



INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD
Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

**A fresagem do canal medular promove a enxertia de progenitores mesenquimais no foco
fraturário e modula a resposta inflamatória local**

LEONARDO ROSA DA ROCHA

Rio de Janeiro

2016



INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD
Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

**A fresagem do canal medular promove a enxertia de progenitores mesenquimais no foco
fraturário e modula a resposta inflamatória local**

LEONARDO ROSA DA ROCHA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador (es): Prof^ª. Dr^ª. Danielle Cabral Bonfim
Prof. Dr. João Antônio Matheus Guimarães

Rio de Janeiro

2016



INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD
Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

**A fresagem do canal medular promove a enxertia de progenitores mesenquimais no foco
fraturário e modula a resposta inflamatória local**

LEONARDO ROSA DA ROCHA

Orientador (es): Prof.^a Dr.^a Danielle Cabral Bonfim
Prof. Dr. João Antônio Matheus Guimarães

Banca examinadora

Prof. Dra. Verônica Fernandes Vianna (INTO)

Prof. Dr. Hélio dos Santos Dutra (UFRJ)

Prof. Dr. Hélio Jorge Alvachian Fernandes (UNIFESP)

Rio de Janeiro

2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE
INTO/BIBLIOTECA SÉRGIO EDUARDO VIANNA

- R672a Rocha, Leonardo Rosa da.
A fresagem do canal medular promove a enxertia de progenitores mesenquimais no foco fraturário e modula a resposta inflamatória local / Leonardo Rosa da Rocha. — 2016.
78f.
- Orientadores: Danielle Cabral Bonfim e João Antônio Matheus Guimarães.
Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético) — Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad, Rio de Janeiro, 2016.
1. Fresagem. 2. Hematoma fraturário. 3. Fratura de fêmur. 4. Consolidação de fraturas. 5. Osteogênese. 6. Haste intramedular. 7. Ossos longos. 8. Ortopedia. I. Bonfim, Danielle Cabral; Guimarães, João Antonio Matheus, orient. II. Título.

NLM WE 185

Aos amores da minha vida, Paola, Mari e Bê.

AGRADECIMENTOS

À minha esposa, Paola, pelo amor, pela amizade, pelo companheirismo, pelo ensinamento, pelo incentivo, por me manter focado e por sempre estar ao meu lado. Obrigado por tudo.

Aos meus filhos, Mariana e Bernardo, pelo amor, pelo carinho de sempre e por permitirem que subtraísse momentos do nosso convívio.

Aos meus pais, Tereza e Licínio, pelo amor, pelo exemplo, por me mostrar o caminho da retidão. Foram incansáveis na minha formação.

Aos meus irmãos, Luciana e Leandro, pelo amor e pela eterna amizade.

À Maria Cristina e Jose Gonzalez, pelo amor e pela presença.

À professora doutora Danielle Bonfim, minha orientadora, responsável pela condução da peça mais importante desta pesquisa, que foram as análises biológicas, com quem aprendi muito e quem me encorajou a buscar um alto padrão no trabalho, que sem a sua mão não teria alcançado.

Ao professor doutor João Antônio Matheus Guimarães, meu orientador, quem tenho profunda gratidão, muito importante na minha carreira, um exímio cirurgião, que sempre foi um exemplo.

À professora doutora Maria Eugênia Leite Duarte, quem possuo uma extrema admiração e carinho, que me acolheu de forma impar e muito me ensinou durante todo esse convívio.

Ao professor doutor José Inácio Salles, pela oportunidade, pela atenção.

À Rafaela Sartore, Ana Leal, Rhayra Dias e a todos os pesquisadores do CTCEL do INTO, que me auxiliaram e muito me ensinaram na execução de todo o estudo.

Aos pacientes, que concordaram em participar e auxiliaram na realização deste trabalho.

Aos profissionais que fazem parte do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, por todo auxílio.

À Deus, que ilumina meus passos.

“Porque em verdade vos afirmo que, se alguém disser a este monte: Ergue-te e lança-te no mar, e não duvidar no seu coração, mas crer que se fará o que diz, assim será com ele” (Marcos 11:23; Mateus 17:20; 21:21; 1 Coríntios 13:2)

RESUMO

ROCHA, Leonardo Rosa da. A fresagem do canal medular promove a enxertia de progenitores mesenquimais no foco fraturário e modula a resposta inflamatória local. Rio de Janeiro, 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético) - Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad, Ministério da Saúde, 2016.

As fraturas da diáfise do fêmur ocorrem geralmente em adultos jovens em decorrência de traumas de alta energia e podem evoluir com não união ou de retarde de consolidação. Embora seja consenso que as novas abordagens terapêuticas voltadas para a regeneração óssea deva simular a biologia da consolidação das fraturas, ainda não estão claramente definidas quais etapas desse processo devem ser priorizadas. Atualmente o tratamento de escolha para a estabilização de fraturas da diáfise do fêmur são as hastes intramedulares bloqueadas, que resultam em maiores índices de consolidação precocemente. Os benefícios do tratamento são atribuídos parcialmente ao procedimento de fresagem, que apesar de violar o hematoma, estimula o reparo ósseo. Para entender como a fresagem influencia esse processo, o presente estudo teve como objetivo avaliar nos hematomas fraturários antes e depois da fresagem a viabilidade celular e a frequência de células CD45⁺/CD31⁻/CD146⁺, onde estão contidas as células osteoprogenitoras e multipotentes. Adicionalmente foi realizado mapeamento da concentração de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento no foco de fratura antes e depois do procedimento de fresagem. As amostras dos hematomas pré e pós fresagem foram obtidas por aspiração percutânea do foco de fratura de quinze pacientes com fratura fechada da diáfise femoral. A viabilidade celular e o percentual de células CD45⁺/CD31⁻/CD146⁺ foram analisadas por citometria de fluxo. A concentração de citocinas e fatores de crescimento foram determinadas por ELISA e a viabilidade celular pela marcação com Anexina V/PI. A fresagem resultou em redução da viabilidade celular no foco de fratura. Por outro lado, o produto da fresagem continha mais células CD45⁺/CD31⁻/CD146⁺, correlacionadas com maior frequência de células com capacidade de formação de colônias. A análise da concentração de citocinas e fatores de crescimento nos sobrenadantes revelou que, após a fresagem, houve redução da concentração dos mediadores inflamatórios IL-6, CCL-4 e MCP-1 e aumento da concentração da citocina IL-1 β e dos fatores de crescimento bFGF e PDGF-AB. Os resultados do presente estudo confirmam que os efeitos positivos da fresagem sobre a consolidação resultariam da enxertia mecânica no foco de fratura de uma população de progenitores esqueléticos contendo células multipotentes; a mudança na sinalização local para um estado menos inflamatório; aumento da disponibilidade local de fatores osteogênicos e angiogênicos específicos. O melhor conhecimento dos estímulos necessários para proporcionar o reparo ósseo ideal, considerando as alterações determinadas pela invasividade dos tratamentos ortopédicos, será fundamental para o desenvolvimento de tratamentos inovadores voltados para potencializar a regeneração óssea.

Palavras chave: Fresagem; Hematoma fraturário; Fratura de fêmur; Consolidação de fraturas; Osteogênese; Haste intramedular; Ossos longos.

ABSTRACT

ROCHA, Leonardo Rosa da. Intramedullary reaming grafts the fracture site with skeletal progenitors and downmodulates the local inflammatory environment. Rio de Janeiro, 2016. Dissertation (Master's Degree in Science Applied to the Musculoskeletal System) – National Institute of Traumatology and Orthopedics, Ministry of Health, 2016.

Femoral shaft fractures generally occur in young adults following a high-energy trauma and can evolve to delayed union/non-union. Although it is agreed that novel therapies to stimulate bone regeneration will have to mimic the biology of fracture healing, which are those aspects are still unclear. Currently, locked intramedullary nailing is the treatment of choice for the stabilization of femur shaft fractures, and it is associated to accelerated healing and increased union rates. These benefits were partially attributed to the reaming procedure, which regardless of significantly destroying the hematoma, stimulates the healing response. To better understand how reaming influence healing, we evaluated the viability of the nucleated cell fraction and the frequency of CD45⁺/CD31⁺/CD146⁺ skeletal progenitors - which contain multipotent cells - in reaming debris. We also screened the concentration of inflammatory mediators and growth factors in the fracture site after reaming, in comparison with the original hematoma. Hematoma and reaming debris were percutaneously aspirated from the fracture site of fifteen patients sustaining closed femoral shaft fractures. Cellular viability and the percentage of CD45⁺/CD31⁺/CD146⁺ progenitors were analyzed by flow cytometry. The concentration of cytokines and growth factors were determined by ELISA. The percentage of viable cells was inferior in reaming debris in comparison to the hematoma. However, reaming debris had an increased percentage of CD45⁺/CD31⁺/CD146⁺ cells, which correlated to an increased frequency of cells with colony-forming ability. Analysis of cytokines and growth factors in supernatants showed a decreased concentration of the inflammatory mediators IL-6, CCL-4, and MCP-1, along with an increase of IL-1 β , and the growth factors bFGF and PDGF-AB after reaming. These findings support the view that the positive effects of reaming on fracture healing might result from mechanically grafting the fracture site with a population of skeletal progenitors that contain multipotent cells; transitioning the signaling environment to a less inflammatory state; and enhancing the local availability of specific osteogenic and angiogenic factors. A better understanding of the requisite stimuli for optimal bone repair, considering the disturbances made by orthopedic treatments, will be determinant for the development of innovative treatments to enhance bone repair.

Keywords: Reaming; Hematoma fracture; Femur fracture; Fracture healing; Osteogenesis; Intramedullary nailing; Long bones.

SUMÁRIO

Resumo	VII
Abstract	VIII
1 Introdução	15
1.1 Fratura do fêmur	15
1.1.1 Diagnóstico e classificação	16
1.1.2 Tratamento	18
1.2 Fresagem intramedular	20
1.3 Estágios e processos da consolidação óssea	22
1.3.1 Formação do hematoma	23
1.3.2 Tecido de granulação	23
1.3.3 Angiogênese	24
1.3.4 Remodelação	26
1.4 Papel de fatores de sinalização na consolidação óssea	27
1.5 Células progenitoras estromais da medula óssea	28
1.6 Justificativa	31
2 Objetivos	32
2.1 Objetivo geral	32
2.2 Objetivos específicos	32
3 Pacientes e métodos	33
3.1 Seleção dos pacientes	33
3.2 Aspectos éticos	35
3.3 Procedimento cirúrgico e coleta de amostras	35
3.4 Acompanhamento clínico	37
3.5 Processamento das amostras	37
3.6 Ensaio de eficiência de formação de colônias (CFE)	38
3.7 Citometria de fluxo	38
3.8 Ensaio de ELISA	38
3.9 Análise estatística	39
4 Resultados	41

4.1 Características dos pacientes	41
4.2 Viabilidade celular	41
4.3 Frequência de progenitores estromais	42
4.4 Análise de fatores de sinalização	45
5 Discussão	49
6 Conclusões	58
7 Referências bibliográficas	59
8 Apêndices e/ou anexos	69

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

α	Alfa
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
cm	Centímetro
cm^2	Centímetro quadrado
G	Gauge
<i>g</i>	Gravidade
g	Grama
mg	Miligrama
μg	Micrograma
μm	Micrômetro
mm	Milímetro
mmHg	Milímetros de mercúrio
mL	Mililitro
%	Porcentagem
pg	Picograma
v/v	Volume/volume
AP	Anteroposterior
AO	<i>Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen</i> (Grupo de estudo de assuntos relacionados à osteossíntese de fraturas)
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i> (Proteína morfogenética do osso)
BMSC	<i>Bone marrow stromal cell</i> (Célula estromal da medula óssea)
bFGF	<i>Basic Fibroblastic Growth Factor</i> (Fator de crescimento básico de fibroblasto)
CCL	<i>Chemokine ligand</i> (Ligante de citocina)
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (grupo de diferenciação)
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CFE	<i>Colony forming efficiency</i> (eficiência de formação de colônias)
CFU-F	<i>Colony Forming Unit – Fibroblast</i> (Unidade formadora de colônia fibroblásticoide)
CO_2	Dióxido de carbono
CXCL	<i>Chemokine ligand</i> (Ligante de citocina)

CXCR	<i>C-X chemokine receptor</i> (Receptor de citocina do tipo C-X)
DP	Desvio padrão
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (Meio Essencial Modificado por Dulbecco)
EPC	<i>Endothelial Progenitor Cell</i> (célula progenitora endotelial)
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i> (Fator de crescimento fibroblástico)
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> (Isotiocianato de fluoresceína)
HIF-1	<i>Hypoxia Inducible Factor</i> (Fator indutor de hipóxia)
HIM	Haste intramedular
IFN- γ	<i>Interferon gamma</i> (Interferon gama)
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i> (Fator de crescimento semelhante à insulina)
IL	Interleucina
iNOS	<i>inducible Nitric Oxide Synthase</i> (Óxido nítrico sintase induzível)
INTO	Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad
MCP	<i>Monocyte chemoattractant protein</i> (Proteína quimiotática de monócitos)
Linf	Linfócito
M-CSF	<i>Macrophage-colony stimulating factor</i> (Fator estimulador de colônias de macrófagos)
MSC	<i>Mesenchymal Stromal Cell</i> (Célula mesenquimal estromal)
OTA	<i>Orthopaedic Trauma Association</i> (Sociedade de Trauma Ortopédico)
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> (Solução salina tamponada)
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> (Fator de crescimento derivado de plaquetas)
PE	<i>Phycoerythrin</i> (Ficoeritrina)
PI	<i>Propidium iodide</i> (Iodeto de propídio)
PMN	Neutrófilo polimorfonuclear
SFB	Soro fetal bovino
SDF	<i>Stromal-cell Derived Factor</i> (Fator derivado de estroma)
TC	Tomografia Computadorizada
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i> (Fator de crescimento transformante-beta)
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i> (Fator de necrose tumoral-alfa)
VEGF	<i>Vascular-endothelial growth factor</i> (Fator de crescimento vascular endotelial)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Classificação AO para as fraturas dos ossos longos	18
Figura 1.2 - Esquema ilustrativo da consolidação óssea	27
Figura 3.1 - Imagens intraoperatórias do procedimento de coleta das amostras	36
Figura 4.1 - Análise de viabilidade celular na fração mononuclear total	42
Figura 4.2 - Análise da população celular CD45 ⁻ /CD31 ⁻ /CD146 ⁺ no microambiente da fratura..	43
Figura 4.3 - Ensaio de eficiência de formação de colônias fibroblastóides (CFE)	44
Figura 4.4 - Quantificação de fatores de sinalização envolvidos na modulação da resposta inflamatória local	47
Figura 4.5 - Quantificação de fatores de sinalização envolvidos com a regulação local da atividade das células progenitoras	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características demográficas dos pacientes.....	34
Tabela 2 - Percentual da subpopulação CD45 ⁺ /CD31 ⁺ /CD146 ⁺ no microambiente da fratura.....	44
Tabela 3 - Concentração de citocinas e de fatores de crescimento no microambiente da fratura antes e depois do procedimento de fresagem.....	46

1. Introdução

1.1. Fratura do fêmur

A diversidade, complexidade e dificuldade no tratamento das fraturas diafisárias do fêmur fazem dessa lesão um dos assuntos mais desafiantes da traumatologia. A restauração do comprimento, da rotação e do alinhamento axial do fêmur são essenciais para o reestabelecimento da função do membro. A correta avaliação inicial e o tratamento das fraturas da diáfise do fêmur melhoram na medida em que compreendemos o impacto do tratamento, sua morbidade e mortalidade e a biomecânica dos materiais utilizados para osteossíntese que, em conjunto, contribuem para o aumento das taxas de sucesso (FERNANDES *et al.*, 2002).

As fraturas da diáfise do fêmur ocorrem principalmente em homens jovens, em decorrência de traumas de alta energia como as colisões de trânsito (AGARWAL-HARDING *et al.*, 2015) sendo frequentes as fraturas expostas e a associação com lesões em outros órgãos (MEISINGER *et al.*, 2002). Em um estudo retrospectivo realizado na Alemanha, de um total de 22.500 acidentes de trânsito, foram documentadas 447 fraturas da diáfise do fêmur. Destas, um terço se associou a lesões do tórax, crânio, pelve e membro ipsilateral (GÖSLING *et al.*, 2012).

O segundo grupo de maior incidência de fraturas do fêmur é formado por mulheres idosas, com lesões secundárias a traumas de baixa energia. A maioria das fraturas é fechada e não tem associação com outras lesões. Além disso, as pacientes são portadoras de fragilidade óssea em decorrência de osteoporose (SASAKI *et al.*, 2012).

Em comparação com outras fraturas de ossos longos, as fraturas da diáfise femoral estão associadas a um maior risco de complicações pós-traumáticas pelo fato da quantidade significativa de energia necessária para causar a fratura. Como consequência, observa-se além da lesão óssea danos extensos às partes moles e considerável perda sanguínea (GÖSLING *et al.*, 2012).

1.1.1. Diagnóstico e classificação

O diagnóstico da fratura diafisária do fêmur é feito segundo aspectos clínicos e radiográficos. O paciente apresenta queixa de dor moderada a intensa, impotência funcional e deformidade angular e/ou rotacional do membro acometido. A avaliação radiográfica é feita nas incidências anteroposterior (AP) e perfil de todo o fêmur, incluindo o quadril e o joelho para determinar o padrão da fratura, a eventual perda óssea, o grau de cominuição, a presença de ar nos tecidos moles e o encurtamento do membro (O'TOOLE *et al.*, 2013). A tomografia computadorizada (TC) também pode ser realizada, para evidenciar lesões associadas no joelho e no quadril (TORNETTA *et al.*, 2007).

As fraturas da diáfise do fêmur são estratificadas de acordo com a localização anatômica em proximal, medial ou distal; pela morfologia, em transversa, oblíqua ou espiral; pelo grau de complexidade, em com ou sem cominuição (WINQUIST e HANSEN, 1980). A classificação AO (*Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen*) foi introduzida por Maurice Edmond Müller e colaboradores (1987) para documentação e avaliação da eficiência do tratamento. Esta classificação é constituída por um sistema de codificação alfanumérico, que facilita a padronização, a comunicação entre os profissionais, auxilia na tomada de decisões e no planejamento cirúrgico (MÜLLER *et al.*, 1987). O primeiro número da classificação corresponde

ao osso afetado, sendo o fêmur designado pelo número três. O segundo número corresponde à localização da fratura, que para o segmento diafisário de ossos longos corresponde ao número dois. Assim, toda a fratura diafisária de fêmur será identificada por trinta e dois. O terceiro item da classificação é designado por uma letra, representando o grau de energia envolvido no trauma, sendo progressivo de A a C. O quarto item descritivo é um número que varia de um a três, representando a morfologia do traço. Fraturas do tipo A tem o traço fraturário simples (espiral, oblíquo ou transversal), fraturas do tipo B apresentam cunha (espiral, em flexão ou segmentar e/ou fragmentada), fraturas do tipo C são consideradas com padrões complexos, já que não apresentam contato cortical entre os principais fragmentos proximal e distal (RÜEDI *et al.*, 2007) (Figura 1.1). No Brasil, a classificação AO é adotada por 84% dos cirurgiões ortopédicos (PIRES *et al.*, 2006).

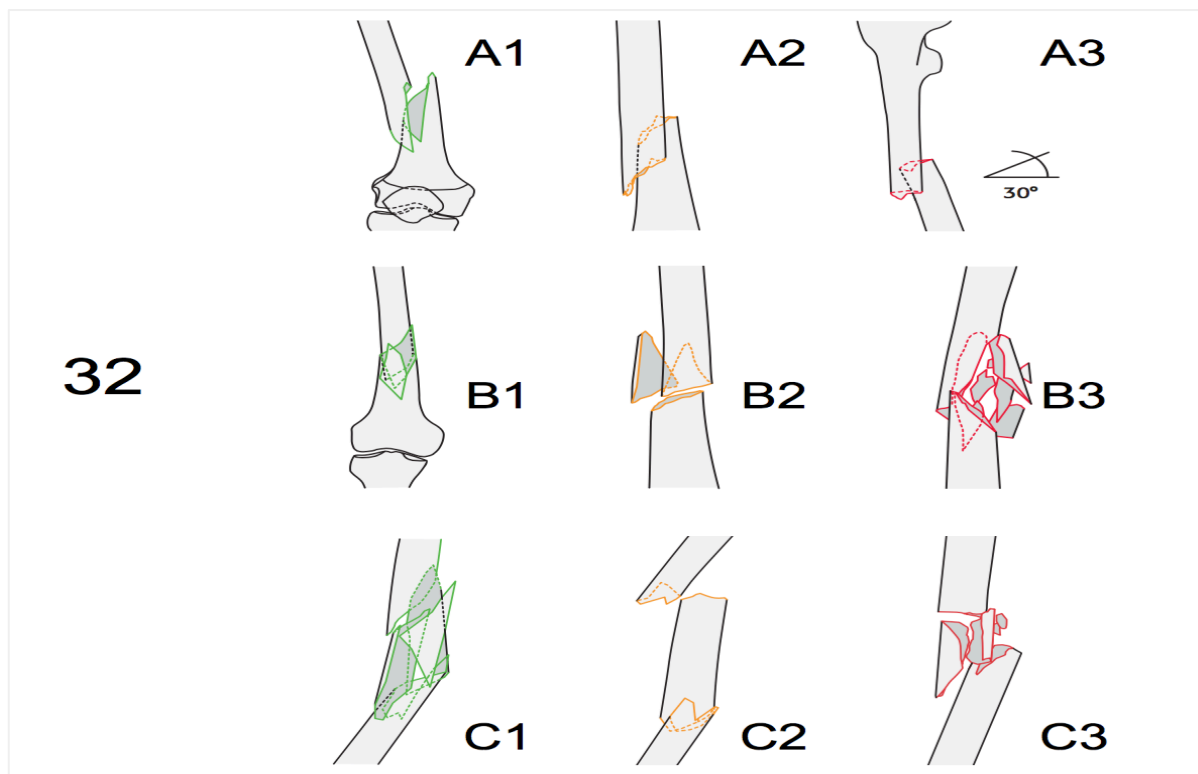


Figura 1.1 - Classificação AO para as fraturas dos ossos longos (MÜLLER *et al.*, 1987).

1.1.2. Tratamento

O objetivo do tratamento da fratura da diáfise femoral é restaurar a anatomia óssea, reestabelecer a função do membro e reabilitar o paciente para retornar às atividades diárias. Na avaliação preliminar devem ser considerados diversos parâmetros como a configuração do traço de fratura, lesões de partes moles, integridade das estruturas neurovasculares, idade, condições clínicas do paciente, comorbidades, funcionalidade do membro e do paciente (WEISS *et al.*, 2009).

O tratamento conservador com imobilização com gesso, tração, órtese ou combinações destes métodos tem indicações limitadas e cursa com taxa de falha é de 67% (WEBB *et al.*, 1988).

A estabilização cirúrgica oferece inúmeras vantagens em comparação aos métodos conservadores, principalmente no que diz respeito à mobilização precoce do membro afetado (CHARASH *et al.*, 1994). Os métodos de tratamento cirúrgico disponíveis são os fixadores externos uni ou multiplanares, as placas de compressão ou em ponte e as hastes intramedulares bloqueadas fresadas ou não fresadas (PIRES *et al.*, 2006).

Os fixadores externos tem indicações limitadas como método de tratamento definitivo, uma vez que é frequente a ocorrência de infecção no trajeto dos pinos (22%) e o encurtamento do membro (7%) (MOHR *et al.*, 1995; ZLOWODZKI *et al.*, 2007). Além disso, a taxa de restrição de movimento do joelho pode alcançar 20% (MOHR *et al.*, 1995). No entanto, seu uso para fixação temporária é uma ferramenta valiosa em circunstâncias emergenciais, como em politraumatizados e em fraturas expostas, já que sua aplicação é rápida e gera pouca agressão às partes moles (ZLOWODZKI *et al.*, 2007).

A osteossíntese com placas de compressão, introduzida por Robert Danis em 1949, permite a mobilização ativa do membro e a consolidação primária por estabilização rígida. Dentre as vantagens destaca-se a capacidade de redução anatômica da fratura. As principais desvantagens são a necessidade de uma extensa abordagem cirúrgica, infecção, lesões nas partes moles e diminuição da vascularização óssea. Por isso, seu uso vem sendo substituído pelas hastes intramedulares (ZLOWODZKI *et al.*, 2007).

A fixação intramedular representa um dos maiores avanços no tratamento das fraturas dos ossos longos, por minimizar a agressão aos tecidos moles circunjacentes. Seu conceito e princípios foram introduzidos durante a Segunda Guerra Mundial, por Gerhard Küntscher. Inicialmente, as hastes não eram bloqueadas, apresentavam estabilidade adequada contra forças de

flexão, porém não eram capazes de estabilizar a fratura contra forças torcionais e axiais (KÜNTSCHER, 2014). Dessa forma, a ampla aceitação da proposta de Küntscher ocorreu somente no início dos anos 80, com a publicação do artigo de Winkist e colaboradores (1984). Esta segunda geração de hastes foi marcada pela introdução dos parafusos de bloqueio, que resultou em ganho biomecânico e melhores resultados clínicos (KEMPF *et al.*, 1985). Desde então foram feitas modificações no desenho, no material, na técnica de colocação e nas opções de bloqueio das hastes (RICCI *et al.*, 2005).

Atualmente, o tratamento de escolha para fraturas diafisárias de ossos longos consiste na associação das hastes intramedulares (HIM) com o procedimento de fresagem do canal medular. Estudos clínicos demonstraram que, além de permitir uma maior estabilidade de fixação, pela possibilidade de usar um implante de maior diâmetro (BONG *et al.*, 2007), esta técnica reduz o tempo de consolidação e apresenta uma maior taxa de sucesso, mesmo em pacientes com falhas de consolidação (KEMPF *et al.*, 1986; WEBB *et al.*, 1986; HIERHOLZER *et al.*, 2014; WESTHAUSER *et al.*, 2015).

1.2. Fresagem intramedular

Na proposta original de Küntscher constava que para o sucesso da técnica de fixação intramedular, seria essencial a combinação perfeita entre o diâmetro da haste e do canal medular, conceito que em razão da variação fisiológica no diâmetro do canal medular entre os indivíduos, culminou posteriormente no desenvolvimento das técnicas de fresagem (RUDLOFF *et al.*, 2009).

Com a introdução do procedimento de fresagem, passou a ser possível realizar o alargamento padronizado do canal medular, aumentando a superfície de contato entre a haste e o

osso cortical, tornando-a mais eficiente contra forças de torção e desvios no plano axial e possibilitando a utilização de implantes mais calibrosos, que agregam maior rigidez à montagem (FAIRBANK *et al.*, 1995). No entanto, ainda existem controvérsias em relação aos efeitos adversos sistêmicos e locais da fresagem e como eles atuam sobre os eventos biológicos da consolidação óssea (FROLKE *et al.*, 2004).

Os principais eventos adversos associados a fresagem são a mudança no padrão do suprimento sanguíneo do osso compacto, o aumento da pressão intramedular, a necrose óssea por geração excessiva de calor e os eventos tromboembólicos (MOUSAVI *et al.*, 2002).

Em condições fisiológicas a circulação cortical é centrífuga e, após a fresagem, se torna centrípeta (REICHERT *et al.*, 1995) resultando na redução em até 83% da perfusão cortical (HUPEL *et al.*, 1998), que somente é restabelecida aos níveis pré-operatórios onze a doze semanas após a cirurgia (McCARTHY *et al.*, 2006). A pressão no interior do canal medular, que em geral oscila em torno de 65 mmHg (PAPE *et al.*, 2007), pode aumentar entre duas a treze vezes durante as etapas iniciais da fresagem (GIANNOUDIS *et al.*, 2002), quando o conteúdo intramedular ainda é elevado (SMITH *et al.*, 2008). Outro evento adverso da fresagem é a geração excessiva de calor pelo aumento da pressão entre a ponta da fresa e o osso e pela alta velocidade de rotação. Já foi descrito que a temperatura constante em torno de 47°C reduz a formação de osso cortical; a 56°C resulta em desnaturação da fração óssea da fosfatase alcalina e a 70°C está associada à necrose óssea maciça (MATTHEWS *et al.*, 1972). Em contrapartida, os efeitos favoráveis da fresagem estão relacionados com o aumento da perfusão e da oxigenação das partes moles adjacentes e à enxertia de progenitores mesenquimais e maior concentração de moléculas

sinalizadoras, presentes no produto da fresagem e que são deslocadas para o foco de fratura (HOEGEL *et al.*, 2004; WENISCH *et al.*, 2005).

À medida que as fresas são introduzidas no canal intramedular, uma quantidade significativa de osso trabecular e endosteal, contendo medula óssea hematopoética, é fragmentada e translocada na extensão do osso. Cerca de 24% deste material é retido no foco de fratura, funcionando como um auto-enxerto e contribuindo diretamente para o reparo da fratura (FROLKE *et al.*, 2000). Em modelos animais, foram detectados no produto da fresagem níveis aumentados de diversos fatores de crescimento, tais como PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), FGF (fator de crescimento fibroblástico), IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina), TGF- β (fator de crescimento transformante β) e BMP-2 (proteína morfogenética do osso) (SCHMIDMAIER *et al.*, 2006). Também foi observado elevação dos níveis séricos das interleucinas (IL) 6 e 10 (IL-6 e IL-10) (SMITH *et al.*, 2000). Todos esses fatores atuam no processo de consolidação da fratura, promovendo a angiogênese e estimulando a osteogênese (GIANNOUDIS *et al.*, 2009).

1.3. Estágios e processos da consolidação óssea

A consolidação óssea é um processo fisiológico complexo e orquestrado, que recapitula os eventos do desenvolvimento embrionário esquelético para promover a neoformação óssea na região da fratura (FERGUSON *et al.*, 1999; KOMATSU e WARDEN, 2010). Dessa forma, ao contrário do reparo por cicatrização, que ocorre na maioria dos outros tecidos, o osso tem a capacidade inata de regenerar, recuperando integralmente as suas propriedades biomecânicas e funcionais (DIMITRIOU *et al.*, 2005; HENLE *et al.*, 2005; KOLAR *et al.*, 2010).

1.3.1. Formação do hematoma

A sequência de eventos que caracteriza o processo de consolidação das fraturas se inicia imediatamente após a lesão tecidual, com a geração de uma reação inflamatória local, mediada por citocinas liberadas por leucócitos do sangue periférico e da medula óssea (EINHORN *et al.*, 1995; KOLAR *et al.*, 2010).

Com a fratura, a arquitetura óssea e das partes moles circunjacentes é destruída. O rompimento dos vasos sanguíneos locais leva à formação de um hematoma e à ativação da cascata da coagulação (CARANO e FILVAROFF, 2003). O hematoma fraturário preenche o espaço entre os fragmentos ósseos e, por esta razão, tem ligação direta com a medula óssea, com o osso cortical, o periósteo, o endósteo e os músculos. Sua composição é semelhante ao sangue contendo células que se originam do sangue periférico e da medula óssea, particularmente células inflamatórias (linfócitos, polimorfonucleares, monócitos) e fibroblastos que participam da formação do tecido de granulação (MARSELL e EINHORN, 2011). As células inflamatórias iniciam a secreção de fatores de sinalização, como IL-1, IL-6, TNF- α (fator de necrose tumoral alfa), M-CSF (fator estimulador de colônias macrofágico) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (EINHORN *et al.*, 1995), que contribuem para a formação de um microambiente complexo que exerce ações individualmente sobre cada população celular. Estes mediadores regulam a migração e a proliferação celular, a osteogênese, a síntese de colágeno e a angiogênese (KOLAR *et al.*, 2010).

1.3.2. Tecido de granulação

Após a remoção por fagocitose dos fragmentos ósseos necróticos do foco de fratura, o

hematoma é gradualmente substituído pelo tecido de granulação, constituído por tecido conectivo rico em capilares sanguíneos (ZUSCIK *et al.*, 2008; COLNOT *et al.*, 2012). As partes moles próximas ao foco de fratura constituem uma importante fonte de suprimento vascular (RHINELANDER *et al.*, 1974; LAROCHE *et al.*, 2002) para fornecimento de oxigênio e nutrientes (BRIGHTON *et al.*, 1992; DIAZ-FLORES *et al.*, 1992).

O tecido de granulação é altamente dependente da presença e da atividade dos fibroblastos e a sua formação orienta o crescimento vascular e o recrutamento de progenitores estromais (MARSELL e EINHORN, 2011). Neste ambiente, as células inflamatórias liberam citocinas, tais como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-11 e IL-18, que além de induzir a diferenciação osteogênica, promovem angiogênese (EINHORN *et al.*, 1998; GERSTENFELD *et al.*, 2003). Posteriormente, o tecido de granulação amadurece e se transforma em um calo mole, conferindo alguma estabilidade mecânica ao foco da lesão. O tecido fibroso originado do tecido de granulação se desenvolve em fibrocartilagem e, em seguida, em cartilagem hialina (EINHORN *et al.*, 1998).

1.3.3. Angiogênese

A revascularização é uma etapa crítica no processo de consolidação por assegurar o fornecimento adequado de nutrientes, a remoção de restos metabólicos residuais e por permitir o afluxo de células do sistema imune e de células progenitoras a partir da circulação sistêmica para o foco de fratura (LAROCHE *et al.*, 2002). Os progenitores estromais e pericitos presentes no local da fratura são fundamentais para o desenvolvimento de angiogênese no local da lesão (KUMAR *et al.*, 2010; MILLS *et al.*, 2013). Apesar de historicamente as pesquisas sobre a angiogênese estarem focadas nas células vasculares, está cada vez mais evidente que as células imunes tem um papel central neste processo. Os macrófagos, em particular, foram identificados

como agentes reguladores centrais da angiogênese inflamatória e da remodelação vascular. Tanto os macrófagos residentes como macrófagos originados de monócitos circulantes contribuem para a neovascularização local no foco de fratura (HEIL *et al.*, 2002). Esta ação é mediada por fatores de crescimento como VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) (MCLAREN *et al.*, 1996), IGF-1 (ROM *et al.*, 1988), PDGF (ROSS *et al.*, 1990), TGF- α/β (RAPPOLEE *et al.*, 1988), e bFGF (fator de crescimento fibroblástico básico) (JOSEPH-SILVERSTEIN *et al.*, 1988), e citocinas como TNF- α (LEIBOVICH *et al.*, 1987), IL-8 (KOCH *et al.*, 1992) e IL-1 β (FERRARI *et al.*, 1997).

Com a interrupção da vascularização após a lesão, cessa a principal fonte de produção energética aeróbica. Como a neoformação tecidual depende do fornecimento de oxigênio, nutrientes e de moléculas sinalizadoras, a restituição da vascularização local é a única forma de garantir a sobrevivência celular, particularmente dos osteoprogenitores. Por esta razão, o restabelecimento da vascularização é uma das etapas primordiais do processo de consolidação das fraturas (DOHLE *et al.*, 2014; KURODA *et al.*, 2014).

O processo de revascularização no local da lesão é modulado por dois mecanismos: (i) angiogênese, através do brotamento e crescimento vascular a partir de vasos sanguíneos pré-existentes no periósteo e (ii) através de vasos sanguíneos neoformados a partir de células progenitoras endoteliais (EPCs). A constatação de que existe mobilização de EPCs em traumas envolvendo o sistema musculoesquelético (LAING *et al.*, 2007), fraturas (MATSUMOTO *et al.*, 2008) e durante a consolidação óssea (MA *et al.*, 2012) confirma a importância da neovascularização no processo de consolidação óssea. Clinicamente são observados índices quatro vezes mais altos de pseudoartrose quando a função vascular está comprometida (LU *et al.*, 2007).

Em modelos animais de fraturas com comprometimento da vascularização, a formação óssea é prejudicada devido a supressão da proliferação osteoblástica (LU *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2010).

1.3.4. Remodelação

Dependendo do grau de estabilidade da fratura, a consolidação ocorre por ossificação intramembranosa (direta) ou pela combinação de ossificação intramembranosa e endocondral (indireta) (GERSTENFELD *et al.*, 2006). A consolidação direta ou primária ocorre quando é obtida redução anatômica juntamente com estabilidade mecânica considerada absoluta da fratura (GIANNOUDIS *et al.*, 2007; MARSELL e EINHORN, 2011). A continuidade do osso é restabelecida através da regeneração do sistema harvesiano e do osso lamelar, por conseguinte, sem necessidade de remodelação para restituição anatômica e funcional do osso (EINHORN *et al.*, 2005; MARSELL e EINHORN, 2011). Na consolidação secundária ou indireta, que ocorre na maioria das situações clínicas, é formado um calo fibrocartilaginoso que é substituído gradativamente pelo calo ósseo (GIANNOUDIS *et al.*, 2007; KOLAR *et al.*, 2010).

A formação óssea inicialmente é representada pela deposição de osso imaturo caracterizado por fibras colágenas grosseiras dispostas de forma desorganizada, que é lentamente substituído por osso lamelar através do processo de remodelação (EINHORN *et al.*, 1998; PHILLIPS *et al.*, 2005). Durante a remodelação, que pode durar de vários meses a anos após a fratura, o calo ósseo, estimulado pela ação do estresse mecânico, é gradativamente remodelado, resultando na restituição do contorno anatômico original do osso (MARSELL e EINHORN, 2011; CLAES *et al.*, 2012). As etapas e os processos que caracterizam a consolidação óssea em condições fisiológicas estão representados na Figura 1.2.

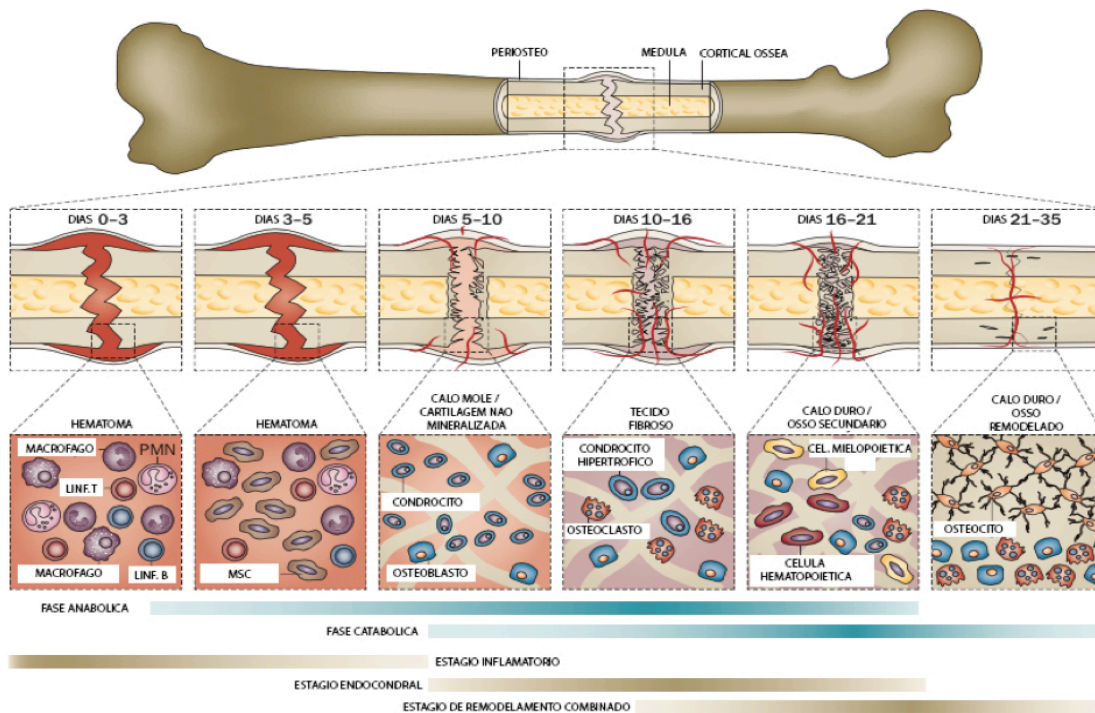


Figura 1.2 - Esquema ilustrativo da consolidação óssea. Etapas do processo de consolidação secundária com os eventos celulares que caracterizam as fases anabólica e catabólica, o estágio inflamatório, o estágio endocondral e o remodelamento. A escala temporal equivale à de uma fratura fechada de fêmur de rato fixada com haste intramedular (modificado de EINHORN e GERSTENFELD, 2015). PMN = leucócito polimorfonuclear; Linf T = linfócito T; Linf B = linfócito B; MSC = célula mesenquimal estromal.

1.4. Papel de fatores de sinalização na consolidação óssea

A resposta imune inicial durante a regeneração óssea é altamente regulada, tem curta duração e é essencial para dar início ao processo de consolidação (MOUNTZIARIS e MIKOS, 2008; TAKAYANAGI *et al.*, 2009; KOLAR *et al.*, 2010; SCHMIDT-BLEEK *et al.*, 2014). Para que haja regeneração tecidual, a lesão óssea deve ser seguida por uma fase inflamatória quando ocorre liberação de fatores pró-inflamatórios, tais como a IL-1, IL-6, TNF- α , M-CSF e iNOS (EINHORN *et al.*, 1995).

Nas primeiras horas após a fratura e mais tardiamente durante a fase de remodelação, ocorrem dois picos de liberação de TNF- α (KON *et al.*, 2001). Animais nocautes para o receptor de TNF- α são incapazes de promover ossificação intramembranosa, o que confere ao TNF- α um

papel central na consolidação de fraturas (GERSTENFELD *et al.*, 2001). O TNF- α também participa do recrutamento local de osteoprogenitores a partir dos tecidos circunjacentes próximos a fratura (GLASS *et al.*, 2011). As citocinas IL-4 e IL-13 também influenciam positivamente a migração de células osteoblásticas (LIND *et al.*, 1995). Ao contrário, a IL-10 e o IFN- γ (interferon gama) inibem a osteoblastogênese e a diferenciação osteoblástica (CORNISH *et al.*, 2003; LORENZO *et al.*, 2008).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e SDF-1 (fator derivado do estroma da medula óssea) são os principais mediadores químicos envolvidos com a mobilização e com a migração direcionada de progenitores endoteliais para o foco de fratura (ASAHARA *et al.*, 1999; KAWAKAMI *et al.*, 2015). VEGF é expresso no osso, encontra-se elevado em indivíduos politraumatizados (GRAD *et al.*, 1998) e, em sinergia com o SDF-1, contribui para o recrutamento de EPCs para o local da fratura. Além disso, o VEGF é expresso por condrócitos hipertróficos, desempenhando papel crucial na ossificação endocondral (GERBER *et al.*, 1999). Aparentemente o VEGF não apenas estimula a angiogênese durante a consolidação da fratura, mas também teria um efeito direto sobre a migração e diferenciação osteoblástica e sobre a remodelação óssea (MAYR-WOHLFART *et al.*, 2002; STREET *et al.*, 2002; ORLANDINI *et al.*, 2006).

1.5. Células progenitoras estromais da medula óssea

A medula óssea pós-natal compreende o compartimento hematopoético e o compartimento estromal, contendo células hematopoéticas e células estromais não hematopoéticas. O tecido estromal, constituído por uma ampla rede de células, funciona como suporte físico e funcional para as células hematopoéticas (BLACK *et al.*, 2015).

Os experimentos clássicos de Fridenstein e colaboradores foram fundamentais para demonstrar que células estromais da medula óssea, quando cultivadas em densidade clonal, permitiam identificar células denominadas de Unidades Formadoras de Colônias Fibroblastóides (CFU-Fs), capazes de estabelecer expansões clonais independentemente da densidade de plaqueamento (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1966; 1970). Os mesmos autores também demonstraram que a porção estromal da medula óssea e a fração clonogênica derivada dele, quando transplantadas *in vivo*, originavam tecido ósseo. A partir da observação da formação de diversos tecidos como osso, cartilagem e gordura nos transplantes heterotópicos de populações celulares originadas de uma única célula estromal, os autores concluíram que os fenótipos osteogênico, condrogênico e adipogênico eram parte de um sistema de diferenciação em diversas linhagens celulares a partir de um progenitor comum - as *Bone Marrow Stromal Cells* ou BMSC, presentes na medula óssea pós-natal (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1974a; 1974b; 1982; OWEN e FRIEDENSTEIN *et al.*, 1988).

In vitro, as BMSC se caracterizam pela expressão dos antígenos de superfície celular CD29, CD44, CD49a, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166 e CD271, que são utilizados por estratégia de imuno seleção positiva, para seleção da fração de células mononucleares da medula óssea (DOMINICI *et al.*, 2006). As BMSC têm propriedades imunomoduladoras que incluem a supressão de TNF- α e a regulação positiva de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 (NAUTA e FIBBE, 2007). As BMSC também atuam negativamente sobre a diferenciação de macrófagos (NAUTA e FIBBE, 2007), estimulam a formação de células T (MACCARIO *et al.*, 2005) e modulam a ação inibidora do fator de crescimento anti-inflamatório TGF- β sobre as células T citotóxicas (CHEN *et al.*, 2006).

Na medula óssea, as BMSC residem em posição perivascular nos sinusóides da medula óssea (BIANCO *et al.*, 2013; BIANCO e ROBEY, 2015; SACCHETTI *et al.*, 2016). Após transplante *in vivo*, as BMSC são capazes de gerar um ossículo heterotópico contendo células estromais com fenótipo e propriedades das células transplantadas, além de promover o restabelecimento da hematopoiese a partir do animal recipiente (SACCHETTI *et al.*, 2007). Recentemente foi demonstrado que o potencial para formar osso e reestruturar a medula óssea *in vivo* é restrito aos progenitores mesenquimais isolados da medula óssea e não é reproduzido por células estromais isoladas de outros sítios como cordão umbilical, gordura ou pele (SACCHETTI *et al.*, 2016).

Dentro de outra visão, alguns autores acreditam que as BMSC são produtos do meio ambiente, e que é possível desenvolver este ambiente *in vitro* (PITTENGER *et al.*, 2013). De acordo com este ponto de vista, as BMSC podem adotar dois fenótipos: (i) um fenótipo "constitutivo" como células perivasculares que expressam os marcadores de superfície celular característico tanto *in vivo* como *ex vivo* e mostram funcionalidade através da multipotencialidade para diferenciação *ex vivo*; (ii) um fenótipo "regulador", ativado em situações de dano tecidual ou vascular, quando haveria liberação dos pericitos que, ativados pela injúria local, se transformam em MSCs que induzem e sustentam localmente o processo de regeneração tecidual (CAPLAN e CORREA, 2011).

O recrutamento de BMSC é uma etapa crítica na regeneração óssea, já tendo sido demonstrada a associação entre a redução na população de BMSC e falhas de consolidação resultando em pseudoartrose atrófica (MATHIEU *et al.*, 2013). O potencial de migração das BMSC é estimulado por SDF-1 tanto *in vitro* como *in vivo* (ABBOTT *et al.*, 2004; JI *et al.*, 2004;

WYNN *et al.*, 2004). Em locais de lesão, a isquemia tecidual induz a expressão do fator indutor de hipóxia-1 (HIF-1), que por sua vez desencadeia expressão de SDF-1 (CERADINI *et al.*, 2004). Em camundongos, durante a consolidação de fraturas, a expressão de SDF-1 está aumentada (KITAORI *et al.*, 2009). A inibição de SDF-1 ou o bloqueio do seu receptor, CXCR4 (receptor de citocina tipo 4), impede o recrutamento das BMSC, reduzindo o processo de consolidação óssea (KITAORI *et al.*, 2009). Também já foi demonstrado que a administração de antagonistas de CXCR4 reduz o volume de cartilagem formada nos estágios iniciais da consolidação óssea, bem como do volume do calo e do osso mineralizado nas fases tardias da consolidação (TOUPADAKIS *et al.*, 2013).

1.6. Justificativa

Os benefícios mecânicos produzidos pelo alargamento do canal medular para inserção da haste intramedular para o tratamento de fraturas de ossos longos foi, por décadas, a principal justificativa para a realização do procedimento cirúrgico. Porém, as alterações provocadas no microambiente da fratura, em decorrência da alteração do hematoma induzida pela fresagem, ainda não são totalmente compreendidas. Se considerarmos que potencialmente qualquer alteração no processo endógeno de regeneração óssea pode ocasionar falhas na consolidação, é fundamental conhecer os efeitos positivos e negativos da técnica de fresagem sobre a biologia da consolidação óssea. Além disso, o conhecimento dos mecanismos celulares e moleculares determinantes do sucesso da consolidação pode possibilitar a detecção precoce de falhas na consolidação e estimular a utilização de protocolos alternativos visando garantir a formação óssea, evitando cirurgias adicionais, reduzindo o tempo de reabilitação e os custos com os tratamentos.

2. Objetivo

2.1. Geral

Avaliar os efeitos da fresagem do canal medular da diáfise do fêmur sobre o microambiente da fratura.

2.2. Específicos

- Avaliar por citometria de fluxo a sobrevivência celular no microambiente da fratura após a fresagem, através do percentual de células nucleadas viáveis;
- Determinar por citometria de fluxo a frequência de progenitores estromais no microambiente do foco de fratura após a fresagem, através do percentual de células CD45⁻/CD31⁻/CD146⁺;
- Avaliar através de ensaio de eficiência de formação de colônias o potencial clonogênico dos progenitores estromais no foco de fratura após a fresagem;
- Avaliar por ELISA a ação da fresagem sobre a liberação local de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento no foco de fratura.

3. Pacientes e Métodos

3.1. Seleção dos pacientes

Foram incluídos no presente estudo, quinze pacientes adultos de ambos os gêneros, portadores de fratura fechada da diáfise do fêmur, com indicação de osteossíntese com haste intramedular bloqueada fresada. Todos os pacientes foram selecionados no Centro de Atenção Especializada do Trauma Ortopédico do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad (INTO), onde foram realizados os procedimentos cirúrgicos e o acompanhamento clínico. Para a classificação das fraturas da diáfise femoral foi utilizada a proposta AO/OTA (MELING *et al.*, 2012).

Não foram incluídos no estudo pacientes com foco de fratura violado, fraturas expostas e/ou infectadas, tempo de ocorrência da fratura superior a 72 horas, politraumatizados, portadores de neoplasias malignas, diabetes, insuficiência renal, doenças reumatológicas, autoimunes, endócrinas, hepáticas, displasia de medula óssea, indivíduos em uso prolongado de glicocorticóides e/ou imunossupressores, tabagistas e dependentes químicos. Os dados demográficos dos pacientes foram obtidos nos prontuários dos pacientes e em formulário padronizado (Anexo I), estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Características demográficas dos pacientes.

Paciente	Gênero	Idade	Causa da lesão	Classificação AO/OTA
1	M	29	Acidente automobilístico	3.2.A.2
2	M	21	Acidente de Motocicleta	3.2.A.3
3	F	37	Acidente de Motocicleta	3.2.A.3
4	M	22	Acidente automobilístico	3.2.B.1
5	F	63	Queda de altura	3.2.A.1
6	M	58	Queda de altura	3.2.A.1
7	M	35	Acidente de Motocicleta	3.2.B.2
8	F	28	Acidente de Motocicleta	3.2.B.1
9	F	45	Queda de altura	3.2.A.2
10	M	19	Acidente de Motocicleta	3.2.B.2
11	M	20	Acidente de Motocicleta	3.2.B.1
12	M	37	Acidente automobilístico	3.2.A.3
13	F	18	Atropelamento	3.2.B.2
14	M	22	Acidente de Motocicleta	3.2.A.1
15	F	25	Atropelamento	3.2.B.2

Os pacientes foram ordenados pela data de atendimento. M: Masculino; F: Feminino;
AO: Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen; OTA: Orthopaedic Trauma Association.

3.2. Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do INTO, registrado sob o nº 57945916.7.0000.5273 (Anexo II). Antes da cirurgia os pacientes foram esclarecidos sobre os procedimentos e objetivos do estudo e concordaram em participar ao assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo III), de acordo com as normas da resolução nº 466 de 12/12/2012 do Conselho Nacional de Saúde.

3.3. Procedimento cirúrgico e coleta de amostras

Todas as coletas foram realizadas durante o procedimento de rotina para a fixação da fratura da diáfise do fêmur com haste intramedular bloqueada fresada. Os pacientes foram tratados no ambiente do centro cirúrgico, com todos os cuidados e atenção para a assepsia e antisepsia. Sob efeito de anestesia geral os pacientes foram posicionados em decúbito dorsal, com os membros inferiores estabilizados pelo dispositivo de tração da mesa ortopédica. Com o auxílio de radioscopia com o intensificador de imagens, localizou-se o foco fraturário onde foi realizada pequena incisão cutânea (1 cm). Através desse orifício foi aspirado 3 mL do hematoma fraturário com agulha calibre 16G acoplada em seringa de 20 mL contendo 0,1 mL de heparina, 5.000UI/mL (HEPAMAX-S, Blau Farmacêutica S.A., Rio de Janeiro, Brasil) (Figura 3.1 A e B).

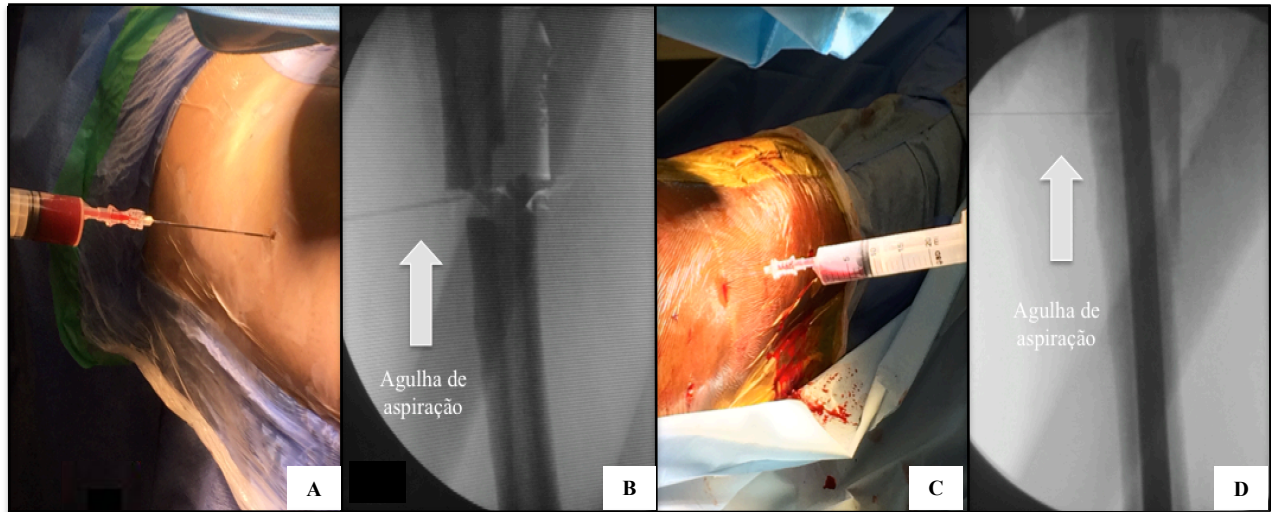


Figura 3.1 – Imagens intraoperatórias do procedimento de coleta das amostras. (A) Coleta da amostra pré-fresagem. (B) Imagem radioscópica evidenciando a agulha posicionada no foco de fratura. (C) Coleta da amostra pós-fresagem. (D) Imagem radioscópica com a haste já inserida no canal medular e a agulha posicionada no foco de fratura. Arquivo pessoal.

A osteossíntese da fratura foi feita pela via anterógrada, através de uma incisão proximal na face lateral do quadril e introdução do fio guia intramedular na extremidade proximal do fêmur. Para a fresagem foram utilizadas fresas intramedulares canuladas (Zimmer Biomet, Warsaw, IN, EUA) com diâmetro inicial de 8 mm, que foi sendo aumentado gradualmente até ser atingido o diâmetro mínimo de 12 mm e máximo de 14 mm. Na síntese de todas as fraturas foram utilizadas hastes intramedulares bloqueadas canuladas e em titânio (Zimmer Biomet, Warsaw, IN, EUA) com um diâmetro de 1 mm a menos do que o diâmetro da última fresa que foi utilizada. O bloqueio na região proximal da haste foi realizado com dois parafusos de travamento, com auxílio do guia externo acoplado à sua extremidade. Na porção inferior distal ao foco de fratura, o travamento também foi realizado com dois parafusos, pela técnica à mão livre auxiliado por radioscopia.

Ao final do procedimento cirúrgico, através do mesmo orifício utilizado para coleta do hematoma fraturário foi realizada coleta de 3 mL do material extravasado no foco de fratura,

resultante do processo da fresagem (Figura 3.1 C e D). Ambas as amostras foram acondicionadas a 4°C e encaminhadas imediatamente para o Centro de Tecnologia Celular do INTO.

3.4. Acompanhamento clínico

A analgesia pré e pós operatória foi realizada com dipirona (Dipirona monoidratada, Farmace, Brasil), 2g de 4 em 4 horas por via endovenosa, associada a opióide (Oxicodona®, Mundipharma, São Paulo, Brasil), 10 mg duas vezes ao dia, por via oral durante três dias. A profilaxia antibiótica foi feita com cefazolina (Cefazolina sódica, Aurobindo, Brasil), 1 g, de 8 em 8 horas, por via endovenosa durante 24 horas.

O acompanhamento dos pacientes foi feito através de exame clínico na 4^a, 8^a, 12^a, 16^a, 20^a, 24^a e 30^a semanas após a cirurgia e controle radiográfico. A consolidação da fratura foi definida por ausência de dor local, capacidade de andar sem apoio e transferir carga para o membro operado e pela visualização nas incidências radiográficas em perfil e anteroposterior do fêmur de pelo menos três pontes conectando os fragmentos ósseos (CORRALES *et al.*, 2008).

3.5. Processamento das amostras

As amostras dos hematomas pré e pós-cirúrgico foram diluídas na proporção de 1:10 (v/v) em solução salina tamponada (*phosphate buffer saline*, PBS), filtradas em malha com poros de 70µm para remoção de espículas ósseas e centrifugadas a 300 g durante 10 minutos a 4°C. Em seguida os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80°C. As células foram então ressuspensas em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium low-glucose, Gibco, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB, Gibco, Grand Island, NY, EUA) e 10 µg/mL de ciprofloxacina (Fresenius Kabi, Barueri, SP, Brasil). O número total de células

nucleadas foi determinado em câmara de Neubauer em microscópio óptico invertido (Nikon TS100) após diluição em solução de Turk (2% ácido acético).

3.6. Ensaio de eficiência de formação de colônias (CFE)

As células nucleadas obtidas dos hematomas pré e pós-cirúrgico foram plaqueadas na densidade de 2×10^5 células viáveis/cm² em frascos de cultura de 25cm² em 5 mL de DMEM suplementado com 10% de SFB e 10 µg/mL de ciprofloxacina (Fresenius Kabi, Barueri, SP, Brasil), durante 3 dias, em incubadora de CO₂ a 5% e a 37°C. Após este período, as células hematopoéticas não aderentes foram removidas mediante lavagem em PBS, com troca do meio de cultivo. As culturas foram mantidas durante mais onze dias quando, então, as colônias foram fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS e coradas com solução aquosa saturada de cristal violeta (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Após secagem à temperatura ambiente, foi realizada a contagem manual das colônias e a medição dos seus diâmetros (expresso em milímetros). O número de células de cada colônia foi contado em microscópio óptico invertido (Nikon, TS 100) e na quantificação final foram incluídas apenas as colônias com mais de 50 células.

3.7. Citometria de fluxo

Uma amostra das células dos hematomas pré e pós-cirúrgico foi destinada à análise por citometria de fluxo. Cerca de 1.0×10^6 células nucleadas/mL foram incubadas em solução BD FACS Lysing Solution (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) durante 10 minutos à temperatura ambiente para promover a lise de hemácias. Após lavagem com PBS, as células nucleadas foram incubadas com os anticorpos anti-CD45 conjugado a PerCP Cy5.5 (clone D3/9,

Immunostep, Salamanca, Espanha), anti-CD31 conjugado a Alexa Fluor[®] 488 (Clone WM59, Biolegend, San Diego, CA, EUA), e anti-CD146 conjugado a Ficoeritrina (PE) (Clone SHM-57, Biolegend, San Diego, CA, EUA) durante 30 minutos, à temperatura ambiente e protegidas da luz. Para avaliação da viabilidade celular, as células foram incubadas com anexina V conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Biolegend, San Diego, CA, EUA) e iodeto de propídio (PI) (Biolegend, San Diego, CA, EUA) durante 15 minutos à temperatura ambiente. A aquisição dos eventos foi feita utilizando citômetro de fluxo BD Accuri (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) e os dados foram analisados com o Software Accuri CSampler (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA).

3.8. Ensaio de ELISA

As concentrações de IL-1 β , IL-8, IL-6, IL-10, TNF- α , TGF- β , CCL-4, CXCL-9, MCP-1, PDGF-AB, VEGF, BMP-2, BMP-4 (Boster Immunoleader, Fremont, CA, EUA), bFGF (Biolegend, San Diego, CA, EUA), e SDF-1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) foram avaliadas em duplicatas dos sobrenadantes dos hematomas pré e pós-cirúrgico seguindo as instruções do fabricante. Os valores obtidos foram normalizados pela quantidade de proteína total em cada sobrenadante, previamente determinada pelo método de Bradford (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), utilizando albumina sérica bovina como padrão.

3.9. Análise estatística

Os dados foram comparados usando o teste *t pareado sobre a razão* (paramétrico) ou teste pareado de Wilcoxon (não paramétrico) após a verificação da normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os valores foram expressos individualmente e/ou como média $\pm$ DP ou

mediana, conforme apropriado. Foi adotado o intervalo de confiança de 95% para as análises, sendo considerado estatisticamente significativo valores de p menores ou igual a 0,05. A análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism (GraphPad software, La Jolla, CA, EUA, versão 7.0).

4. Resultados

4.1 Características dos pacientes

Constituiu a amostra do presente estudo quinze adultos (9 homens e 6 mulheres) com idade média de $33,2 \pm 14,7$ anos, portadores de fratura fechada da diáfise femoral classificadas como 32-A (n=8) ou 32-B (n=7) relacionadas com traumas de alta energia. O tempo médio entre a ocorrência da fratura e a osteossíntese com haste intramedular fresada foi de $46,2 \pm 22,9$ horas. Todos os pacientes evoluíram com consolidação da fratura $17,8 \pm 2,6$ semanas após o tratamento (Anexo IV).

4.2 Viabilidade celular

A sobrevivência celular no microambiente da fratura após a fresagem, avaliada por citometria de fluxo através do percentual de células nucleadas viáveis, revelou redução do percentual de células nucleadas viáveis (Anexina V⁻/PI⁻) após a fresagem ($40,0\% \pm 22,75\%$ vs $63,0\% \pm 16,63\%$, $p=0,01$) (Figura 4.1). Analisando comparativamente as amostras em relação às células em estágio de apoptose inicial (Anexina V⁺/PI⁻), não foi observada diferença estatística entre o hematoma pré e pós-cirúrgico ($12,4\% \pm 17,67\%$ vs $16,5\% \pm 5,57\%$, $p=0,12$). No entanto, foi observado aumento no percentual de células em estágio de apoptose tardia/mortas (Anexina V⁺/PI⁺) no hematoma pós-cirúrgico em relação ao hematoma pré-cirúrgico ($43,28\% \pm 27,02\%$ vs $24,58\% \pm 18,87\%$, $p=0,005$) (Figura 4.1).

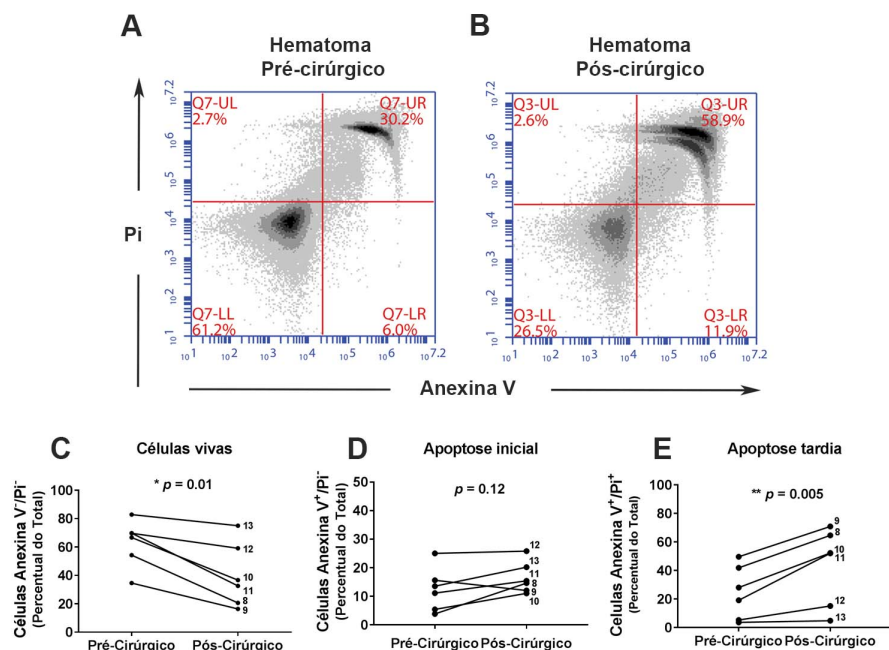


Figura 4.1 – Análise de viabilidade celular na fração mononuclear total. (A e B) Expressão de Anexina V/PI no hematoma pré-cirúrgico (A) e pós-cirúrgico (B). (C) Percentual de células vivas (Anexina V⁻/PI⁻). (D) Percentual de células em apoptose inicial (Anexina V⁺/PI⁻). (E) Percentual de células em apoptose tardia/mortas (Anexina V⁺/PI⁺). Os pontos representam os valores individuais das amostras dos doadores 8-13 (n = 6). Valores de p obtidos pelo teste *t* pareado.

4.3 Frequência de progenitores estromais

A frequência de progenitores estromais após a fresagem foi avaliada no microambiente da fratura através do percentual de células CD45⁻/CD31⁻/CD146⁺, após exclusão dos leucócitos pela alta granulação citoplasmática e pela expressão de CD45 e exclusão das células endoteliais pela expressão de CD31 (Figura 4.2).

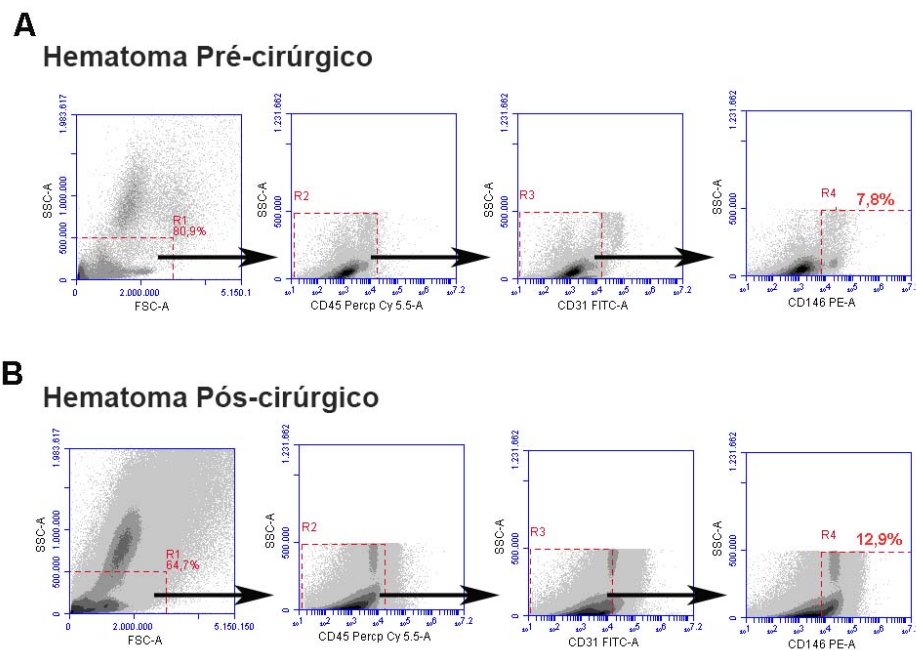


Figura 4.2 – Análise da população celular $CD45^-/CD31^-/CD146^+$ no microambiente da fratura. (A) Hematoma pré-cirúrgico e (B) pós-cirúrgico (amostra do paciente 10).

Na maioria dos pacientes avaliados, após a fresagem, houve aumento do percentual da população estromal $CD45^-/CD31^-/CD146^+$ (Tabela 2). Esta observação foi confirmada na análise de eficiência de formação de colônias (CFE), que demonstrou que o hematoma pós-cirúrgico tinha um maior número de células clonogênicas em relação ao hematoma pré-cirúrgico ($43,89 \pm 24,9$ vs $29,99 \pm 24,16$, $p=0,03$) (Figura 4.3). Não foi observada diferença no diâmetro das colônias, indicando que as células presentes nos hematomas pré e pós-cirúrgico tinham capacidade proliferativa semelhante.

Tabela 2. Percentual da subpopulação CD45⁻/CD31⁻/CD146⁺ no microambiente da fratura.

Paciente	<i>Pré-cirúrgico</i> (% total)	<i>Pós-cirúrgico</i> (% total)
7	0.2	1.2
9	0.3	0.2
10	0.4	0.5
11	7.8	12.9
12	6.4	10.8
13	1.0	1.6
14	0.04	0.2

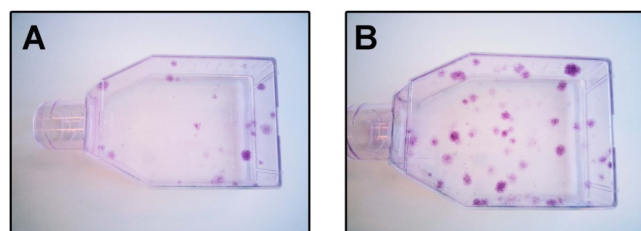
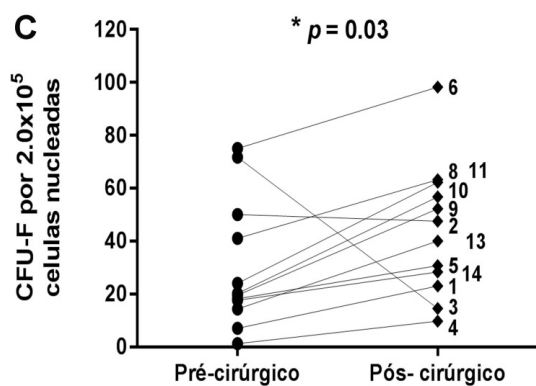


Figura 4.3 – Ensaio de eficiência de formação de colônias fibroblásticas (CFE). (A e B) Imagens representativas das colônias originadas pelos hematomas pré-cirúrgico (A) e pós-cirúrgico (B). (C) Número de colônias obtidas por paciente (n=12). Valor de p obtido pelo teste *t* pareado.



4.4 Análise de fatores de sinalização celular

A regulação local da atividade celular, avaliada através da liberação de mediadores pró-inflamatórios, revelou que após a fresagem houve redução da concentração de IL-8 e IL-6 em 2,1 e 2,6 vezes, respectivamente, em relação aos níveis locais observados no hematoma pré-cirúrgico. No entanto, apenas a redução dos níveis de IL-6 obteve significância estatística. De forma similar, após a fresagem, foi observada redução de 6,1 vezes na concentração de MCP-1 e de 3,6 vezes na concentração de CCL-4. Dentre os mediadores pró-inflamatórios investigados, apenas a concentração de IL-1 β aumentou significativamente após a fresagem. Apesar da concentração da citocina antiinflamatória IL-10 ter aumentado cerca de 3 vezes no hematoma pós-cirúrgico, não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p=0,06$) (Tabela 3 e Figura 4.4).

Tabela 3. Concentração de citocinas e de fatores de crescimento no microambiente da fratura antes e depois do procedimento de fresagem.

<i>Mediador</i>	<i>Pré-cirúrgico</i>	<i>Pós-cirúrgico</i>
<i>IL-8</i>	520,6	2,9
<i>IL-6</i>	139,1	53,4 [*]
<i>CXCL-9</i>	51,3	64,3
<i>MCP-1</i>	34,3	5,6 [*]
<i>CCL-4</i>	19,8	5,4 [*]
<i>TNF-α</i>	8,8	7,6
<i>IL-10</i>	4,0	11,9
<i>IL-1β</i>	2,6	5,8 [*]
<i>CXCL12</i>	155,3	43,1
<i>TGF-β</i>	138,5	139,7
<i>BMP-2</i>	84,6	76,4
<i>BMP-4</i>	70,9	50,4
<i>PDGF-AB</i>	57,6	68,9 ^{**}
<i>VEGF</i>	20,4	18,3
<i>bFGF</i>	12,6	30,5 [*]

Valores medianos expressos em pg/mg. ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$, teste pareado de Wilcoxon.

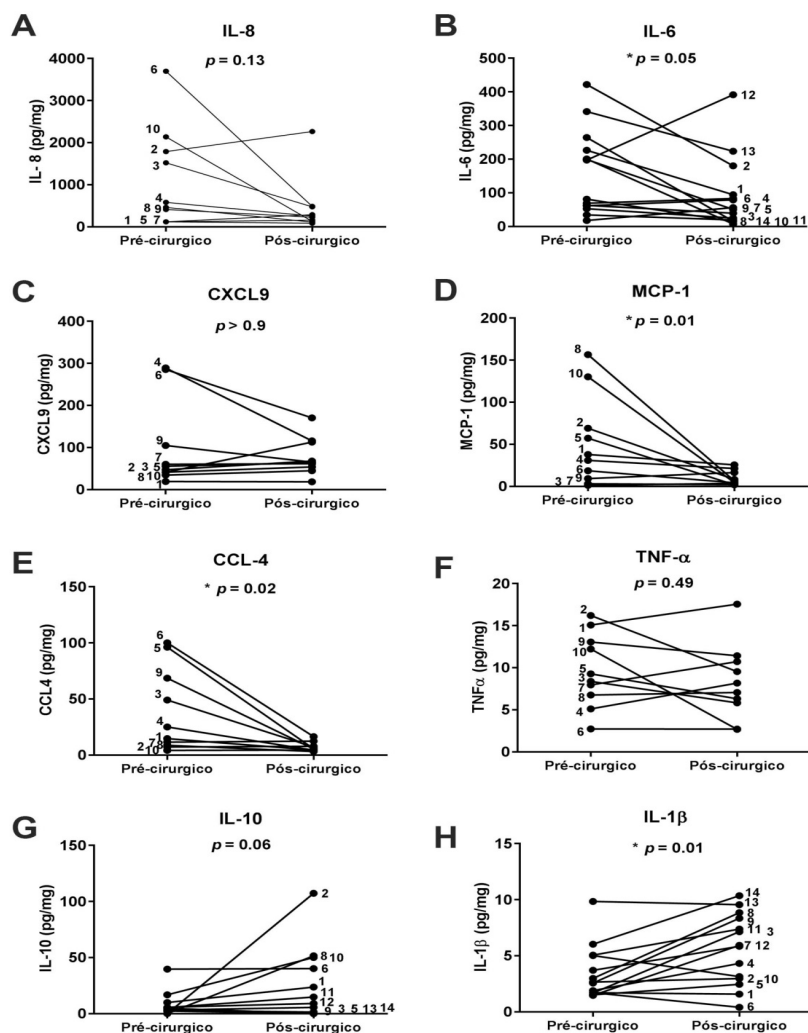


Figura 4.4 – Quantificação de fatores de sinalização envolvidos na modulação da resposta inflamatória local. (A-H) Concentrações individuais obtidas nos sobrenadantes dos hematomas pré e pós-cirúrgico dos pacientes indicados em cada gráfico. Os valores são relativos a quantidade de proteína total de cada sobrenadante e expressos em mediana em pg/mg. Valores de p obtido pelo teste não paramétrico pareado de Wilcoxon.

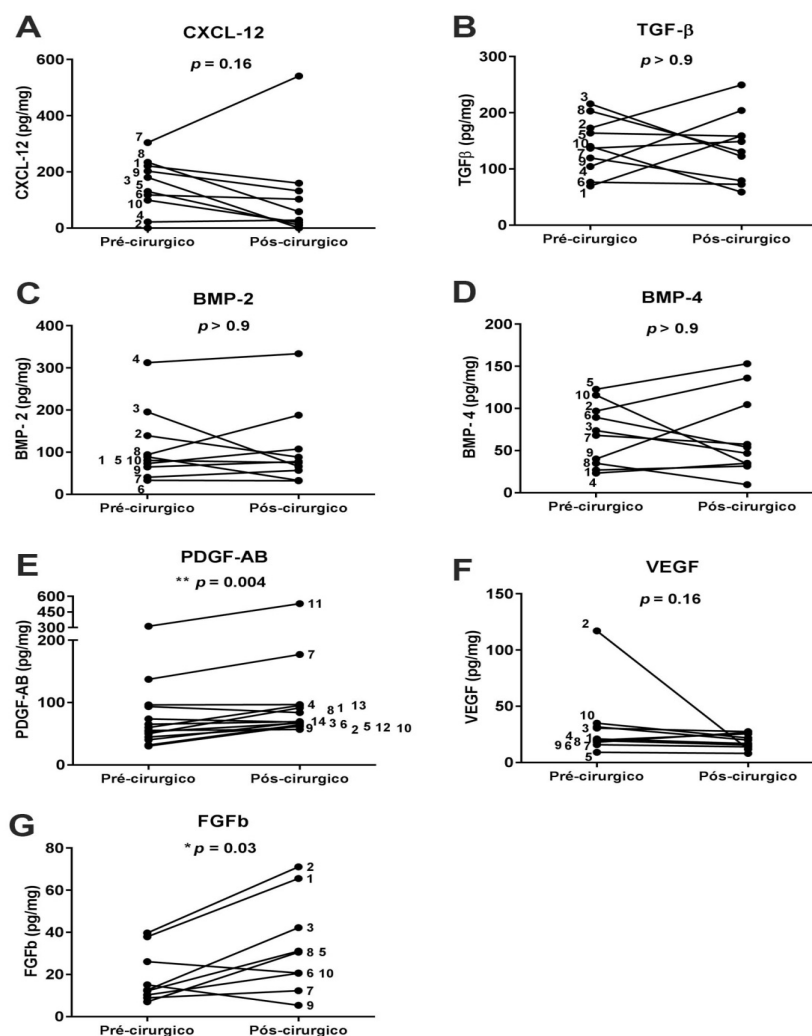


Figura 4.5 – Quantificação de fatores de sinalização envolvidos com a regulação local da atividade das células progenitoras. (A-H) Concentrações individuais obtidas nos sobrenadantes dos hematomas pré e pós-cirúrgico dos pacientes indicados em cada gráfico. Os valores são relativos a quantidade de proteína total de cada sobrenadante e expressos em mediana em pg/mg. Valores de p obtido pelo teste não paramétrico pareado de Wilcoxon.

5. Discussão

A consolidação óssea é um dos poucos processos que ocorrem na vida pós-natal que pode ser considerado verdadeiramente regenerativo, uma vez que restitui integralmente as características celulares, estruturais e biomecânicas do osso observadas antes da fratura. No entanto, trata-se de um processo extremamente complexo, influenciado tanto pela integração de diversos mecanismos biológicos envolvidos no reparo e na neoformação tecidual, como pelas características intrínsecas da fratura e a forma da abordagem terapêutica (EINHORN e GERSTENFELD, 2015; PERREN, 2015).

Embora diversos estudos demonstrem que o hematoma fraturário é a fonte de células e moléculas sinalizadoras que iniciam o processo de regeneração do osso (EINHORN, 2005; WENISCH *et al.*, 2005; OE *et al.*, 2007; KOLAR *et al.*, 2010), e que a correta progressão temporal dos eventos que ocorrem nesta etapa são determinantes para restituir a integridade tecidual (HOFF *et al.*, 2016; LOI *et al.*, 2016), alguns aspectos deste processo ainda são pouco conhecidos. Particularmente, a diversidade da população celular envolvida com o processo regenerativo e as sinalizações locais e sistêmicas que direcionam e controlam as funções das células ainda não estão totalmente esclarecidos.

Em um novo cenário, com o advento do tratamento das fraturas dos ossos longos com haste intramedular fresada, houve necessidade de conhecer o impacto real da fresagem sobre a progressão dos eventos envolvidos com a consolidação das fraturas. Inicialmente, a maior parte dos relatos sobre os efeitos da fresagem do canal medular sobre a consolidação óssea eram voltados para a avaliação das propriedades mecânicas da fixação (INDREKVAM *et al.*, 1991), das consequências sobre o fluxo sanguíneo do osso cortical e da sua reconstituição depois da

fresagem (GRUNDNES *et al.*, 1994) e dos efeitos da rigidez da haste (SHA *et al.*, 2009). Entretanto, os efeitos da fresagem dos ossos longos sobre a resposta inflamatória local e a indução da osteogênese ainda são, em parte, desconhecidos. No presente estudo observamos que a fresagem do canal medular altera o ambiente do foco fraturário, enxertando-o com um produto biológico enriquecido em progenitores mesenquimais CD146⁺. Além disso, o procedimento resulta em uma diminuição da concentração de IL-6, CCL-4 e MCP-1, acompanhada pela elevação de IL-10, PDGF-AB e bFGF, em comparação com o microambiente do hematoma fraturário pré-fresagem.

A presença de osteoprogenitores viáveis no material resultante da fresagem, com capacidade de estimular a consolidação óssea por auto-enxertia, foi descrita pela primeira vez em um modelo animal (FROLKE *et al.*, 2001). Após a realização de uma osteotomia de 5mm na tíbia de ovelhas, os autores acompanharam a evolução do calo ósseo nos animais em que foi feito o preenchimento da osteotomia com debris produzidos pela fresagem do fêmur ipsilateral ou com enxerto cortico-esponjoso da crista ilíaca. Após três semanas, o volume do calo ósseo dos animais tratados com o produto da fresagem foi semelhante ao dos animais tratados com enxerto ósseo (FROLKE *et al.*, 2001). Posteriormente, o mesmo grupo descreveu o isolamento de células semelhantes à osteoblastos a partir dos debris da fresagem, que eram capazes de proliferar *in vitro* e responder ao tratamento com 1,25-di-hidroxivitamina D3 aumentando a atividade da fosfatase alcalina (FROLKE *et al.*, 2004). Corroborando esses achados, Hoegel e colaboradores (2004) demonstraram que células osteoblásticas isoladas de fresados obtidos de ovelhas, mantinham a atividade de fosfatase alcalina em níveis normais, confirmando que estas células permaneceram viáveis após o procedimento de fresagem.

Em humanos, o isolamento de osteoprogenitores em material resultante de fresagem foi descrito pela primeira vez por Wenisch e colaboradores (2005). As amostras foram obtidas de doze pacientes com fraturas diafisárias fechadas do fêmur, das quais pequenos fragmentos ósseos foram cultivados *in vitro*. Após 4-7 dias, os autores observaram a migração de células fibroblastóides a partir dos fragmentos ósseos. Seguindo a incubação com meio osteoindutor, estas células passaram a expressar fosfatase alcalina e osteocalcina e originaram depósitos de matriz mineralizada identificados pela coloração de Von Kossa (WENISCH *et al.*, 2005).

Apesar de ter sido demonstrado que as células presentes nos fragmentos ósseos sobreviviam à ação mecânica exercida pela fresa, ainda pode ser questionado se as células dispersas no estroma medular e mais diretamente atingidas por essa ação mecânica, por não estarem protegidas por uma matriz extracelular rígida como a matriz óssea, também sobreviveriam ao procedimento. Por esta razão, no presente estudo optamos por não restringir nossa avaliação na população celular selecionada *in vitro* pela capacidade de adesão aos plásticos de cultivo, excluindo dessa forma as populações hematopoéticas que majoritariamente são não aderentes e/ou não sobrevivem nesse sistema de cultivo *in vitro*. Assim, por considerar que a atividade global da população celular no local da fratura é fundamental para induzir a resposta inflamatória que dá início à regeneração óssea, acreditamos que a avaliação da viabilidade celular de todo o material resultante da fresagem, sem manipulações através de cultivo *in vitro*, é um método mais apropriado para determinar os efeitos da fresagem sobre a sobrevivência celular no foco fraturário do que a seleção através de protocolos de cultivo.

De fato, observamos que o processo mecânico da fresagem reduz a viabilidade celular no foco fraturário, resultando no aumento do percentual de células em processo de morte por apoptose. Tal efeito pode ser atribuído tanto à lesão mecânica promovida pela fresa, quanto ao

aumento de temperatura no canal medular durante o procedimento (MULLER *et al.*, 1993; LEUNIG e HERTEL, 1996; RUDLOFF e SMITH, 2009). Em um estudo realizado em porcos, observou-se que a fresagem produziu um aumento médio de 6,9°C na temperatura do canal medular. Embora este aumento de temperatura não seja suficiente para induzir necrose tecidual, em particular necrose óssea, ele pode induzir morte celular por ser significativamente maior do que a temperatura corporal normal (GARCIA *et al.*, 2004).

Considerando que a sequência correta dos eventos que regulam o início e o desenvolvimento do processo inflamatório dependem da atividade das células presentes no foco fraturário, é razoável supor que após a fresagem a diminuição da viabilidade celular total possa impactar na progressão dos eventos do processo regenerativo que culminam com a consolidação óssea. No entanto, não existem evidências concretas de que os efeitos da fresagem sejam de fato prejudiciais para a consolidação. Ao contrário, estudos clínicos prospectivos que compararam o tratamento de fraturas com haste intramedular fresada e não fresada demonstram que nos pacientes submetidos à fresagem, a formação de calo ósseo ocorreu mais rapidamente e a fratura consolidou mais precocemente (COURT-BROWN *et al.*, 1996; CLATWORTHY *et al.*, 1998; SHROEDER *et al.*, 2009), inclusive em pacientes com diagnóstico prévio de pseudoartrose (KEMPF *et al.*, 1986; WEBB *et al.*, 1986; HIERHOLZER *et al.*, 2014; WESTHAUSER *et al.*, 2015). Seguindo este racional, supomos que o efeito da fresagem sobre a viabilidade celular no foco fraturário possa ser compensada pela dissociação e mobilização mecânica das áreas de osso esponjoso, enriquecidas em osteoprogenitores mais indiferenciados, como as células estromais mesenquimais, que poderiam contribuir para o aumento da resposta osteogênica.

Confirmando esta hipótese, observamos um aumento significativo na frequência da população estromal CD45⁻/CD31⁻/CD146⁺ no material resultante da fresagem. Segundo dados da

literatura, esta população celular contém 100% das células com potencial clonogênico, isto é, todas as células iniciadoras de colônias fibroblastóides (CFU-F), incluindo o subconjunto multipotente, as células-tronco esqueléticas (SACCHETTI *et al.*, 2007; BIANCO e ROBEY, 2015). De fato, o aumento no percentual de células CD45⁻/CD31⁻/CD146⁺ foi acompanhado pelo aumento do número de CFU-F obtidas no produto da fresagem, confirmando seu enriquecimento com essa população de osteoprogenitores. Dessa forma, o aporte de células CD146⁺ no foco fraturário sugere um efeito estimulador da fresagem sobre a neoformação óssea e sobre a regeneração tecidual, uma vez que além de contribuir para a geração de novos osteoblastos por diferenciação direta, essas células também auxiliam na reorganização do nicho hematopoético e da neovascularização local, funções exclusivas das células CD146⁺ e que não são reproduzidas por células mais diferenciadas como os osteoblastos e as células do periósteo (SACCHETTI *et al.*, 2007; MENDEZ-FERRER *et al.*, 2010; KFOURY *et al.*, 2015).

No entanto, para que a atividade das células enxertadas no foco fraturário estimule a osteogênese e a regeneração tecidual, a sinalização no microambiente da fratura também necessita ocorrer de forma adequada (BARNES *et al.*, 1999; GIANNOUDIS *et al.*, 2008; KOLAR *et al.*, 2010; SCHMIDT-BLEEK *et al.*, 2015). Dessa forma, a etapa final deste estudo visou compreender as mudanças na sinalização local depois do procedimento de fresagem, por meio de uma visão ampla dos fatores de crescimento implicados tanto com a fase inflamatória da consolidação óssea, como com a indução da osteogênese e da angiogênese (EINHORN e GERSTENFELD, 2015; KOLAR *et al.*, 2010). Nas primeiras horas após a fratura, a hipóxia no ambiente do hematoma estimula a secreção de vários fatores inflamatórios como IL-8, IL-6, IL1 β , e TNF α , por células locais do sistema imune inato, que resulta no recrutamento de leucócitos periféricos (SCHMIDT-BLEEK *et al.*, 2015; HERMAN *et al.*, 2008; KOLAR *et al.*, 2011). A

seguir, este perfil de sinalização muda, gerando uma resposta anti-inflamatória, marcada pelo pico de expressão de IL-10 e TGF- β . O início dos processos de angiogênese e osteogênese dependem diretamente da resolução deste processo inflamatório (SCHMIDT-BLEEK *et al.*, 2015). Dessa forma, a redução dos fatores inflamatórios IL-6, MCP-1, e CCL-4 no material fresado, acompanhada pelo aumento nos níveis de IL-10, sugere que, imediatamente após a fresagem, o ambiente da fratura progride para um estado menos inflamatório (SCHMIDT-BLEEK *et al.*, 2015; MENTEN *et al.*, 2002). Simultaneamente, o aumento na concentração de bFGF e PDGF-AB pode ativar a resposta osteogênica, estimulando a progressão do processo de consolidação para a fase anabólica subsequente, quando se inicia a neoformação tecidual (EINHORN e GERSTENFELD, 2015).

Durante o processo de regeneração óssea, bFGF tem papel fundamental nos processos de angiogênese e osteogênese, estimulando a proliferação e a diferenciação de progenitores endoteliais e mesenquimais (RADOMSKY *et al.*, 1998; FEI *et al.*, 2013). Em modelos animais, observou-se que tanto o aumento da expressão de bFGF em osteoprogenitores quanto sua aplicação direta no local da fratura aceleraram a consolidação (HURLEY *et al.*, 2016; XIAO *et al.*, 2014; UENO *et al.*, 2014; FURUYA *et al.*, 2014). Resultados semelhantes foram observados em um modelo de osteotomia em cães, no qual uma única injeção de bFGF resultou em maior calo ósseo (NAKAMURA *et al.*, 1998). *In vivo*, em biomateriais cerâmicos semeados com BMSCs modificadas geneticamente para super expressar bFGF, ocorreu a formação de uma quantidade substancial de osso associada à extensa rede capilar (GUO *et al.*, 2006). Em humanos, um ensaio clínico randomizado, controlado por placebo, mostrou que a aplicação de bFGF em fraturas da diáfise da tíbia resultou na redução do tempo de consolidação e no aumento índices de sucesso do tratamento (KAWAGUCHI *et al.*, 2010).

Durante a vida pos-natal, bFGF é produzido por osteoblastos e, devido à sua afinidade com glicosaminoglicanos, é abundantemente armazenado na matriz extracelular óssea (YAYON *et al.*, 1991). Esta forma de armazenamento protege as moléculas de bFGF de proteólise e desnaturação térmica e limita a difusão no espaço intersticial (VANDEN BERG-FOELS, 2014). A dissociação mecânica da matriz óssea promovida pela fresa pode ser, portanto, responsável por aumentar sua disponibilidade no local da fratura, promovendo diretamente a ativação tanto dos osteoprogenitores periosteais como daqueles enxertados mecânicamente (DU *et al.*, 2012).

O PDGF-AB é uma das isoformas circulantes da família dos PDGFs (CAPLAN e CORREA, 2011), liberado durante as primeiras fases do processo de regeneração óssea por plaquetas localizadas no hematoma fraturário (WEISS *et al.*, 2009). As suas principais funções no reparo ósseo são estimular a proliferação e a quimiotaxia de progenitores mesenquimais (TOKUNAGA *et al.*, 2008); estimular a liberação autócrina de fatores de crescimento e citocinas por neutrófilos e monócitos; e coordenar a interação entre progenitores mesenquimais e pericitos, promovendo a neovascularização local (CHEN *et al.*, 2009). Utilizado em um modelo de osteotomia em coelhos, Nash e colaboradores (1994) observaram que na presença de PDGF havia aumento na densidade e no volume do calo ósseo (NASH *et al.*, 1994). Recentemente, Westhauser e colaboradores (2015) verificaram que os níveis séricos de PDGF-AB aumentam progressivamente em pacientes com fraturas de ossos longos até a 6ª semana após o trauma. Por outro lado, nos pacientes que desenvolveram pseudoartrose, os níveis sistêmicos de PDGF-AB diminuem a partir da 1ª semana, confirmando o papel do PDGF na regulação da consolidação óssea (WESTHAUSER *et al.*, 2015).

O conjunto dos resultados deste estudo demonstram que embora a fresagem impacte sobre a viabilidade celular no foco fraturário, este efeito parece ser compensado pela enxertia mecânica

de uma população de osteoprogenitores contendo células com potencial para promover neoformação óssea e também capazes de reorganizar a microanatomia do estroma medular e promover a angiogênese (BIANCO e ROBEY, 2015; KFOURY e SCADDEN, 2015); pelo potencial em modular a resposta inflamatória, promovendo sua progressão para um nível de menor intensidade; e pelo aumento da disponibilidade de fatores de sinalização envolvidos com a promoção de osteogênese e angiogênese. É importante ressaltar, contudo, que as avaliações do presente estudo se restringem ao momento imediatamente após a realização do procedimento de fresagem, tendo como objetivo caracterizar o material que permanece no foco fraturário. Considerando que a fresagem promove uma extensa lesão na superfície endosteal do osso, rompendo uma ampla rede vascular, não pode ser excluída a possibilidade de que se desenvolva uma resposta inflamatória secundária, modificando as características originais do foco de fratura. Porém, tal análise no cenário clínico é de difícil execução pela impossibilidade de avaliar o hematoma em diferentes tempos de evolução. As análises das repercussões sistêmicas induzidas pela fresagem poderão contribuir para esclarecer alguns pontos desse complexo processo e devem ser objeto de estudos futuros. Da mesma forma, será fundamental para o aprofundamento dos conhecimentos adquiridos neste estudo correlacionar a frequência de progenitores esqueléticos CD146⁺ no foco fraturário após a fresagem e a dinâmica dos fatores de sinalização após a intervenção cirúrgica, localmente (imediatamente após a fresagem) e em nível sistêmico (em tempos posteriores), com o tipo de desfecho clínico (consolidação vs pseudoartrose) em uma amostra maior de pacientes¹.

Um melhor entendimento da dinâmica do processo de regeneração óssea, à luz das alterações provocadas pelos procedimentos ortopédicos vigentes, será um passo fundamental para

¹ Anexos V e VI

o desenvolvimento de novos protocolos terapêuticos que estimulem a regeneração óssea e reduzam os índices de complicações.

6. Conclusões

O procedimento de fresagem do canal medular para o tratamento da fratura diafisária do fêmur:

- Reduz o número de células nucleadas viáveis no foco da fratura;
- Promove o enriquecimento de osteoprogenitores no foco de fratura;
- Modula a resposta inflamatória no microambiente da fratura através da diminuição de IL-6, CCL-4 e MCP-1 e aumento de IL-1 β ;
- Aumenta a disponibilidade local de fator indutor de osteogênese bFGF e do fator angiogênico PDGF-AB.

7. Referências bibliográficas

- ABBOTT JD, HUANG Y, LIU D, HICKEY R, KRAUSE DS, GIORDANO FJ. Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation* 2004;110(21):3300-3305.
- AGARWAL-HARDING KJ, MEARA JG, GREENBERG SL, HAGANDER LE, ZURAKOWSKI D, DYER GS. Estimating the global incidence of femoral fracture from road traffic collisions: a literature review. *J Bone Joint Surg Am* 2015;97(6):e31.
- ASAHARA T, TAKAHASHI T, MASUDA H, KALKA C, CHEN D, IWAGURO H, INAI Y, SILVER M, ISTNER JM. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* 1999;18(14):3964-3972.
- BAKKER HK, STRUIKENKAMP RS. Biological variability and lean body mass estimates. *Hum Biol* 1977;49(2):187-202.
- BAKKER AD, KROEZE RJ, KORSTJENS C, DE KLEINE RH, FROLKE JP, KLEIN-NULEND J. Reaming debris as a novel source of autologous bone to enhance healing of bone defects. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2011;97(4):457-465.
- BARNES GL, KOSTENUK PJ, GERSTENFELD LC, EINHORN TA. Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res* 1999;14(11):1805-1815.
- BIANCO P, CAO X, FRENETTE PS, MAO JJ, ROBEY PG, SIMMONS PJ, WANG CY. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat Med* 2013;19(1):35-42.
- BIANCO P, ROBEY PG. Skeletal stem cells. *Development* 2015;142(6):1023-1027.
- BLACK CRM, GORIAINOV V, GIBBS D, KANCZLER J, TARE R, OREFFO ROC. Bone tissue engineering. *Curr Mol Bio Rep* 2015;1(3):132-140.
- BONG MR, KUMMER FJ, KOVAL KJ, EGOL, KA. Intramedullary nailing of the lower extremity: biomechanics and biology. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 2007;15(2),97-106.
- BRIGHTON CT, LORICH DG, KUPCHA R, REILLY TM, JONES AR, WOODBURY RA 2nd. The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell. *Clin Orthop Relat Res* 1992;275:287-299.
- CAPLAN AI, CORREA D. The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell* 2011;9(1):11-15.
- CAPLAN AI, CORREA D. PDGF in bone formation and regeneration: new insights into a novel mechanism involving MSCs. *J Orthop Res* 2011;29(12):1795-1803.
- CARANO RA, FILVAROFF EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discovery Today* 2003;8(21):980-989.
- CERADINI DJ, KULKARNI AR, CALLAGHAN MJ, TEPPER OM, BASTIDAS N, KLEINMAN ME, CAPLA JM, GALIANO RD, LEVINE JP, GURTNER GC. Progenitor cell tracking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 2004;10(8):858-864.

- CHARASH WE, FABIAN TC, CROCE MA. Delayed surgical fixation of femur fractures is a risk factor for pulmonary failure independent of thoracic trauma. *J Trauma* 1994;37(4):667–672.
- CHEN X, ARMSTRONG MA, LI G. Mesenchymal stem cells in immunoregulation. *Immunol Cell Biol* 2006;84(5):413–421.
- CHEN L, HE Z, CHEN B, ZHAO Y, SUN W, XIAO Z. Direct chemical cross-linking of platelet-derived growth factor-BB to the demineralized bone matrix improves cellularization and vascularization. *Biomacromolecules*. 2009;10(12):3193–3198.
- CLAES L, RECKNAGEL S, IGNATIUS A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat Rev Rheumatol* 2012; 8(3):133–143.
- CLATWORTHY MG, CLARK DI, GRAY DH, HARDY AE. Reamed versus unreamed femoral nails. A randomised, prospective trial. *J Bone Joint Surg Br* 1998;80(3):485–489.
- COLNOT C, ZHANG X, KNOTHE TATE ML. Current insights on the regenerative potential of the periosteum: molecular, cellular, and endogenous engineering approaches. *J Orthop Res* 2012;30(12):1869–1878.
- CORNISH J, GILLESPIE MT, CALLON KE, HORWOOD NJ, MOSELEY JM, REID IR. Interleukin-18 is a novel mitogen of osteogenic and chondrogenic cells. *Endocrinology* 2003;144(4):1194–1201.
- CORRALES LA, MORSHED S, BHANDARI M, MICLAU III T. Variability in the Assessment of Fracture-Healing in Orthopaedic Trauma Studies. *J Bone Joint Surg Am* 2008;90(9):1862–1868.
- COURT-BROWN CM, WILL E, CHRISTIE J, MCQUEEN MM. Reamed or unreamed nailing for closed tibial fractures. A prospective study in Tscherne C1 fractures. *J Bone Joint Surg Br*. 1996;78(4):580–583.
- DIAZ-FLORES L, GUTIERREZ R, LOPEZ-ALONSO A, GONZALEZ R, VARELA H. Pericytes as a supplementary source of osteoblasts in periosteal osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res* 1992;275:280–286.
- DIMITRIOU R, TSIRIDIS E, GIANNOUDIS PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 2005;36(12):1392–1404.
- DOHLE E, BISCHOFF I, BOSE T, MARSANO A, BANFI A, UNGER RE, KIRKPATRICK CJ. Macrophage-mediated angiogenic activation of outgrowth endothelial cells in co-culture with primary osteoblasts. *Eur Cell Mater* 2014;27:149–165.
- DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, SLAPER-CORTENBACH I, MARINI F, KRAUSE D, DEANS R, KEATING A, PROCKOP D, HORWITZ E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315–317.
- DU X, XIE Y, XIAN C J, CHEN L. Role of FGFs/FGFRs in skeletal development and bone regeneration. *J Cell Physiol* 2012;227(12):3731–3743.
- EINHORN TA, MAJESKA RJ, RUSH EB, LEVINE PM, HOROWITZ MC. The expression of cytokine activity by fracture callus. *J Bone Miner Res* 1995;10(8):1272–1281.
- EINHORN TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 1998;355(Suppl):S7–21.

- EINHORN TA. The science of fracture healing. *J Orthop Trauma* 2005;19(10S):S4–6.
- EINHORN TA, GERSTENFELD LC. Fracture healing: mechanisms and interventions *Nat Rev Rheumatol* 2015;11(1):45-54.
- FAIRBANK AC, THOMAS D, CUNNINGHAM B, CURTIS M, JINNAH RH. Stability of reamed and unreamed intramedullary tibial nails: a biomechanical study. *Injury* 1995;26(7):483–485.
- FAKHRY SM, RUTLEDGE R, DAHNERS LE, KESSLER D. Incidence, management, and outcome of femoral shaft fracture: a statewide population based analysis of 2805 adult pacientes in rural state. *J Trauma* 1994;37(2):255-260.
- FEI Y, GRONOWICZ G, HURLEY MM. Fibroblast growth factor-2, bone homeostasis and fracture repair. *Curr Pharm Des* 2013;19(19):3354-3363.
- FERGUSON C, ALPERN E, MICLAU T, HELMS JA. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech Dev* 1999;87(1-2):57–66.
- FERNANDES HJA, REIS FB, NETO PFT, BELANGERO WD. Placa em ponte e haste intramedular bloqueada: estudo comparativo no tratamento de fraturas multifragmentárias da diáfise do fêmur. *Rev Bras Ortop* 2002;37(9):392-398.
- FERRARI D, CHIOZZI P, FALZONI S, DAL SUSINO M, MELCHIORRI L, BARICORDI OR, DI VIRGILIO F. Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J Immunol* 1997;159(3):1451-1458.
- FRIEDENSTEIN AJ, CHAILAKHJAN RK, LALYKINA KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970;3(4):393-403.
- FRIEDENSTEIN AJ, CHAILAKHYAN RK, LATSINIK NV, PANASYUK AF, KEILISS-BOROK IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* 1974;17(4): 331-340.
- FRIEDENSTEIN AJ, DERIGLASOVA UF, KULAGINA NN, PANASUK AF, RUDAKOWA SF, LURIA EA, RUADKOW IA. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 1974; 2(2):83-92.
- FRIEDENSTEIN AJ, LATZINIK NW, GROSHEVA AG, GORSKAYA UF. Marrow microenvironment transfer by heterotopic transplantation of freshly isolated and cultured cells in porous sponges. *Exp Hematol* 1982;10(2):217–227.
- FRIEDENSTEIN AJ, PIATETZKY-SHAPIRO II, PETRAKOVA KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966;16(3):381-390.
- FROLKE JP, VAN DE KROL H, BAKKER FC. Destination of debris during intramedullary reaming. An experimental study on sheep femurs. *Acta Orthop Belg* 2000;66(4):337–340.
- FROLKE JP, BAKKER FC, PATKA P, HAARMAN HJ. Reaming debris in osteotomized sheep tibiae. *The Journal of trauma*. 2001;50(1):65-9; discussion 9-70.
- FROLKE JP, NULEND JK, SEMEINS CM, BAKKER FC, PATKA P, HAARMAN HJ. Viable osteoblastic potential of cortical reamings from intramedullary nailing. *Journal of Orthopaedic Research*. 2004;22(6):1271-1275.

- FURUYA H, TABATA Y, KANEKO K. Bone regeneration for murine femur fracture by gelatin hydrogels incorporating basic fibroblast growth factor with different release profiles. *Tissue engineering Part A* 2014;20(9-10):1531-1541.
- GARCIA OG, MOMBIELA FL, DE LA FUENTE CJ, ARANGUEZ MG, ESCRIBANO DV, MARTIN JV. The influence of the size and condition of the reamers on bone temperature during intramedullary reaming. *The Journal of Bone and Joint Surgery American volume*. 2004;86-a(5):994-999.
- GERBER HP, VU TH, RYAN AM, KOWALSKI J, WERB Z, FERRARA N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 1999;5(6):623–628.
- GERSTENFELD LC, CHO TJ, KON T, AIZAWA T, CRUCETA J, GRAVES BD, EINHORN TA. Impaired intramembranous bone formation during bone repair in the absence of tumor necrosis factor- α signaling. *Cells Tissues Organs* 2001;169(3):285–294.
- GERSTENFELD LC, CULLINANE DM, BARNES GL, GRAVES DT, EINHORN TA. Fracture healing as a post- natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 2003;88(5):873–884.
- GERSTENFELD LC, ALKHIARY YM, KRALL EA, NICHOLLS FH, STAPLETON SN, FITCH JL, BAUER M, KAYAL R, GRAVES DT, JEPSEN KJ, EINHORN TA. Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis. *J Histochem Cytochem* 2006;54(11):1215–1228.
- GIANNOUDIS PV, PAPE HC, COHEN AP. Review: systemic effects of femoral nailing: from Küntscher to the immune reactivity era. *Clin Orthop Relat Res* 2002;404:378–386.
- GIANNOUDIS PV, EINHORN TA, MARSH D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury* 2007;38(4S):S3–6.
- GIANNOUDIS PV, POUNTOS I, MORLEY J, PERRY S, TARKIN HI, PAPE HC. Growth factor release following femoral nailing. *Bone* 2008;42:751-757.
- GIANNOUDIS PV. Fracture healing and bone regeneration: autologous bone grafting or BMPs? *Injury* 2009;40(12):1243–1244.
- GLASS GE, CHAN JK, FREIDIN A, FELDMANN M, HORWOOD NJ, NANCHAHAL J. TNF- α promotes fracture repair by augmenting the recruitment and differentiation of muscle-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(4):1585–1590.
- GÖSLING T, KRETTEK C. Femurschaft. In: HAAS N, KRETTEK C, editors. *Tscherne Unfallchirurgie*. 1st ed. Berlin/Heidelberg/New York: Springer 2012;1:239-318.
- GRAD S, ERTEL W, KEEL M, INFANGER M, VONDERSCHMITT DJ, MALY FE. Strongly enhanced serum levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) after polytrauma and burn. *Clin Chem Lab Med* 1998;36(6):379–383.
- GRUNDNES O, UTVAG SE, REIKERAS O. Effects of graded reaming on fracture healing. Blood flow and healing studied in rat femurs. *Acta Orthop Scand* 1994;65(1):32-36.
- GRUNDNES O, UTVAG SE, REIKERAS O. Restoration of bone flow following fracture and reaming in rat femora. *Acta Orthop Scand* 1994;65(2):185-190.

GUO X, ZHENG Q, KULBATSKI I, YUAN Q, YANG S, SHAO Z, WANG H, XIAO B, PAN Z, TANG S. Bone regeneration with active angiogenesis by basic fibroblast growth factor gene transfected mesenchymal stem cells seeded on porous beta-TCP ceramic scaffolds. *Biomed Mater* 2006;1(3):93-99.

HEIL M, ZIEGELHOEFFER T, PIPP F, KOSTIN S, MARTIN S, CLAUSS M, SCHAPER W. Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283(6):H2411-2419.

HENLE P, ZIMMERMANN G, WEISS S. Matrix metalloproteinases and failed fracture healing. *Bone* 2005;37(6):791-798.

HERMAN S, KRONKE G, SCHETT G. Molecular mechanisms of inflammatory bone damage: emerging targets for therapy. *Trends in molecular medicine*. 2008;14(6):245-253.

HIERHOLZER C, GLOWALLA C, HERRLER M, VON RUDEN C, HUNGERER S, BUHREN V. Reamed intramedullary exchange nailing: treatment of choice of aseptic femoral shaft nonunion. *J Orthop Surg Res* 2014;9:88.

HOEGEL F, MUELLER CA, PETER R, PFISTER U, SUEDKAMP NP. Bone debris: dead matter or vital osteoblasts. *J Trauma* 2004;56(2):363-367.

HOFF P, GABER T, STREHL C, SCHMIDT-BLEEK K, LANG A, HUSCHER D, BURMESTER GR, SCHMIDMAIER G, PERKA C, DUDA GN, BUTTGEREIT F. Immunological characterization of the early human fracture hematoma." *Immunol Res*. 2016.

HUPEL TM, AKSENOV SA, SCHEMITSCH EH. Effect of limited and standard reaming on cortical bone blood flow and early strength of union following segmental fracture. *J Orthop Trauma* 1998;12(6):400-406.

HURLEY MM, ADAMS DJ, WANG L, JIANG X, BURT PM, DU E, XIAO L. Accelerated Fracture Healing in Transgenic Mice Overexpressing an Anabolic Isoform of Fibroblast Growth Factor 2. *J Cell Biochem*. 2016;117(3):599-611.

INDREKVAM K, GJERDET NR, ENGESAETER LB, LANGELAND N. Effects of intramedullary reaming and nailing of rat femur. A mechanical and chemical study. *Acta Orthop Scand* 1991;62(6):582-586.

JI F, HE BP, DHEEN ST, TAY SS. Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury. *Stem Cells* 2004;22(3):415-427.

JOSEPH-SILVERSTEIN J, MOSCATELLI D, RIFKIN DB. The development of a quantitative RIA for basic fibroblast growth factor using polyclonal antibodies against the 157 amino acid form of human bFGF. The identification of bFGF in adherent elicited murine peritoneal macrophages. *J Immunol Methods* 1988;110(2):183-192.

KAWAGUCHI H, OKA H, JINGUSHI S, IZUMI T, FUKUNAGA M, SATO K. A local application of recombinant human fibroblast growth factor 2 for tibial shaft fractures: A randomized, placebo-controlled trial. *Journal of bone and mineral research* 2010;25(12):2735-2743.

KAWAKAMI Y, II M, MATSUMOTO T, KURODA R, KURODA T, KWON SM, KAWAMOTO A, AKIMARU H, MIFUNE Y, SHOJI T, FUKUI T, KUROSAKA M, ASAHARA T. SDF-1/CXCR4 axis in Tie2-lineage cells including endothelial progenitor cells contributes to bone fracture healing. *J Bone Miner*

Res 2015;30(1):95–105.

KEMPF I, GROSSE A, BECK G. Closed locked intramedullary nailing. Its application to comminuted fractures of the femur. *J Bone Joint Surg Am* 1985;67(5):709–720.

KEMPF I, GROSSE A, RIGAUT P. The treatment of noninfected pseudarthrosis of the femur and tibia with locked intramedullary nailing. *Clin Orthop Relat Res* 1986;(212):142-154.

KFOURY Y, SCADDEN DT. Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche. *Cell stem cell*. 2015;16(3):239-253

KIM HS. Assignment1 of the human basic fibroblast growth factor gene FGF2 to chromosome 4 band q26 by radiation hybrid mapping. *Cytogenetics and cell genetics*. 1998;83(1-2):73.

KITAORI T, ITO H, SCHWARZ EM, TSUTSUMI R, YOSHITOMI H, OISHI S, NAKANO M, FUJII N, NAGASAWA T, NAKAMURA T. Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model. *Arthritis Rheum* 2009;60(3):813-823.

KOCH AE, POLVERINI PJ, KUNKEL SL, HARLOW LA, DIPIETRO LA, ELNER VM, ELNER SG, STRIETER RM. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 1992;258(5089):1798-1801.

KOLAR P, SCHMIDT-BLEEK K, SCHELL H, GABER T, TOBEN D, SCHMIDMAIER G, PERKA C, BUTTGEREIT F, DUDA GN. The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing. *Tissue Eng Part B Rev* 2010;16(4):427–434.

KOLAR P, GABER T, PERKA C, DUDA GN, BUTTGEREIT F. Human early fracture hematoma is characterized by inflammation and hypoxia. *Clinical orthopaedics and related research*. 2011;469(11):3118-3126.

KOMATSU DE, WARDEN SJ. The control of fracture healing and its therapeutic targeting: improving upon nature. *J Cell Biochem* 2010;109(2):302–311.

KON T, CHO TJ, AIZAWA T, YAMAZAKI M, NOOH N, GRAVES D, GERSTENFELD LC, EINHORN TA. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res* 2001;16(6):1004–1014.

KUMAR A, SALIMATH BP, STARK GB, FINKENZELLER G. Platelet-derived growth factor receptor signaling is not involved in osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A* 2010;16(3):983–993.

KÜNTSCHER G. The Intramedullary Nailing of fractures. *J Orthop Trauma* 2014;28(8):Supplement.

KURODA R, MATSUMOTO T, KAWAKAMI Y, FUKUI T, MIFUNE Y, KUROSAKA, M. Clinical impact of circulating CD34-positive cells on bone regeneration and healing. *Tissue Eng Part B Rev* 2014;20(3):190-199.

LAING AJ, DILLON JP, CONDON ET, STREET JT, WANG JH, MCGUINNESS AJ, REDMOND HP. Mobilization of endothelial precursor cells: systemic vascular response to musculoskeletal trauma. *J Orthop Res* 2007;25(1):44–50.

- LAROCHE M. Intraosseous circulation from physiology to disease. *Joint Bone Spine* 2002;69(3):262–269.
- LEIBOVICH SJ, POLVERINI PJ, SHEPARD HM, WISEMAN DM, SHIVELY V, NUSEIR N. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. *Nature* 1987;329(6140):630-632.
- LEUNIG M, HERTEL R. Thermal necrosis after tibial reaming for intramedullary nail fixation. A report of three cases. *J Bone Joint Surg Br* 1996;78(4):584-587.
- LIND M, DELEURAN B, YSSEL H, FINK-ERIKSEN E, THESTRUP-PEDERSEN K. IL- 4 and IL-13, but not IL-10, are chemotactic factors for human osteoblasts. *Cytokine* 1995;7(1):78-82.
- LIU R, SCHINDELER A, LITTLE DG. The potential role of muscle in bone repair. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2010;10(1):71–76.
- LOI F, CORDOVA LA, PAJARINEN J, LIN TH, YAO Z, GOODMAN SB. (2016). Inflammation, fracture and bone repair. *Bone* (2016)86:119-130.
- LORENZO J, HOROWITZ M, CHOI Y. Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *Endocr Rev* 2008;29(4):403-440.
- LU C, MICLAU T, HU D, MARCUCIO RS. Ischemia leads to delayed union during fracture healing: a mouse model. *J Orthop Res* 2007;25(1):51–61.
- MA, XL, SUN XL, WAN CY, MA JX, TIAN P. Significance of circulating endothelial progenitor cells in patients with fracture healing process. *J Orthop Res* 2012;30(11):1860-1866.
- MACCARIO R, PODESTA M, MORETTA A, COMETA A, COMOLI P, MONTAGNA D, DAUDT L, IBATICI A, PIAGGIO G, POZZI S, FRASSONI F, LOCATELLI F. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica* 2005;90(4):516-525.
- MARSELL R, EINHORN TA. The biology of fracture healing. *Injury* 2011;42(6):551–555.
- MATHIEU M, RIGUTTO S, INGELS A, SPRUYT D, STRICWANT N, KHARROUBI I, ALBARANI V, JAYANKRA M, RASSCHAERT J, BASTIANELLI E, GANGJI V. Decreased pool of mesenchymal stem cells is associated with altered chemokines serum levels in atrophic nonunion fractures. *Bone* 2013;53(2):391–398.
- MATSUMOTO T, MIFUNE Y, KAWAMOTO A, KURODA R, SHOJI T, IWASAKI H, SUZUKI T, OYAMADA A, HORII M, YOKOYAMA A, NISHIMURA H, LEE SY, MIWA M, DOITA M, KUROSAKA M, ASAHARA T. Fracture induced mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for bone healing. *J Cell Physiol* 2008;215(1):234–242.
- MATTHEWS LS, HIRSCH C. Temperatures measured in human cortical bone when drilling. *J Bone Joint Surg Am* 1972;54(2):297–308.
- MAYR-WOHLFART U, WALTENBERGER J, HAUSSER H, KESSLER S, GUNTHER KP, DEHIO C, PUHL W, BRENNER RE. Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. *Bone* 2002;30(3):472–477.
- MCCARTHY I. The physiology of bone blood flow: a review. *J Bone Joint Surg Am* 2006;88(Suppl3):4-9.

- MCLAREN J, PRENTICE A, CHARNOCK-JONES DS, MILLICAN SA, MULLER KH, SHARKEY AM, SMITH SK. Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. *J Clin Invest* 1996;98(2):482-489.
- MEISINGER C, WILDNER M, STIEBER J, HEIER M, SANGHA O, DORING A. Epidemiology of limb fractures. *Orthopade* 2002;31(1):92-99.
- MELING T, HARBOE K, ENOKSEN CH, AARFLOT M, ARTHURSSON AJ, SØREIDE K. How reliable and accurate is the AO/OTA comprehensive classification for adult long-bone fractures? *J Trauma Acute Care Surg* 2012;73(1):224-231.
- MENDEZ-FERRER S, MICHURINA TV, FERRARO F, MAZLOOM AR, MACARTHUR BD, LIRA SA. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010;466(7308):829-834.
- MENTEN P, WUYTS A, VAN DAMME J. Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine & growth factor reviews*. 2002;13(6):455-481.
- MILLS SJ, COWIN AJ, KAUR P. Pericytes, mesenchymal stem cells and the wound healing process. *Cells* 2013;2(3):621-634.
- MOHR VD, EICKHOFF U, HAAKER R. External fixation of open femoral shaft fractures. *J Trauma* 1995;38(4):648-652.
- MOUNTZIARIS PM, MIKOS AG. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 2008;14(2):179-186.
- MOUSAVI M, DAVID R, SCHWENDENWEIN I, SCHADEN E, MARLOVITS S, KOLONJA A, SCHWANZER E, HEINZ T, VECSEI V. Influence of controlled reaming on fat intravasation after femoral osteotomy in sheep. *Clin Orthop Relat Res* 2002;394:263-270.
- MÜLLER ME, NAZARIAN S, KOCH P. Classification AO des fractures. *Tome I. Les os longs* 1987;1st ed. Berlin: Springer-Verlag.
- MÜLLER C, MCIF T, RAHN BA, PFISTER U, WELLER S. Intramedullary pressure, strain on the diaphysis and increase in cortical temperature when reaming the femoral medullary cavity--a comparison of blunt and sharp reamers. *Injury* 1993;24 Suppl 3:S22-30.
- NAKAMURA T, HARA Y, TAGAWA M, TAMURA M, YUGE T, FUKUDA H, NIGI H. Recombinant human basic fibroblast growth factor accelerates fracture healing by enhancing callus remodeling in experimental dog tibial fracture. *J Bone Miner Res* 1998;13(6):942-949.
- NASH TJ, HOWLETT CR, MARTIN C, STEELE J, JOHNSON KA, HICKLIN DJ. Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. *Bone* 1994;15(2):203-208.
- NAUTA AJ, FIBBE WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 2007;110(10):3499-3506.
- OE K, MIWA M, SAKAI Y, LEE SY, KURODA R, KUROSAKA M. An in vitro study demonstrating that haematomas found at the site of human fractures contain progenitor cells with multilineage capacity. *J Bone Joint Surg Br* 2007;89(1):133-138.
- ORLANDINI M, SPREA CO, A, BARDELLI M, ROCCHIGIANI M, SALAMEH A, NUCCIOTTI S,

CAPERUCCI C, FREDIANI B, OLIVIERO S. Vascular endothelial growth factor-D activates VEGFR-3 expressed in osteoblasts inducing their differentiation. *J Biol Chem* 2006;281(26):17961–17967.

O'TOOLE RV, DANCY L, DIETZ AR, POLLAK AN, JOHNSON AJ, OSGOOD G, NASCONE JW, SCIADINI MF, CASTILLO RC. Diagnosis of Femoral Neck Fracture Associated With Femoral Shaft Fracture: Blinded Comparison of Computed Tomography and Plain Radiography. *J Orthop Trauma* 2013;27(6):325–330.

OWEN M, FRIEDENSTEIN AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* 1988;136:42–60.

PAPE HC, GIANNOUDIS P. The biological and physiological effects of intramedullary reaming. *J Bone Joint Surg Br* 2007;89-B:1421–1426.

PERREN SM. Fracture healing: fracture healing understood as the result of a fascinating cascade of physical and biological interactions. Part II. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech* 2015;82(1):13–21.

PHILLIPS AM. Overview of the fracture healing cascade. *Injury* 2005;36(3S):S5–7.

PIRES RES, FERNANDES HJA, BELLOTI JC, BALBACHEVSKY D, FALOPPA F, REIS FB. Como são tratadas as fraturas diafisárias fechadas do fêmur no Brasil? Estudo transversal. *Acta Ortopédica Brasileira* 2006;14(3):165–169.

PITTENGER MF. MSCs: science and trials. *Nat Med* 2013;19(7):811.

RADOMSKY ML, THOMPSON AY, SPIRO RC, POSER JW. Potential role of fibroblast growth factor in enhancement of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 1998;(355 Suppl):S283–293.

RAPPOLEE DA, MARK D, BANDA MJ, WERB Z. Wound macrophages express TGF- α and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science* 1988;241(4866):708–712.

REICHERT IL, MCCARTHY ID, HUGHES SP. The acute vascular response to intramedullary reaming. Microsphere estimation of blood flow in the intact ovine tibia. *J Bone Joint Surg Br* 1995;77(3):490–493.

RHINELANDER FW. Tibial blood supply in relation to fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 1974;105:34–81.

RICCI WM, DEVINNEY S, HAIDUKEWYCH G. Trochanteric nail insertion for the treatment of femoral shaft fractures. *J Orthop Trauma* 2005;19(8):511–517.

ROM WN, BASSET P, FELS GA, NUKIWA T, TRAPNELL BC, CRYSLAL RG. Alveolar macrophages release an insulin-like growth factor I-type molecule. *J Clin Invest* 1988;82(5):1685–1693.

ROSS R, MASUDA J, RAINES EW, GOWN AM, KATSUDA S, SASAHARA M, MALDEN LT, MASUKO H, SATO H. Localization of PDGF-B protein in macrophages in all phases of atherogenesis. *Science* 1990;248(4958):1009–1012.

RUDLOFF MI, SMITH WR. Intramedullary nailing of the femur: current concepts concerning reaming. *J Orthop Trauma* 2009;23:S12–17.

RÜEDI TP, BUCKLEY RE, MORAN CG. AO Principles of Fracture Management. *Thieme Publishing*. 2007.

SACCHETTI B, FUNARI A, MICHIEZI S, DI CESARE S, PIERSANTI S, SAGGIO I, TAGLIAFICO E, FERRARI S, ROBEY PG, RIMINUCCI M, BIANCO P. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* 2007;131(2):324–336.

SACCHETTI B, FUNARI A, REMOLI C, GIANNICOLA G, KOGLER G, LIEDTKE S, COSSU G, SERAFINI M, SAMPAOLESI M, TAGLIAFICO E, TENEDINI E, SAGGIO I, ROBEY PG, RIMINUCCI M, BIANCO P. No identical “mesenchymal stem cells” at different times and sites: human committed progenitors of distinct origin and differentiation potential are incorporated as adventitial cells in microvessels. *Stem Cell Reports* 2016;6(6):897-913.

SASAKI S, MIYAKOSHI N, HONGO M. Low-energy diaphyseal femoral fractures associated with bisphosphonate use and severe curved femur: a case series. *J Bone Miner Metab* 2012;30(5):561-567.

SCHMIDMAIER G, HERRMANN S, GREEN J. Quantitative assessment of growth factors in reaming aspirate, iliac crest, and platelet preparation. *Bone* 2006;39(5):1156-1163.

SCHMIDT-BLEEK K, SCHELL H, LIENAU J, SCHULZ N, HOFF P, PFAFF M, SCHMIDT G, MARTIN C, PERKA C, BUTTGEREIT F, VOLK HD, DUDA G. Initial immune reaction and angiogenesis in bone healing. *J Tissue Eng Regen Med* 2014;8(2):120-130.

SCHMIDT-BLEEK K, KWEE BJ, MOONEY DJ, DUDA GN. Boon and Bane of Inflammation in Bone Tissue Regeneration and Its Link with Angiogenesis. *Tissue Eng Part B Rev.* 2015;21(4):354-364.

SHA M, GUO Z, FU J, LI J, YUAN CF, SHI L, LI SJ. The effects of nail rigidity on fracture healing in rats with osteoporosis. *Acta Orthop* 2009;80(1):135-138.

SHROEDER JE, MOSHEIFF R, KHOURY A, LIEBERGALL M, WEIL YA. The outcome of closed, intramedullary exchange nailing with reamed insertion in the treatment of femoral shaft nonunions. *J Orthop Trauma* 2009;23(9):653-657.

SMITH PN, LEDITSCHKE A, MCMAHON D. Monitoring and controlling intramedullary pressure increase in long bone instrumentation: a study on sheep. *J Orthop Res* 2008;26(10):1327–1333.

SMITH RM, GIANNOUDIS PV, BELLAMY MC. Interleukin-10 release and monocyte human leukocyte antigen-DR expression during femoral nailing. *Clin Orthop Relat Res* 2000;373:233–240.

STREET J, BAO M, DEGUZMAN L, BUNTING S, PEALE FV JR, FERRARA N, STEINMETZ H, HOEFFEL J, CLELAND JL, DAUGHERTY A, VAN BRUGGEN N, REDMOND HP, CARANO RA, FILVAROFF EH. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(15):9656–9661.

TAKAYANAGI H. Osteoimmunology and the effects of the immune system on bone. *Nat Rev Rheumatol* 2009;5(12):667-676.

TOKUNAGA A, OYA T, ISHII Y, MOTOMURA H, NAKAMURA C, ISHIZAWA S. PDGF receptor beta is a potent regulator of mesenchymal stromal cell function. *Journal of bone and mineral research* 2008;23(9):1519-1528.

TORNETTA P 3RD, KAIN MS, CREEVY WR. Diagnosis of femoral neck fractures in patients with a femoral shaft fracture. Improvement with a standard protocol. *J Bone Joint Surg Am* 2007;89A:39-43.

TOUPADAKIS CA, GRANICK JL, SAGY M, WONG A, GHASSEMI E, CHUNG DJ, ORJESSON DL, YELLOWLEY CE. Mobilization of endogenous stem cell populations enhances fracture healing in a

murine femoral fracture model. *Cytotherapy* 2013;15(9):1136-1147.

UENO M, UCHIDA K, SAITO W, MATSUSHITA O, YOGORO M, NISHI N. Acceleration of bone union after structural bone grafts with a collagen-binding basic fibroblast growth factor anchored-collagen sheet for critical-size bone defects. *Biomedical materials*. 2014;9(3):035014.

VANDEN BERG-FOELS WS. In situ tissue regeneration: chemoattractants for endogenous stem cell recruitment. *Tissue Eng Part B Rev* 2014;20(1):28-39.

WANG T, WANG Y, MENENDEZ A, FONG C, BABEY M, TAHIMIC CG. Osteoblast-Specific Loss of IGF1R Signaling Results in Impaired Endochondral Bone Formation During Fracture Healing. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2015;30(9):1572-1584.

WEBB LX, WINQUIST RA, HANSEN ST. Intramedullary nailing and reaming for delayed union or nonunion of the femoral shaft. A report of 105 consecutive cases. *Clin Orthop Relat Res* 1986;212:133-41.

WEBB LX, GRISTINA AG, FOWLER HL. Unstable femoral shaft fractures: a comparison of interlocking nailing versus traction and casting methods. *J Orthop Trauma* 1988;2(1):10-12.

WEISS RJ, MONTGOMERY SM, DABBAGH ZA, JANSSON KA. National data of 6409 Swedish inpatients with femoral shaft fractures: Stable incidence between 1998 and 2004. *Injury* 2009;40(3):304-308.

WEISS S, ZIMMERMANN G, PUFE T, VAROGA D, HENLE P. The systemic angiogenic response during bone healing. *Arch Orthop Trauma Surg* 2009;129(7):989-997.

WENISCH S, TRINKAUS K, HILD A. Human reaming debris: a source of multipotent stem cells. *Bone* 2005;36(1):74-83.

WESTHAUSER F, ZIMMERMANN G, MOGHADDAM S, BRUCKNER T, SCHMIDMAIER G, BIGLARI B. Reaming in treatment of non-unions in long bones: cytokine expression course as a tool for evaluation of non-union therapy. *Arch Orthop Trauma Surg* 2015;135:1107-1116.

WINQUIST RA, HANSEN ST JR. Comminuted fractures of the femoral shaft treated by intramedullary nailing. *Orthop Clin North Am* 1980;11(3):633-648.

WYNN RF, HART CA, CORRADI-PERINI C, O'NEILL L, EVANS CA, WRAITH JE, FAIRBAIRN LJ, BELLANTUONO LA. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood* 2004;104(9):2643-2645.

XIAO L, UENO D, CATROS S, HOMER-BOUTHIETTE C, CHARLES L, KUHN L. Fibroblast growth factor-2 isoform (low molecular weight/18 kDa) overexpression in preosteoblast cells promotes bone regeneration in critical size calvarial defects in male mice. *Endocrinology*. 2014;155(3):965-974.

YAYON A, KLAGSBRUN M, ESKO JD, LEDER P, ORNITZ DM. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 1991;64(4):841-848.

ZLOWODZKI M, VOGT D, COLE PA. Plating of femoral shaft fractures: open reduction and internal fixation versus submuscular fixation. *J Trauma* 2007;63(5):1061-1065.

ZUSCIK MJ, HILTON MJ, ZHANG X, CHEN D, O'KEEFE RJ. Regulation of chondrogenesis and chondrocyte differentiation by stress. *J Clin Invest* 2008;118(2):429-438.

8. Apêndices e / ou anexos

ANEXO I: Instrumento de coleta de dados

Instrumento de coleta de dados

Nome:

Número do prontuário:

Data de nascimento: ____ / ____ / ____

Sexo: () Masculino () Feminino

Peso: Altura: Comorbidades:

Mecanismo do trauma:

Classificação AO da fratura: **3 2** (A) (B) (C) (1) (2) (3)

Data da fratura:

Intervalo entre o trauma e a cirurgia definitiva:

Data cirurgia:

Data do processamento:

Data da consolidação (semanas):

Material: Fresa: _____ mm Haste: _____ mm X _____ mm

Fumo: () não fumante () fumante

Medicamentos: AINE: () não () sim. Qual?

Corticoides: () não () sim. Qual?

Anticoagulantes: () não () sim. Qual?

Anticonvulsivantes: () não () sim. Qual?

Estatinas: () não () sim. Qual?

Outros: () não () sim. Qual?

Complicações pós operatória: () não () sim. Qual?

Revisão 4ª semana:	Dor no local de fratura: () não () sim	Transfere carga para o membro: () não () sim
	Anda sem apoio: () não () sim	Radiografias:(3 pontes ósseas): () não () sim

Revisão 8ª semana:	Dor no local de fratura: () não () sim	Transfere carga para o membro: () não () sim
	Anda sem apoio: () não () sim	Radiografias:(3 pontes ósseas): () não () sim

Revisão 12ª semana:	Dor no local de fratura: () não () sim	Transfere carga para o membro: () não () sim
	Anda sem apoio: () não () sim	Radiografias:(3 pontes ósseas): () não () sim

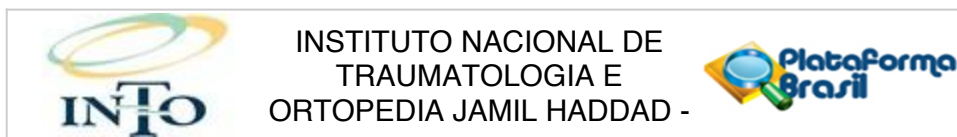
Revisão 16ª semana:	Dor no local de fratura: () não () sim	Transfere carga para o membro: () não () sim
	Anda sem apoio: () não () sim	Radiografias:(3 pontes ósseas): () não () sim

Revisão 20ª semana:	Dor no local de fratura: () não () sim	Transfere carga para o membro: () não () sim
	Anda sem apoio: () não () sim	Radiografias:(3 pontes ósseas): () não () sim

Revisão 24ª semana:	Dor no local de fratura: () não () sim	Transfere carga para o membro: () não () sim
	Anda sem apoio: () não () sim	Radiografias:(3 pontes ósseas): () não () sim

Revisão 30ª semana:	Dor no local de fratura: () não () sim	Transfere carga para o membro: () não () sim
	Anda sem apoio: () não () sim	Radiografias:(3 pontes ósseas): () não () sim

ANEXO II: Parecer emitido pelo CEP do INTO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do potencial osteogênico do hematoma fraturário de ossos longos após fresagem para inserção de haste intramedular.

Pesquisador: Leonardo Rosa da Rocha

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 57945916.7.0000.5273

Instituição Proponente: Instituto Nacional de Traumatologia - Ortopedia / INTO / SAS/ MS - RJ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.664.204

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisador do INTO, vinculado ao Centro de Trauma do Adulto, envolvendo a análise do material do fresado medular em relação ao seu potencial osteogênico.

Objetivo da Pesquisa:

O estudo possui 4 objetivos:

- 1) Avaliar os efeitos da fresagem do canal medular na viabilidade celular, frequência de osteoprogenitores e concentração de mediadores inflamatórios; e osteoindutores no foco fraturário em comparação ao hematoma pré cirúrgico.
- 2) Avaliar, por citometria de fluxo, a viabilidade do fresado medular em comparação ao hematoma pré cirúrgico;
- 3) Determinar a frequência de osteoprogenitores no fresado medular e no hematoma pré cirúrgico através de ensaio clonogênico e citometria de fluxo;
- 4) Avaliar a concentração de mediadores inflamatórios e fatores osteoindutores nos sobrenadantes do fresado medular e do hematoma pré cirúrgico por ELISA.

Endereço: Avenida Brasil, nº 500

Bairro: São Cristóvão

CEP: 20.940-070

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2134-5000

Fax: (21)2134-5228

E-mail: cep.into@into.saude.gov.br



INSTITUTO NACIONAL DE
TRAUMATOLOGIA E
ORTOPEDIA JAMIL HADDAD -



Continuação do Parecer: 1.664.204

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O estudo permitirá compreender melhor a composição celular e mediadores inflamatórios presentes no fresado medular e que colaboram para o processo de consolidação de fraturas. O procedimento de fresagem já é de rotina no tratamento de fraturas diafisárias. Desse modo, os riscos associados à pesquisa são os mesmos inerentes ao procedimento e incluem: Eventos tromboembólicos, necrose ossea, infecção. Não houve descrição de tais complicações.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa extremamente relevante e de interesse para o INTO.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Pesquisa está sendo realizada conforme aprovação pelo CEP.

Recomendações:

Nada a acrescentar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nada a acrescentar.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_425509.pdf	18/07/2016 22:49:17		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	TESE14072016.docx	18/07/2016 22:47:52	Leonardo Rosa da Rocha	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	18/07/2016 22:42:07	Leonardo Rosa da Rocha	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Doc2.pdf	18/07/2016 22:27:10	Leonardo Rosa da Rocha	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	18/07/2016 22:23:27	Leonardo Rosa da Rocha	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Avenida Brasil, nº 500

Bairro: São Cristóvão

CEP: 20.940-070

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2134-5000

Fax: (21)2134-5228

E-mail: cep.into@into.saude.gov.br

ANEXO III: Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).



MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Avaliação do potencial osteogênico do hematoma fraturário após fresagem de ossos longos
(De acordo com as normas da Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466 de 12/12/2012)

Você está sendo convidado para participar da pesquisa “**Avaliação do potencial osteogênico do hematoma fraturário após fresagem de ossos longos**”. Você foi selecionado e sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

O objetivo deste estudo é avaliar o benefício de fazer a fresagem do canal medular do fêmur com um material específico que é a fresa. Sua participação nesta pesquisa consistirá em ser submetido ao tratamento cirúrgico que é proposto para o seu problema, será realizada a estabilização da sua fratura com uma haste intramedular bloqueada.

Quando a cirurgia estiver pronta para seu início, será feita a coleta por aspiração com seringa, 05 (cinco) mililitros de sangue, o mesmo procedimento será repetido ao final da cirurgia, sendo colhido mais 05 (cinco) mililitros de sangue.

Os riscos relacionados a essa aspiração, são pequenos, podendo ficar dolorido e/ou aparecer uma equimose no local da punção com a agulha. Não havendo risco de lesão de estruturas. Tais alterações costumam durar por um a três dias e normalmente cessam com compressa gelada e uso de analgésico. Os benefícios relacionados com a sua participação são: promover melhores resultados com o uso deste procedimento, aumentando o nosso conhecimento sobre o seu uso e os pacientes que venham utilizá-la no futuro. Tal procedimento possui custo elevado no mercado e a comprovação de seus benefícios permitirá que enfatizemos a sua distribuição pelo Sistema Único de Saúde para paciente que não disponham de recursos financeiros para a sua aquisição.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados da pesquisa serão divulgados de forma a não possibilitar sua identificação. Todos os questionários e avaliações serão identificados por sequência numérica de forma que somente os pesquisadores terão acesso ao nome dos pacientes envolvidos.

Este Termo foi redigido em duas vias, sendo uma para o participante e outra para o pesquisador, onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal e do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP. Você poderá esclarecer suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento através dos números dos telefones ou endereço de e-mail disponível neste Termo.

Rio de Janeiro, _____ de _____ de _____.

Pesquisador Responsável: Dr. Leonardo Rosa da Rocha
Endereço: INTO – Centro de Trauma Ortopédico – Av. Brasil, 500 – Ambulatório do Trauma
Telefone: 2134-5144

Responsável pela aplicação do termo
Assinatura e carimbo

Folha 1 de 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Avaliação do potencial osteogênico do hematoma fraturário após fresagem de ossos longos

(De acordo com as normas da Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466 de 12/12/2012)

Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do INTO.

Endereço: Avenida Brasil nº 500, 9º andar – sala nº 4 – São Cristóvão – Rio de Janeiro – RJ –
CEP: 20940-070 - Telefone: 21 2134-5000 - e-mail: cep.into@into.saude.gov.br

Declaro que eu tive tempo de ler com calma e pensar sobre as informações contidas neste formulário antes de aceitar entrar para o estudo. Este foi explicado com clareza e desta forma entendi os objetivos e condições de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Participante da pesquisa:

Nome: _____

Data de nascimento: ____ / ____ / ____ Prontuário: _____

Assinatura do participante da pesquisa

ANEXO IV – Tempo entre a ocorrência da fratura e realização da osteossíntese, tempo de cirurgia e tempo de consolidação das fraturas.

Paciente	Tempo entre fratura e cirurgia (horas)	Duração da cirurgia (minutos)	Tempo de consolidação (semanas)
1	24	90	16
2	24	100	16
3	24	120	20
4	24	85	16
5	24	100	20
6	24	90	16
7	72	110	20
8	72	120	24
9	72	105	16
10	72	90	16
11	48	115	20
12	48	120	16
13	72	105	16
14	24	95	16
15	72	125	20

ANEXO V: Trabalho apresentado sob a forma de pôster no Orthopaedic Research Society, Orlando, Flórida, 2016.

Intramedullary reaming increases the frequency of CD45⁺CD31⁺CD146⁺ mesenchymal stromal cells and downmodulates the inflammatory environment in the fracture site

Leonardo R. Rocha^{1,2}, Ana C. Leal³, Rafaela C. Sartore³, Rhayra B. Dias^{1,3}, Maria Eugenia L. Duarte³, Joao M. Guimaraes², Danielle C. Bonfim^{3,4}

¹Master Program in Musculoskeletal Sciences, National Institute of Orthopedics and Traumatology, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

²Trauma Center, National Institute of Orthopedics and Traumatology, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

³Research Division, National Institute of Orthopedics and Traumatology, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

⁴Craniofacial and Skeletal Diseases Branch, National Institute of Dental and Craniofacial Research, NIH, Bethesda, Maryland, USA

Author Disclosures: All authors state they have no disclosures to declare.

Introduction: Femur fractures generally occur as the result of high energy trauma in young men and low energy trauma in elderly women. These fractures are highly prone to delayed union and non-union, thus constituting one of the major concerns at orthopedic trauma centers. Hence, safe, non-invasive, effective approaches for bone regeneration are urgently needed. It is becoming widely accepted that advances in bone regeneration therapies will likely incorporate strategies that mimic critical aspects of the natural process of fracture healing, taking into consideration not only the requirement of specific cell types and/or signaling molecules, but also the proper dose and time-window for its application. Currently, locked intramedullary nailing is the treatment of choice for the stabilization of femur shaft fractures, which have been shown to accelerate the healing process and increase union rates. These benefits have been partially attributed to the reaming procedure, which generates a significant amount of fragmented bone associated with marrow (reaming debris), that would remain in the fracture site and act as an autograft. However, as reaming results in a severe mechanical disruption of the intramedullary bone architecture, along with blood vessels and part of the hematoma, we also hypothesized that the reaming process may alter the secretion of signaling molecules involved in the initial inflammatory phase of fracture healing, improving its natural course. In an effort to better understand how the sum of reaming effects may influence healing, the present study aimed at evaluating the cellular viability of reaming debris and its composition regarding a specific population of Bone Marrow Stromal Cells (BMSCs) which harbors a subset of multipotent cells, known as the Skeletal Stem Cell (SSC). Also, we mapped the concentration of several inflammatory mediators and growth factors in the fracture site, right after the reaming procedure, in comparison with the undisturbed hematoma.

Methods: Thirteen patients, aged between 18-60 years with closed, non-infected femoral shaft fractures, and no history of autoimmune and inflammatory systemic conditions consented to participate in the study, which was approved by the Institutional Research Ethics Committee. Samples of the fracture hematoma were percutaneously aspirated under general anesthesia, previously and after the reaming procedure. The aspirates were diluted 1:5 in phosphate buffer saline and centrifuged. The supernatants were collected and stored at -80°C. Cell pellets were resuspended in DMEM containing 10% lot-selected fetal bovine serum and the total number of nucleated cells was determined. For viability evaluation, 1.0×10^6 mononuclear cells from each sample were stained with an anti-Anexin-V-FITC antibody and Propidium Iodide (PI). To determine the percentage of the CD45⁺CD31⁺CD146⁺ subpopulation, $1.0 - 5.0 \times 10^6$ mononuclear cells were stained with anti-CD45-PerCP Cy5.5, -CD31-FITC, and -CD146-PE conjugated antibodies. Both parameters were analyzed by flow cytometry. For colony forming efficiency (CFE) evaluation, a total of 2.0×10^6 mononuclear cells were plated in 25cm² tissue culture flasks and allowed to grow for 14 days. After this period, colonies were fixed, stained with crystal violet, and counted. The concentration of cytokines and growth factors in supernatants were determined by ELISA. Data were compared using either the Wilcoxon signed rank test or Paired t test after checking for normal distribution by the Kolmogorov-Smirnov test. Values were expressed as mean $\pm$ SD or median, as appropriate. *p* values < 0.05 were considered significant.

Results: Flow cytometry analysis of cells present at the fracture site showed that the percentage of viable cells (AnexinV⁺PI⁻) decreased after reaming in comparison with the original hematoma (Mean $\pm$ SD: 35.70 ± 23.77 vs 57.61 ± 20.82 , respectively. *n* = 7; *p* = 0.0025) (Fig.1). Nevertheless, when cultured *in vitro* under clonal density, reaming debris originated a higher number of stromal cell colonies in the CFE assay (Mean $\pm$ SD: 42.58 ± 21.26 vs 18.75 ± 12.71 ; *n* = 7; *p* = 0.002) (Fig.2, A-G), which correlated with an increased percentage of the CD45⁺CD31⁺CD146⁺ cell fraction (Mean $\pm$ SD: 22.93 ± 21.27 vs 12.62 ± 19.55 ; *n* = 6; *p* = 0.03) (Fig. 2, H-J). Analysis of cytokines and growth factors in supernatants (Table 1) showed an increase in the concentration of FGFb (Median: 12.61 vs 30.54, *n* = 9, *p* = 0.04) and an important trend of increase in PDGF-AB (Median: 60.27 vs 68.97, *n* = 10, *p* = 0.06) after reaming. We also observed a significant decrease of CCL-4 (Median: 19.87 vs 5.465, *n* = 10, *p* = 0.01), IL-6 (Median: 74.93 vs 53.49, *n* = 10, *p* = 0.05), and MCP-1 (Median: 34.35 vs 5.625, *n* = 10, *p* = 0.02) (Fig.3).

Discussion: Our findings demonstrate that although reaming generates a biological material with inferior overall viability than the undisturbed hematoma, it is still significantly enriched with viable BMSCs. This enrichment is reflected in the CD45⁺ (non-hematopoietic), CD31⁺ (non-endothelial) and CD146⁺ stromal cell population, which contains a subset of SSCs. Although more committed osteoprogenitors are also needed for bone formation, only SSCs are able to self-renew and thus are fundamental for bone regeneration due to their ability to support bone turnover. Besides, reaming procedure also changes the balance of important signaling mediators. CCL-4, MCP-1, and IL-6 are proinflammatory chemoattractants, acting in the recruitment of monocytes, neutrophils, and macrophages at the initiation of the bone healing cascade. In the other hand, FGFb is one of the most prominent osteogenic and angiogenic growth factor, with the potential to induce BMSC migration, survival, proliferation, and differentiation, as well as to promote vascular regeneration. Similarly, PDGF is known to provide proliferative and migratory stimulus for BMSCs and osteoblasts. Therefore, our data collectively support the view that long bone reaming may have a favorable effect on bone repair by downmodulating the inflammatory environment and stimulating the activity of the mechanically engrafted BMSCs/SSCs at the fracture site.

Significance:

The science of bone regeneration is still in its infancy, with current or emerging therapies having significant limitations. A deeper understanding of the dynamics of healing, taking into consideration the disturbances in the endogenous process made by orthopedic treatments, is a fundamental step towards this goal.



 [Print this Page for Your Records.](#)

Thank you for confirming that you have **Read the Notification**.

Dear Dr. Leonardo Rocha:

Congratulations! Your abstract has been chosen to be a Poster at the ORS 2016 Annual Meeting at the Disney's Coronado Springs Resort in Orlando, Florida, March 5-8. Details are listed below.

POSTER SESSION #: PS1-029

POSTER SESSION TITLE: Bone - Progenitors and Stem Cells

POSTER #: 0709

POSTER TITLE: Intramedullary Reaming Increases The Frequency Of Cd45-cd31-cd146+ Mesenchymal Stromal Cells And Downmodulates The Inflammatory Environment In The Fracture Site

AUTHORS: **Leonardo R. Rocha, MD**¹, Danielle C. Bonfim^{1,2}, João M. Guimaraes¹, Maria Eugenia L. Duarte¹, Rafaela C. Sartore¹, Rhayra B. Dias¹, Ana C. Leal¹.

¹National Institute of Orthopedics and Traumatology, Rio de Janeiro, Brazil, ²National Institute of Dental and Craniofacial Research, Bethesda, MD, USA.

POSTER INFORMATION

Posters will be located in the Veracruz Exhibit Hall of the Disney's Coronado Springs Resort.

Poster Session 1 (PS1): Posters displayed Saturday and Sunday

Poster Session 2 (PS2): Posters displayed Monday and Tuesday

Posters must reflect the material summarized in your submitted abstract.

Detailed information for poster presenters - including poster set-up, dismantle, and when to stand by your poster - is available on the ORS Annual Meeting website at <http://www.ors.org/2016-poster-presenter-speaker-moderator-info/>.

****** If your Poster was selected as a NIRA finalist, you will receive a separate e-mail.