância dos autoenxertos ósseos, por possuírem, potencialmente, os principais fatores favoráveis à incorporação: osteoindução, osteocondução, osteogênese e ausência de reação imunológica (MENDONÇA et al., 2011). Dessa forma, utilizando-se das coccígeas, tais propriedades são mantidas e os pacientes beneficiados com o tratamento de menor morbidade e melhores condições de sucesso.

Diante das características analisadas, cabe ressaltar que a vértebra coccígea reuniu atributos inerentes aos enxertos corticoesponjosos de segmento ósseo total. Sua espessura e seu formato reto e cilíndrico, permitem adequada aposição óssea entre os fragmentos e sua resistência biomecânica associada ao elevado percentual de osso esponjoso, lhe confere suporte estrutural e grande poder osteogênico.

## **CONCLUSÃO**

Os enxertos da costela, asa do ílio e coccígea não diferem estatisticamente quanto a resistência à compressão axial. Entretanto, a 4ª vértebra coccígea apresenta maior quantidade de osso esponjoso do que as costelas e conformação cilíndrica melhor ajustável aos ossos longos do que a asa do ílio, tornando-se uma boa opção para substituição de segmento ósseo total de ossos longos.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Carlos Jesus Haygert pela disponibilidade na realização do exame de tomografia computadorizada.

## **COMITÊ DE ÉTICA**

Pesquisa aprovada pelo CEUA/UFSM, sob parecer 097/2014.

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, E.S.V. et al. Reconstrução mandibular para reparo da perda de tecido ósseo em felino mediante o emprego de enxerto ósseo e adiposo autógenos e pino de Steinmann. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35 (supl 2), p.s348-s349, 2007. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/13363/000644349.pdf?sequence=1>>.

Acesso em: 17 jan. 2015.

BAUER, T.W.; MUSCHLER, G.F. Bone graft materials: An overview of the basic science. **Clinical Orthopedics and Related Research**, v.371, p.10-27, 2000. Disponível em: <[http://journals.lww.com/corr/Abstract/2000/02000/Bone\\_Graft\\_Materials\\_An\\_Overview\\_of\\_the\\_Basic.3.aspx](http://journals.lww.com/corr/Abstract/2000/02000/Bone_Graft_Materials_An_Overview_of_the_Basic.3.aspx)>. Acesso em: 17 jan. 2015.

BITTAR, J.A. **A utilização da tomografia computadorizada em implantodontia**. 2002. 56 f. Monografia (Especialização em Radiologia Odontológica). Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, SP.

BRAGA-SILVA, J. et al. Reconstrução do segmento ósseo mandibular: comportamento dos implantes ósseo-integrados nos retalhos vascularizados de crista ilíaca e fíbula. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v.20, n.3, p.176-181, 2005. Disponível em: <[http://www.rbcpc.org.br/detalhe\\_artigo.asp?id=269](http://www.rbcpc.org.br/detalhe_artigo.asp?id=269)>. Acesso em: 17 jan. 2015.

CASTANIA, V.A. **Enxerto córtico-esponjoso homogêneo processado quimicamente e esterilizado em óxido de etileno em cães**. 2002. 54f. Mestrado (Mestrado em Bioengenharia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/82/82131/tde-07012003-092038/pt-br.php>>. Acesso em: 17 jan. 2015.

DENNY, H.R.; BUTTERWORTH, S.J. Enxertos ósseos. In: \_\_\_\_\_. **Cirurgia Ortopédica em Cães e Gatos**. 4.ed. São Paulo: Roca, 2006. Cap. 2, p.14-18.

DRAGO, M.A. **Placa de osso bovino na osteossíntese de tíbia de coelhos: avaliação biomecânica *ex vivo***. 2011. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES. Disponível em: < [http://portais4.ufes.br/posgrad/teses/tese\\_5256\\_.pdf](http://portais4.ufes.br/posgrad/teses/tese_5256_.pdf)>. Acesso em: 17 jan. 2015.

EL-DAHARAWY, M. H. et al. The effect of immobilization on reconstruction of mandibular defect using free iliac crest bone graft in dogs. **Nature and Science**, v. 8, n. 11, p. 52-58, 2010. Disponível em: < [http://www.sciencepub.net/nature/ns0811/08\\_3220ns0811\\_52\\_58.pdf](http://www.sciencepub.net/nature/ns0811/08_3220ns0811_52_58.pdf)>. Acesso em: 17 jan. 2015.

GOMES, C. **Avaliação da cicatrização óssea em falha mandibular com autoenxerto ósseo associado a suspensão celular de medula óssea autógena: estudo experimental**. 2008. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. Disponível em: < <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/14332/000665032.pdf?sequence=1>>. Acesso em 17 jan. 2015.

HULSE, D., HYMAN, B. Biomecânica e biologia das fraturas. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3 ed. Barueri: Manole, 2007. Cap.126, p.1785-1792.

LUNARDI, D. V. et al. Tratamento cirúrgico do ameloblastoma com reconstrução de mandíbula com enxerto de crista ilíaca não vascularizado – Estudo de sete casos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.28, n.1, p. 09-12, 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rcbc/v28n1/02.pdf>>. Acesso em: 17 jan. 2015.

MCDUFFEE, L.A.; ANDERSON, G.I. *In vitro* comparison of equine cancellous bone graft donor sites and tibial periosteum as sources of viable osteoprogenitors. **Veterinary Surgery**, v.32, p.455-463, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14569574>. Acesso em: 17 jan. 2015. doi:10.1053/jvet.2003.50060.

MENDONÇA, J.C.G.; LIMA, C.M.C.; TERRA, G.A.P. Uso de enxerto ósseo autógeno de crista ilíaca na reconstrução de fenda alveolar em paciente fissurada: relato de caso. **Revista Brasileira de Cirurgia Craniomaxilofacial**, v.14, n.3, p.162-165, 2011. Disponível em: <[http://www.abccmf.org.br/cmfm/Revi/2011/julho-setembro/08-](http://www.abccmf.org.br/cmfm/Revi/2011/julho-setembro/08-Uso%20de%20enxerto%20%C3%B3sseo%20aut%C3%B3geno%20.pdf)

[Uso%20de%20enxerto%20%C3%B3sseo%20aut%C3%B3geno%20.pdf](http://www.abccmf.org.br/cmfm/Revi/2011/julho-setembro/08-Uso%20de%20enxerto%20%C3%B3sseo%20aut%C3%B3geno%20.pdf)>. Acesso em: 17 jan. 2015.

MILLIS, D.L.; MARTINEZ, S.A. Enxertos ósseos. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3.ed. Barueri: Manole, 2007. Cap.133, p.1875-1891.

MOMIN, M.A.; KURABAYASHI, T.; YOSUE, T. Quantitative and morphological evaluation of cancellous and cortical bone of the mandible by CT. **OMICS Journal of Radiology**, v.3, n.1, p.1-5, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4172/2167-7964.1000155>>. Acesso em: 25 jan. 2015. doi:10.4172/2167-7964.1000155.

PIERMATTEI, D.L.; FLO, G.L.; DECAMP, C.E. Enxertos ósseos. In: \_\_\_\_\_. **Ortopedia e Tratamento de Fraturas de Pequenos Animais**. 4.ed. São Paulo: Manole, 2009. Cap.3, p.180-188.

PORTINHO, C.P. **Reconstrução óssea de calota craniana com enxerto com células-tronco mesenquimais: estudo experimental**. 2006. 156f. Dissertação (Mestrado em Medicina: Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. Disponível em: <

<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/8962/000592230.pdf?sequence=1>>.

Acesso em: jan. 2015.

STEVENSON, S. Enxertadura óssea. In: BOJRAB, M.J. **Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais**. 3.ed., São Paulo: Roca, 1996. Cap. 48, p. 758-819.

SANTOS JÚNIOR E.B. et al. Rinoplastia experimental com enxerto autógeno de costela em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.2, p.346-352, 2008.

Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v60n2/a11v60n2.pdf>. Acesso em: 17 jan. 2015.

YEH, L.S.; HOU, S.M. Repair of a mandibular defect with a free vascularized coccygeal vertebra transfer in a dog. **Veterinary Surgery**, v.23, n.4, p.281-285, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8091631>>. Acesso em: jan. 2015.

YEH, L.S.; HOU, S.M.; LIN, A.C. Vascularized autogenous canine coccygeal bone transfer. **Microsurgery**, v.12, p.326-331, 1991. Disponível em: <<http://libgen.asia/119b68eb63f9015e6f75c13b7302c7a8/yeh1991.pdf>>. Acesso em: 17 jan. 2015.

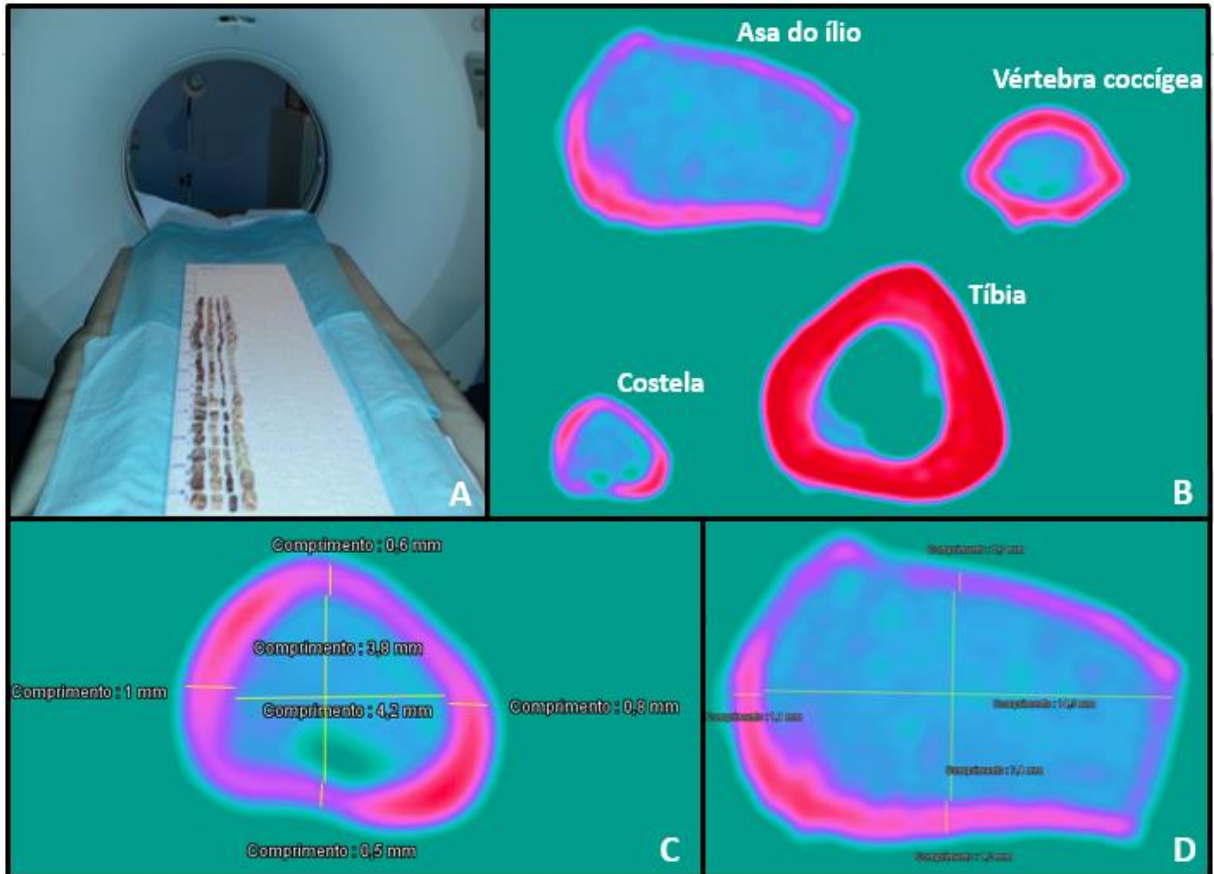


Figura 1 – A – Segmentos ósseos posicionados para exame de tomografia computadorizada. B – Secção transversal de cada segmento ósseo. Observar contorno em tom rosa demonstrando a espessura do osso cortical; e em tom azulado a de osso esponjoso (exceto na tíbia). C – Demonstração da mensuração da espessura de osso cortical em quatro pontos distintos e de osso esponjoso em duas direções. D – Asa do ílio apresentando-se com aproximadamente 75% da área de uma coroa circular, correspondente a área de osso cortical.



## 5. DISCUSSÃO

O interesse pela vértebra coccígea ancorou-se na possibilidade de se obter uma alternativa de autoenxerto corticoesponjoso, o qual pudesse ser utilizado em fraturas com perda de segmento ósseo total. Sabe-se que uma das dificuldades na colheita de autoenxertos para esse fim é a obtenção de um tamanho compatível com o desejado (CASTANIA, 2002).

A característica corticoesponjosa da vértebra coccígea também incentivou sua investigação, pois enxertos dessa natureza são considerados o “padrão ouro” da enxertia óssea (PORTINHO, 2006), devido sua ação osteogênica, osteocondutiva, osteoindutiva (BAUER e MUSCHLER, 2000) e de suporte estrutural (DENNY e BUTTERWORTH, 2006). Além disso, por se tratar de um enxerto do próprio animal, adicionam-se outras vantagens, como incorporação superior aos enxertos alógenos, ausência de problemas imunológicos e isenção de banco de ossos (CASTANIA, 2002).

Optou-se pela 4ª e 5ª vértebras coccígeas devido a suas espessuras, pois sabe-se que estas vértebras tornam-se mais finas na medida que avançam distalmente. Dessa forma, constatou-se que a 4ª e 5ª ainda apresentam diâmetro adequado para substituição de um segmento ósseo total para alguns ossos longos (Figura 1). Ao preservar as três primeiras coccígeas, permite-se que o animal mantenha um segmento de cauda, porém, como amputações de cauda perto da base são realizadas para tratamento de algumas doenças sem geralmente acarretar complicações ao animal (HEDLUND, 2008), tais vértebras também poderiam ser removidas caso fosse necessário um enxerto de espessura maior.

Durante as coletas, removeu-se as apófises e o arco dorsal das coccígeas, pois pensando na aplicação prática desse enxerto, é o corpo vertebral que fará contato com o osso receptor e sustentação do peso. Dessa forma, tais estruturas não ofereceriam resistência adicional ao enxerto e atrasariam a incorporação óssea devido ao processo de reabsorção para posterior formação de osso novo (MILLIS e MARTINEZ, 2007).

No que se refere ao diâmetro do enxerto ósseo, Millis e Martinez (2007) aconselham que ele seja o mais próximo possível do osso receptor, pois isso será um dos atributos que auxiliará na incorporação. Embora a 4ª e 5ª vértebras coccígeas não tenham oferecido um diâmetro de 100% com relação à tíbia, é possível que a espessura alcançada seja o suficiente para promover a consolidação óssea. Além disso, Yeh et al. (1991) sugerem macerar as vértebras coccígeas distais à escolhida para a enxertia, que seriam descartadas, e preenché-las nas interfaces do osso doador com o osso receptor, de modo a fornecer mais células osteogênicas que contribuirão para a cicatrização.

Para a cicatrização bem-sucedida de um enxerto de segmento total, Millis e Martinez (2007) salientam que além do diâmetro também é necessária estabilização rígida dos fragmentos ósseos e boa vascularização local. Yeh et al. (1991) ao utilizarem a autoenxertia de vértebras coccígeas vascularizadas e não vascularizadas (8<sup>a</sup>, 9<sup>a</sup> ou 10<sup>o</sup> vértebra) em defeitos tibiais, só obtiveram cicatrização óssea adequada, nos enxertos nos quais os vasos foram anastomosados. Os autores atribuem a falha da consolidação ao diâmetro reduzido do enxerto transferido em relação a diáfise da tíbia e falta de fixação rígida. Em função disso, com base no presente estudo, sugere-se a autoenxertia da 4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> coccígeas em defeitos tibiais, que por apresentarem diâmetro maior, conferem maior superfície de contato entre os fragmentos.

Em defeitos mandibulares tanto a autoenxertia vascularizada da 8<sup>a</sup> (YEH e HOU, 1994), quanto a autoenxertia da 14<sup>a</sup> vértebra coccígea associada a gordura abdominal (AGUIAR et al., 2007) foram utilizadas para preenchimento de defeitos mandibulares em cão e felino, respectivamente. Em ambos os casos a cicatrização foi apropriada e sem complicações.

Yeh e Hou (1994) consideraram o comprimento limitado da vértebra coccígea, o que dificultaria sua aplicação em grandes falhas ósseas. Esse inconveniente foi observado nas coccígeas estudadas, em que o comprimento máximo encontrado foi de 1,22 cm em um cão de porte médio. No entanto, considera-se a possibilidade da utilização de duas ou mais vértebras, desde que se efetue a correta curetagem do disco intervertebral, evitando a interferência na consolidação entre esses implantes, além da estabilidade rígida, a qual pode ser oferecida pela aplicação de placas ósseas.

Pode-se considerar como uma desvantagem da vértebra coccígea, o efeito cosmético adverso causado pela necessidade da caudectomia. Entretanto, essa desvantagem pode ser compensada pela segurança dada ao paciente no momento da coleta, devido a facilidade de obtenção da mesma e baixa morbidade do sítio doador quando comparado aos enxertos mais comuns (YEH e HOU, 1994). Na coleta da costela, por exemplo, o difícil manuseio do perióstio devido a sua aderência à costela pode acarretar em abertura do tórax durante a coleta (SANTOS JÚNIOR, et al., 2008).

Durante a coleta das costelas foi possível observar que seu formato curvado e espessura delgada são impeditivas para autoenxertia em defeitos de segmento total de osso longo. Quanto a asa do ílio, embora ofereça espessura apropriada, seu comprimento é escasso, pois como uma de suas extremidades é curvada, é necessário seccioná-la, tornando-a plana para a aposição óssea. Ambos enxertos possuem estrutura morfológica mais apropriada para uso em defeitos mandibulares (GOMES, 2008), fendas alveolares (MENDONÇA et al., 2011) e rinoplastias (SANTOS JÚNIOR et al., 2008).

Quanto a reidratação de segmentos ósseos após a conservação, a mesma tem sido realizada por diferentes períodos de tempo e resultados variáveis (AMENDOLA et al., 2008). Seguindo recomendação de Salbego e Raiser (2006), os segmentos ósseos deste trabalho foram reidratados por um período de seis horas antes dos testes compressivos, como forma de restaurar as características mecânicas do osso. O mesmo período de reidratação foi seguido por Amêndola et al. (2008) e Melo Filho et al. (2011) em suas amostras ósseas antes dos ensaios biomecânicos. Recomenda-se a reidratação com solução de NaCl a 0,9% pura ou associada a iodo povidine na proporção de 50:1 em frascos estéreis e com tampa para manter a assepsia (AMÊNDOLA et al., 2008). Neste trabalho utilizou-se a solução salina a 0,9% pura e os frascos utilizados eram apenas higienizados e sem tampa, pois os segmentos não seriam implantados posteriormente.

Os ensaios biomecânicos têm se tornado cada vez mais comuns na avaliação da rigidez de segmentos ósseos (SALBEGO, 2010), pois uma vez implantados são submetidos aos diversos tipos de força. Portanto, torna-se necessário que o cirurgião saiba que sua técnica oferecida apresentará condições estruturais adequadas (DALLABRIDA et al., 2005).

Para obtenção de resultados mais confiáveis nos testes biomecânicos com ossos é preciso atenção a alguns detalhes, como fonte dos ossos, procedimentos de colheita, métodos de estocagem, preparação das amostras e os testes propriamente ditos (AN et al., 2000). Dessa forma, atentou-se para que os cães doadores das amostras estivessem livres de doenças que interferissem na resistência óssea, padronizou-se o tempo e o método de conservação dos segmentos ósseos sob congelamento a  $-80^{\circ}\text{C}$  e todos os testes de compressão foram realizados na mesma máquina e com a mesma velocidade de compressão. Escolheu-se conservar os segmentos ósseos devido à indisponibilidade de realizar os exames tomográficos e ensaios biomecânicos com uma amostra de cada vez a fresco. O método de preservação escolhido foi o congelamento, pois este método provoca efeitos mínimos nas propriedades materiais do osso (MILLIS e MARTINEZ, 2007).

A máquina EMIC utilizada nesse estudo para mensurar resistência óssea era conectada a um computador dotado do software Tesc, específico para receber as informações geradas pelo teste de compressão. Dessa forma, os ensaios foram registrados através de uma curva de força x deformação, onde foi possível definir a carga máxima que os enxertos suportaram antes da ruptura (SCHWARZ, 1996). Através das imagens fornecidas por esse sistema, observou-se, durante os ensaios, que conforme os segmentos ósseos eram comprimidos, o gráfico apresentava uma curva ascendente até atingir um pico de força, onde ocorria a fratura, e em seguida, a curva declinava. No grupo da asa do ílio e das vértebras coccígeas, onde foram

encontrados valores superiores de percentual de osso esponjoso em comparação à tíbia e costela, o patamar desse pico de força era mantido por mais tempo até iniciar o declínio (Figura 2). Tal evento deve-se à porosidade do osso esponjoso, pois após atingir o ponto de queiscência, as trabéculas ósseas vão sofrendo fratura e colapso de forma gradativa. Além disso, a ruptura ao longo da camada cortical dos segmentos da tíbia era melhor identificada, ao contrário dos demais.

De acordo com os resultados de resistência obtidos, observou-se que não houve diferença estatística entre os grupos da asa do ílio, coccígea e costela, mas sim da tíbia. A superioridade biomecânica do grupo da tíbia já era aguardada, pois nesse estudo, tal grupo teve a função de controle, servindo apenas para informar a resistência original de um possível osso receptor de enxerto. Com relação aos demais grupos, chama-se a atenção para as vértebras coccígeas que além de obterem um bom desempenho no teste de resistência, também obtiveram um alto percentual de osso esponjoso. Tais características são justamente as almejadas em um enxerto corticoesponjoso: uma camada cortical para assegurar suporte estrutural e uma camada esponjosa para garantir células osteogênicas (MILLIS e MARTINEZ, 2007).

O percentual de osso esponjoso e de osso cortical dos enxertos ósseos deste trabalho foi quantificado através da tomografia computadorizada que é um exame que permite uma qualidade de imagem de alto nível, permitindo melhor precisão na delimitação das corticais ósseas (BITTAR, 2002). Com isso a tomografia permitiu mensurar a espessura de cada tipo de osso com precisão em vários locais e direções ao longo de cada segmento ósseo o que aumentou a acurácia dos resultados.

A obtenção das medidas de osso esponjoso e de osso cortical através da TC também foi relatada por Momin et al. (2013). Os autores obtiveram tais medidas de mandíbulas de homens e mulheres em cinco secções, desde 6 mm anterior até 18 mm posterior ao forame mentoniano. As medidas de osso esponjoso foram de 5,5 a 11,1 mm e de 4,8 a 10,3 mm; e de osso cortical foram de 4,5 a 5,3 mm e de 3,8 a 5,2 mm em homens e mulheres, respectivamente. Na implantodontia, o conhecimento da espessura desses tipos de ossos é essencial para o planejamento pré-operatório de colocação de implantes, já que a espessura do osso cortical tem grande influência sobre a estabilização inicial da fixação do implante no paciente.

Neste trabalho objetivou-se ter conhecimento de tais proporções de ossos, a fim de estimar o potencial osteogênico de cada enxerto. Observou-se que, estatisticamente, todos os grupos diferiram entre si, sendo o das vértebras coccígeas composto por 42% de osso esponjoso. Esse valor elevado revela a grande capacidade osteogênica da vértebra, a qual foi confirmada por McDuffee e Anderson (2003) que ao realizarem cultura celular *in vivo* do osso esponjoso

da 4<sup>a</sup> coccígea de equinos concluíram que é um local doador com boas propriedades osteogênicas, pois apresentou grande quantidade de osso esponjoso denso com bom potencial osteonconductor.

Cabe ressaltar ainda que as vértebras coccígeas estudadas neste trabalho além de terem apresentado elevada resistência biomecânica e significativo percentual de osso esponjoso, também demonstraram-se morfológicamente propícias para a aposição óssea devido a espessura e formato reto e cilíndrico. Essas características tornam a 4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> vértebras coccígeas boas candidatas a autoenxertia corticoesponjosa de segmento ósseo total.

Quando se fala em enxertos ósseos, sejam eles corticais ou corticoesponjosos é necessário lembrar que o tempo de incorporação dos mesmos é sempre longo e passa por um período crítico, onde o enxerto é gradativamente absorvido e substituído por osso novo. Essa fase deixa o enxerto enfraquecido e com risco de fraturas (MILLIS e MARTINEZ, 2007). Nesse sentido, devido a capacidade de diferenciação das células-tronco em linhagens osteogênicas, sua aplicação associada a enxertos ósseos vem sendo empregada com o intuito de otimizar o tempo de integração dos enxertos e, conseqüentemente, diminuir os riscos de complicações.

Considerando a revisão bibliográfica realizada nesse trabalho, por meio da qual verificou-se os estudos realizados com a associação das células-tronco aos enxertos ósseos, foi possível observar que independentemente do local de coleta ou do processamento dado, geralmente elas contribuem com a redução no tempo de cicatrização. Segundo Portinho (2006), o emprego de células-tronco mesenquimais pode significar uma melhoria na qualidade dos enxertos ósseos e uma otimização no tempo para a integração desses enxertos.

Essa observação foi comprovada nos trabalhos de Li; Li (2005), Portinho (2006), Gomes (2008), Souza (2009) e Prata (2010), os quais mostraram cicatrização óssea superior nos grupos onde os enxertos foram acrescidos de células-tronco, com aceleração da neoformação óssea e aumento da densidade.

Os trabalhos realizados até o momento trouxeram resultados que incentivam o uso das células-tronco na incorporação de enxertos ósseos. Para Cristante e Narazaki (2011), o estudo das células-tronco é provavelmente o campo de estudo mais promissor de toda a medicina que, em um espaço curto de tempo, irá revolucionar todas as especialidades médicas, tanto clínicas quanto cirúrgicas, solucionando enfermidades hoje de difícil tratamento.



Figura 1 – Demonstração da aposição da vértebra coccígea com o rádio de um mesmo cão. A aposição entre essas extremidades ósseas é próxima de 100% (A). Demonstração da aposição da vértebra coccígea com a tíbia de um mesmo cão. A aposição entre essas extremidades ósseas é próxima de 70% (B).

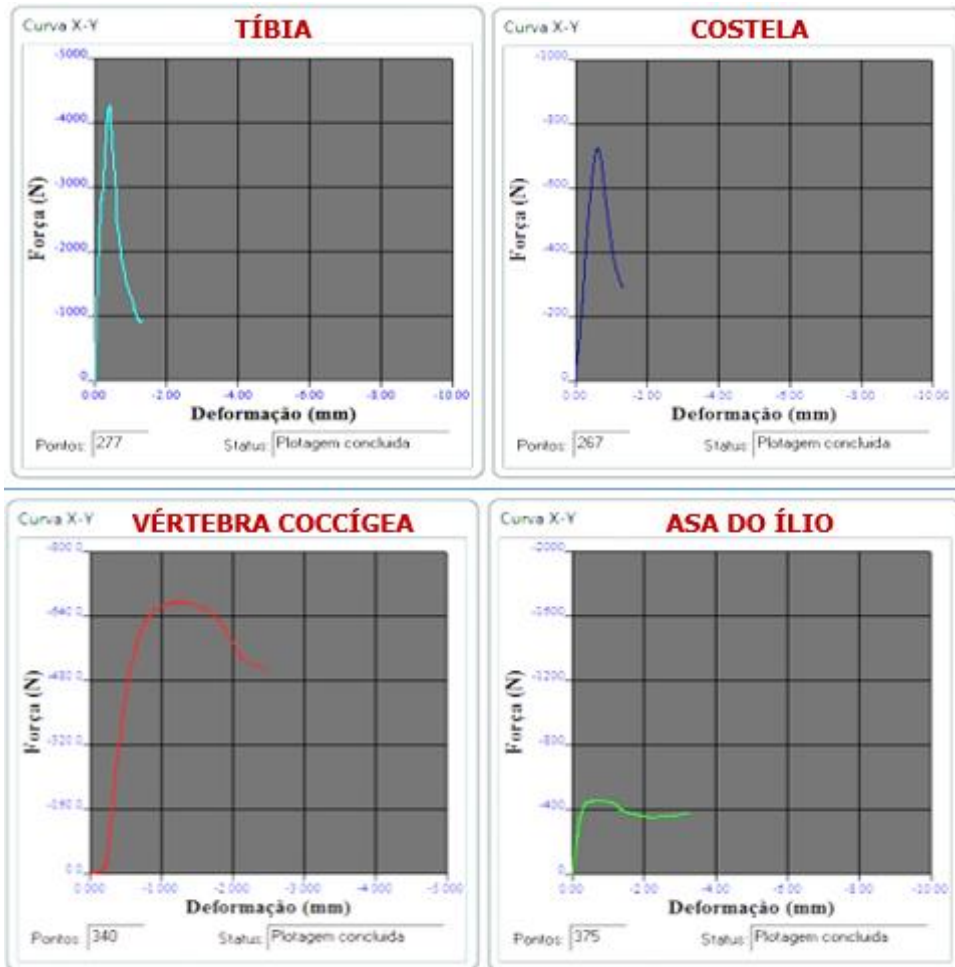


Figura 2 – Gráfico da força x deformação, após ensaio biomecânico, da tíbia, costela, vértebra coccígea e asa do ílio, respectivamente. Observar que no gráfico da vértebra coccígea e da asa do ílio, que possuem valores superiores de osso esponjoso, o patamar do pico de força é mantido por mais tempo até iniciar o declínio. Tal evento deve-se à porosidade do osso esponjoso, pois após atingir o ponto de queiscência, as trabéculas ósseas vão sofrendo fratura e colapso de forma gradativa.

## 6. CONCLUSÃO

Considerando os resultados desse trabalho foi possível concluir que:

- A 4ª e a 5ª vértebras coccígeas de cães apresentam características desejáveis em um autoenxerto corticoesponjoso de segmento ósseo total, pois apresentam significativa camada de osso esponjoso, elevada resistência compressiva, espessura e formato adequados para serem utilizadas em determinados ossos longos quando comparadas aos segmentos da costela e da asa do ílio.



## 7. REFERÊNCIAS

AGUIAR, E.S.V. et al. Reconstrução mandibular para reparo da perda de tecido ósseo em felino mediante o emprego de enxerto ósseo e adiposo autógenos e pino de Steinmann. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35 (supl 2), p.348-s349, 2007.

AMÊNDOLA, G.F. et al. Aspectos biomecânicos compressivos de diáfises femorais caninas conservadas em glicerina a 98% ou em mel. **Ciência Rural**, v.38, n.5, p.1341-1345, 2008.

AJZEN, S.A. et al. Análise por tomografia computadorizada do enxerto autógeno na cirurgia de “sinus lift”. **Radiologia Brasileira**, v.38, n.1, p. 25-31, 2005.

AN, Y.H. et al. Basic concepts of mechanical property measurement and bone biomechanics. In: AN, Y.H.; DRAUGHN, R.A. **Mechanical testing of bone and the bone-implant interface**. New York, 2000. Cap.2, p.23-40.

BAUER, T.W.; MUSCHLER, G.F. Bone graft materials. **Clinical Orthopedics and Related Research**, v. 371, p. 10-27, 2000.

BITTAR, J.A. **A utilização da tomografia computadorizada em implantodontia**. 2002. 56 f. Monografia (Especialização em Radiologia Odontológica). Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, SP.

CASTANIA, V.A. **Enxerto córtico-esponjoso homogêneo processado quimicamente e esterilizado em óxido de etileno em cães**. 2002. 54f. Mestrado (Mestrado em Bioengenharia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

CRISTANTE, A.F.; NARAZAKI, D.K. Avanços no uso de células-tronco em ortopedia. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 46, n. 4, p. 359-367, 2011.

DALLABRIDA, A. L. et al. Análise biomecânica *ex vivo* de dois métodos de osteossíntese de fratura diafisária transversal em fêmur de cães. **Ciência rural**, v. 35, n. 1, p. 116-120, 2005.

DALMOLIN, F. et al. Biomecânica óssea e ensaios biomecânicos - fundamentos teóricos. **Ciência Rural**, v.43, n.9, p.1675-1682, 2013.

DENNY, H.R.; BUTTERWORTH, S.J. Enxertos ósseos. In:\_\_\_\_\_. **Cirurgia Ortopédica em Cães e Gatos**. 4 ed. São Paulo: Roca, 2006a. Cap. 2, p.14-18.

DENNY, H.R.; BUTTERWORTH, S.J. Cicatrização óssea. In:\_\_\_\_\_. **Cirurgia Ortopédica em Cães e Gatos**. 4 ed. São Paulo: Roca, 2006b. Cap. 1, p.2-13.

DIAS, R.M.F. et al. Aloenxertos ósseos na osteossíntese de fracturas traumáticas. **Revista Portuguesa de Ortopedia e Traumatologia**, v. 16, p. 31-42, 2008.

DUARTE, L.S; SCHAEFFER, L. Compressão de ossos bovinos congelados e liofilizados. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 16, n. 2, p. 89-93, 2000.

FRANÇA, A.F.; FILHO, T.E.P.B.; PEREIRA, C.A.M. Estudo experimental da vertebroplastia: análise biomecânica e segurança da técnica. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 10, n.1, p. 31-47, 2002.

GARIB, D.G. et al. Tomografia computadorizada de feixe cônico (Cone beam): entendendo este novo método de diagnóstico por imagem com promissora aplicabilidade na Ortodontia. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, v. 12, n. 2, p. 139-156, 2007.

GOMES, C. **Avaliação da cicatrização óssea em falha mandibular com auto-enxerto ósseo associado a suspensão celular de medula óssea autógena: estudo experimental**. 2008. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

HEDLUND, C.S. Cirurgia do sistema tegumentar. In: FOSSUM T.W. **Cirurgia de Pequenos Animais**. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. Cap. 15, p. 159-259.

HULSE, D.; HYMAN, B. Biomecânica e biologia das fraturas. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3 ed. Barueri: Manole, 2007. Cap. 126, p. 1785-1792.

JOHNSON A.L. Fundamentos da cirurgia ortopédica e manejo de fraturas. In: FOSSUM T.W. **Cirurgia de Pequenos Animais**. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. Cap. 31, p. 930-1014.

LI, Z.; LI, ZB. Repair of mandible defect with tissue engineering bone in rabbits. **ANZ Journal of Surgery**, v. 75, p. 1017-1021, 2005.

MCDUFFEE, L.A.; ANDERSON, G.I. *In vitro* comparison of equine cancellous bone graft donor sites and tibial periosteum as sources of viable osteoprogenitors. **Veterinary Surgery**, v.32, p.455-463, 2003.

MELO FILHO, E.V. et al. Mecânica e microbiologia de placas produzidas a partir de osso cortical bovino, conservadas em diferentes meios. **Ciência Rural**, v.41, n.4, p.660-666, 2011.

MENDONÇA, J.C.G.; LIMA, C.M.C.; TERRA, G.A.P. Uso de enxerto ósseo autógeno de crista ilíaca na reconstrução de fenda alveolar em paciente fissurada: relato de caso. **Revista Brasileira de Cirurgia Craniomaxilofacial**, v.14, n.3, p.162-165, 2011.

MILLIS, D.L.; MARTINEZ, S.A. Enxertos ósseos. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3 ed. Barueri: Manole, 2007. Cap. 133, p. 1875-1891.

MOMIN, M.A.; KURABAYASHI, T.; YOSUE, T. Quantitative and morphological evaluation of cancellous and cortical bone of the mandible by CT. **OMICS Journal of Radiology**, v.3, n.1, p.1-5, 2013.

PIERMATTEI, D.L.; FLO, G.L.; DECAMP, C.E. Enxertos ósseos. In: \_\_\_\_\_. **Ortopedia e Tratamento de Fraturas de Pequenos Animais**. 4 ed. São Paulo: Manole, 2009. Cap. 3, p.180-188.

PAGLIOSA, G.M.; ALVES, G.E.S. Considerações sobre obtenção e uso do plasma rico em plaquetas e das células mesenquimais indiferenciadas em enxertos ósseos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1202-1205, 2007.

PORTINHO, C.P. **Reconstrução óssea de calota craniana com enxerto com células-tronco mesenquimais: estudo experimental**. 2006. 156 f. Dissertação (Mestrado em Medicina: Cirurgia). Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

PRATA, C.A. **Avaliação da osteogênese em defeitos ósseos com utilização da engenharia tecidual óssea: uma comparação entre osso autógeno, substituto ósseo e células-tronco mesenquimais**. 2010. 118f. Doutorado (Doutorado em Odontologia). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

SANTOS JÚNIOR E.B. et al. Rinoplastia experimental com enxerto autógeno de costela em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 2, p. 346-352, 2008.

SALBEGO, F.Z. **Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar femoral em cães associado à inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea**. 2010. 211f. Doutorado (Doutorado em Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

SALBEGO, F.Z. RAISER, A.G. Teste de resistência biomecânica de implantes ósseos corticais conservados em glicerina a 98% e submetidos a diferentes tempos de reidratação. In: CONGRESSO DO COLÉGIO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA

VETERINÁRIA, 7, 2006, Santos, SP. Anais... Belo Horizonte: **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2006. v.58, supl., p.77-78, 2006.

SANTOS, F.C.; RAHAL, S.C. Enxerto ósseo esponjoso autólogo em pequenos animais. **Ciência Rural**, v. 34, n. 6, p. 1969-1975, 2004.

SCHWARZ, P.D. Biomecânica das fraturas do esqueleto apendicular: causas e avaliação. In: BOJRAB, M.J. **Mecanismos da moléstia na cirurgia de pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1996. Cap. 136, p.1161-1181.

SOUZA, L.A. **Enxerto osteocondral alógeno associado à inoculação de células mononucleares autólogas da medula óssea no reparo do sulco troclear de coelhos**. 2009. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.

SOUZA, S.A. **Ensaio mecânicos de materiais metálicos**. São Paulo: Edgar Blücher, 1974. 235p.

STEVENSON, S. Enxertadura óssea. In: BOJRAB, M.J. **Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais**. 3.ed., São Paulo: Roca, 1996. Cap. 48, p. 758-819.

TAL, H.; MOSES, O. A comparison of panoramic radiography with computed tomography in the planing of implant surgery. **Dentomaxillofacial Radiology**, v. 20, n. 1, p. 40-42, 1991.

YEH, L.S.; HOU, S.M. Repair of a mandibular defect with a free vascularized coccygeal vertebra transfer in a dog. **Veterinary Surgery**, v.23, n.4, p.281-285, 1994.

YEH, L.S.; HOU, S.M.; LIN, A.C. Vascularized autogenous canine coccygeal bone transfer. **Microsurgery**, v.12, p.326-331, 1991.

## 8 APÊNDICES

**APÊNDICE A - Percentual de osso esponjoso e osso cortical de cada segmento ósseo. A letra “D” refere-se aos segmentos do lado direito do cão e da 4ª vértebra coccígea e a letra “E” refere-se aos segmentos do lado esquerdo do cão e da 5ª vértebra coccígea.**

<b>Percentual de osso esponjoso (OE) e osso cortical (OC) de cada segmento ósseo</b>				
	<b>ASA DO ÍLIO</b>	<b>COCCÍGEA</b>	<b>COSTELA</b>	<b>TÍBIA</b>
<b>CÃO 1 D</b>	OE: 73% OC: 27%	OE: 38% OC: 62%	OE: 23% OC: 77%	OE: 0% OC: 100%
<b>CÃO 1 E</b>	OE: 70% OC: 30%	OE: 35% OC: 65%	OE: 20% OC: 80%	OE: 0% OC: 100%
<b>CÃO 2 D</b>	OE: 89% OC: 11%	OE: 47% OC: 53%	OE: 35% OC: 65%	OE: 0% OC: 100%
<b>CÃO 2 E</b>	OE: 84% OC: 16%	OE: 49% OC: 51%	OE: 50% OC: 50%	OE: 0% OC: 100%
<b>CÃO 3 D</b>	OE: 67% OC: 33%	OE: 41% OC: 59%	OE: 19% OC: 81%	OE: 0% OC: 100%
<b>CÃO 3 E</b>	OE: 52% OC: 48%	OE: 47% OC: 53%	OE: 19% OC: 81%	OE: 0% OC: 100%
<b>CÃO 4 D</b>	OE: 54% OC: 46%	OE: 37% OC: 63%	OE: 24% OC: 76%	OE: 0% OC: 100%
<b>CÃO 4 E</b>	OE: 57% OC: 43%	OE: 31% OC: 69%	OE: 27% OC: 73%	OE: 0% OC: 100%
<b>CÃO 5 D</b>	OE: 62% OC: 38%	OE: 45% OC: 55%	OE: 23% OC: 77%	OE: 0% OC: 100%
<b>CÃO 5 E</b>	OE: 67% OC: 33%	OE: 48% OC: 52%	OE: 26% OC: 74%	OE: 0% OC: 100%
<b>CÃO 6 D</b>	OE: 72% OC: 28%	OE: 41% OC: 59%	OE: 24% OC: 76%	OE: 0% OC: 100%
<b>CÃO 6 E</b>	OE: 74% OC: 26%	OE: 41% OC: 59%	OE: 26% OC: 74%	OE: 0% OC: 100%
<b>CÃO 7 D</b>	OE: 72% OC: 28%	OE: 44% OC: 56%	OE: 14% OC: 86%	OE: 0% OC: 100%
<b>CÃO 7 E</b>	OE: 71% OC: 29%	OE: 41% OC: 59%	OE: 13% OC: 87%	OE: 0% OC: 100%
<b>CÃO 8 D</b>	OE: 72% OC: 28%	OE: 44% OC: 56%	OE: 36% OC: 64%	OE: 0% OC: 100%
<b>CÃO 8 E</b>	OE: 65% OC: 35%	OE: 43% OC: 57%	OE: 37% OC: 63%	OE: 0% OC: 100%
<b>MÉDIA</b>	<b>OE: 69% (±9,75)</b> <b>OC: 31% (±9,75)</b>	<b>OE: 42% (±4,95)</b> <b>OC: 58% (±4,95)</b>	<b>OE: 26% (±9,49)</b> <b>OC: 74% (±9,49)</b>	<b>OE: 0% (±0)</b> <b>OC: 100% (±0)</b>

**APÊNDICE B – Valores do ensaio biomecânico de cada segmento ósseo. A letra “D” refere-se aos segmentos do lado direito do cão e da 4ª vértebra coccígea e a letra “E” refere-se aos segmentos do lado esquerdo do cão e da 5ª vértebra coccígea.**

<b>TESTE DE COMPRESSÃO AXIAL (NEWTONS)</b>				
	<b>ASA DO ÍLIO</b>	<b>COCCÍGEA</b>	<b>COSTELA</b>	<b>TÍBIA</b>
<b>CÃO 1 D</b>	273,52	413,54	322,36	3.301,8
<b>CÃO 1 E</b>	677,29	286,55	410,28	4.711,7
<b>CÃO 2 D</b>	481,92	433,07	208,40	5.698,3
<b>CÃO 2 E</b>	631,70	569,83	354,93	5.268,5
<b>CÃO 3 D</b>	706,59	970,35	885,68	7.222,2
<b>CÃO 3 E</b>	892,20	677,29	976,86	7.893
<b>CÃO 4 D</b>	687,06	638,21	338,64	4.653,1
<b>CÃO 4 E</b>	651,24	670,78	221,42	5.770
<b>CÃO 5 D</b>	462,38	742,41	661,01	4.275,4
<b>CÃO 5 E</b>	595,88	647,98	615,42	6.404,9
<b>CÃO 6 D</b>	563,32	455,87	459,12	6.727,3
<b>CÃO 6 E</b>	530,76	534,02	556,81	6.922,7
<b>CÃO 7 D</b>	928,02	563,32	478,66	4.672,6
<b>CÃO 7 E</b>	794,51	494,94	547,04	4.812,7
<b>CÃO 8 D</b>	1.592,3	960,58	957,32	8.322,8
<b>CÃO 8 E</b>	1.507,6	1.058,3	1.051,8	9.016,4
<b>MÉDIA</b>	<b>748,51</b> ( $\pm 352,17$ )	<b>632,31</b> ( $\pm 215,22$ )	<b>565,35</b> ( $\pm 272,95$ )	<b>5.979,58</b> ( $\pm 1.605,98$ )