



## Células tronco esqueléticas para o tratamento da não união de fraturas

### Skeletal stem cells for the treatment of nonunion fractures in dogs

Helia Zamprogno

Doutoranda, Programa de Ciências Morfológicas (PCM), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), RJ/Brasil.  
Email: nanehcd@hotmail.com

#### ABSTRACT

The stem cell therapy have been very effective to treat several pathologic conditions, including osteogenic stimulation for the non union fractures treatment in dogs. There are many unknown mechanisms and protocols such as ideal cellular concentration, allowed mobility between fractured fragments and cell differentiation *in vivo*. The objective of this study was radiographic and clinical evaluation of non union fractured patients, after the percutaneous injection of bone marrow skeletal stem cells.

**Key words:** stem cell, dog, non union, fracture.

#### INTRODUÇÃO

A natureza estromal das células tronco esqueléticas pode ser caracterizada pela rápida aderência dessas células após o plaqueamento de medula óssea em baixa densidade celular. Essas células aderentes, chamadas de CFU-F (colony forming unit – fibroblasts) se proliferam e estabelecem colônias. Após a expansão *ex vivo*, elas teriam a capacidade de gerar osso e cavidade medular quando transplantadas para um sistema *in vivo* aberto e cartilagem, osso, tecido fibroso e gordura quando transplantadas para um sistema *in vivo* fechado [1,3,5]. As propriedades destas células são: clonogenicidade – habilidade de perceber a baixa densidade celular ativando assim a capacidade de duplicação celular; multipotencialidade – estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que as células tronco esqueléticas tem um variável, porém limitado, potencial de diferenciação, dependendo do estímulo recebido; e auto-renovação – é o resultado de divisão celular assimétrica, ou seja, dará origem à uma célula filha que se expandirá clonogenicamente, ou se diferenciará e outra célula filha que não se expandirá ou se diferenciará. Essa propriedade não foi ainda demonstrada *in vivo*. O potencial das células tronco esqueléticas como ferramentas de engenharia tecidual já é uma realidade, entretanto, o uso dessas células para entender processos patológicos é ainda exclusivo para poucos [2].

Mais recentemente, pesquisas têm ressaltado a importância da concentração de células da medula óssea para a eficácia da terapia. Hernigou *et al.* [4] em 2005 tratou 60 pacientes que apresentavam não união óssea na diáfise da tíbia, com concentrado de medula óssea autóloga, onde 300 ml de medula foram reduzidas a um volume de 50 ml através de centrifugação e separação celular permanecendo apenas a fração mononuclear da medula óssea. Esse concentrado foi injetado percutaneamente no tecido fibroso interfragmentar, no foco de não união. O número de progenitores também foi avaliado neste estudo, através do ensaio de CFU-Fs (colony forming units). Foi observada reversão da não união e consolidação óssea em 53 casos, onde foi injetado um número > 1500 progenitores/cm<sup>3</sup> e em torno de 54 CFU-Fs. Entretanto, nos sete pacientes que não apresentaram boa resposta à terapia celular, a injeção foi de apenas 634 progenitores/cm<sup>3</sup> e 19 CFU-Fs, quantidade considerada pelos autores insuficiente para promover a reversão da patologia em questão.

#### MATERIAIS E MÉTODOS

Seis animais, de raça e idade variadas apresentando não união de fratura em diversos ossos, foram tratados com células esqueléticas provenientes da medula óssea. As regiões do trocanter maior do fêmur e do tubérculo maior do úmero, contralaterais à lesão óssea preexistente, foram preparadas para um procedimento cirúrgico asséptico. Com os animais sob anestesia geral, uma incisão de pele foi feita sobre o trocanter maior do fêmur ou sobre o tubérculo maior do úmero de cada paciente. Uma agulha Jamshidi de punção de medula óssea, gauge 13, de cinco centímetros de comprimento foi inserida através da córtex do osso até se instalar na região metafisária. Uma seringa, contendo 0.5 ml de heparina, acoplada na agulha, permitiu o aspirado da medula óssea. As seringas foram acondicionadas em um isopor com gelo e imediatamente encaminhadas para o laboratório.

No laboratório, as células foram manipuladas dentro de um fluxo laminar, para garantir a esterilidade do processo. A expansão celular aconteceu a partir do plaqueamento de  $3 - 6 \times 10^7$  células/75cm<sup>2</sup> e  $6 - 9 \times 10^7$  células/150cm<sup>2</sup> em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 2UI penicilina-estreptomicina. Após a confluência da cultura, em aproximadamente duas semanas, a tripsinização e ressuspensão das células em DMEM não suplementado foram feitas, com subsequente quantificação celular através do método de exclusão de azul de tripan em câmara de Neubauer. As células serão novamente centrifugadas, o sobrenadante descartado e o pellet ressuspensionado em DMEM não suplementado, no volume de injeção correspondente ao defeito ósseo apresentado por cada paciente.

Com os animais sob anestesia geral, o membro acometido pela lesão de não união óssea foi preparado para procedimento asséptico. Após o posicionamento de panos de campo para isolar a área do procedimento de injeção das células estromais da medula óssea, uma agulha hipodérmica 18 x 24 foi inserida entre os fragmentos da fratura. A confirmação do perfeito posicionamento da agulha foi obtida através de exame radiográfico simples ou fluoroscopia. O conteúdo do tubo foi transferido para uma seringa de 10 ml e injetado na fibrose contida entre os fragmentos da fratura, em diversos ângulos para tentar preencher todo o perímetro do defeito ósseo. A avaliação radiográfica ocorreu a cada 30 dias.

## RESULTADOS

Todos os animais apresentaram consolidação da fratura em questão em até três meses após a injeção das células. Nenhuma reação inflamatória em tecidos adjacentes ou periosteal foi observada no período pós injeção. A expansão celular *in vitro* propiciou o aumento do número de células em até duas ordens de grandeza ( $10^2$ ).

## DISCUSSÃO

Concordando com Hernigou *et al.* [4], a concentração das células é importante para a efetividade da terapia, pois neste estudo um paciente que recebeu na ordem de 105 células não apresentou consolidação. A repetição da terapia celular com a injeção de 107 células, neste mesmo paciente, promoveu união óssea. Outro ponto interessante observado neste estudo foi a importância da estabilização eficiente dos fragmentos fraturados, pois em fraturas estabilizadas somente com imobilização externa, a terapia celular não foi tão satisfatória, exigindo até posterior fixação e repetição do tratamento.

Diferentemente das técnicas de estimulação osteogênica empregadas até o momento, para o tratamento de não união de fraturas, a terapia celular não é uma técnica traumática, invasiva ou trabalhosa, pois através da via percutânea e sem a remoção da fibrose existente entre os fragmentos, esta técnica apresenta resultados satisfatórios.

## CONCLUSÃO

A terapia com células tronco esqueléticas, provenientes da medula óssea, se mostrou muito efetiva para a estimulação osteogênica de não união de fraturas, através de um método não invasivo, promovendo a união óssea em pacientes que apresentavam um ano ou mais de fratura, e diversas cirurgias anteriores fracassadas.

## REFERÊNCIAS

- 1 Ashton B.A., Allen T.D., Howlett C.R., Eaglesom C.C., Hattori A. & Owen M. 1980. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clinic Orthopaedics*. 151: 294-307.
- 2 Bianco P., Kuznetsov S.A., Reginucci M. & Robey P.G. 2006. Postnatal skeletal stem cells. *Methods of Enzymology*. 419: 117-148.
- 3 Friedenstein A.J., Chailakhjan R.K. & Lalykina K.S. 1970. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinetics*. 3: 393-403.
- 4 Hernigou P.H., Poignard A., Beaujean F. & Rouard H. 2005. Percutaneous autologous bone marrow grafting for nonunions – Influence of number and concentration of progenitor cells. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 87: 1430-1437.
- 5 Krebsbach P.H., Kuznetsov S.A., Satomura K., Emmons R.V., Rowe, D.W. & Robey P.G. 1997. Bone formation *in vivo*: Comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts. *Transplantation*. 63: 1059-1069.