



Universidade do Sagrado Coração – USC

Fabício Arias Farina de Oliveira

**“O uso de membrana de Látex natural como cobertura e
auxílio da fusão intervertebral lombar”.**

**Bauru
2008**



Universidade do Sagrado Coração – USC

Fabício Arias Farina de Oliveira

“O uso de membrana de Látex natural como cobertura e auxílio da fusão intervertebral lombar”.

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Oral, Área de concentração: Biologia Oral.

Orientador: Prof. Dra. Angela Kinoshita

Co-orientador: Prof. Dr. Sérgio A. Catanzaro
Guimarães

**Bauru
2008**

O482a

Oliveira, Fabrício Arias Farina de

O uso de membrana Látex natural como cobertura e auxílio da fusão intervertebral lombar / Fabrício Arias Farina de Oliveira – 2008.

85f.

Orientadora: Profa. Dra. Angela Kinoshita.

Co-orientador: Prof. Dr. Sérgio A. Catanzaro Guimarães.

Dissertação (Mestrado em Biologia Oral) -

Universidade do Sagrado Coração - Bauru - SP.

1. Artrodese. 2. Fusão intervertebral. 3. Látex. 4. Biomaterial. 5. Enxerto ósseo. I. Kinoshita, Angela. II. Guimarães, Sérgio A. Catanzaro. III. Título.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora Professora Doutora Ângela Kinoshita, pela orientação deste trabalho, por seu apoio, amizade, respeito e experiência, qualidades do verdadeiro professor.

Ao coordenador do curso de Pós Graduação em Biologia Oral da USC, Professor Doutor Sérgio Augusto Catanzaro Guimarães, pela seriedade do seu trabalho, pelo exemplo de pesquisador e professor, pelo extraordinário ser humano que eu tive o privilégio de conhecer.

Com toda minha admiração e respeito

AGRADECIMENTOS

À Universidade do Sagrado Coração pelo conhecimento e experiência transmitidos;

À Professora Doutora Silvana Pasetto, pelo auxílio na análise histológica;

Ao Professor Doutor Carlos F. O. Graeff (FC-UNESP) pelo apoio neste trabalho e por disponibilizar as membranas de látex;

Ao Departamento de Física e Matemática da FFCLRP-USP pelo fornecimento dos animais e ao Prof. Dr. Oswaldo Baffa por disponibilizar o laboratório de Ressonância Magnética para realizar parte deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Marcello Henrique Nogueira-Barbosa pelas imagens de Tomografia Computadorizada e ao Prof. Dr. Paulo Mazzoncini de Azevedo Marques (FMRP-USP) e Eduardo Alvarez Ribeiro (FFCLRP-USP) pelo apoio acerca dos experimentos com imagens tomográficas e pelo software de volumetria utilizado neste trabalho;

Ao responsável pelo Biotério da Universidade do Sagrado Coração, Sérgio Henrique Pereira Moura, pelo apoio e eficiência no trato com os animais durante a realização deste trabalho;

À Maira Cristina Rondina e Wilson Aparecido Orsini, técnicos de laboratório da USC, pelo profissionalismo e colaboração com este trabalho;

Aos amigos Leandro Holgado, Renato Martins, Tatiana Peixoto Telles de Souza, Leonardo Marques e Cibele Ereno pela amizade e colaboração com este trabalho.

Aos Professores do Programa de Mestrado em Biologia Oral, pelos conhecimentos e experiência transmitidos, pela amizade e pelo carinho;

A todos os colegas e funcionários do curso de Pós Graduação em Biologia Oral da USC, pela convivência e amizade, durante todo o curso;

Aos companheiros do Curso de Mestrado, pelos momentos que compartilhamos;

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A artrodese póstero-lateral é uma das cirurgias mais realizadas na coluna lombar. É um método de tratamento cirúrgico bem reconhecido para o tratamento de várias patologias vertebrais incluindo espondilolistese, escoliose, cifose, doenças degenerativas vertebrais e tumores. O sucesso da fusão intervertebral consiste na sintetização de uma nova matriz óssea contígua com o osso hospedeiro, que se mineraliza e remodela tornando-se madura, e com rigidez suficiente para suportar cargas fisiológicas sem injúria. Para estimular a formação óssea, vários procedimentos têm sido adotados. Neste trabalho, avaliamos a influência da membrana de látex natural como cobertura no auxílio da fusão intervertebral lombar em adição ao uso de enxertos autólogo extraídos da crista ilíaca. O látex é um material biocompatível, capaz de acelerar a angiogênese e mostrou-se eficiente como membrana oclusiva em procedimento de regeneração óssea guiada. Foram utilizados 8 coelhos da raça Nova Zelândia, onde a artrodese foi feita na região postero-lateral, entre os processos transversos das vértebras lombares L4 e L5. Um dos lados foi recoberto com membrana de látex natural e o outro foi mantido apenas com o enxerto. Os coelhos foram eutanasiados após oito semanas e a influência da membrana de látex foi avaliada através de palpação manual, análise histológica descritiva, histometria e radiológica, através de radiografia e tomografia computadorizada. A análise macroscópica demonstrou consolidação em seis lados tratados com membrana e cinco sem a membrana, bem como maior consistência do calo ósseo no lado em que se utilizou a membrana. A análise radiográfica demonstrou área de maior radiopacidade do lado tratado entre os processos transversos com a cobertura da membrana do látex em cinco dos oito coelhos, em apenas um deles, o lado controle mostrou maior radiopacidade, demonstrando a contribuição positiva da membrana de látex no processo de fusão intervertebral. Os resultados da análise de volumetria por tomografia computadorizada mostraram que dos 8 coelhos, cinco (62,5%) apresentaram volume ósseo maior no lado tratado, 2(25%) apresentaram o mesmo volume ósseo e 1(12,5%) apresentou volume ósseo maior do lado controle, considerando-se o erro do processo de quantificação em 5%. O resultado global da média dos volumes apresentou diferença significativa ($p < 0,1$) usando teste ANOVA e teste Tukey para comparação entre as médias. Os resultados da análise histométrica foram semelhantes com os da volumetria por Tomografia Computadorizada.

Palavras Chaves: Artrodese, fusão intervertebral, látex, biomaterial, enxerto ósseo, volumetria

ABSTRACT

Arthrodesis posterolateral is one of the most common surgeries carried in the lumbar vertebra. It is a well recognized surgical method for treatment of some vertebral pathology including spondylolisthesis, scoliosis, kyphosis, vertebral degenerative illnesses and tumors. The success of the intertransverse fusion consists on the formation of a new bone matrix contiguous with the host bone. This bone matrix mineralizes and remodels, becoming mature with rigidity enough to support physiological loads without injury. To stimulate the bone formation, several procedures have been adopted. In this work we evaluate the influence of the natural latex membrane used as an occlusive membrane in addition to autogenous iliac crest bone graft in the lumbar intertransverse fusion process. Latex is a biocompatible material, capable to accelerate angiogenesis and is an efficient occlusive membrane for guided bone regeneration procedures. Eight male New Zealand White rabbits underwent posterolateral intertransverse process lumbar spinal fusion in the L4 and L5 vertebrae using iliac crest autograft. One of the sides was covered with natural latex membrane (treated side) and the other was kept only with graft (control side). The rabbits had been euthanized eight weeks pos surgery and the influence of the latex membrane was evaluated through manual palpation, qualitative histology, histomorphometry, radiography (plain radiograph and CT scan). The macroscopic analysis demonstrated fusion in six sides protected with membrane and five without the membrane and higher consistency of the osseous callus in the side treated with the membrane. The radiographic analysis demonstrated higher radiopacity area on the treated side in five of the eight rabbits. In only one of them the control side showed greater radiopacity, demonstrating the positive contribution of the latex membrane in the process of intertransverse fusion. The bone volume in the arthrodesis region assessed by Computerized Tomography showed that 5 of 8 rabbits (62.5%) presented greater bone volume in the treated side, 2(25%) presented the same volume and 1(12.5%) the volume of control side was greater than treated side, considering an error of 5% in the measurement process. The global results showed difference of means statically significant at $p < 0.1$ level by ANOVA and Tukey test. The histomorphometric results were similar to bone volume CT measurements.

Keywords: arthrodesis, intertransverse fusion, latex, biomaterial, bone graft, volumetry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Estrutura Molecular da borracha (a), forma das cadeias (b)
- Figura 2 – Forma da membrana de látex utilizadas nas cirurgias
- Figura 3 – Flexibilidade e elasticidade da membrana de látex
- Figura 4 – Coelho anestesiado e posicionado sobre a mesa de cirurgia após tricotomia
- Figura 5 – Realizada antissepsia com povidine e colocação de campos estéreis
- Figura 6 – Incisão na linha média posterior longitudinal mediana
- Figura 7 – Exposição da fascia intermuscular
- Figura 8 – Exposição da musculatura para vertebral
- Figura 9 – Visualização das facetas articulares
- Figura 10 – Afastamento e visualização dos processos transversos
- Figura 11 – Processos transversos do lado E
- Figura 12 – Posicionamento do Drill
- Figura 13 – Processos transversos decorticados do lado E
- Figura 14 – Processos transversos decorticados do lado D
- Figura 15 – Visualização da crista ilíaca coberta pela fascia muscular
- Figura 16 – Crista ilíaca
- Figura 17 – Colocação do enxerto ósseo do lado E
- Figura 18 – Colocação do enxerto ósseo do lado D
- Figura 19 – Colocação da membrana de látex sobre o enxerto ósseo do lado E
- Figura 20 – Fechamento por planos
- Figura 21 – Sutura e curativo
- Figura 22 – Imagens axiais de coluna de coelhos

Figura 23 – Imagens relativas à figura 22, após aplicação do threshold no valor de 100 UH

Figura 24 – Peça anatômica em posição ventral, mostrando vértebras, discos , processos transversos e a área fusuinada entre eles. Foi considerado consolidada bilateralemente através da palpação manual

Figura 25 – Outra peça com a mesma vista ventral, considerada não consolidada pela palpação manual bilateralmente

Figura 26 – Aspecto dorsal da peça, mostrando os processos transversos com a área fusionada entre eles.

Figura 27 – Radiografias da região lombar da coluna vertebral 56 dia após a cirurgia. O lado Esquerdo corresponde ao lado tratado com a membrana de látex, o lado Direito, lado controle.

Figura 28 – Representação gráfica dos volumes da região artrodesada de acordo com a TABELA 1.

Figura 29 – Diferença em % dos volumes em relação ao lado controle.

Figura 30 – Histologia do lado tratado com membrana mostrando os processos transversos e a formação de calo ósseo exuberante entre eles, Aumento de 2x

Figura 31 – Foto histológica do lado onde foi realizada artrodese sem a utilização da cobertura com membrana de látex, no qual se evidencia um calo ósseo de menor espessura. Aumento 2x

Figura 32 – Fração dos volumes ósseos dos lados controle e tratado, obtidos por histomorfometria

Figura 33 – Diferença entre os volumes ósseos dos lados controle e tratado, obtidos por histomorfometria, tomando o lado controle como referência

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Volume ósseo relativa à região de artrodese obtido por tomografia, considerando o nível 100 UH

TABELA 2 – Fração de volume ósseo (%) dos lados controle e tratado, obtidos por histomorfometria

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BMP – Proteína morfogenética óssea

CCIFM – Centro de Ciências de Imagem e Física Médica

cm³ – centímetro cúbico

CT – Tomografia Computadorizada

DICOM – Digital Imaging Communication in Medicine

HCRP – Hospitas das Clínicas de Ribeirão Preto

HE – Hematoxilina Eosina

kg – Kilograma

kV – Kilovolt

L - litros

m – metros

MO – medula óssea

mA – miliAmpere

ml – mililitros

mm – milímetros

PVPI – Polivinilpirrolidona-iodo

rhBMP – Recombinante humana Proteína Morfogenética Óssea

rhGDF5 – Fator de crescimento e diferenciação recombinante humana Proteína Morfogenética Óssea

ROI - Região de Interesse

s - segundo

SD – Desvio Padrão

TCO – Tecido conjuntivo Osteogênico

TM – Tecido Muscular

TOI – Tecido ósseo imaturo

TOM – Tecido ósseo maduro

TCP – Tricálcio Fosfato

UH – Unidades Hounsfield

USC – Universidade do Sagrado Coração

USP – Universisdade de São Paulo

SUMÁRIO

1 – Introdução	16
2 – Revisão de Literatura	26
2.1 – Tecido Ósseo: Constituição e Processo de Reparo	26
2.2 – Regeneração Óssea Guiada e Látex natural	28
2.3 – Modelos Experimentais de Artrodese	32
3 – Objetivos	36
4 – Materiais e Métodos	38
4.1 – Local e Grupo de Estudo	38
4.2 – Delineamento Experimental	38
4.3 – Procedimentos Cirúrgicos	40
4.3.1 – Anestesia e Antissepsia	40
4.3.2 – Técnica Cirúrgica	41
4.4 – Preparo das Peças e Forma de Análise de Resultados	50
4.4.1 – Análise Macroscópica	50
4.4.2 – Análise das Peças por Imagem Radiográfica	50
4.4.3 – Volumetria por Tomografia Computadorizada	51
4.4.4 – Análise Microscópica	53
5 – Resultados	55
5.1 – Aspecto Clínico	55
5.2 – Análise Macroscópica	55
5.3 – Análise Radiográfica	57
5.3.1 – Radiografia	57
5.3.2 – Volumetria por Tomografia Computadorizada	58
5.5 – Análise Histológica Descritiva	60
5.6 – Análise Histomorfométrica	62
6- Discussão	65
7 – Conclusões	67
8- Referências	78
9- Anexos	86

INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

A artrodese póstero-lateral é uma das cirurgias mais realizadas na coluna lombar. É um método de tratamento cirúrgico bem reconhecido para o manejo de várias patologias vertebrais incluindo espondilolistese, escoliose, cifose, doenças degenerativas vertebrais e tumores. Já é bem conhecido que a fusão espinhal é um processo que ocorre por via hematogênica através da transformação do colágeno em osso, podendo seu resultado final ser influenciado por diversos fatores. Entre eles podemos citar a composição do enxerto ósseo, número de níveis fusionados, instrumentação vertebral, estimulação elétrica, hábito de fumar, patologias de base e uso de medicamentos (antiinflamatórios ou corticóides).

Fusão vertebral pode ser definida como uma união óssea entre dois espaços vertebrais após manipulação cirúrgica. Fusão vertebral foi primeira reportada em 1911 por Albee e Hibbs para o tratamento de Tuberculose vertebral (ALBEE, 1911). Fusão lombar intertransversa foi desenvolvida como uma técnica alternativa às fusões intercorporais anteriores e posteriores na coluna lombar. Em 1939, Campbell relatou um método de colocação de enxerto em contato com a lâmina e processo transversos entre a quarta e a quinta vértebra lombar em conjunção com uma fusão extra-articular da articulação sacro ilíaca. Em 1948, Cleveland, Bosworth e Thompson desenvolveram o uso de enxerto ósseo colocado contra as articulações posteriores como um método de tratamento de pseudo-artrose da coluna vertebral. Desde esta época, muitas modificações da fusão intertransversa têm sido descritas. Esta técnica de fusão tem sido estendida para tratar uma variedade de deformidades espinhais,

incluindo escoliose, cifose, fraturas, luxações, espondilolisteses e doença do disco intervertebral.

A colocação do enxerto em posição postero-lateral tem vantagens biomecânicas ao se almejar à fusão vertebral, os autores têm recomendado a fusão de ambos os lados, entre as vantagens seria a obtenção de uma fusão sólida e a possibilidade de realizar a fusão mesmo na ausência de elementos posteriores. Esta operação em humanos se realiza sob anestesia geral devido à posição do paciente em decúbito ventral sobre coxins para minimizar o colapso das veias epidurais e a compressão abdominal. Os coxins são colocados lateralmente abaixo do tórax e do abdômen a fim de permitir a ventilação pulmonar. Tecnicamente é feita uma incisão horizontal na linha média, abertura da aponeurose e afastamento dos músculos para vertebrais através de uma dissecação subperióstica e é estendida lateralmente até a exposição dos processos transversos das vértebras a serem fusionadas. Uma vez eliminado os tecidos moles dos processos transversos é feita a decorticação do osso com exposição do tecido esponjoso sangrante. O enxerto ósseo é retirado em seguida da crista ilíaca e depositado sobre os processos transversos adjacentes a serem fusionados.

Todas as cirurgias de fusão envolvem preparação cirúrgica das superfícies ósseas no sítio a ser realizada a fusão e alguma tentativa de estimular a formação de osso no volume tecidual entre as interfaces a serem fusionadas. O estímulo para a resposta para a formação óssea pode ser através de enxerto ósseo autólogo ou homólogo (também conhecido como enxerto alográfico) ou um aumentado número de materiais sintéticos ou substâncias bioativas. Como o enxerto é incorporado, tecido ósseo é formado por células osteogênicas. União é alcançada quando matriz óssea é sintetizada novamente torna-se mecanicamente contíguo com o osso local hospedeiro, torna-se mineralizada e remodela com osso maduro com força suficiente para suportar

cargas fisiológicas sem injúria. Fracasso na formação óssea, união ou efetiva remodelação resulta em pseudo-artrose. A incidência de pseudo-artrose varia de 5% a 34% (SOLGAARD & KLEPPE, 1983; BODEN, 2003).

O requisito fundamental para o sucesso de uma fusão vertebral é dado por uma adequada população de células osteogênicas, a presença de matriz osteocondutiva na região onde tecido ósseo deverá ser formado, um suplemento sanguíneo adequado local, meio ambiente local adequado para a formação óssea.

O crescimento ósseo entre as vértebras a serem fusionadas é um processo celular. Enxerto ósseo autógeno adiciona células osteogênicas, mas tem sido reconhecido que somente uma pequena fração delas sobrevive (BURWELL, 1969), (URIST, 1980). Consequentemente, preparação do sítio de fusão e manuseio do leito tecidual são de suprema importância para o sucesso da artrodese. Os componentes do leito tecidual que contribuem mais para o processo de cicatrização é a população local de células osteoprogenitoras (tronco), vascularização tecidual local, células que contribuem para a resposta inflamatória e a formação de um coágulo estável dentro do espaço vazio para o sítio de enxerto.

A importância do suprimento sanguíneo local serve como (1) fonte de suprimento sanguíneo e outros nutrientes para a cicatrização tecidual e controle local de pH, (2) um veículo de estimulação endócrina, (3) um veículo condutor para o recrutamento de células inflamatórias o qual produzem fatores parócrinos que pode mediar à proliferação precoce de células progenitoras osteoblásticas e para reduzir o potencial para infecção, (4) como uma fonte de células endoteliais que produzem fatores parócrinos que podem aumentar a diferenciação osteoblástica (VILLANUEVA & NIMNI, 1990) e (5) como uma fonte potencial de células progenitoras osteoblásticas (BRIGHTON, LORICH & KUPCHA, 1992; ZVAIFLER,

2000). Para preservar o suprimento sanguíneo local o cirurgião deve tentar minimizar o trauma ao leito tecidual hospedeiro imposto por trauma ou retratores, cautério ou dissecação.

O efeito do hematoma pós-operatório no sucesso da fusão tem sido debatido. Alguns autores têm sugerido que o hematoma pode fornecer scaffold osteocondutivo ou matriz que pode facilitar algumas das fases iniciais da cicatrização óssea. Adicionalmente, o hematoma atrairia fatores de crescimento derivado de plaquetas, fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento fibroblástico, fator de crescimento endotelial e outros fatores de crescimento (GRONTHOS & SIMMONS, 1995). Por outro lado, a presença de grandes hematomas pode remover algum tecido vascular ao redor do sítio de enxerto desacelerando a vascularização do sítio do enxerto.

A resposta inflamatória no local da fusão é um evento crítico de suma importância. Esta resposta envolve a remoção do tecido necrótico, lise da fibrina no local do coágulo, restabelecimento de suprimento vascular para o enxerto e tecido hospedeiro, síntese de matriz rica em ácido hialurônico (URIST, 1980; SIMMONS, 1985; PROLO, 1985). Após o procedimento cirúrgico, células polimorfas nucleares, linfócitos, monócitos e macrófagos migram para o local da fusão. No local são estimulados sinais parácrinos (citosinas, quininas e prostaglandinas). Estes sinais são quimiotáticos e fatores de crescimento, afetam a proliferação, migração, diferenciação e uma variedade de atividades celulares bem como modulação do suprimento sanguíneo local, permeabilidade vascular e resposta angiogênica das células endoteliais locais (NILSSON & BAUER, 1986; RIEW & RHEE, 2003).

Em adição a influência do coágulo, suprimento sanguíneo local e resposta celular inflamatória, a superfície óssea do sítio hospedeiro tem efeitos profundos no

processo de fusão óssea. Quando adequadamente preparado pelo cirurgião, osso local vai servir como um reservatório de células osteogênicas e sinais osteoindutores. Ele também fornece uma superfície osteocondutiva para a incorporação do enxerto bem como fonte de suplemento sanguíneo. É sabido que a meta do cirurgião no preparo do local para colocação do enxerto deverá minimizar os danos mecânicos e celulares do osso hospedeiro enquanto maximiza a utilidade das células osteoprogenitoras e as propriedades osteocondutivas e osteoindutivas de sua superfície. Isto é geralmente alcançado pela dissecação subperiosteal e decorticação ou tornando áspero o osso debaixo da cortical para expor os vasos ou espaços ósseos endosteais. A decorticação pode ser alcançada com ferramentas de corte manuais, tais como osteótomo ou rugina. Alternativamente, um drill também pode ser usado, tomando-se a precaução de prevenir necrose térmica devido à fricção da cabeça da broca, para isso, devem-se limitar os períodos de contato entre o drill e o osso e usando irrigação contínua (SUCATO, WELCH & PIERCE, 2002).

A área de superfície do osso esponjoso exposto durante a decorticação é outro fator que pode afetar o sucesso da fusão vertebral. Aumentando a área osteocondutiva, também aumentam o número de células osteogênicas no local a ser fusionado, o que aumenta os efeitos positivos sobre as possibilidades de fusão óssea. Isto pode contar para o grande sucesso dos enxertos colocados em fusões anteriores quando comparados com fusões posteriores, as quais geralmente contam com áreas menores de osso decorticado por segmento de fusão (CURTIS, 1970; ALLEN & FERGUNSON, 1979).

O enxerto ósseo é utilizado para acelerar, aumentar ou substituir a capacidade regenerativa natural do osso. A demanda funcional dos recursos biológicos e deficiências de cada potencial sítio doador variam nos diferentes locais do corpo

humano. Um bom enxerto ósseo deveria ter um número aumentado de células tronco ou progenitoras. Estas funções promovidas pelo enxerto têm sido descritas como osteogênicas, osteoindutivas e osteocondutivas (MUSCHLER & NAKAMOTO, 2003; GRIFFITH, 2004).

O potencial osteogênico do enxerto é derivado do seu número de células tronco e progenitoras viáveis que podem ser transplantadas no local a ser fusionado sob condições que elas poderiam sobreviver e contribuir diretamente para a formação de osso novo.

Atividade osteoindutiva se refere à capacidade de algum estímulo (em geral peptídeos de fator de crescimento) estimular eventos celulares que transformam uma célula potencial tornando-a ativada para contribuir para a nova formação óssea. Os protótipos para fatores osteoindutivos são a família das proteínas morfogenéticas (BMP), particularmente BMPs 2, 4, 6, 7 e 9, que parece ser a mais osteoindutiva. Entretanto, outros fatores de crescimento solúveis também contribuem para este processo, tais como TGF- β , fator de crescimento insulino dependente e imunoglobulinas.

A osteocondução é resultado de características estruturais e de superfície da matriz do enxerto. Osteocondutividade se refere à capacidade da matriz do enxerto alcançar adesão, migração, proliferação e diferenciação de células tronco osteoblásticas e osteoprogenitoras, tão bem como outros tipos celulares que contribuem para o processo de cicatrização e fusão óssea. A osteocondutividade da matriz é uma função da macro-estrutura ou arquitetura, tamanho e conexão entre os poros do material, bem como características químicas da textura da superfície. No caso de materiais degradáveis, as propriedades de degradação do material são também

críticas, especificamente velocidade de degradação, tipos químicos que são liberados com a degradação e a velocidade de sua limpeza no sítio da fusão (GRIFFITH, 2004).

Enxerto ósseo esponjoso autólogo tem sido considerado “gold standard” dos materiais de enxerto. O enxerto autólogo tem mantido propriedades de o mais efetivo e seguro dos materiais de enxerto particularmente em cenários desafiadores de fusão vertebral (HEIPLE, CHASE & HELDON, 1963), (WILSON & LANCE, 1965). Estes achados são reforçados pelo reconhecimento que enxerto ósseo autólogo fornece todas as três áreas de funcionabilidade: células osteogênicas da medula óssea, matriz osteocondutiva de colágeno, mineral, e matriz proteica; e um espectro de proteínas osteoindutivas.

O enxerto ósseo esponjoso utilizado em cirurgias de fusão vertebral do segmento lombar tem sido retirado da crista ilíaca devido a sua proximidade com o local operado e pela quantidade de tecido ósseo esponjoso disponível. Porém, mesmo este material biológico e aparentemente livre de rejeições tem suas limitações como material celular. Embora o osso esponjoso da pelve seja a mais abundante fonte de células osteoblásticas e osteoprogenitoras, estas representam somente e aproximadamente 1 em 20000 células da medula óssea normal, a qual esta misturada com muitas outras células que não contribuem necessariamente com a cicatrização e fusão óssea. Quando este enxerto ósseo é retirado da pelve e implantado no local a ser fusionado, inicialmente fica desprovido do seu suplemento sanguíneo natural, e então implantado sob condições nas quais ele deve competir com todas as outras células da medula óssea também implantada (que não contribuem com a fusão óssea) por uma quantidade limitada de suprimento de oxigênio e outros nutrientes necessários que entrariam por difusão. A demanda metabólica dentro do sítio do enxerto excede em muito a capacidade para difusão natural de nutrientes. Isto resulta em profunda

hipóxia dentro do enxerto. Como resultado, somente células dentro de 1 a 2 milímetros pra dentro da superfície do enxerto seriam capazes de sobreviver no sítio transplantado. Este fato foi reconhecido por Burwell através de avaliações histológicas na década de sessenta e pode ser definido em termos mais quantitativos baseados em princípios de engenharia química (MUSCHLER, NAKAMOTO & GRIFFITH, 2004). Necrose no interior do enxerto tem sido uma dificuldade adicional ao sítio transplantado. Tecidos necróticos devem ser removidos antes da formação do novo osso poder ocorrer. Em adição, células necrosadas e citosinas que estão sendo removidas por células da resposta inflamatória local, adicionam uma demanda metabólica local.

Uma alternativa a este stress metabólico seriam os enxertos vascularizados que têm sido utilizados em alguns grandes centros para procedimentos de reconstrução músculo-esquelético. Alto suprimento vascular pode ser alcançado por experimentados micro-cirurgiões. Muitos estudos têm mostrado amplas vantagens usando enxertos vascularizados num número de situações (WEILAND, MOORE & DANIEL, 1983; WEILAND, PHILLIPS & RANDOLPH, 1984). Em fusões vertebrais anteriores, vasos doadores são capazes de manter o enxerto vascularizado. Enxertos adequados com boa força mecânica são disponíveis da crista ilíaca anterior, crista ilíaca posterior, fíbula ou costela (HAYASHI, MARUYAMA, OKAJIMA & MOTEGI, 1994; HUBBARD, HERNDON & BUONANNO, 1985; LASCOMBLES, GROSDILIER, ORLY & THOMAS, 1991). Em enxeros ósseos do ilíaco um vaso sanguíneo pode ser levado rodando o músculo quadrado lombar, em procedimentos intra-torácicos levando o intercostal junto ao enxerto da costela. Entretanto, o uso rotineiro de enxerto vascularizado é muito pouco realizado devido ao aumento do tempo operatório, dificuldade técnica e morbidade adicional ao paciente, além de

exigir uma equipe multidisciplinar para a sua feição. Mas tem se mostrado altamente desejável em algumas situações quando a incorporação do enxerto avascular pode ser comprometida, tais como em áreas de radiação fibrose induzida ou em locais de infecção prévia.

Tem-se visto muitos estudos realizados com o intuito de se alcançar uma fusão vertebral em procedimentos realizados por via posterior na coluna lombar, uma vez que trabalhos têm mostrado que as fusões vertebrais realizadas somente com a colocação de enxerto ósseo no sítio a ser fusionado têm níveis de não consolidação e conseqüente pseudo-artrose variando, segundo trabalhos, entre 5 até 35%. (DEPALMA & ROTHMAN, 1968; STEIMANN & HERKOWITZ, 1992). Entretanto, todas estas técnicas mais modernas disponíveis envolvem custos elevados, tais como, a utilização de implantes, extratos de BMP, cerâmicas inorgânicas etc.

Os procedimentos de regeneração óssea guiada são uma alternativa para contornar este problema (DAHLIN, ALBERIUS & LINDE 1991; LINDE et al., 1993; DAHLIN et al., 1988; BOSCH, MELSEN & VARGERVIK, 1995; LUNDGREN, LUNDGREN & TAYLOR, 1998). A técnica consiste em prevenir a invasão de células indesejáveis, como os fibroblastos, no defeito ósseo, durante a reparação, permitindo a re-povoamento desta área por células específicas para a neoformação óssea (NYMAN, 1991). Com isto, neste trabalho, propomos o uso da Regeneração Óssea Guiada com uso de membrana oclusiva de látex e enxerto autólogo para auxiliar a fusão vertebral. O modelo experimental de estudo é o coelho da raça Nova Zelândia, por apresentar anatomia lombar comparada a dos humanos, quantidade suficiente de enxerto ósseo de crista ilíaca para se alcançar uma fusão intertransversa e por reproduzir o ambiente de cargas submetidas ao enxerto similares ao encontrado no caso de humanos.

REVISÃO DE LITERATURA

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tecido Ósseo: Constituição e Processos de Reparo

O tecido ósseo é o principal constituinte do esqueleto, serve de suporte para as partes moles e protege órgãos vitais, como os contidos nas caixas craniana e torácica e no canal raquidiano. Aloja e protege a medula óssea, formadora de células do sangue. Proporciona apoio aos músculos esqueléticos, transformando suas contrações em movimentos úteis, e constitui um sistema de alavancas que amplia as forças geradas na contração muscular. Além disso, é reservatório de cálcio, fosfato e outros íons, sendo essencial na manutenção dos níveis desses elementos no sangue (JUNQUEIRA & CARNEIRO 1999).

O osso é um tipo de tecido conjuntivo especializado, formado por matriz óssea, células e membranas conjuntivas. A matriz óssea é composta de uma porção inorgânica onde os íons mais encontrados são o fosfato e o cálcio, há também bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato em pequenas quantidades; e de uma porção orgânica, formada por fibras colágenas (95%) e por pequena quantidade de substância fundamental amorfa (LEGERS, 2002). Neste tecido existem três tipos celulares: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Todos os ossos são revestidos em suas superfícies externas e internas por membranas conjuntivas, que possuem células osteogênicas, o perióstio e o endóstio, respectivamente (MANN & PAYNE, 1989).

Os osteoblastos são as células responsáveis pela síntese e secreção da matriz orgânica do osso. São capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz. Estão dispostos na superfície e possuem prolongamentos citoplasmáticos, que se prendem aos osteoblastos vizinhos (WLODARSKI, 1990).

Uma vez aprisionados pela matriz óssea, passam a ser chamado de osteócitos, que são células achatadas e também possuem prolongamentos citoplasmáticos. São essenciais para a manutenção da matriz mineralizada do osso (STEVENS & LOWE, 2001).

Os osteoclastos são as células que estão associadas à remodelação óssea, estas são tipos celulares gigantes localizadas nas lacunas de Howship da superfície óssea (LINDHE, 2005).

Os ossos se mantêm ativos durante toda a vida do organismo, apesar de aparentemente inertes, eles crescem e são remodelados constantemente. Quando lesados são capazes de reparação, retornando completamente a sua estrutura e função originais depois de lesado, sem deixar cicatriz, fenômeno que demonstra sua permanente vitalidade (SCHENK, 1994; KATCHBURIAN & ARANA, 1999).

Uma vez lesado, o processo de reparação óssea ocorre da mesma forma que o crescimento e desenvolvimento ósseo, a lesão inicial desencadeia uma sequência contínua de eventos celulares, terminando com a remodelação completa sem deixar cicatriz, sendo este processo semelhante à ossificação intramembranosa ou endocondral (BOSTROM & CAMACHO, 1998, CARNEIRO 1999).

A neoformação óssea em defeitos cirúrgicos envolve dois princípios básicos: osteoindução e osteocondução (SCHENK, 1994; KATCHBURIAN & ARANA, 1999; JUNQUEIRA & CARNEIRO 1999).

A osteoindução pode ser obtida através de dois processos: um mediado por células e outro mediado por fatores de crescimento específicos. No primeiro, as células osteogênicas da medula óssea induzem neoformação óssea. Já, no segundo processo, as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), que são fatores de crescimento, têm propriedade de estimular células mesenquimais indiferenciadas osteoprogenitoras e

sua migração, reagregação e diferenciação em condroblastos e/ou osteoblastos, com subsequente deposição de matriz óssea (FRIEDENSTEIN, 1976).

Na osteocondução, a neoformação óssea pode ser auxiliada por materiais com estrutura especializada, que preenchem o defeito ósseo e atuam como arcabouço de sustentação para a penetração de células ósseas. O material implantado serviria como ancoragem para o crescimento de capilares, tecido perivascular, e células indiferenciadas osteoprogenitoras originadas no leito ósseo cirúrgico, e também impedem que tecidos não osteogênicos invadam o local a ser reparado (SCHENK, 1994; KATCHBURIAN & ARANA, 1999).

Entretanto, devido a sua estrutura calcificada rígida, o osso tem requisitos específicos que devem ser respeitados para a sua regeneração. A estrutura calcificada do osso tem perfusão limitada, por isso a nova formação óssea é criticamente dependente da estabilidade do coágulo sanguíneo (MELCHER & DREYER, 1962), da vascularização da área (CARRANZA, NEWMAN & TAKEI, 2004), do tamanho do defeito e da alta capacidade proliferativa dos tecidos competidores (SCHENK, 1994).

2.2 – Regeneração Óssea Guiada e Látex Natural

A Regeneração Óssea Guiada consiste de uma técnica usada para prevenir a invasão de células indesejáveis, como os fibroblastos, no defeito ósseo, durante a reparação, permitindo a repovoamento desta área por células específicas para a neoformação óssea (NYMAN, 1991).

O uso de membranas oclusivas é eficaz na regeneração óssea guiada quando utilizadas como barreiras à proliferação de células do tecido epitelial e conjuntivo para o interior do defeito ósseo, permitindo um tempo adicional para as células

osteogênicas, de migração mais lenta, repovoarem a área do defeito, desencadeando com eficiência a neoformação óssea (DAHLIN et al., 1988; DAHLIN, ALBERIUS & LINDE, 1991; LINDE et al., 1993).

MURRAY, HOLDEN & ROSELLAN, (1957) demonstraram que quando uma cavidade com uma fonte de osteoblastos e um suprimento sanguíneo foi isolada dos tecidos moles adjacentes, a cavidade era rapidamente preenchida com osso; entretanto, se o espaço não fosse protegido, poderia ser preenchido com tecido conjuntivo fibroso.

As membranas são materiais que servem para proteger o coágulo sanguíneo e prevenir as células do tecido conjuntivo e epitelial de migrarem para o interior do defeito ósseo. Algumas propriedades ideais para as membranas são: biocompatibilidade; criação e manutenção de espaço; facilidade de manuseio; e capacidade de absorção (HAMMERLE & JUNG, 2003; CARRANZA, NEWMAN & TAKEI, 2004).

Um dos materiais membranosos que atende a estas propriedades é o filme de látex natural. O látex é extraído da seringueira *hevea brasilienses*. Tribos indígenas da Amazônia utilizavam-no em seu estado natural para curar feridas de pele. Pesquisadores observaram o seu poder cicatrizante, que é uma defesa natural da planta, (ZIMMERMANN et al., 2006). Este biomaterial apresenta certas vantagens, como: elasticidade, flexibilidade, resistência mecânica, capacidade de induzir a angiogênese e o baixo custo (MAZOCCO, 2002). Além de ser de origem vegetal, não tendo o potencial de transmissão de doenças infecciosas (PINHO et al., 2003).

O látex da seringueira *Hevea brasilienses* forma um sistema coloidal polifásico e polidisperso. Depois de centrifugado, o látex pode ser representado como sendo formado por três componentes fundamentais (BERNARDES, 2000).

1. Fase borracha – hidrocarboneto isoprênico 37%. Apresenta coloração branca e é formada quase exclusivamente de borracha.

2. Soro 48%. Fração intermediária em forma de líquido é o meio dispersível do sistema coloidal látex e contém proteínas e sais dissolvidos em água.

3. Fração de fundo (depósito) 15% . Apresenta coloração amarela e é constituída de componentes não borrachas: os lutóides (proteínas, fosfolipídeos e sais minerais) e as partículas Frey-Wyssling (constituídas de carotenóides e lipídeos conferindo, por isso, a borracha, a coloração amarelada).

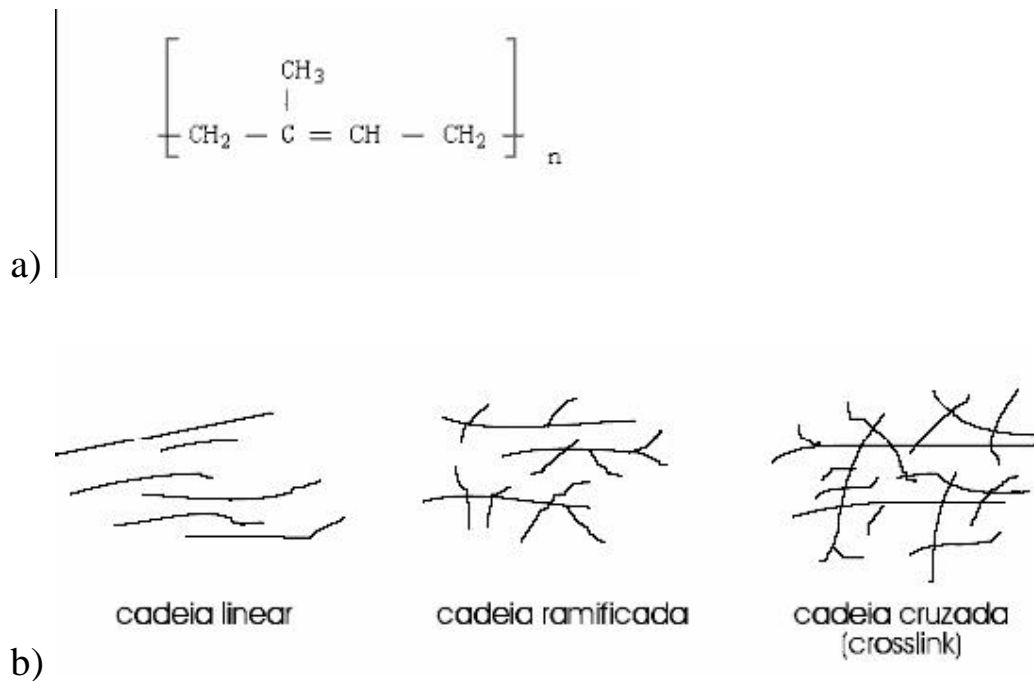


Figura 1 - Estrutura molecular da borracha (a), formas das cadeias (b).

O processo de separação destas partes se dá através da ação de uma força centrífuga elevada (40000 rpm). O látex pode ser considerado um composto perecível devido à composição do soro que contém carboidratos, proteínas, sais minerais e microorganismos sendo que ele se coagula espontaneamente de 8 a 10 horas após a colheita separando a borracha em forma de coágulo. O látex natural no primeiro

instante que se escoa da seringueira é levemente alcalino. Por efeito de reações químicas vai se acidificando rapidamente, em contato com o ar.

O conteúdo da borracha seca é variável, notando-se que as primeiras sangrias, em árvores virgens ou em árvores após um repouso prolongado, produz menor quantidade, porém em maior concentração de borracha. Na medida em que as sangrias se sucedem, a quantidade aumenta e o conteúdo da borracha decresce, até certo limite. O conteúdo de borracha seca também decresce após períodos chuvosos ou em seguida a aplicação de estimulantes

Sabe-se também que o látex natural é capaz de acelerar a angiogênese (ALVES et al, 2003) e esta propriedade pode estar relacionada aos processos de osteogênese. A hipótese é de que o látex natural da seringueira tem um fator de crescimento na sua composição que atuaria promovendo a neovascularização, adesão celular e formação de matriz extra celular (FRADE et al, 2003).

No homem, já vem sendo testada como material indutor de neoformação tecidual, tendo sido aplicada em pacientes com úlceras crônicas de membros inferiores e meringoplastias (PINHO et al, 2003). Em animais, um trabalho utilizou a biomembrana de látex com polilisina a 0,1% na herniorrafia perianal em um cão, permitindo a oclusão do anel herniário, com formação de tecido de granulação e posteriormente retirada da membrana (PAULO et al, 2005). Outro trabalho empregou a membrana em herniorrafias umbilicais recidivantes e constataram que ela foi eficaz em doze bovinos leiteiros (RABELO et al, 2004). Em pesquisas na área de Ortopedia visando à regeneração óssea mais eficiente, o látex foi eficaz na reparação de fraturas de tíbia de coelho demonstrando grande potencial para este tipo de aplicação. Em falhas no crânio de ratos, os resultados foram semelhantes e os pesquisadores acreditam que novas pesquisas apontam sua utilização em osteoporose, odontologia e

reconstituição de ossos da face. O uso da membrana oclusiva de látex mostrou-se eficiente no reparo de defeito crítico em calvárias de coelhos, quando comparados com grupo controle sem uso de membranas (ERENO, 2006).

2.3 Modelos Experimentais de Artrodese

Trabalhos experimentais com animais são realizados desde 1913, porém, o modelo ideal é aquele cujos resultados mais se aproximassem dos procedimentos realizados em humanos. Alguns modelos animais de fusão vertebral não apresentam reprodutibilidade na técnica cirúrgica, meio ambiente mecânico, ou a biologia da incorporação do enxerto associada com a fusão vertebral do processo intertransverso. A maioria dos modelos animais têm usado fusão intercorporal vertebral anterior, ou fusão espinhal posterior da lâmina ou articulação facetaria mais que fusão intertransversa. Os estudos animais tem tentado focar sobre valores biomecânicos de fusão através de sistemas de fixação interna. Enquanto usado extensivamente em simulações clínicas, fixações internas não eliminaram as não uniões, claramente porque fatores biológicos podem interferir nos resultados. Um modelo animal confiável é necessário para dar um entendimento básico da biologia das fusões vertebrais e comprovar a atuação de citosinas, fatores de crescimento e hormônios durante a fusão. Enquanto muito é conhecido a respeito da reparação biológica das fraturas, pouco é conhecido sobre a biologia das fusões vertebrais postero-laterais (BODEN, 1995).

Conseqüentemente, modelos animais deveriam fornecer meios adicionais para se examinar e caracterizar os efeitos da estabilidade de fusões vertebrais. Boden e colaboradores introduziram coelhos brancos da raça Nova Zelândia como um modelo

mais próximo do ideal para simular fusões postero-laterais vertebrais em humanos. A técnica cirúrgica usada neste modelo era similar a que é usada clinicamente. As taxas de pseudo-artrose variam em torno de 33% o que também tem se aproximado dos resultados clínicos. Desde a sua introdução, este modelo tem sido adotado em muitas outras pesquisas (ERULKAR, GRAUER, PATEL & PANJABI, 2001). Características biomecânicas dos coelhos da raça Nova Zelândia razoavelmente se aproximam daquelas encontradas na coluna de humanos.

O primeiro requerimento para qualquer modelo animal de fusão vertebral entre processos transversos deveria ser a repetição das técnicas cirúrgicas e do ambiente de cargas submetidas ao enxerto como vistas em humanos. O segundo requerimento deveria ser a repetição dos resultados vistos em humanos-quantidades similares de não uniões (BODEN, 1995).

O coelho é um dos menores animais com uma anatomia lombar comparada a dos humanos e quantidade suficiente de enxerto ósseo de crista ilíaca pra se alcançar uma fusão intertransversa (BODEN, 1995).

Com relação ao tempo ideal para se observar a formação de um calo ósseo, o clássico trabalho de Boden tenta reproduzir os resultados em humanos e mostrou em sessenta coelhos operados e eutanasiados com 2, 3, 4, 5, 6 ou 10 semanas e avaliados através de métodos de palpação manual, radiografias e testes mecânicos. Evidências radiográficas de fusão eram usualmente vistas após 4 semanas com sinais de remodelação óssea vistas após 6 semanas. Com relação à palpação manual, após 4 semanas, sólidas fusões poderiam ser facilmente distinguidas de não uniões. Testes mecânicos mostraram diferenças estatisticamente diferentes após 3 semanas. Em suas conclusões, o autor admite resultados semelhantes de não união óssea em torno de 33% após quatro, cinco, seis ou dez semanas.

A maioria dos trabalhos que visam mostrar análises de fusões postero-laterais são sempre a partir de seis semanas. Jhonathan et al, 2001, avaliou a flexibilidade destas fusões em coelhos a partir de 5 semanas, Hile et al, 2006, em um trabalho avaliou taxas de fusão postero-laterais com utilização de membranas osteocondutivas a partir de 6 semanas, Yee et al 2004, em um trabalho de avaliação tomográfica das fusões lombares sacrificou um grupo de animais com 9 semanas.

OBJETIVOS

3- OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é estudar a influência da membrana de látex como cobertura e auxílio da fusão intervertebral lombar, quando usada como membrana oclusiva. A avaliação da consolidação óssea foi realizada por análise macroscópica, histológica descritiva, histométrica e radiológica através de radiografias e tomografia computadorizada. Para isso, os animais foram eutanasiados 8 semanas após a data da realização da cirurgia.

MATERIAIS E MÉTODOS

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Local e Grupo de Estudo

Foram utilizados 8 coelhos brancos adultos da raça Nova Zelândia, machos, com peso médio de 3 kg, idade entre três e quatro meses, mantidos, durante todo o período experimental, em boas condições ambientais, de alimentação, temperatura, higiene e iluminação e em cativeiros individuais. Os coelhos foram obtidos do Biotério Geral da USP – Ribeirão Preto/SP.

A análise de neoformação óssea foi realizada no período de 8 semanas. Os procedimentos cirúrgicos ocorreram no Biotério da Universidade do Sagrado Coração, na cidade de Bauru, São Paulo, após aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade do Sagrado Coração, Bauru, SP (Anexo I).

4.2 – Delineamento Experimental

Cada animal sofreu o procedimento cirúrgico em ambos os lados do processo transversos. Um dos lados recebeu enxerto autólogo de crista ilíaca e sobre este, uma cobertura da membrana de látex. O outro lado recebeu apenas o enxerto e foi considerado como controle para o lado tratado com membrana de látex. Após o período de 8 semanas, os animais foram eutanasiados, as peças contendo os processos transversos fusionados foram retirados e analisados macroscopicamente, histologicamente e radiologicamente.



Fig. 2 Forma da membrana de látex utilizada nas cirurgias
(ERENO, 2007)

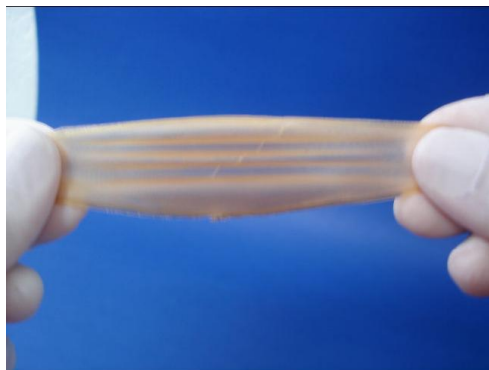


Fig. 3 Flexibilidade e elasticidade da membrana de Látex
(ERENO, 2007)

4.3 - Procedimentos Cirúrgicos

4.3.1 – Anestesia e Assepsia

Para realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram submetidos à anestesia geral com administração da medicação pré-anestésica de relaxante intramuscular (Diazepan), a uma dose de 0,1 ml/kg de peso corpóreo, seguido pela administração intramuscular do anestésico geral (Ketamina), a uma dose de 0,25 ml/kg.

Após este procedimento foram realizados os procedimentos de tricotomia na região lombo sacra posterior (figura 4), de assepsia com PVPI (polivinilpíloridona) (figura 5) tópico e de infiltração, para fins de isquemia, com anestésico local cloridrato de prilocaína a 3% e felipressina 0,03U.I. na região que a ser incisada.



Fig. 4 Coelho anestesiado e posicionado sobre a mesa cirúrgica após tricotomia

4.3.2 - Técnica Cirúrgica

A área a ser operada foi isolada com campos cirúrgicos estéreis. Foi realizada uma incisão lombar, mediana, de aproximadamente 6 cm, no plano sagital mediano da coluna com lâmina de bisturi número quinze (figura 6 e 7). O plano intermuscular entre o multifído e o longíssimo foi afastado para se expor os processos transversos de L4 e L5 bem como a membrana intertransversa (figuras 8, 9 10 e 11). Pela mesma via de acesso foi abordada a crista ilíaca e retirado enxerto ósseo. Em seguida, foi feita a decorticação dos processos transversos com um drill de baixa rotação e a colocação do enxerto ósseo sobre eles em ponte (figura 12, 13, 14, 15 e 16).



Fig. 5 Realizado antissepsia com povidine e colocação de campos estéreis



Fig. 6 Incisão na linha média posterior longitudinal mediana

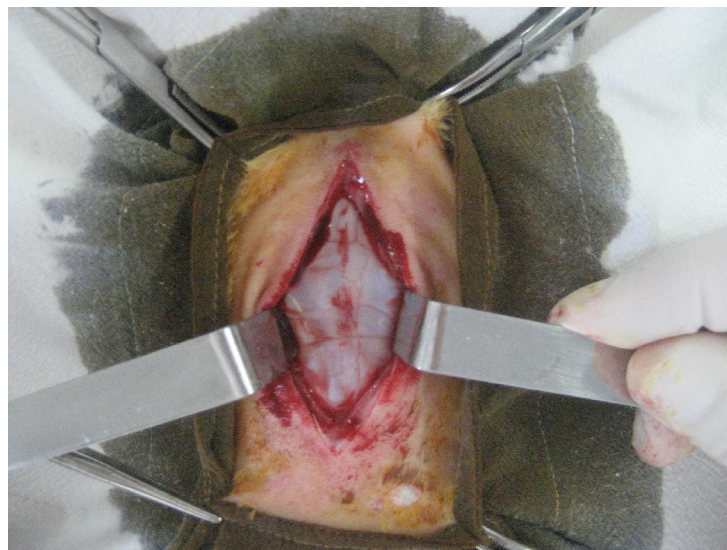


Fig. 7 Exposição da fascia intermuscular

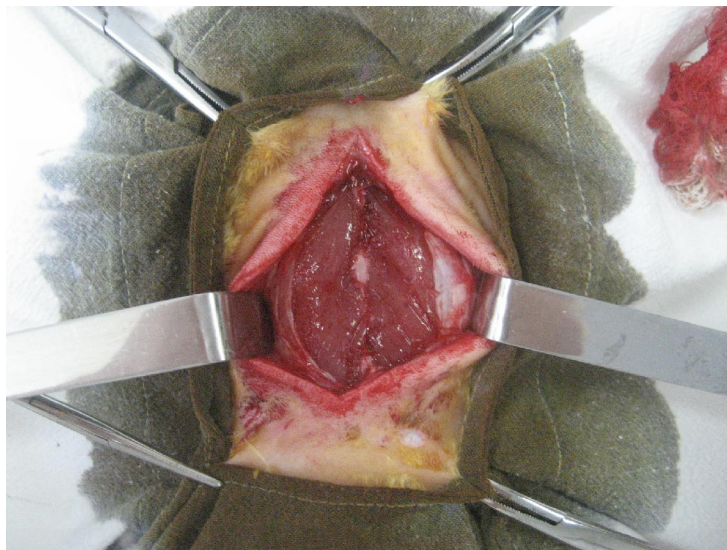


Fig. 8 Exposição da musculatura para vertebral

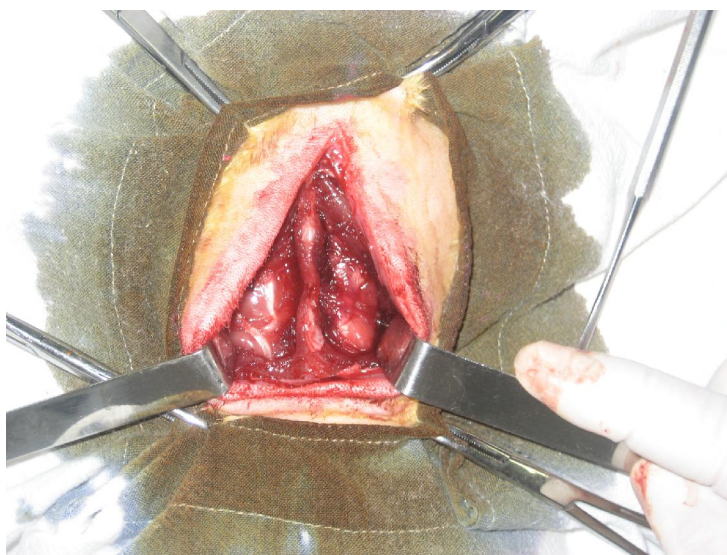


Fig. 9 Visualização das facetas articulares

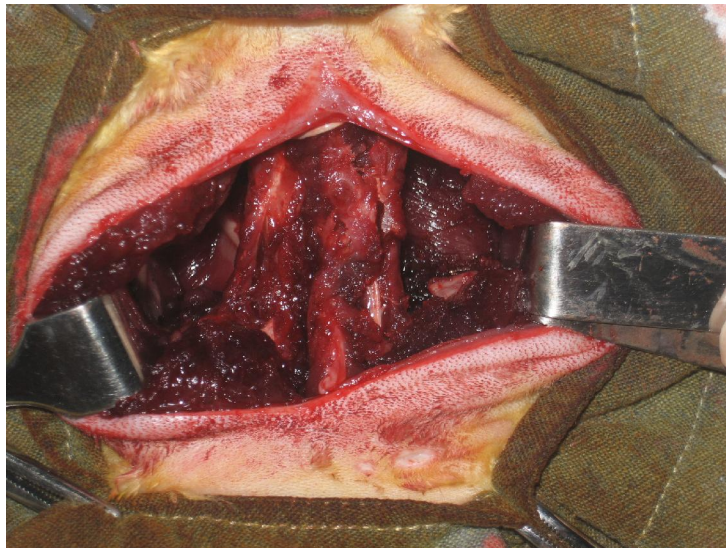


Fig. 10 Afastamento e visualização dos processos transversos

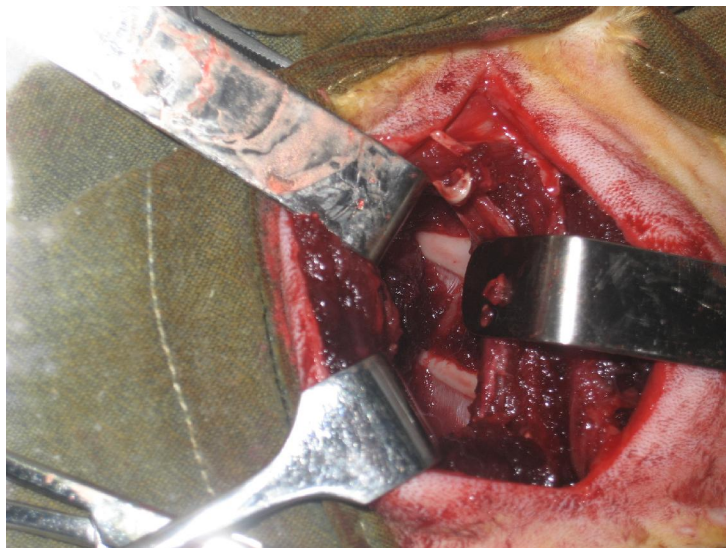


Fig. 11 Processos transversos do lado E



Fig. 12 Posicionamento do Drill

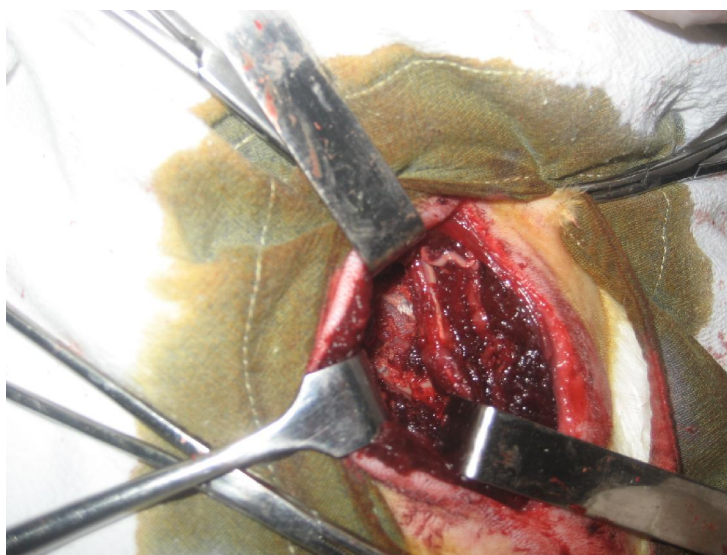


Fig. 13 Processos transversos decorticados do lado E

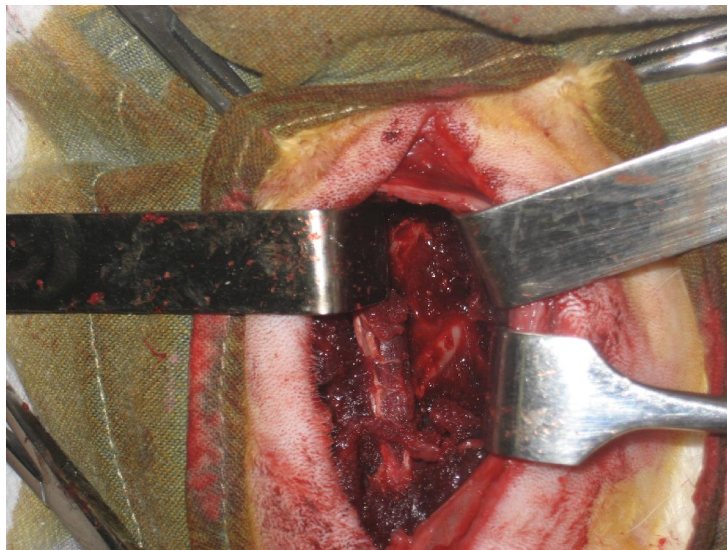


Fig. 14 Processos transversos decorticados do lado D

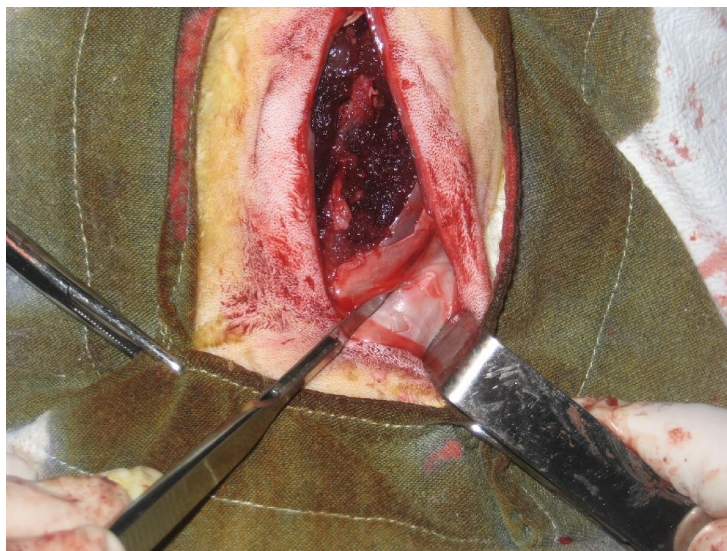


Fig. 15 Visualização da crista ilíaca coberta pela fascia muscular

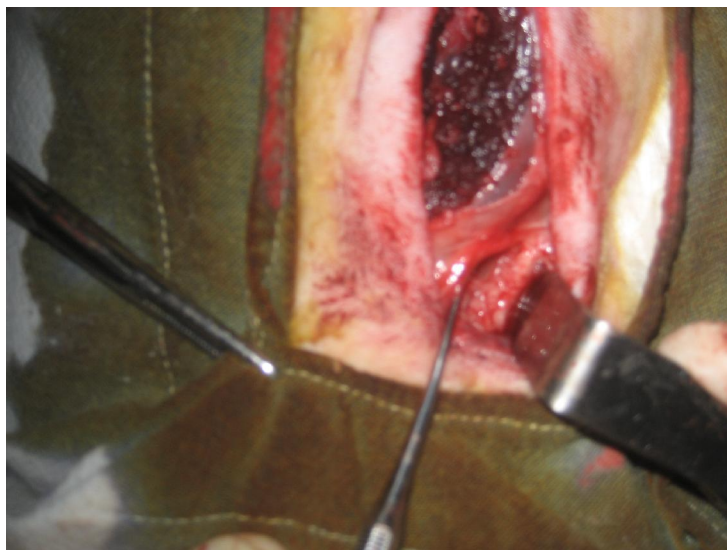


Fig. 16 Crista ilíaca

O lado tratado recebeu uma membrana de látex natural, na superfície do enxerto. O lado controle recebeu apenas o enxerto (figura 17, 18 e 19). O procedimento de sutura foi realizado inicialmente no músculo e, posteriormente, na pele com fio seda 4.0 reabsorvível (figura 20 e 21).



Fig. 17 Colocação do enxerto ósseo do lado E

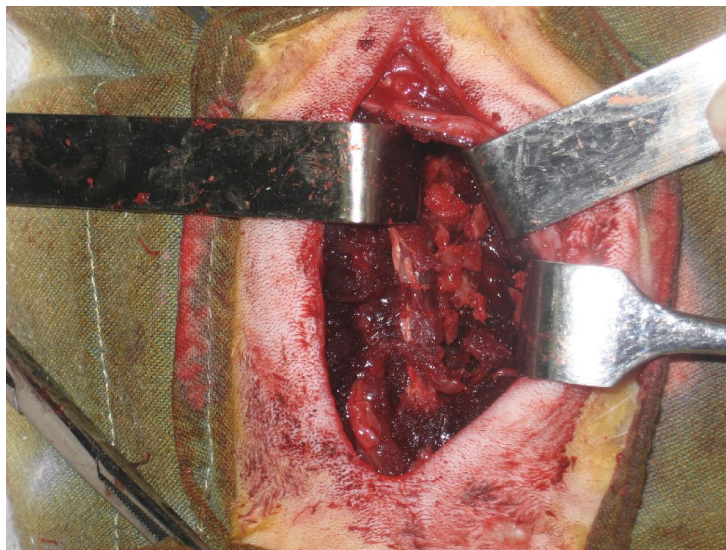


Fig. 18 Colocação de enxerto ósseo do lado D

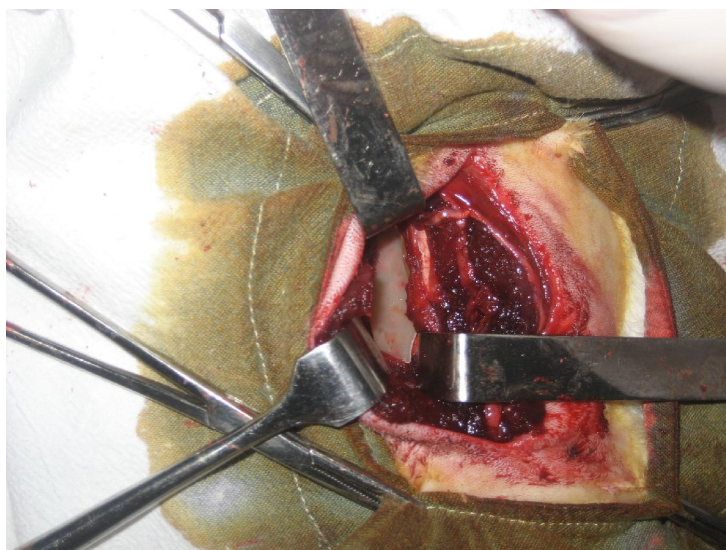


Fig.19 Colocação da membrana de látex sobre o enxerto ósseo do lado E

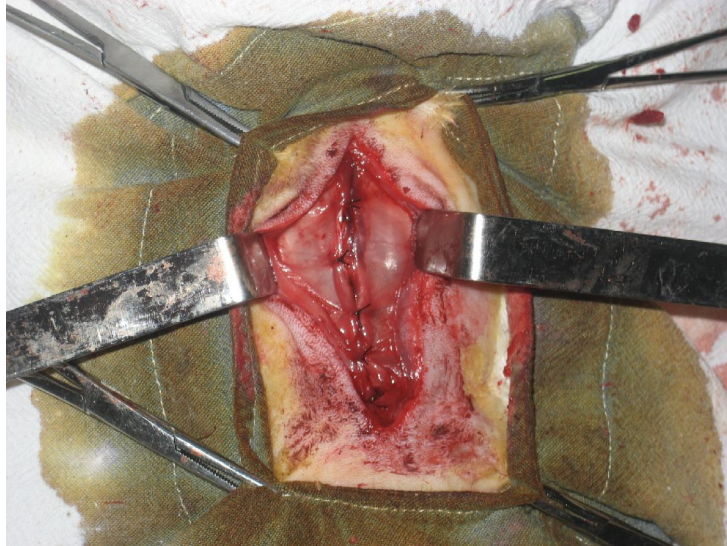


Fig. 20 Fechamento por planos

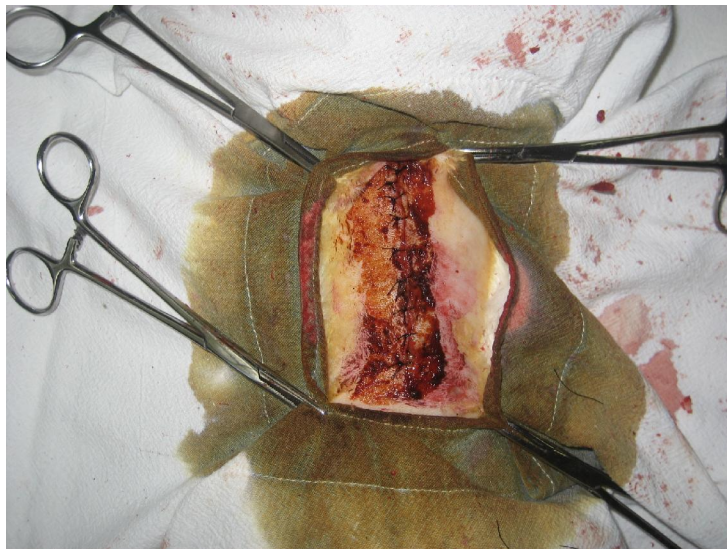


Fig.21 Sutura e curativo

Após os procedimentos cirúrgicos, como profilaxia a infecções, foi administrada Ampicilina sódica numa dose única de 1ml/kg por via intramuscular.

Após os períodos de preservação os animais foram eutanasiados com superdosagem de anestésico geral Ketalar (4 ml).

4.4 - Preparo das Peças e Forma de Análise dos Resultados

A coleta das peças foi realizada com um disco de Carborundum com auxílio de micro motor cirúrgico. Subseqüentemente, as peças foram fixadas em formol a 10%, para que posteriormente fossem feitas as análises macroscópicas, microscópicas e radiográficas. Logo após a análise radiográfica, a análise histológica de cada peça foi realizada para obtermos avaliação e quantificação da fusão óssea a partir de diferentes técnicas.

4.4.1 – Análise macroscópica

Os espécimes foram analisados macroscopicamente nas suas dimensões, coloração e fotografados em lente de aproximação.

4.4.2 - Análise das peças por imagens radiográficas

Inicialmente as peças foram envolvidas por um lenço de papel, para a retirada da umidade. Utilizamos um aparelho de raios X médico com os seguintes parâmetros: distância foco-filme 1,15m; tensão 40kV; corrente 1,5mA; tempo de exposição 3ms.

Após a revelação os filmes foram digitalizados para posterior análise comparativa da radiopacidade obtida entre os processos transversos em ambos os

lados, tratado e controle. O equipamento scanner utilizado é da marca Vidar, modelo DiagnosticPro, com resolução espacial de 300dpi e tamanho aproximado de pixel de 84,67 μ m.

4.4.3 – Volumetria por Tomografia Computadorizada

As peças das colunas fixas em formol foram submetidas ao processo de imagem por Tomografia Computadorizada. Estas imagens foram realizadas no Tomógrafo Siemens, pertencente ao Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP-USP. Foram adquiridas imagens axiais com 1mm de espessura, diâmetro de reconstrução 254 mm, distância fonte – detector 940 mm, distância fonte – paciente 535 mm, altura 115 mm, direção de rotação CW, tempo de exposição 1500s, corrente do tubo 80mA.

Os dados digitais da imagem produzida pelo Tomógrafo são gerados no padrão DICOM (Digital Imaging Communications in Medicine) os quais foram utilizados para o cálculo do volume. Para tanto, um software foi desenvolvido no CCIFM (Centro de Ciências de Imagem e Física Médica) do HCRP (Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto), possibilitando a visualização de cada fatia a partir de um determinado nível de cinza (número de CT) e a delimitação da área de interesse, referente a artrodese. O cálculo do volume da artrodese na fatia se dá pelo produto da área pela espessura (1mm). O volume final é dado pela soma dos volumes das fatias.

Inicialmente, o software apresenta a imagem da fatia em uma janela, como mostra a figura 22, a seguir:

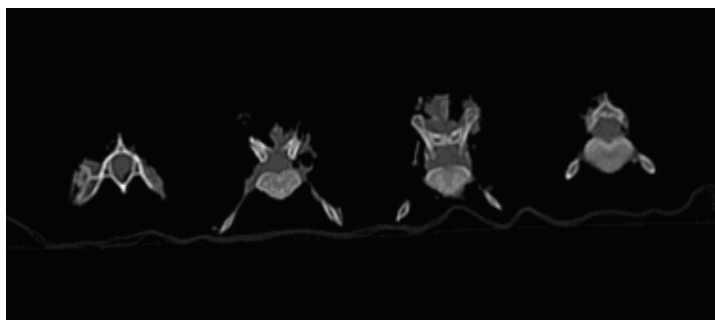


Figura 22: Imagens axiais de coluna de coelhos

A seguir, o software permite que se adote um valor limiar (threshold) de um determinado nível de cinza em escala de UH para a apresentação das imagens. Exemplificando, a figura 20 mostra o resultado obtido para o nível threshold de 100UH.

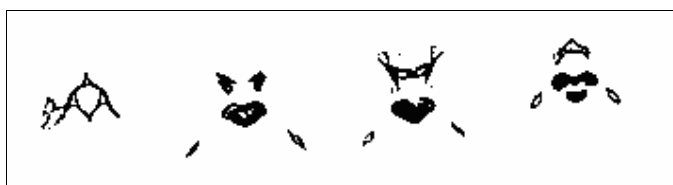


Figura 23: Imagens relativas à figura 22, após a aplicação do threshold no valor de 100UH.

Posteriormente, a delimitação de uma região de interesse (ROI) é efetuada para que seja feita a volumetria da parte desejada, no caso desse estudo, onde se encontra a artrodese implementada. A contagem do número de pixels relativos à área de interesse é armazenada para cada fatia, o que possibilita o cálculo do volume. A conversão de número de pixels em área é feita através do tamanho do pixel. No procedimento de aquisição da imagem adotada neste trabalho, cada pixel tem a dimensão de 0.5mm de altura e largura, valor fornecido pelo software que opera o

tomógrafo. Com isso, a área em pixels é convertida em mm^2 , que multiplicado pela espessura da fatia (1mm) fornece o valor do volume da artrodese na fatia. Como o número de CT do osso varia de 100 a 400UH, neste trabalho, adotamos o valor de 100UH como threshold.

4.4.4 – Análise Microscópica

Inicialmente as peças foram fixadas em formol a 10% por 92 horas, seguida de descalcificação pelo método Morse (solução aquosa de ácido fórmico/citrato de sódio) e incluídas em parafina. Os cortes microscópicos foram obtidos no sentido longitudinal com seis micrômetros de espessura e corados pelos métodos da hematoxilina/eosina e Tricômico Masson.

Os cortes microscópicos foram analisados e descritos em todas as suas peculiaridades. Foram selecionados e fotografados os dados mais relevantes, no próprio microscópio Nikon H550L, adquirido pelo projeto FAPESP 03/09503-3 sob responsabilidade do Prof. Dr. Sérgio A. Catanzaro Guimarães. A análise Histomorfométrica foi realizada através do Software Image Pro-Plus, o qual calcula a fração de volume relativo à estrutura selecionada. Neste trabalho a fração de volume ósseo foi determinada.

RESULTADOS

5- RESULTADOS

5.1 – Aspecto Clínico

Todos os animais mantiveram suas funções vitais, permanecendo em gaiolas individuais, sem imobilização. Não houve infecções pós-operatórias e evidências de reação inflamatória do tipo corpo estranho. Durante o pós-operatório foi observada excelente recuperação destes animais.

5.2 – Análise Macroscópica

As figuras 24, 25 e 26 mostram fotografias das peças coletadas das cirurgias. Através de palpação manual das mesmas, bem como se utilizando uma pinça percorrendo toda a superfície artrodesada a fim de se avaliar se havia ou não uma superfície de dura e consistente entre os processos transversos. Através desta técnica, consideramos artrodesados 6 peças do lado revestido com a membrana e 5 do lado controle.



Fig. 24 Peça anatômica em posição ventral, mostrando vértebras, discos, processos transversos e a área fusionada entre eles. Foi considerado consolidado bilateralmente através da palpação manual. O lado tratado está a esquerda, nesta fotografia.



Fig. 25 – Outra peça com a mesma vista ventral, considera não consolidada pela palpação manual bilateralmente. O lado tratado corresponde ao lado direito nesta fotografia.



Fig. 26 Aspecto dorsal da peça, mostrando os processos transversos com a área fusionada entre eles.

5.3 – Análise Radiográfica

5.3.1 - Radiografia

Os filmes foram digitalizados através de um scanner de transmissão e a figura 27, a seguir, mostra alguns dos resultados obtidos.

Evidenciamos que há maior radiopacidade no lado tratado com membrana em cinco animais, em dois não foram notadas diferenças e em apenas um deles houve maior radiopacidade do lado não recoberto com a membrana de látex.

Por esta análise, consideramos radiograficamente consolidado seis lados tratados com a membrana e cinco do lado controle.

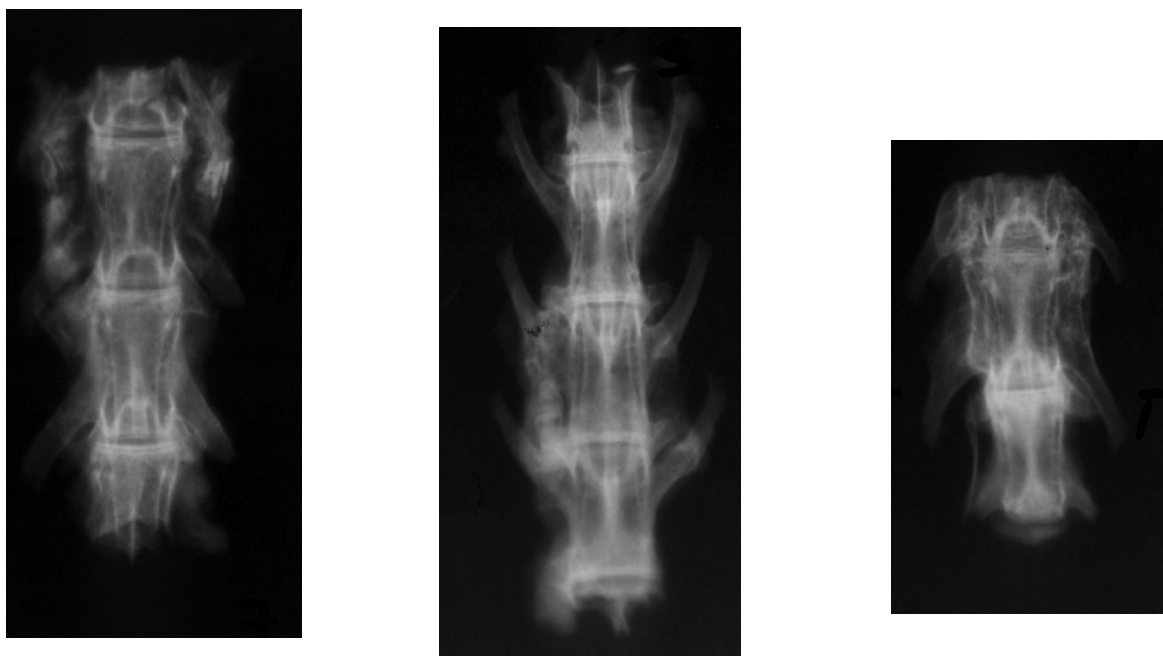


Figura 27: Radiografias da região lombar da coluna vertebral 64 dias após a cirurgia.

O lado Esquerdo corresponde ao lado tratado com membrana de látex, o lado Direito, lado controle.

5.4 Volumetria por Tomografia Computadorizada

A tabela 1 mostra os valores dos volumes obtidos por Tomografia Computadorizada (TC)

Tabela 1: Volume ósseo relativa à região de Artrodese obtido por TC, considerando o nível 100UH

Animal	Lado Controle (cm ³)	Lado Tratado (cm ³)	Δ Volume (%) [*]
1	0.75	1.59	112.8
2	2.34	1.51	-35.6
3	2.13	3.62	69.9
4	2.17	2.22	2.2
5	2.71	2.75	1.5
6	1.17	3.93	235.9
7	1.85	2.05	10.8
8	1.30	2.56	96.5
Média e SD	1.80 \pm 0.67	2.52 \pm 0.88	

^{*}Variação em relação ao lado controle

A figura 28 mostra a representação gráfica dos valores de volume e a figura 29, da diferença percentual entre os lados tratado e controle, tomando o lado controle como referência.

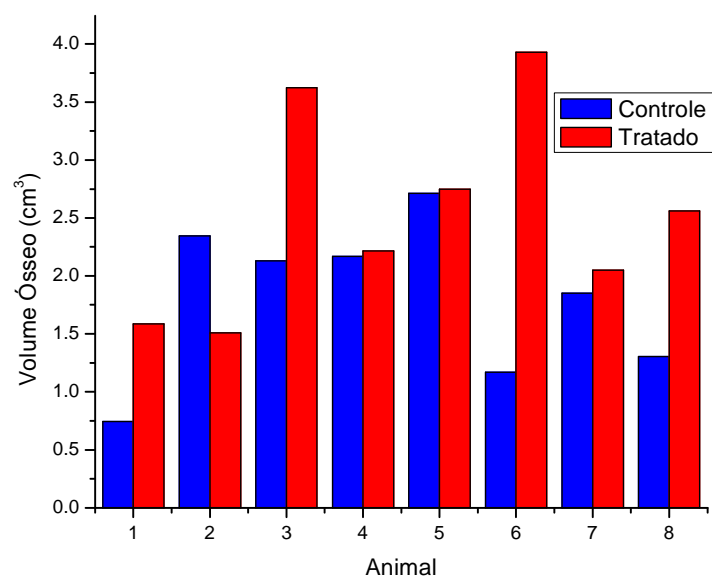


Figura 28 : Representação Gráfica dos volumes da região de artrodese de acordo com a tabela 1

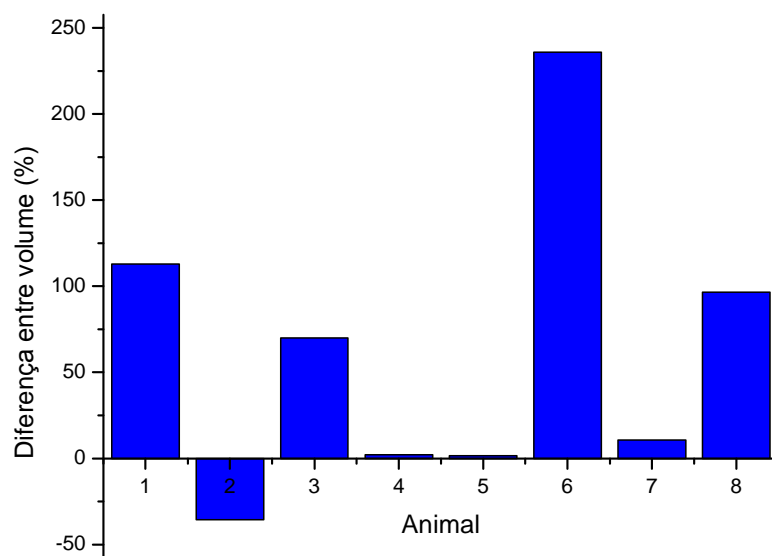


Figura 29: Diferença em % dos volumes em relação ao lado controle

5.5 Análise Histológica Descritiva

A análise Histológica descritiva mostrou que todos os animais analisados: lado controle (somente enxerto ósseo) e tratado (enxerto ósseo + membrana), apresentaram as áreas dos defeitos ósseos bem evidentes.

Através desta análise, é possível considerar que o lado controle se mostrou incipiente em relação ao processo de regeneração, isto é de neoformação óssea. O lado no qual foi colocada a membrana (tratado) apresentou maior quantidade de tecido conjuntivo osteogênico, tecido ósseo neoformado e também de tecido ósseo com maior conteúdo mineral, demonstrando então uma regeneração mais eficiente provavelmente pela presença da membrana.

As figuras 30 e 31 mostram fotomicrografias de lâminas histológicas coradas com Tricrômico de Masson. As fotomicrografias foram realizadas com aumento de 2x

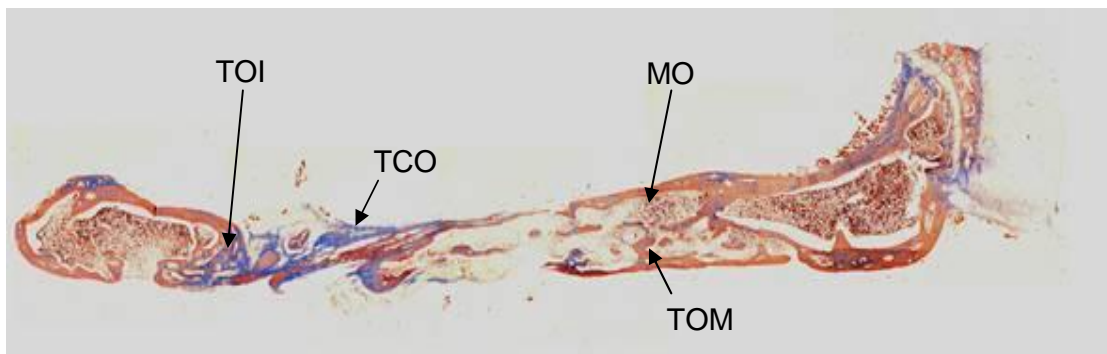


Fig. 30 – Histologia do lado tratado com membrana mostrando os processos transversos e a formação de calo ósseo entre eles. A extensão do defeito apresenta na lateral esquerda, tecido ósseo imaturo (TOI) com pontos de tecido ósseo mais mineralizado (TOM), também pontos de tecido conjuntivo osteogênico (TCO), da porção central para a lateral direita nota-se uma quantidade considerável de tecido ósseo maduro (TOM) (trabéculas ósseas) com várias áreas com presença de medula óssea (MO). Aumento 2x

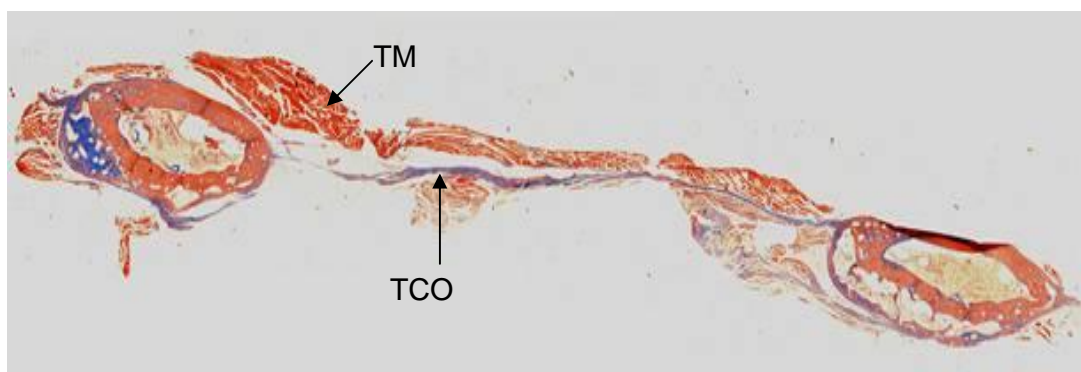


Fig. 31 – Foto histológica do lado onde foi realizada a artrodese sem a utilização da cobertura com membrana de látex. Nesta fotomicrografia observa-se uma fina camada de tecido conjuntivo osteogênico (TCO) em toda extensão do defeito, com pontos de tecido ósseo imaturo (TOI) mais na região central, acima do tecido conjuntivo há presença de tecido muscular (TM). Aumento 2x

5.6 Análise Histomorfométrica

A tabela 2 relaciona a fração de volume ósseo entre os processos transversos, de todos os animais, do lado controle e lado tratado.

Tabela 2: Fração de Volume Ósseo (%) dos lados controle e tratado, obtido por histomorfometria

Animal	Controle	Tratado	Variação
1	7,4 ± 1,9**	47,6 ± 4,4**	40,1 ± 6,3
2	47,4 ± 4,7*	18,9 ± 1,5*	-28,5 ± 6,6
3	25,7 ± 7,2	34,8 ± 3,6	9,0 ± 10,9
4	51,7 ± 18,9	45,8 ± 7,8	-5,9 ± 26,6
5	42,1 ± 1,8**	61,0 ± 1,9**	18,9 ± 3,7
6	16,6 ± 1,3*	41,0 ± 5,1*	24,4 ± 6,4
7	52,3 ± 9,7	36,4 ± 8,2	-15,9 ± 17,9
8	14,7 ± 2,2**	65,2 ± 2,8**	50,5 ± 4,9
	32,2 ± 18,2	43,8 ± 14,8	

* Valores significativamente diferentes, * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ usando teste ANOVA e Tukey para comparação entre as médias

A figura 32 mostra os valores da fração de volume ósseo de todos os animais e comparando os lados tratado e controle, obtidos por histomorfometria. E a figura 33 mostra a diferença entre ambos, tomando o lado controle como referência.

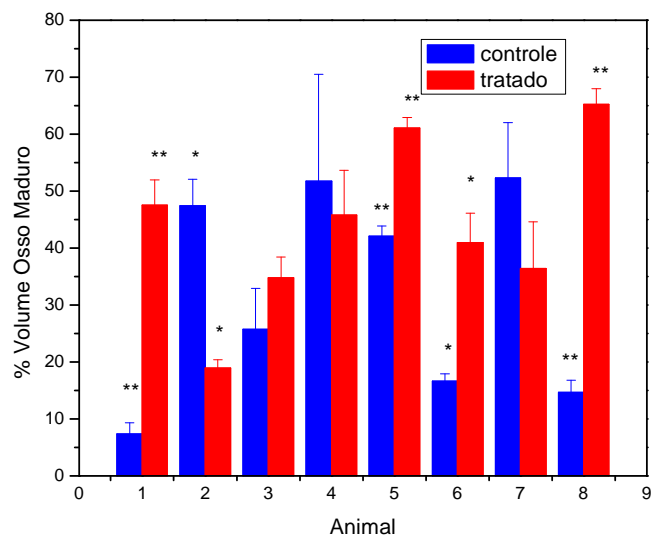


Figura 32: Fração dos volumes ósseos maduro dos lados controle e tratado, obtidos por Histomorfometria. Diferenças estatisticamente significativas usando teste ANOVA e Tukey, para comparação entre a médias com $P<0.05$ (*) e $P<0.01$ (**)

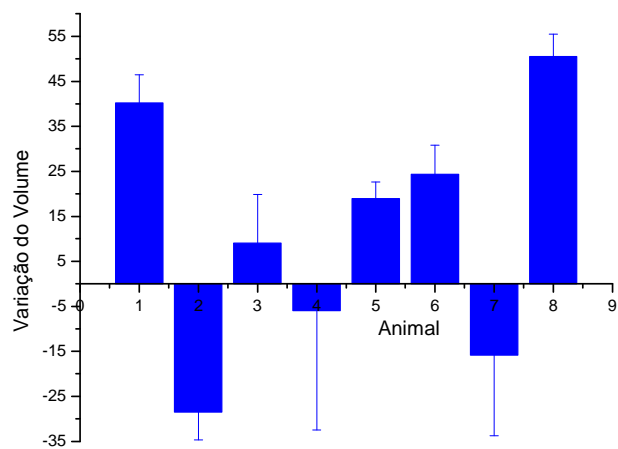


Figura 33: Diferença entre os volumes ósseos dos lados controle e tratado, obtidos por Histomorfometria, tomando o lado controle como referência

DISCUSSÃO

6- DISCUSSÃO

O tecido ósseo apresenta alta capacidade de regeneração, mas em determinadas situações tal processo deixa de realizar-se, comprometendo a sua fisiologia.

Muitos fatores locais podem influenciar a cicatrização do osso, em alguns casos esses fatores são inevitáveis. Em outros casos, métodos racionais podem ser empregados para limitar os efeitos negativos.

Dentre os fatores que influenciam negativamente na cicatrização do osso incluem osteoporose, desordens da medula óssea, tecido cicatricial, uso de radiação ionizante, denervação, tumores, infecção, doença óssea local, movimentação mecânica e cera óssea.

A osteoporose é um fator indesejável na cicatrização de fraturas, a qualidade da fixação interna é significativamente afetada pela massa óssea e é uma variável importante no resultado de fusões vertebrais. Ademais, tem sido reportado que a qualidade da medula óssea local e outros tecidos regionais em termos de concentração, prevalência e potencial biológico de células tronco osteogênicas e osteoprogenitoras pode estar reduzida em idosos. Estas mudanças relacionadas com a idade podem ou não estar diretamente relacionadas com a fisiopatologia da osteoporose, mas é provável ter um impacto negativo na biologia do sítio do enxerto nas artrodeses vertebrais. Estes efeitos podem ser parcialmente revertidos por estratégias que permitem concentração de células osteogênicas de matriz óssea de outros tecidos.

A estabilidade mecânica do sítio do enxerto é geralmente um fator que é controlado pelo cirurgião. Boas fixações internas com implantes aumentam as chances

de se alcançar uma fusão vertebral. O sítio anatômico, peso do paciente, nível de atividade do paciente e o uso de imobilização externa são todas importantes variáveis. Altas taxas de fusão vertebral têm sido vistas em pacientes com atrofia muscular vertebral e distrofia muscular podendo ser resultado de uma diminuída movimentação voluntária.

Invasão tumoral local enfraquece o osso, substitui tecido ósseo normal e pode invadir diretamente o sítio de fusão vertebral. Este problema pode ser parcialmente resolvido com técnicas especiais de fixação vertebral e apropriada irradiação e quimioterapia, dependendo do tipo histológico do tumor.

Desordens da medula óssea, tais como talassemia maior podem diminuir o potencial de células osteogênicas da medula; similarmente, doença óssea local, tal como a doença de Paget ou a displasia fibrosa pode substituir a população de células osteogênicas normais por células anormais diminuindo o sucesso das fusões vertebrais.

O uso da Radiação Ionizante é um fator adverso, especialmente quando administrada peri operatóriamente. Ela pode ter um efeito diretamente citotóxico e induzir a osteonecrose e a formação de um extenso tecido cicatricial hipovascularizado.

Estimulação elétrica tem se mostrado benéfico no tratamento de não uniões, fracasso de artrodeses e pseudo-artrose congênita. Há evidências de que podem ser úteis em modelos experimentais de fusões vertebrais.

Através deste trabalho, nós pesquisamos um modelo comparativo de artrodese inter-transversa lombar em modelo animal utilizando uma membrana de látex num dos lados. As vantagens do nosso modelo são a utilização de uma membrana biológica, de baixo custo, e sem os inconvenientes dos modelos de membrana animal

que tem sido amplamente difundidos. A importância deste trabalho reside no fato primário de que obtivemos resultados semelhantes de taxas de fusão, do lado controle, em análises de palpação manual e radiográficas tal qual observadas em técnicas cirúrgicas com a mesma técnica realizada em humanos, que variam segundo alguns trabalhos em torno de 33% de taxas de não consolidação (BODEN, 1995), outros citam algo em torno de 37.5%(ERULKAR,2001). Nossas taxas de não consolidação do lado controle foram de 42,8% . Quando analisamos estes valores com o lado em que foi adicionada a membrana de látex sobre o enxerto ósseo observamos já nas primeiras análises de palpação manual e radiografias que houve uma aumento do número de animais considerados fusionados, 71.4% .

Demonstramos também o uso potencial deste modelo experimental respondendo questões biológicas referentes à fusão vertebral. Representativas secções histológicas através da massa de fusão vertebral durante o processo de fusão mostram claramente a presença de quantidades significativas de osso maduro e imaturo em formação.

Animais têm sido usados para estudar fusão vertebral desde pelo menos 1913, ainda surpreendentemente pouco é entendido a respeito da biologia da fusão vertebral comparado com o profundo entendimento sobre processos de reparação e cicatrização de fraturas (ALBEE, 1913). A cicatrização do enxerto intertransverso é diferente da cicatrização das fraturas, longos defeitos ósseos e fusão inter-vertebral anterior. Durante o processo de fusão intertransversa em humanos, enxerto ósseo de crista ilíaca é colocado sobre o leito muscular para vertebral em contato direto com osso vertebral que foi eliminado o periósteo e a cortical e este enxerto não pode ser submetido a cargas mecânicas diretas até que ocorra consolidação suficiente para conectar os dois processos transversos. O meio ambiente mecânico e biológico de

fusão entre as lâminas ou processos transversos é diferente do processo de fusão intertransverso. Assim, o primeiro requerimento para todos os modelos animais de fusão intertransversa deve ser a reprodutibilidade da técnica cirúrgica e o meio ambiente para o enxerto ósseo semelhante ao observado em humanos. O segundo requerimento deve ser a replicação dos resultados tal como observado em humanos, isto é, as taxas de não consolidação. Os benefícios de se usar estes modelos animais com coelhos da raça Nova Zelândia foi preencher estes critérios.

Modelos de cirurgia experimental em cães têm sido muito comuns . Alguns modelos têm estudado a fusão intercorporal anterior ou fusões torácicas posteriores, nenhuma das quais são análogos aos processos de fusão intertransversa em humanos . A maioria dos modelos posteriores tem estimulado fusão interlaminar, inter facetária ou entre os processos espinhosos . A conclusão negativa destes modelos caninos foi que na sua grande maioria ocorreram fusões, diferentemente dos resultados observados em humanos, não uniões foram extremamente raras, só observadas na junção lombo sacra (MUSCHLER, 2003). Estes modelos não revelam os resultados da maioria das fusões vertebrais observadas em humanos, bem como o sítio de fusão realizado na maioria das cirurgias em que se utiliza fusão intertransversa, nas patologias degenerativas lombares.

A maioria dos modelos animais (cães, carneiros, porcos) é significativamente mais custosa e não simulam o meio ambiente observado para o enxerto em humanos e não produzem resultados melhores que em modelos com pequenos animais. O coelho é um dos menores animais com uma anatomia da coluna lombar comparada os humanos e suficiente enxerto de crista ilíaca para o processo de fusão intertransversa. Fusões em animais menores, tais como os ratos, tem na sua maioria sido posteriores e não usado enxerto de crista ilíaca.

As drogas anti inflamatórias , largamente utilizadas, inibem a formação de células ósseas, reduz a resposta imune a anti inflamatória e inibe a síntese de prostaglandinas.

Existem fatores positivos que influenciam na cicatrização e formação de tecido ósseo, dentre eles, aumento da área local de tecido ósseo para receber o enxerto ósseo, fontes de células tronco, materiais osteocondutivos, estabilidade mecânica, cargas mecânicas, fatores promotores de recrutamento, ativação e proliferação de células osteoblásticas, fatores osteocondutivos e fatores promotores de angiogênese e estimulação elétrica.

Avanços já tem sido feitos dentro das estratégias e materiais de enxerto capazes de substituir o tecido ósseo retirado do sítio doador com o intuito de aumentar as taxas de fusão vertebral e diminuir a morbidade do sítio doador, entretanto, o enxerto ósseo da crista ilíaca ainda é “gold standard” nos processos de fusão.

O potencial para avanços adicionais na área de fusão vertebral e tecidos de reparação e regeneração na coluna é vasto. Avanços na biologia das células tronco (NAKAJIMA et al, 2007), biomateriais (CHOI et al, 2007; HILE et al, 2006; MAGIT et al, 2006), fatores de crescimentos purificados e manufaturados (HISAMITSU et al, 2006; NAMIKAWA et al, 2005) e outras biomoléculas e carreadores destes agentes tem se difundido ultimamente de forma rápida (KRAIWATTANAPONG et al, 2005; MINAMIDE et al, 2004).

Muitas pesquisas tem sido realizadas com a utilização de proteínas morfogenéticas (BMPs) e diferentes carreadores, como colágeno, matriz óssea, hidroxiapatita, além de avanços na área de implantes que aumentariam a estabilidade mecânica. Minamide e colaboradores (MINAMIDE et al, 2004) testaram em coelhos

diferentes carreadores para BMP: o cimento de tricálcio-fosfato (TCP), cerâmica óssea bovina (True Bone Ceramics) e o colágeno tipo I. A fusão espinhal foi analisada avaliada radiograficamente, por palpação manual, por teste biomecânico (teste tensão uniaxial) e análise histológica, nos períodos de 3 e 6 semanas após a cirurgia. Os autores determinaram que o TCP e a cerâmica óssea bovina forneceram melhores resultados em relação ao colágeno que é o carreador usado tradiocionalmente. Mais recentemente Namikawa e colaboradores (NAMIKAWA et al, 2005) testaram outros sistemas carreadores, o beta TCP associado ao gel polimérico (PLA/DX/PEG) e a rhBMP, obtendo bons resultados de fusão intervertebral. Os autores ainda relatam que, com o uso deste sistema carreador, a dose de rhBMP para produzir a fusão foi menor em comparação a outros trabalhos relatados na literatura.

Kraiwananpong e colaboradores (KRAIWATTANAPONG et al, 2005) realizaram um estudo comparativo (em coelhos) entre a combinação esponja de colágeno e hidroxiapatita (Healos bone void filler) associada à medula óssea heparinizada e rhBMP-2 liberada por esponja de colágeno (INFUSE Bone Graft), envolta em esponja cerâmica de colágeno (Matergraft Matrix: 15%HA e 85%TCP) como meio de suporte. Após 8 semanas observaram através de palpação manual, radiografia plana e tomográfica e testes histológicos com material não descalcificado que o grupo 2 (INFUSE/Matergraft Matrix) proporcionou uma sólida fusão espinhal, diferentemente do outro grupo, tratado com Healos associado com medula óssea. Neste grupo, as radiografias e imagens de TC mostraram uma neoformação óssea próxima aos processos transversos, mas em nenhum destes animais foi observada uma massa contínua de fusão.

Para avaliar a eficácia do fator de crescimento e diferenciação recombinante humano 5 (rhGDF-5), Magit e colaboradores (MAGIT et al, 2006) realizaram um

estudo comparativo usando Healos (colágeno tipo I e Hidroxiapatita, DePuy Spine) como sistema carreador deste fator (Grupo I), apenas o carreador (Grupo 2) e enxerto autógeno de crista ilíaca (Grupo 3). Após 8 semanas, através de palpação manual, o grupo 3 (osso autógeno) revelou uma taxa de fusão de 38%, enquanto que o grupo 2 (Healos apenas) uma taxa de 0% e o grupo 1(rhGDF-5+Healos), 100%, concluindo que este fator de crescimento liberado por este sistema carreador é uma alternativa potencial para enxerto ósseo.

As técnicas de engenharia tecidual com uso destas proteínas são de alto custo e, particularmente no Brasil, o uso de BMPs ainda não está autorizado pela ANVISA para uso em Ortopedia. Além disso, o osso autógeno é ainda considerado o padrão ouro para material de enxerto na fusão lombar posterolateral. Vários trabalhos buscam otimizar o uso do enxerto ósseo autógeno, na tentativa de proporcionar maiores taxas de fusão. Yee e colaboradores (YEE et al, 2003) em estudos realizados em coelhos, utilizaram uma massa de osso desmineralizado alogênico em associação a osso autógeno da crista ilíaca, na tentativa de aumentar a massa fusional e concluíram que as taxas de fusão foram maiores em relação ao uso apenas do enxerto de osso autógeno. Mais recentemente, Choi e colaboradores (CHOI et al, 2007) demonstraram em estudo experimental realizado em coelhos, que o osso desmineralizado combinado com hialuronato e gelatina formando uma tira sólida quando associado ao osso autógeno resulta em uma taxa fusional de 100%, avaliada por palpação manual, enquanto que o uso de apenas o osso autógeno, produziu uma taxa de 37.5%.

Neste contexto, utilizando o modelo animal já fundamentado de fusão lombar posterolateral em coelhos (BODEN, 1995), estudamos a influência da membrana de látex natural associado ao uso de osso autógeno neste processo de fusão. O látex é derivado da seingueira, *hevea brasilienses*, e apresenta certas vantagens relevantes a

esta aplicação como: elasticidade, flexibilidade, resistência mecânica, angiogênese, baixo custo (MAZOCCO, 2002) e, além disso, é de origem vegetal, não tendo potencial de transmissão de doenças infecciosas (PINHO, 2003).

O látex natural é um cicatrizante natural da seringueira, a partir daí, estudos vem sendo desenvolvidos para comprovar as características indutoras de neovascularização e regeneração tecidual que foram atribuídas a esse material(ZIMMERMANN, 2006).

Tanto em contato temporário com os tecidos como em contato permanente, o látex apresenta amplo uso na área da saúde. Como contato temporário com os tecidos humanos ocorre na forma de luvas, êmbolos de seringas, sondas, drenos cirúrgicos, dique de borracha para isolamento dentário, etc. E, como em contato permanente, na forma de cones para obturação de canais radiculares em endodontia. Em sua forma natural, há poucos relatos de seu uso contínuo em medicina e odontologia. Em nosso estudo, os achados em nível macroscópico e microscópico não indicaram sinais de reações alérgicas e/ou de rejeição. Apesar de ser um biomaterial não absorvível, não foi observada reação inflamatória tipo corpo estranho nos tecidos em contato com as membranas.

Neste trabalho observou-se que a membrana de látex natural foi de fácil manipulação e implantação. O processo de consolidação óssea foi estudada com 8 semanas. Os resultados deste estudo foram obtidos por análise macroscópica, radiografia, tomografia computadorizada e microscopia óptica.

A radiografia convencional foi posteriormente digitalizada por oferecer maior precisão para a realização da interpretação radiográfica da consolidação óssea dos grupos estudados, sendo considerado um exame rápido e preciso na busca e análise da

imagem. Após o período de 8 semanas, os estudos radiográficos mostraram que o grupo tratado com enxerto ósseo de crista ilíaca adicionado de membrana de látex apresentou uma maior taxa de consolidação quando comparado com o lado controle (75% x 62,5%).

Outra análise, por palpação manual, das peças cirúrgicas retiradas dos animais eutanasiados também mostraram um maior índice de consolidação do lado adicionado com membrana de látex quando comparado com o lado controle após 8 semanas (75% x 62,5%) .

A volumetria por tomografia computadorizada foi realizada apenas na região da artrodese e, considerando-se o erro de 5% do processo de media, dos 8 animais, 5(62,5%) apresentaram volume ósseo maior no lado tratado, 2(25%) apresentaram o mesmo volume ósseo e 1(12,5%) apresentou volume ósseo maior no lado controle. O resultado global da média dos volumes apresentou diferença significativa ($p < 0,1$) usando teste ANOVA para comparação entre as médias e teste Tukey.

Os resultados histológicos após 8 semanas confirmaram que a formação óssea do lado tratado foi superior em relação ao lado controle, mediu-se a fração de osso maduro dos lados controle e tratado, em duas lâminas e comparamos as médias. Os resultados demonstraram que o lado tratado apresentou maior volume de osso maduro em quatro animais com diferenças estatisticamente significativas usando-se o teste ANOVA e Tukey, o lado controle apresentou maior volume em 1 animal, com diferença estatisticamente significativa e os demais (3) não apresentaram diferenças entre os lados. Portanto, os resultados da histometria são semelhantes com os de volumetria por tomografia.

CONCLUSÃO

7 – CONCLUSÕES

O uso da biomembrana de látex natural associado ao enxerto de osso autógeno mostrou resultados superiores de tecido ósseo formado quando comparado com o lado controle, portanto, sendo considerada um material promissor para futuros estudos de modelos experimentais de artrodese póstero-lateral de coluna lombar.

REFERENCIAS

8 – REFERÊNCIAS

1. ALBEE, F.H. : Transplantation of a portion of the tibia into the spine for Pott's disease. **Jama** 57: 885-886, 1911.
2. ALLEN, B.L. Jr, FERGUNSON, R.L. : The operative treatment of myelomeningocele spinal deformity – 1979. **Orthop Clin North Am** 10: 845-862, 1979.
3. ALVES, M.C.O. **Teste da angiogênese estimulada por membrana de látex natural**. 2003. Dissertação(Mestrado), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, USP, Rib.Preto.
4. BERNARDES, M.S. **Sangria da Seringueira**. 2000, 2 ed, cap. 16, Piracicaba, Brasil.
5. BODEN, S.D. : The Marshall Urist Lecture : Clinical applications of BMPs for spine fusion. In Proceedings of the Pittsburgh Bone Symposium, Pittsburgh, 2003, pp 425-443.
6. BODEN,S.D.: An experimental Lumbar intertransverse process spinal fusion model, **Spine**, vol.20, n.4, pp412-420, 1995.
7. BOSCH, C.; MELSEN, B.; VARGERVIK,K.: Guided bone regeneration in calvarial defects using polytetrafluoroethylene membranes. **Cleft Palate Cranioface J** , Denmark, v.32, n.4, pp 33-317, jul, 1995.
8. BOSTRON, M.P.; CAMACHO, N.P. Potential role of bone morphogenetic proteins in fracture healing . **Clin Orthop Relat Res**, United States, 355 Suppl, pp 274-283, oct, 1998.
9. BRIGHTON, C.T.; LORICH D.G.; KUPCHA R. : The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell. **Clin Orthop** 275: 287-299, 1992.
10. BURWELL, R.G. : The fate of bone graft. In Apley GA(ed) : **Recent Advances in Orthopaedics** . London, Churchill Livingstone, 1969, pp 115-207.
11. CARRANZA, F.A.; NEWMAN, M.G.; TAKEI, N.N. **Periodontia Clínica**. 9 ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
12. CHOI, Y; OLDENBUR FP; SAGE, L; JOHNSTONE, B; YOO, JU. A bridging demineralized bone implant facilitates posterolateral lumbar fusion in New Zealand White rabbits. **Spine** 32(1):36-41, 2007
13. CURTIS, B.H. : Orthopaedic management of muscular dystrophy and related disorders. **Instr Course Lect** 19: 78-89, 1970.

14. DAHLIN, C., et al : Healing of bone defects by guided tissue regeneration. **Plast Reconstr Surg Unitd States**, v.81, n.5, pp 672-676, may, 1988.
15. DAHLIN, C.; ALBERIUS, P.; LINDE, A.: Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique. **J Neurosurg.**, Sweden, v.74, n.3, pp 487-491, mar, 1991.
16. DE PALMA, A.F., ROTHMAN, R.H.: The nature of pseudo arthrosis. **Clin Orthop** 1968; 59: 113-118.
17. ERENO, C. Estudo radiográfico digitalizado comparatives das membranas de poliuretano e politetrafluoroetileno em neoformação óssea. **In: 23ª Reunião anual da SBPqO** , 2006, Atibaia, Brazilian Oral Research, pp 89, 2006.
18. ERULKAR, J.S., GRAUER, J.N., PATEL, T.C., PANJABI, M.M.: Flexibility analysis of posterolateral fusion in a New Zeland white rabbit model. **Spine**, vol.26, n.10, pp 1125-1130, 2001.
19. FRADE, M.C.A.: Úlcera de perna: caracterização clínica e perfil imunohistopatológico da cicatrização na presença da biomembrana de látex natural da seringueira Hevea Brasiliensis. Tese de Doutorado FMRP-USP, 2003.
20. FRIEDENSTEIN, A.J. Precursor cells of mechanocytes . **In Rev Cytol.** , United States, v.47, pp 327-359, 1976.
21. GRIFFITH, L. : The engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. **J Bone Joint Surg Am** 16: 1541-1558, 2004.
22. GRONTHOS, S.; SIMMONS, P.J. : The growth factor requeriments of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro. **Blood** 85: 929-940, 1995.
23. HAMMERLE, C.H.; JUNG, R.E. Bone augmentation by means of barrier membranes. **Periodont.** 2000. Denmark, v.33, pp 36-53, 2003.
24. HARRY, N. H. **The Spine** - 5ª ed. Philadelphia, PA, USA : Elsevier, 2006.
25. HAYASHI, A.; MARUYAMA, Y.; OKAJIMA, Y.; MOTEGI, M.: Vascularized iliac bone graft base on a pedicle of upper lumbar vessels of anterior fusion of the thoraco-lumbar spine. **Br J Plast Surg** 47: 425-430, 1994.

26. HEIPLE, K.G.; CHASE, S.W.; HERNDON, C.H. : A comparison study of the healing process following defferent types of bone transplantation. **J Bone Joint Surg Am** 45: 1592, 1963.
27. HILE, DD; KANDZIORA, F; LEWANDROWSKI, KU; DOHERTY, SA; KOWALESKI, MP; TRANTOLO, DJ. A poly(propylene glycol-co-fumaric acid) based bone graft extender for lumbar spinal fusion: in vivo assessment in a rabbit model. **Eur Spine Journal** 15 (6): 936-943, 2006.
28. HISAMITSU, J; YAMAZAKI, M; SUZUKI, H; HASHIMOTO, M; NAKAJIMA, A; MORIYA, H. Gene expression for type-specific collagens in osteogenic protein-1 (rhBMP-7)-induced lumbar intertransverse process fusion in rabbits. **Connec Tiss Res** 47 (5): 256-263, 2006
29. HUBBARD, L.F.; HERNDON, J.H.; BUONANNO, A.R. : Free vascularized fibula transfer for stabilization of the thoracolumbar spine. A case report. **Spine** 10: 891-893, 1985.
30. JUNQUEIRA, L.C. ; CARNEIRO, J. **Histologia Básica** – 10 ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1999.
31. KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e Embriologia Oral São Paulo**: Medicina Panamericana, pp39-76, 1999.
32. KRAIWATTANAPONG, C; BODEN, SD; LOUIS-UGBO, J; ATTALLAH, E; BARNES, B; HUTTON, WC. Comparison of Healos/bone marrow to INFUSE(rhBMP-2/ACS) with a collagen-ceramic sponge bulking agent as graft substitutes for lumbar spine fusion. **Spine** 30(9): 1001-1007, 2005
33. LASCOMBLES, P.; GROSDILIER, G.; ORLY, R.; THOMAS, C.: Anatomical bases of the anterior vertebral grafts using a pediculated rib. **Surg Radiol Anat** 13: 259-263, 1991.
34. LEGERS,R.Z.: Properties of osteoconductive biomaterials calcium phosphates. **Clin Orthop Relat Res** United States, n.395, pp 81-89, fev, 2002.
35. LINDE, A. et al. Osteopromotion : a soft time exclusion principle using a membrane for bone healing and bone neogenesis. **J Periodontol.** , United States, v.64, Suppl 11, pp 116-128, nov, 1993.
36. LINDHE,J. **tratado de Periodontia clínica e Implantologia Oral**. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

37. LUNDGREN, A.; LUNDGREN, D.; TAYLOR, A.: Influence of barrier occlusiveness on guided bone augmentation. An experimental study in the rat. **Cli Oral Implants Res.**, Denmark, v.9, n.4, pp 251-260, aug, 1998.
38. MAGIT, DP; MAAK, T; TRIOANO, N; RAPHAEL, B; HAMOURIA, Q; POLZHOFFER, G; DRESPE, I; ALBERT, TJ; GRAUER, JN. Healos/recombinant human growth and differentiation factor-5 induces posterolateral lumbar fusion in a New Zealand white rabbit model. **Spine** 31 (19): 2180-2188, 2006.
39. MANN, F.A.; PAYNE, J.T.: **Bone healing. Seminars in Vet. Med. Sug** United States, v.4, n.4, pp 312-321, nov, 1989.
40. MAZOCCO, F. Látex extraído da seringueira é utilizado com sucesso na Medicina. **Tecnologia, Brasil**, pp 58-61, abr/jun, 2002.
41. MELCHER, A.H.; DREYER, C.J. Protection of blood clot in healing circumscribed bone defects. **J Bone Joint Surg.** , v.44, n.2, pp 424-430, 1962.
42. MINAMIDE, A; KAWAKAMI, M; HASHIZUME, H; SAKATA, R; YOSHIDA, M; TAMAKI, T. 2004. Experimental study of carriers of bone morphogenetic protein used for spinal fusion. **J Orth Sci** 9 (2): 142-151, 2004.
43. MURRAY, G.; HOLDEN, R.; ROSELLAN, W. Experimental and clinical study of new growth of bone in a cavity. **Am J Surg.**, United States, v.93, n.3, pp 385-387, 1957.
44. MUSCHLER, G.F.; NAKAMOTO, C. : Practical Modeling concepts for connective tissue stem cell and progenitor compartment-kinetics. **J Biomed Biotech** 2003: 170-193, 2003.
45. MUSCHLER, G.F.; NAKAMOTO, C., GRIFFITH, L.: The engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. **J Bone Joint Surg Am** 86: 1541-1558, 2004.
46. NAKAJIMA, T; IIZUKA, H; TSUTSUMI, S; KAYAKABE, M; TAKAGISHI, K. Evaluation of posterolateral spinal fusion using mesenchymal stem cell. **Spine** 32:2432-2436, 2007.
47. NAMIKAWA, T; TERA, H; SUZUKI, E; HOSHINO, M; TOYODA, H; NAKAMURA, H; MIYAMOTO, S; TAKAHASHI, N; NINOMIYA, T; TAKAOKA, K. 2005. Experimental spinal fusion with recombinant human bone morphogenetic protein-2 delivered by a synthetic polymer and beta-tricalcium phosphate in a rabbit model. **Spine** 30 (15): 1717-1722.

48. NILSSON, O.S.; BAUER, H.C. : Influence of indomethacin on induced heterotopic bone formation in rats: Importance of length of treatment and of age. **Clin Orthop** 207: 239-245, 1986.
49. NYMAN, S.: Bone regeneration using the principle of guided tissue regeneration. **J Clin Periodontol.**, Sweden, v.18, n.6, pp 494-498 , jul, 1991.
50. PAULO,N.M.; SILVA, M.A.; CONCEIÇÃO,M.: Biomembrana de Látex Natural(Hevea Brasiliensis) com polilisina a 0,1% para herniorrafia perianal em um cão. *Acta Scientiae Veterinarie*, vol.33, pp 78-82, 2005.
51. PINHO, E.C.C.M. et al. Uso experimental da biomembrana de látex na reconstrução conjuntival. **Arq. Bras. Oftalmol., Brasil**, v.67, pp 27-32, 2003.
52. PROLO, D.J. : Contemporary bone graft physiology and surgery. **Clin Orthop** 200: 322-342, 1985.
53. RABELO, R.E. et al. Emprego do compósito de látex, poliamida e polilisina a 0,1% na correção cirúrgica de hérnias umbelicais recidivantes em bovinos leiteiros. **Acta Scientia Veterinarie**, v.33, pp 169-175, 2005.
54. RIEW, K.D.; RHEE, J : Time-dependent inhibitory effects of indomethacin on spinal fusion. **J Bone Joint Surg Am** 85: 632-634, 2003.
55. SCHNEK,R.K. **Bone Regeneration Biologis Basis In:** Buser, D.; DAHLIN,C.;SCHENK, R.K. Guided bone regeneration in implant density. Chicago: Quintenerice, pp 49-100, 1994.
56. SIMMONS, D.J. : Fracture healing perspectives. **Clin Orthop** 200: 100-113, 1985.
57. SOLGAARD, T.; KLEPPE H : The knee-elbow position in lumbar disc surgery : A review of complications. **Spine** 8 : 900, 1983.
58. STEINMANN, J.C.; HERKOWITZ, H.N.: Pseudoarthrosis of the spine. **Clin Orthop** 1992; 284: 80-90.
59. STEVENS,A.; LOWE,J.S. **Histologis Humana 2 ed.** São Paulo: Manole, 2001.
60. SUCATO, D.J.; WELCH, R.D.; PIERCE, B. : Thoracoscopic discectomy and fusion in an animal model: Safe and effective when segmental blood vessels are spared. **Spine** 27: 880-886, 2002.
61. URIST M.R. : Bone and bone transplants. In Urist MR(ed) : **Fundamental and clinical Physiology of bone**. Philadelphia, WB Saunders, 1980, pp 131.

62. VILLANUEVA J.E.; NIMNI ME : Promotion of calvarial cell osteogenesis by endothelial cells. **J Bone Miner Res** 5: 733-739, 1990.
63. WEILAND, A.J.; PHILLIPS, T.W.; RANDOLPH, M.A.: Bone grafts: A radiologic, histologic and biomechanical model comparing autografts, allografts and free vascularized bone grafts. **Plast Reconstr Surg** 74: 368-379, 1984.
64. WEILAND, A.J.; MOORE, J.R.; DANIEL, R.K. : Vascularized bone autografts: Experience with 41 cases. **Clin Orthop** 174: 87-95, 1983.
65. WILSON, P.D.; LANCE, E.M. : Surgical reconstruction of the skeleton following segmental resection for bone tumors. **J Bone Joint Surg Am** 47: 1629-1656, 1965.
66. WLODARSKI, K.H.: Properties and origin of osteoblasts. **Clin Orthop Relat Res.** , United States, n.252, pp 276-293, mar, 1990.
67. YEE, AJM; BAE, HW; FRIESS, D; ROBBIN, M; JOHNSTONE, B; YOO, JU. 2003. Augmentation of rabbit posterolateral spondylodesis using a novel demineralized bone matrix-hyaluronan putty. **Spine** 28 (21): 2435-2440, 2003.
68. ZIMMERMANN, M. et al. Teste de Biocompatibilidade e resistência de membranas de látex em cães. **Ciência Rural**, Brasil, 2006.
69. ZVAIFLER, N.I. : Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. **Arthritis Res** 2: 477-488, 2000.



PRPPG
Pró-reitoria
de Pesquisa e
Pós-graduação

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Protocolo n.º 155/07

Título do Projeto: "O uso de membrana de Látex natural como cobertura e auxílio da fusão intervertebral lombar"

Pesquisador (a) Responsável: Prof.ª Dr.ª Angela Mitie Otta Kinoshita

Comitê de Ética:

O CEP analisou, baseado em parecer competente, o presente projeto e o considerou aprovado.

Data: 13 de dezembro de 2007

Assinatura do Presidente:

Prof. Dr. Marcos da Cunha Lopes Virmond