



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



Monografia

Tratamento da pseudoartrose com o uso de células-tronco: uma revisão sistemática

Jardel Teixeira da Silva

Salvador (Bahia)
Dezembro, 2014

FICHA CATALOGRÁFICA

(elaborada pela Bibl. **SONIA ABREU**, da Bibliotheca Gonçalo Moniz : Memória da Saúde Brasileira/SIBI-UFBA/FMB-UFBA)

Silva, Jardel Teixeira da

S586

Tratamento da pseudoartrose com o uso de células-tronco: uma revisão sistemática / Jardel Teixeira da Silva. (Salvador, Bahia): JT, Silva, 2014

VIII. 35 fls.: il. [fluxogr. tab. quadros].

Monografia, como exigência parcial e obrigatória para conclusão do Curso de Medicina da Faculdade de Medicina da Bahia (FMB), da Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Professor orientador: Gildásio de Cerqueira Daltro

Palavras chaves: 1. Pseudoartrose. 2. Células-Tronco. 3. Revisão Sistemática. I. Daltro, Gildásio de Cerqueira. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina da Bahia. III. Título.

CDU: 616-001.52



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



Monografia

Tratamento da pseudoartrose com o uso de células-tronco: uma revisão sistemática

Jardel Teixeira da Silva

Professor orientador: **Gildásio de Cerqueira Daltro**

Monografia de Conclusão do Componente Curricular MED-B60/2014.2, como pré-requisito obrigatório e parcial para conclusão do curso médico da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, apresentada ao Colegiado do Curso de Graduação em Medicina.

Salvador (Bahia)
Dezembro, 2014

Monografia: *Tratamento da pseudoartrose com o uso de células-tronco: uma revisão sistemática*, de **Jardel Teixeira da Silva**.

Professor orientador: **Gildásio de Cerqueira Daltro**

COMISSÃO REVISORA:

- **Gildásio de Cerqueira Daltro** (Presidente, Professor orientador), Departamento de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.
- **Alex Guedes**, Professor do Departamento de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.
- **José Valber Lima Meneses**, Professor do Departamento de Anestesiologia e Cirurgia da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.
- **Charleston Ribeiro Pinto**, Doutorando do Curso de Doutorado do Programa de Pós graduação de Medicina em Saúde (PPgMS) da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.

TERMO DE REGISTRO ACADÊMICO: Monografia avaliada pela Comissão Revisora, e julgada apta à apresentação pública no VIII Seminário Estudantil de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA, com posterior homologação do conceito final pela coordenação do Núcleo de Formação Científica e de MED-B60 (Monografia IV). Salvador (Bahia), em ____ de _____ de 2014.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”. (**Charles Chaplin**)

Dedico este trabalho aos Meus
Pais, **Valdek Mafra e Denúzia
Teixeira**, meus maiores exemplos
de vida.

EQUIPE

- Jardel Teixeira da Silva, Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA.
Correio-e: jardel.teixeiras@hotmail.com.
- Gildásio de Cerqueira Daltro, Departamento de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.
Correio-e: gildasio.daltro@yahoo.com.br.

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

➤ Faculdade de Medicina da Bahia (FMB)

FONTES DE FINANCIAMENTO

1. Recursos próprios.

AGRADECIMENTOS

- ◆ Ao meu Professor orientador, Doutor **Gildásio de Cerqueira Daltro**, pelos grandes ensinamentos passados e fundamental apoio para a realização deste trabalho.
- ◆ Aos meus Pais **Valdek Mafra da Silva** e **Denúzia Bomfim Teixeira da Silva**, meu irmão **Vitor Teixeira da Silva**, que sempre me apoiaram por toda vida.
- ◆ Ao Professor **José Tavares-Neto**, pela constante busca para uma formação médica de qualidade, incentivando e orientando em todos os momentos a produção das monografias.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FLUXOGRAMAS, QUADROS E TABELAS	2
I. RESUMO	3
II. OBJETIVOS	4
III. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	5
III.1. Terapia Celular	5
III.2. Pseudoartrose	7
IV. METODOLOGIA	9
V. RESULTADOS	11
VI. DISCUSSÃO	19
VII. CONCLUSÕES	23
VIII. SUMMARY	24
IX. REFERÊNCIAS	25

ÍNDICE DE FLUXOGRAMAS, QUADROS E TABELAS

FLUXOGRAMA:

FLUXOGRAMA 1. Seleção de artigos pesquisados no PUBMED/MEDLINE.	11
---	-----------

QUADROS:

QUADRO 1. Representação Numérica.	12
QUADRO 2. Quadro simplificado de resultados dos estudos.	17

TABELAS:

TABELA 1. Características gerais dos pacientes que receberam aspirado simples de M.O.	13
TABELA 2. Características gerais dos pacientes que receberam células mononucleares purificadas com Sepax®.	13
TABELA 3. Características gerais do artigo 2	14

I – RESUMO

Introdução: O tratamento das deformações ósseas tem sido objeto constante de estudos para os pesquisadores, dentre elas estão as fraturas não consolidadas como a pseudoartrose. Diante da evolução das técnicas de regeneração celular, a medicina regenerativa vem ganhando destaque na opção terapêutica para diversas patologias congênitas e adquiridas, assim, é observado que na área da ortopedia e traumatologia o uso de células-tronco vem seguindo caminhos promissores. **Objetivos:** Analisar a terapêutica aplicada com células-tronco para o tratamento da pseudoartrose. **Metodologia:** Trata-se de um estudo baseado em revisão sistemática de literatura desenvolvida a partir do método descritivo, de abordagem qualitativa buscando colher o conhecimento e informações científicas sobre o tratamento da pseudoartrose com uso de células-tronco, de acordo com os critérios de elegibilidade do estudo. **Resultados:** Foram selecionados 8 artigos para estudo, num total de 204 pacientes participantes destes ensaios clínicos. Observaram-se diversas técnicas de tratamento da pseudoartrose com uso de células-tronco, dentre elas infusão percutânea de aspirado de medula óssea, osteoindução de células mesenquimais de curto prazo antes da implantação nos pacientes, tratamento combinado de células mononucleares autólogos da medula óssea e do enxerto ósseo alogênico. Os resultados foram satisfatórios em relação à consolidação óssea. **Discussão:** A técnica de infusão percutânea de aspirado de medula óssea obteve consolidação em um prazo mais curto do que a osteoindução de células mesenquimais. A baixa consolidação pode estar relacionada a fatores fisiológicos gerais do paciente e eficácia do tratamento com célula-tronco está diretamente relacionada com a quantidade de células progenitoras no enxerto. **Conclusão:** A terapêutica com uso de células-tronco da medula óssea se mostrou um método seguro, simples e confiável para o tratamento da pseudoartrose.

Palavras-chaves – 1. Pseudoartrose; 2. Células-Tronco; 3. Revisão sistemática.

II - OBJETIVOS

II.1. Principal

Analisar a terapêutica aplicada com células-tronco para o tratamento da pseudoartrose.

II.2. Secundários

1. Comparar a eficácia das técnicas para regeneração óssea na pseudoartrose.
2. Informar sobre novas técnicas com potencial resultado regenerativo do tecido ósseo na pseudoartrose.

III – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

III. 1. Terapia celular

A pesquisa sobre células-tronco está na vanguarda da recente investigação biomédica e se mantém no cerne de um novo campo chamado medicina regenerativa. O entusiasmo criado pela pesquisa de célula-tronco deriva dos achados do desafio das concepções estabelecidas sobre diferenciação celular e da esperança de que as células-tronco possam ser usadas um dia para reparar tecidos humanos lesados, como o coração, cérebro, fígado e músculo esquelético (Mimeault et al., 2007).

Células primordiais, ou células-tronco, são células indiferenciadas multipotentes, com capacidade de proliferar e originar células de qualquer linhagem, formando qualquer tecido do organismo. As células-tronco podem ser classificadas em células-tronco embrionárias, que são encontradas na massa celular interna do blastocisto (embrião), ou em células-tronco somáticas ou adultas, que são encontradas em adulto (Cristante, A.F; Narazaki, D.K, 2011).

No início do desenvolvimento embrionário, a massa interna de células do blastocisto contém células-tronco pluripotenciais, essas células isoladas do blastocisto podem ser mantidas em cultura como linhagens de células indiferenciadas ou ser induzidas a se diferenciar em linhagens específicas, como as células cardíacas e hepáticas. (Laflamme et al., 2007).

As células-tronco somáticas (adultas) podem ser encontradas em tecidos que se dividem continuamente, como a medula óssea, pele e revestimento do trato gastrointestinal. Podem, também, estar presentes em órgãos como o fígado, pâncreas e tecido adiposo, nos quais, em condições normais, não produzem ativamente linhagens celulares diferenciadas. Na maioria dos tecidos, as células-tronco se dividem muito lentamente, mas existem evidências de que estejam continuamente no ciclo celular do epitélio do intestino delgado (Barker et al., 2007).

Na medula óssea existem pelo menos duas populações de células-tronco progenitoras: as células progenitoras hematopoiéticas (HSC) e as células progenitoras mesenquimais (MSC) (Forsberg et al., 2006). As HSC geram todas as linhagens celulares do

sangue, podem reconstituir a medula óssea após depleção causada por doença ou irradiação e são amplamente utilizadas para tratamento de doenças hematológicas (Bryder et al., 2006). Estas podem ser colhidas diretamente da medula óssea, do sangue do cordão umbilical e do sangue periférico de indivíduos que recebem citocinas, como o fator estimulador de colônias de granulócito-macrófago, que mobiliza as HSC (Levesque, JP; Winkler, IG, 2005).

As células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea humana (hMSC), também conhecidas como células-tronco esqueléticas, células estromais da medula óssea ou, como recentemente sugerido pela International Society for Cytotherapy, células estromais mesenquimais multipotentes, são um grupo de células clonogênicas, presentes no estroma da medula óssea, capazes de diferenciação em várias linhagens de células do tipo mesodérmico e, possivelmente, mas ainda parte de assunto controverso, em outros tipos celulares não mesodérmicos, como células neurais ou hepatócitos (Abdallah et al., 2008). Estas células, quando submetidas a diferentes estímulos, foram descritas como capazes de diferenciações como a condrogênica, adipogênica, neurogênica, cardiogênica, osteogênica (Kulterer et al., 2007).

Na área da ortopedia, o principal alvo terapêutico com células mesenquimais é a osteoporose. As células-tronco seriam utilizadas para repovoar o osso com células novas e mais funcionais (Raisz LG, 2005). Em lesões articulares com perda ou deformação de discos cartilagosos, os estudos mostram melhora das articulações pela infusão de condrócitos ou, ainda, pela reconstrução *in vitro* (Kunisaki et al., 2007). Na reumatologia, estuda-se o uso para ajudar o organismo a desenvolver nova cartilagem em doenças como lúpus eritematoso sistêmico ou artrite reumatóide, para o restabelecimento das funções normais dos tecidos afetados (Dazzi et al., 2007).

De acordo com pesquisas relacionadas com a utilização de células-tronco embrionárias, foi possível produzir diferentes tecidos para transplante a partir dessas células. Observa-se diante dos resultados a capacidade de transformar em células da medula óssea, pancreáticas, de pele, músculo, cartilagem e neurônios, entre outras (Pereira, 2008). Essas células apresentam um grande potencial em medicina regenerativa, tanto como fonte de tecidos para transplantes quanto como modelo para o estudo do desenvolvimento embrionário humano, porém, diante da polêmica utilização e manuseio das células-tronco embrionárias, no

Brasil, o uso do embrião humano foi regulamentado pela Lei de Biossegurança (Lei 11.105), de 24 de março de 2005.

Contudo, existe ainda uma busca pela identificação dos fatores que promovem a diferenciação celular, pois, através de uma possível descoberta desses, num futuro próximo, poderá se pensar na geração de tecidos e órgão para suprir diversos tecidos lesados. De acordo com a regulamentação em lei, atendendo aos requisitos, o Brasil tem a possibilidade de estender na busca de diversos tratamentos que utilizam células-tronco embrionárias.

III. 2. Pseudoartrose

A estrutura óssea é a responsável pela sustentação e a forma do corpo. O osso tem uma marcante combinação de propriedades físicas dentre as quais a resistência à tensão e à compressão, alguma elasticidade e estrutura porosa e com peso da massa sólida relativamente leve. Trata-se de um tecido em constante renovação e reconstituição e que sobressai pela sua capacidade auto-reparadora. Pode alterar sua propriedade de consolidação e a geometria trabecular em resposta a estímulos mecânicos que incidam sobre ele (Kaplan et al., 1994).

Fratura é uma solução de continuidade do tecido ósseo causado, geralmente, por traumas ou ainda doenças metabólicas, endócrinas, tumorais e infecciosas. A ação de um agente vulnerante externo, principal causa, resulta no rompimento de vasos que compõem a rede da medula óssea, bem como no dano aos tecidos circunvizinhos. Tais condições facilitam a instalação de processos necróticos, e que, por sua vez, interferem com a evolução fisiológica da cicatrização e predisõem ao aparecimento de deformidades ou a ausência da consolidação óssea (Carano RAD; Filvaroff EH, 2003).

Pseudoartrose é o termo usado para designar a não consolidação de uma fratura, quando o processo de reparação óssea, por algum motivo deixou de atuar. A falta da união das superfícies ósseas fraturadas decorre da presença de um tecido fibroso ou fibro-cartilaginoso entre as extremidades (Hietaniemi et al., 1996). Portanto, não há união dos fragmentos de uma fratura, levando à formação de uma pseudocápsula com sinóvia e líquido sinovial (Cristante, A.F; Narazaki, D.K, 2011).

A pseudoartrose pode ser dividida em dois principais tipos: hipertróficas ou hipervasculares e atróficas ou avasculares. A primeira tem como principal causa o movimento no foco de fratura, e a última, a falta de condições biológicas locais para a consolidação óssea. Nas pseudoartroses hipertróficas, o tratamento visa a melhora da estabilização da fratura, seja com gesso, órteses, osteossínteses ou fixadores externos. A vantagem dos dois últimos é que podemos, além de estabilizar, comprimir o foco. É no segundo tipo de pseudoartrose, tipo atrófico, que tem-se aplicabilidade das células-tronco como tratamento. Sabe-se que a consolidação tem três fases: I) inflamação – na qual existe a infiltração de leucócitos que determinam a quimiotaxia de células mesenquimais e fibroblastos que se diferenciarão em osteoblastos; II) reparação – na qual temos a formação de um calo mole (tecido conjuntivo frouxo-fibroblastos) e, em seguida, o calo duro (tecido ósseo imaturo); e III) remodelação – na qual se forma o tecido ósseo maduro. Assim, as células progenitoras interfeririam nas duas primeiras fases (Rahaman MN; Mao JJ, 2005).

Apesar do desenvolvimento de numerosas técnicas de reparação óssea na cirurgia traumatológica, ainda é bastante desafiador a busca da melhor terapêutica a ser utilizada para o tratamento dos grupos de fraturas que apresentam alterações no processo de consolidação e que culminam em pseudoartrose. Estima-se que cerca de 5 a 10% das fraturas de ossos longos evoluem para a disfunção no processo de consolidação, sendo mais comum na tíbia, fíbula e úmero (Reis et al., 2005).

Portanto, o tratamento das deformações ósseas tem sido objeto constante de estudos para os pesquisadores. Diante da evolução da genética e das técnicas de regeneração celular, a medicina regenerativa vem ganhando destaque na opção terapêutica para diversas patologias congênitas e adquiridas, assim, é observado que na área da ortopedia o uso de células-tronco vem seguindo caminhos promissores. Por fim, este trabalho se justifica pela importância de se entender alguns aspectos da situação do tratamento da pseudoartrose com o uso de células-tronco, favorecendo então a compreensão dos principais benefícios e possíveis dificuldades para a eficácia no tratamento, avaliando o grau de satisfação dos pacientes submetidos aos procedimentos terapêuticos.

IV- METODOLOGIA

Trata-se de um estudo baseado em revisão sistemática de literatura desenvolvida a partir do método descritivo, de abordagem qualitativa buscando colher o conhecimento e informações científicas sobre o tratamento da pseudoartrose com uso de células-tronco.

IV.1 Fontes de informação usadas na pesquisa de literatura

Foram selecionados artigos por busca no PUBMED/MEDLINE através do endereço eletrônico <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Na base de dados do SCIELO não foram identificados artigos que estivessem no critério de inclusão.

IV.2 Elegibilidade dos estudos para serem incluídos na revisão sistemática

Foram selecionados artigos publicados nos últimos 17 anos, que estão disponíveis nos idiomas em português, espanhol, francês ou inglês, cujos desenhos de estudo foram ensaios clínicos em humanos coorte e caso-controle, que estavam disponíveis com o texto completo de artigo.

IV.3 Estratégias usadas para pesquisa da literatura

Foram realizadas duas buscas no banco de dados do PUBMED. Os seguintes termos descritores foram utilizados na primeira busca da pesquisa: *pseudarthrosis stem cells [All fields]*, *pseudarthrosis treatment [All fields]*. A estratégia utilizada na segunda busca foi utilizar os descritores secundários: *non union bone [All fields]*, *bone regeneration [Title/Abstract]*, *bone marrow mesenchymal [Title/Abstract]*. Foram incluídos na revisão os artigos pertinentes aos critérios de elegibilidade.

IV.4 Processo de seleção dos estudos para a revisão sistemática

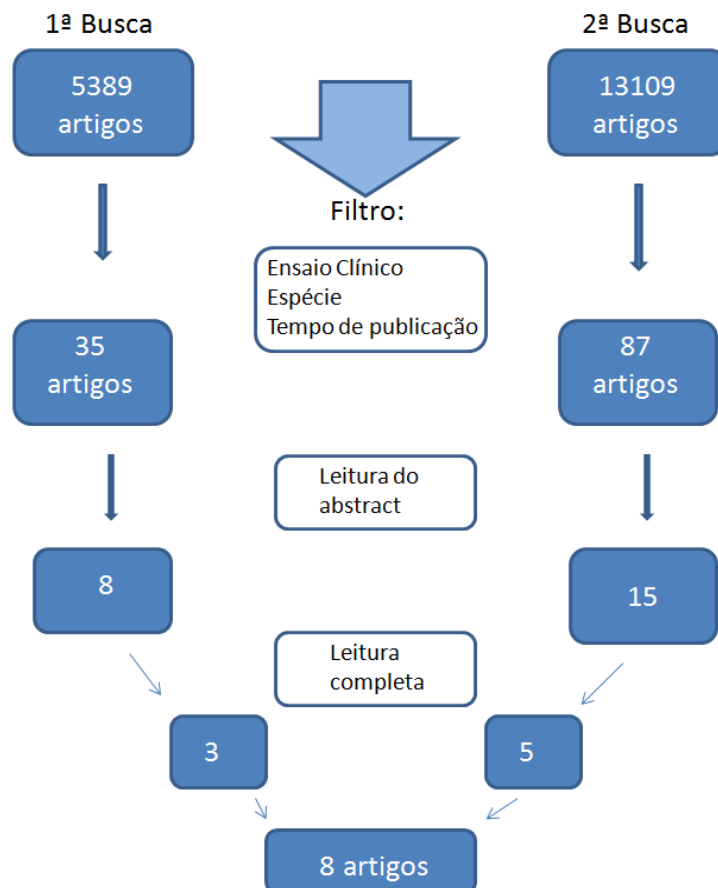
Os artigos que não foram excluídos através da triagem por títulos e resumos foram avaliados de forma completa para definição de critério de elegibilidade. A avaliação foi feita por uma única pessoa, considerando o conteúdo do artigo, caso este comparasse o tratamento da pseudoartrose com o uso de terapia celular levando em conta o resultado da consolidação

óssea, assim o mesmo seria adicionado. Os critérios de exclusão foram: artigos publicados fora do período pré-estabelecido, outros desenhos de estudos, idiomas não estabelecido na pesquisa, ausência de mensuração dos desfechos de interesse e exclusão dos artigos não gratuitos.

V- RESULTADOS

De acordo com os descritores da primeira estratégia de busca no PUBMED, foram encontrados 8 artigos após ser filtrados por tempo de publicação, tipo de estudo e estudo em humanos, além de leitura do *abstract*. Posteriormente na segunda estratégia de busca, a partir dos descritores secundários, foram encontrados 15 artigos após leitura do abstract e passados pelos mesmos filtros da primeira busca. Com a leitura completa destes 23 artigos selecionados, foram eleitos 8 artigos que estavam dentro dos critérios de elegibilidade do estudo.

Fluxograma 1: Seleção de artigos pesquisados no PUBMED/MEDLINE



Para facilitar a compreensão dos resultados dos artigos e apresentação, cada artigo receberá uma representação numérica de acordo com o quadro 1.

Quadro 1 - Representação Numérica

Artigo	Autor/Ano	Número	Origem
“Cell therapy of pseudarthrosis.”	Bastos et al., 2012	1	Brasil
“Use of autologous human mesenchymal stromal cell/fibrin clot constructs in upper limb non-unions: long-term assessment.”	Giannotti et al., 2013	2	Itália
“Repair of long-bone pseudoarthrosis with autologous bone marrow mononuclear cells combined with allogenic bone graft.”	Fernandez et al., 2013	3	Espanha
“Attempt to treat congenital pseudarthrosis of the tibia with mesenchymal stromal cell transplantation.”	Tikkanen et al., 2010	4	Finlândia
“Pseudarthrosis treated by percutaneous autologous bone marrow graft.”	Hernigou et al., 1997	5	França
“Percutaneous treatment of long bone nonunions: the use of autologous bone marrow and allograft bone matrix.”	Wilkins et al., 2003	6	Estados Unidos
“Percutaneous bone marrow grafting for the treatment of tibial non-union.”	Goel et al., 2005	7	Reino Unido
“Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells.”	Hernigou et al., 2005	8	França

O artigo 1, de Bastos et al. (2012), visou avaliar a segurança e a eficácia da terapia celular para o tratamento da pseudoartrose. Foi feito um implante de aspirado simples autólogo de medula óssea em comparação com a infusão de células mononucleares purificadas utilizando um sistema de isolamento celular chamado Sepax®, onde esse visa

minimizar o fator humano e aumentar a reprodutibilidade hematopoiética e mesenquimais progenitoras. Foram tratados cerca de seis pacientes com pseudoartrose da tíbia ou fêmur no Hospital Antônio Pedro da Universidade Federal Fluminense. Quatro receberam uma infusão percutânea do aspirado da medula óssea autóloga, advinda da crista ilíaca, constituindo assim o Grupo I e dois receberam células mononucleares purificadas da medula óssea autóloga através do uso de Sepax®, Grupo II. O primário método de fixação não foi alterado, usavam molde de gesso, prego intramedular ou fixador externo e o foco da não união óssea não estavam expostos. O exame físico e radiografias foram realizadas 2, 4 e 6 meses após o tratamento com o mesmo médico. Após a consolidação da fratura a satisfação dos pacientes foi estimada utilizando a escala QALY adaptado, observada nas tabelas 1 e 2. De acordo com os resultados, não houve complicações referentes ao uso dos procedimentos utilizados e a consolidação óssea foi obtida em todos os casos dentro de 3 a 24 semanas. O grau de satisfação do paciente antes e após a consolidação óssea foi avaliada e obteve uma média de valor crescente de dois para nove.

Tabela 1: Grupo I – Características gerais dos pacientes que receberam aspirado simples de M.O.

Paciente	Osso afetado	Tempo de Pseudoartrose (semanas)	Tempo de consolidação (semanas)	Satisfação antes da cirurgia (0-10)	Satisfação depois da cirurgia (0 – 10)
I	Fêmur	56	24	5	8
II	Tíbia	24	03	3	10
III	Tíbia	136	16	3	9
IV	Tíbia	32	12	0	9
Média	-	62	13.75	2.75	9

Adaptado de Bastos et al. (2012)

Tabela 2: Grupo II – Características gerais dos pacientes que receberam células mononucleares purificadas com Sepax®.

Paciente	Osso afetado	Tempo de Pseudoartrose (semanas)	Tempo de consolidação (semanas)	Satisfação antes da cirurgia (0-10)	Satisfação depois da cirurgia (0 – 10)
V	Tíbia	68	16	0	8
VI	Tíbia	68	12	2	9
Média	-	68	14	1	8.5

Adaptado de Bastos et al. (2012)

Produzido por Giannotti et al. (2013), o artigo 2 pesquisou a eficácia e segurança do (ex vivo) de células mesenquimais da medula óssea (MSC). Essa é uma técnica de

proliferação osteogênica incorporadas aos coágulos de fibrina autólogas, sendo utilizadas em pacientes com pseudoartrose atrófica do membro superior, sendo observados possíveis resultados a longo prazo. O trabalho baseou exclusivamente na osteoindução das células mesenquimais de curto prazo antes da implantação. Foram isoladas MSCs de medula óssea de cerca de oito pacientes, onde foram expandidas (ex vivo) a curto prazo, em condições de cultura à base de autólogos diferenciados para células osteogênicas. A cicatrização radiográfica foi avaliada em curto e longo prazo de seguimento. Todos os pacientes recuperaram a função do membro, com nenhuma evidência de crescimento excessivo do tecido ou formação de tumores.

Tabela 3: Características gerais do artigo 2.

Paciente	Sexo	Idade	Tempo de consolidação radiográfica (meses)
I	F	45	5
II	M	27	3.5
III	F	73	5
IV	M	61	10
V	M	51	7.5
VI	M	46	6
VII	F	18	5
VIII	F	31	6

Adaptado de Giannotti et al. (2013)

O terceiro artigo é um estudo espanhol, onde Fernandez et al. (2013) objetiva a consolidação óssea no casos de pseudoartrose de ossos longos. A consolidação proposta advém da utilização de células mononucleares da medula óssea com potencial pró-angiogênico e pró-osteogênico combinado com o enxerto de osso esponjoso alogênico, assim promovendo comparação com o tratamento usual de enxerto ósseo autólogo, visando eliminar as principais limitações desse último tais como: a quantidade limitada de ossos que pode ser feita e a maior morbidade do local doador. Foram tratados cerca de sete pacientes com o combinado de células mononucleares da medula óssea e enxerto ósseo esponjoso alogênico congelado, esse último obtido a partir do banco de tecidos. Obtiveram como resultados a consolidação óssea completa em todos os pacientes em cerca de 5,3 meses (intervalo, 2-9 meses) após o transplante de células, além disso, a dor do membro referidas antes do tratamento desapareceu em todos eles. O tempo médio de acompanhamento foi de cerca de 35,8 meses após o transplante (intervalo de 24-51 meses) sem recorrência da pseudoartrose ou dor.

Produzido por Tikkanen et al. (2010), o quarto artigo avalia o uso do tratamento de células mesenquimais (MSC) num possível tratamento para a pseudoartrose congênita da tíbia (CPT), causada por neurofibromatose tipo 1 (NF1), doença refratária que ocorre na infância. Foram estudados dois casos que falharam em todas as tentativas terapêuticas anteriores, assim os pacientes foram tratados com (MSC) antes da amputação já elucidada. O (MSC) de medula óssea foram colhidos a partir da crista ilíaca e cultivadas em meio osteoindutor durante 3 semanas, após o cultivo, foram transplantados para tíbia e em torno da linha de ressecção óssea. Após o transplante de MSC, os pacientes foram monitorados durante um período de acompanhamento de 10 meses. Por razões clínicas não relacionadas ao transplante de células, tais como a nova infecção, pseudoartrose e encurtamento grave da perna, ambos os membros foram finalmente amputado e amostras ósseas foram analisadas para avaliar os efeitos e a segurança da terapia com células MSC. Obtiveram como resultados do estudo uma normalização na remodelação óssea e promoveu a reabsorção óssea e melhora da estrutura global de osso. O número de osteoclastos no osso cortical foi duas vezes mais elevada em comparação com a situação antes da transferência monitorizada, além disso, o conteúdo mineral do osso foi melhorado após o transplante. Não foi observado sinal de formação óssea anormal ou transformação maligna.

O artigo 5 é um estudo francês, promovido por Hernigou et al. (1997), que tem como objetivo a avaliação da medula óssea do paciente em relação ao estroma medular e compartimento hematopoiético. Neste estudo, buscou-se avaliar as anomalias sistêmicas que possam explicar a susceptibilidade a não união óssea, constituindo a não consolidação mesmo após o tratamento com células-tronco. Também foi comparada a atividade in vitro de medula óssea retirada de sítios não união com o de amostras colhidas a partir da crista ilíaca, do mesmo paciente. Foram incluídos seis grupos: vinte e seis casos de não união pós-traumático, dois casos de não união seguintes artrodese do joelho para prótese infectada, um caso de uma não união de uma artrodese tibiotársica, quatro casos de extensões illizarov regenerados, que mostraram nenhuma evidência de ossificação três meses após a operação, dois de pacientes que sofrem de anomalias congênitas. As amostras foram tomadas a partir de uma população de 30 "doadores de medula óssea", para atuar como controles para as amostras da crista ilíaca. Os resultados obtidos foram relevantes na comparação com os casos controles, onde a densidade de células da medula óssea, o números de células progenitoras obtidas, e em geral a principal fonte de células mesenquimais (MSCs) o CFU-F eram menores que o dos controle.

Em 8 casos foram outros fatores ou doenças que possivelmente contam para a anormalidade, como a idade (2 casos), intoxicação alcoólica claro (1 caso), o tabagismo pesado (2 casos), história de quimioterapia (2 casos) e doença de Lobstein (1 caso).

O artigo 6 é um estudo prospectivo, produzido por Wilkins et al. (2003) nos EUA, onde foram avaliados 66 pacientes com fraturas não consolidadas (sem movimentação rigorosa) em ossos longos. A única intervenção terapêutica foi a administração percutânea de uma mistura de medula óssea autóloga e enxerto de matriz óssea desmineralizada em regime de ambulatorio. Na avaliação dos resultados, obtiveram a maior união óssea em 61 pacientes num período de 8,1 meses.

Um estudo do Reino Unido, Goel et al. (2005) promove uma avaliação da eficácia do enxerto de medula óssea percutânea através de um estudo prospectivo, foram estudados pacientes com perda de consolidação tibial mínima, enquanto estes esperam pelo procedimento cirúrgico aberto. Um número de 20 pacientes foram tratados com injeção de medula óssea percutânea, juntamente com anestesia local. A medula óssea foi obtida a partir da crista ilíaca, cerca de 3-5 ml de medula foi aspirada e injetada imediatamente para e sobre o local da não união. Os resultados revelaram união óssea clínica e radiológica após a injeção percutânea em 15 dos 20 pacientes (75%), com um tempo médio de união após a primeira injeção de 14 semanas.

O artigo 8, de Hernigou et al. (2005), teve como objetivo avaliar o número e concentração de células progenitoras que foram transplantadas para o tratamento de pseudoartrose, o volume de calo obtido após o transplante, e a taxa de cura clínica. Foi utilizada para o estudo aspirado medula óssea da crista ilíaca anterior, onde foram concentradas num separador e aplicadas em 60 pacientes com não união atrófica da tibia. O número de células progenitoras que foi transplantado foi estimado pela contagem das unidades formadoras de colônias de fibroblastos. O volume de formação óssea mineralizada foi determinada pela comparação pré-operatória de exames de tomografia computadorizada com varreduras realizadas quatro meses após a injeção. Foram obtidas 53 uniões da tibia em média de 12 meses, num intervalo de 4 a 16 meses.

De acordo com os resultados obtidos dos artigos, foi feito um quadro simplificado dos resultados apresentados por cada um desses (quadro 5), juntamente com sua representação

numérica acima citada, o número total de participantes de cada pesquisa sem distinguir os grupos, o tipo de desenho de estudo aplicado por cada artigo, além do osso onde foi aplicado a terapêutica baseada em células mononucleares de aspirado de medula óssea.

Quadro 5: Quadro simplificado de resultados dos estudos.

Número do artigo	Tipo de estudo	n	Principais resultados dos estudos
1	Coorte (tíbia ou fêmur)	6	Não houve complicações em nenhum dos grupos referente ao uso dos procedimentos utilizados e a consolidação óssea foi obtida em todos os casos dentro de 3 a 24 semanas.
2	Coorte (ossos longos)	8	Foram isoladas MSCs de medula óssea de cerca de 8 pacientes, onde foram expandidas (ex vivo) a curto prazo em condições de cultura à base de autólogos diferenciados para células osteogênicas. A consolidação foi estabelecida em todos dentro em média de 6 meses.
3	Coorte (ossos longos)	7	Foram tratados cerca de 7 pacientes com o combinado de células mononucleares da medula óssea e enxerto ósseo esponjoso alogênico congelado, esse último obtido a partir do banco de tecidos. Obtiveram como resultados a consolidação óssea completa em todos os pacientes em cerca de 5,3 meses.
4	Coorte (tíbia)	2	Obtiveram como resultados do estudo uma normalização na remodelação óssea e promoveu a reabsorção óssea e melhora da estrutura global de osso.
5	Caso-controlado	35	Teve como resultado de baixa consolidação somente em 8 casos onde foram avaliados outros fatores ou doenças que possivelmente contam para a anormalidade, como a idade (2 casos), intoxicação alcoólica clara (1 caso), o tabagismo pesado (2 casos), história de quimioterapia (2 casos) e doença de Lobstein (1 caso).
6	Coorte (ossos longos)	66	Na avaliação dos resultados, obtiveram a maior união óssea em 61 pacientes num período de 8,1 meses.
7	Coorte (tíbia)	20	Os resultados revelaram união óssea clínica e radiológica após a injeção percutânea em 15 dos 20 pacientes (75%), com um tempo médio de união após a primeira injeção de 14 semanas.

Quadro 5: Quadro simplificado de resultados dos estudos (continuação).

8	Coorte (tíbia)	60	Foram obtidas 53 uniões da tíbia em média de 12 meses, num intervalo de 4 a 16 meses.
----------	-------------------	----	--

VI – DISCUSSÃO

Os principais fatores predisponentes para o retardo na consolidação ou não união são a presença de fraturas expostas (chance de 3,6 vezes maior) ou fraturas maiores que 5 cm (chance 5,7 vezes maior), comparadas as fraturas fechadas (Audige et al.,2005). Outros fatores relacionados a baixa consolidação podem ser observados, como evidencia o estudo promovido por Hernigou et al. (1997), artigo 5, onde foi observado uma redução global de células progenitoras da medula óssea, como resultado de algum problema fisiológico geral (quimioterapia, tabagismo, intoxicação alcoólica), assim interferindo na consolidação óssea.

Na análise dos artigos 6,7 e 8 produzidos por Wilkins et al, Gael et al e Hernigou et al.(2005) respectivamente, é possível observar que todos utilizaram aspirado de medula óssea e enxertia percutânea principalmente no osso da tíbia para a avaliação da consolidação óssea, assim sendo usados parâmetros clínicos e radiográficos para interpretar os resultados. Somente desses, Wilkins et al utilizou de uma técnica conjunta de enxertia de matriz óssea desmineralizada. Os resultados obtidos foram proporcionalmente semelhantes entre eles, concluindo que o enxerto de medula óssea percutânea é um método seguro, simples e confiável para o tratamento da não união óssea, além de que este método de tratamento de fraturas é tão bem sucedido quanto ao enxerto ósseo autólogo de crista ilíaca padrão e oferece as vantagens de diminuição da morbidade, custos reduzidos e menor tempo de internação. Sua eficácia parece estar relacionada com o número de células progenitoras no enxerto.

De acordo com tratamento convencional, as diretrizes da Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia e de Reumatologia recomendam que as fraturas de ossos longos não consolidadas ou com perda de correção devam ser tratadas rotineiramente com enxertia óssea autóloga ou homóloga como terapia adjuvante ao tratamento cirúrgico convencional em função da maior velocidade de consolidação óssea. As áreas doadoras mais utilizadas é a crista ilíaca posterior, anterior, o grande trocanter, o fêmur distal e a tíbia proximal (Guerra et al., 2008). Apesar das vantagens da utilização da enxertia autóloga óssea, esta técnica induz morbidade do sítio doador, apresentam complicações tais como dor, lesões neurovasculares, fraturas, hematomas, hérnias, distúrbios de marcha, alterações estéticas, instabilidade da região sacroilíaca e lesão uretral (Kim et al., 2009). Contudo, com o avanço da medicina regenerativa, foram desenvolvidas pesquisas como a infusão de proteínas morfogenéticas

óssea, além de células mononucleares da medula óssea autóloga, visando diminuir os riscos de complicações atribuídas ao ato cirúrgico na enxertia óssea autóloga e suas conseqüências.

O estudo de Gianotti et al, artigo 2, proporcionou o desenvolvimento de uma nova técnica de enxertia, utilizando células mesenquimais de medula óssea (MSC) e promovendo a proliferação osteogênicas incorporadas aos coágulos de fibrina autóloga, assim o trabalho foi baseado na osteoindução de células mesenquimais de curto prazo antes da implantação nos pacientes. O estudo indicou que todos os 8 pacientes, tendo uma proporcionalidade entre homens e mulheres teve consolidação avaliada na radiografia, recuperando a função do membro afetado e sem a evidência de complicações, crescimento excessivo de tecido ou formação de tumorações. Importante destacar na análise deste estudo que houve um menor tempo de consolidação radiográfica nos pacientes de menor idade que em relação aos de idade mais avançada. Foi evidenciado no final do estudo que o tratamento altamente autólogo pode ser eficaz e seguro na cura a longo prazo dos ossos não consolidados. Esta abordagem de engenharia de tecidos resultou em resultados clínicos e funcionais de sucesso para todos os pacientes.

Outra técnica aplicada para a consolidação óssea nos casos de pseudoartroses de ossos longos foi promovida por Fernandez et al, artigo 3, onde o estudo propôs a utilizar células mononucleares da medula óssea combinada com o enxerto ósseo autólogo, visando então eliminar as complicações evidenciadas no tratamento convencional cirúrgico. Obtiveram consolidação em todos os pacientes estudados, além de desaparecimento da dor no membro referido antes da terapêutica. O tratamento combinado de células mononucleares autólogos da medula óssea e do enxerto ósseo alogênico poderia constituir uma tentativa fácil, segura, barata e eficaz para o tratamento de pseudoartrose de ossos longos, reproduzindo as propriedades benéficas do enxerto ósseo autólogo, limitando suas desvantagens.

A evolução dos dispositivos médicos aplicados à terapia celular das doenças crônicas e traumáticas é evidente nos últimos anos. Um exemplo é o sistema automatizado e fechado para separação e a concentração da fração de células mononucleares obtidas do sangue periférico, do cordão umbilical ou do aspirado de medula óssea (Sepax®) (Aktas et al., 2008). O estudo de Bastos et al., artigo 1, visou analisar a comparação do implante de aspirado de medula óssea simples com a infusão de células mononucleares purificadas utilizando o sistema Sepax® de separação. Foram avaliados com essa nova técnica 6 pacientes, onde 4

receberam o aspirado simples de medula e 2 a infusão de células purificadas pelo Sepax®. Em relação ao tempo de consolidação e satisfação do pacientes depois da terapêutica aplicada com o método de purificação, comprovou-se que foi ligeiramente superior levando em conta a proporcionalidade e grau de satisfação do paciente medidas pelo QALY adaptado. Foi observado que obteve consolidação mais lenta no paciente que recebeu a terapêutica no osso do fêmur do que em relação ao da tíbia, assim, também foi percebido uma menor crescente de no grau de satisfação em relação ao grupo que se beneficiou da terapia na tíbia. O estudo concluiu que o método proposto pode ser eficaz e seguro para o tratamento da pseudoartrose de ossos longos, independentemente do método de estabilização utilizado.

O artigo 4, produzido por Tikkanen et al., foi o único artigo encontrado que analisa a não consolidação óssea congênita, assim este estudo avalia a possibilidade terapêutica para uma parcela específica da população, onde essa apresenta pseudoartrose congênita da tíbia (CPT) causada por neurofibromatose tipo 1 (NF1), doença refratária da infância. O estudo se dá de forma experimental em pacientes que utilizaram de outras terapêuticas e obtiveram falhas. Os pacientes foram tratados com MSC antes da amputação elucidada. Após a amputação, amostras ósseas foram então analisadas para avaliar os efeitos da terapêutica. Obteve resultados satisfatórios como a normalização na remodelação óssea e promoveu uma melhor reabsorção óssea e melhora na estrutura global do osso. Não foi observada nenhuma formação óssea anormal. Devido o número de pacientes ser pequeno, o estudo é pouco limitado, mas apresenta resultados animadores para alternativa de tratamento da pseudoartrose congênita da tíbia causado por neurofibromatose tipo 1, em casos menos severos, sem defeitos adjuntos a pseudoartrose.

É observado um enfoque nas pesquisas de Hernigou et al para o tema do tratamento da pseudoartrose. O estudo de 1997 propôs um enfoque na análise da consolidação óssea, avaliando conjuntamente os possíveis fatores que poderiam interferir na não consolidação, assim foi visto que diversos aspectos do paciente, bem como doenças sistêmicas e hábitos de vida poderiam interferir significativamente no êxito do tratamento e resolução do quadro destes pacientes. Somente que no estudo de 2005, ele propõe uma pesquisa de avaliação terapêutica nos ossos da tíbia, onde é possível observar resolução da pseudoartrose em cerca de 80% dos pacientes submetidos ao método de terapia celular. Dentre todos os estudos observados, Hernigou et al utilizou de um número maior de pacientes, onde proporcionalmente necessitou de um tempo maior de acompanhamento e uma maior

diversidade de pacientes submetidos as técnicas de terapia celular com aspirado de medula óssea de células-tronco, principalmente da crista ilíaca anterior.

Os estudos foram estabelecidos a partir de acompanhamento do paciente, utilizando meios como a radiografia para avaliar o grau de consolidação óssea e assim determinar o prognóstico do paciente com a terapia celular proposta. Os pacientes foram avaliados por 6 a 12 meses em média, a depender do tempo de pseudoartrose, idade e aspectos fisiológicos de cada indivíduo.

VII – CONCLUSÕES

1. A terapêutica com uso de células-troco da medula óssea se mostrou um método seguro, simples e confiável para o tratamento da pseudoartrose. Oferece vantagens das não complicações do método tradicional convencional cirúrgico, além de ter um custo reduzido, ser menos invasivo e culminando com menor tempo de internação.

2. A eficácia parece estar relacionada com o número de células progenitoras no enxerto. A técnica de osteoindução de células mesenquimais de curto prazo antes da implantação nos pacientes se mostrou mais eficaz na regeneração óssea em longo prazo, outras técnicas como a infusão do aspirado de medula óssea mostrou uma regeneração em um prazo mais curto.

3. A técnica de purificação das células mononucleares é utilizada para melhor eficácia no tratamento da pseudoartrose, dentre estas se destaca o Sepax®, onde constitui de um sistema automatizado e fechado para separação e a concentração da fração de células mononucleares obtidas da medula óssea.

VIII - SUMMARY

Introduction: The treatment of bone deformities has been a constant subject of study for researchers, among them are the nonunions like pseudarthrosis. The evolution of the techniques of cell regeneration, regenerative medicine has been gaining attention in therapeutic option for many congenital and acquired diseases is thus seen that in the area of orthopedics and traumatology the use of stem cells has followed promising paths. **Objectives:** To analyze the applied stem cells for the treatment of nonunion treatment. **Methodology:** This is a study based on systematic review of literature developed from the descriptive method, qualitative approach seeking to reap the knowledge and scientific information on the treatment of nonunion with use of stem cells, according to the eligibility criteria the study. **Results:** 8 articles were selected for study, a total of 204 patients enrolled in these clinical trials. It was observed several techniques for treatment of pseudoarthrosis using stem cells, among them percutaneous infusion of bone marrow aspirate, osteoinduction mesenchymal cells before the short-term implantation in patients, combination therapy with autologous mononuclear bone marrow cells and allogenic bone graft. All obtained satisfactory results with regard to bone healing. **Discussion:** The technique of percutaneous infusion of bone marrow aspirate obtained in a shorter consolidation than osteoinduction of mesenchymal cells within. The low consolidation can be related to the general physiological factors of the patient and effective treatment with stem cell is directly related to the amount of progenitor cells in the graft. **Conclusion:** The treatment using cells from bone marrow-exchange proved a safe, reliable and simple method for the treatment of pseudarthrosis.

Keywords - 1. Pseudarthrosis; 2. Stem Cells; 3. Systematic review.

IX – REFERÊNCIAS

1. Mimeault, M; et al., Stem cells: a revolution in therapeutics - recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies, *Clin Pharmacol Ther* (2007) 252.
2. Cristante, A.F.; Narazaki, D.K. Avanços no uso de células-tronco em ortopedia. *Rev Bras Ortop*, v.46, n.4, 2011.
3. Laflamme, MA; et al., Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts, *Nat Biotechnol* 25 (2007) 1015.
4. Barker, N; et al., Identification of stem cells in the small intestine and colon by marker gene *Lgr5*, *Nature* 449 (2007) 1003.
5. Bryder, D; et al., Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell, *Am J Pathol* 169 (2006) 338.
6. Levesque, JP; Winkler, IG, Mobilization of hematopoietic stem cells: state of the art, *Curr Opin Organ Transplant* 13 (2008) 53.
7. Abdallah BM, Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther.* 2008;15 (2):109-16.
8. Kulterer B, Friedl G, Jandrositz A, Sanchez-Cabo F, Prokesch A, Paar C, *et al.* Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics.* 2007;8:70.
9. Raisz LG.. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest.* 2005;115(12):3318-25.
10. Kunisaki SM, Fuchs JR, Steigman SA, Fauza DO. A comparative analysis of cartilage engineered from different perinatal mesenchymal progenitor cells. *Tissue Eng.* 2007;13(11):2633-44.
11. Dazzi F, van Laar JM, Cope A, Tyndall A. Cell therapy for autoimmune diseases. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(2):206.
12. Pereira, Lygia da Veiga, A importância do uso das células tronco para a saúde pública. 2008.
13. Kaplan FS, Hayes WC, Keaveny TM et al. Form and function of bone. In: Simon SP, Wilson J, editors. *Orthopedic basic science*. Chicago: American Academy of Orthopaedics Surgeons; 1994. p.127-84.
14. Carano RAD, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today.* 2003; 8(21):980-9.

15. Hietaniemi K, Paavolainen P, Penttinen R. Connective tissue parameters in experimental nonunion. *J Orthop Trauma*. 1996; 10(2):114-8.
16. Rahaman MN, Mao JJ. Stem cell-based composite tissue constructs for regenerative medicine. *Biotechnol Bioeng*. 2005;91(3):261-84.
17. Forsberg EC, Bhattacharya D, Weissman IL. Hematopoietic stem cells: expression profiling and beyond. *Stem Cell Rev*. 2006;2(1):23-30.
18. Bastos Filho R, Lermontov S, Borojevic R, Schott PC, Gameiro VS, Granjeiro JM: Cell therapy of pseudarthrosis. *Acta Ortop Bras*; 2012;20(5):270-3
19. S Giannotti, V Bottai, M Ghilardi, G Dell'Osso, R Fazzi, L Trombi, M Petrini, Treatment of pseudoarthrosis of the upper limb using expanded mesenchymal stem cells: a pilot study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* aug 2013, 17 (2), 224-7
20. Fernandez-Bances I1, Perez-Basterrechea M, Perez-Lopez S, Nuñez Batalla D, Fernandez Rodriguez MA, Alvarez-Viejo M, Ferrero-Gutierrez A, Menendez-Menendez Y, Garcia-Gala JM, Escudero D, Paz Aparicio J, Carnero Lopez S, Lopez Fernandez P, Gonzalez Suarez D, Otero Hernandez J. Repair of long-bone pseudoarthrosis with autologous bone marrow mononuclear cells combined with allogenic bone graft. *Cytotherapy*. 2013 May;15(5):571-7.
21. Tikkanen J1, Leskelä HV, Lehtonen ST, Vähäsarja V, Melkko J, Ahvenjärvi L, Pääkkö E, Väänänen K, Lehenkari P. Attempt to treat congenital pseudoarthrosis of the tibia with mesenchymal stromal cell transplantation. *Cytotherapy*. 2010 Sep;12(5):593-604.
22. Hernigou P, Beaujean F. Pseudoarthrosis treated by percutaneous autologous bone marrow graft. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot*. 1997;83(6):495-504.
23. Wilkins R.M, Chimenti B.T, Rifkin R.M. Percutaneous treatment of long bone nonunions: the use of autologous bone marrow and allograft bone matrix. *Orthopedics*. 2003 May;26(5 Suppl):s549-54.
24. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am*. 2005 Jul;87(7):1430-7.
25. Goel A1, Sangwan SS, Siwach RC, Ali AM. Percutaneous bone marrow grafting for the treatment of tibial non-union. *Injury*. 2005 Jan;36(1):203-6.
26. Reis FB NJ, Pires RES. Pseudoartrose. *Ver. Bras Ortop*. 2005;40:79-88.

27. Audige L, Griffin D, Bhandari M, Kellam J, Ruedi TP. Path analysis of factors for delayed healind and nonunion in 416 operaively trated tibial shaft fractures. *Clinical orthopaedics and related research*. Sep 2005; 438:221-232.
28. Guerra M.T.E., C.S. Fratura traumática subtrocanteriana do fêmur do adulto. Projeto diretrizes.2008.
29. Kim DH, Rhim R, Li L, et al. Prospective study os iliac crest boné graft harvest site pain and morbidity. *Spine J*. Nov 2009; 9 (11): 886-892.
30. Aktas M, Radke TF, Stauer BE, Wernet P, Kogler G. Separation of adult bone morrow mononuclear cells using the automated closed separation system Sepax. *Citotherapy*. 2008; 10 (2):203-211.