LUIZ AUGUSTO UBIRAJARA SANTOS

**Efeito da utilização de plasma rico em plaquetas na osteointegração
dos enxertos ósseos homólogos criopreservados : estudo
histomorfométrico em coelhos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Ortopedia e Traumatologia

Orientador: Prof. Dr. Alberto Tesconi Croci

São Paulo

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Santos, Luiz Augusto Ubirajara

Efeito da utilização de plasma rico em plaquetas na osteointegração dos enxertos ósseos homólogos criopreservados : estudo histomorfométrico em coelhos / Luiz Augusto Ubirajara Santos. -- São Paulo, 2007.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Ortopedia e Traumatologia.

Área de concentração: Ortopedia e Traumatologia.

Orientador: Alberto Tesconi Croci.

Descritores: 1.Plasma rico em plaquetas 2.Transplante homólogo 3.Banco de tecidos 4.Músculo esquelético/transplante 5.Criopreservação/métodos 6.Coelhos

USP/FM/SBD-196/07

À minha amada **Lucimara**, aquela que o destino colocou em minha vida e
hoje minha companheira de ideais.

À minha filha **Mariana**, nosso maior ideal já alcançado.

À minha mãe **Sônia** e irmãos **André** e **Fernando**, por tudo que vivemos, e
tudo que nos tornamos...

À Tia **Wilma**, pelo carinho e gestos marcantes em minha vida...

À toda família e aos amigos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Alberto Tesconi Croci, por seu incentivo e confiança não só na orientação deste estudo, mas também durante esses anos de trabalho.

Ao Departamento de Ortopedia e Traumatologia, em especial ao Prof. Olavo Pires de Camargo pela oportunidade na admissão como aluno do Programa de Pós Graduação neste instituto.

Ao Prof. Arnaldo Jose Hernandez, Dr. Reginaldo Perilo Oliveira e Dr. Wlastemir Grigoletto Junior, pela gentileza e valiosas sugestões durante o exame de qualificação.

À Profa. Vanda Jorgetti e Luciene Machado dos Reis, pelo acolhimento nos momentos de aprendizado.

À minha amiga Arlete, quem os anos revelaram ser exemplo de atitude, cumplicidade e zelo. Muito obrigado pelo carinho também estendido à minha família!

Aos meus amigos Júlio e Graziela, elos da melhor equipe de trabalho do planeta, pelo companheirismo e compreensão demonstrados em todos os nossos dias de convívio.

À Ana Cristina F. Bassit, pessoa que tive o prazer de conhecer durante este trabalho, e que hoje, me contempla com sua especial amizade.

À Márcia Uchoa de Rezende pelos ensinamentos e apoio desde os tempos das primeiras captações e pela importante colaboração neste estudo.

Ao amigo Erik R. S. Fernandes, pelo interesse e colaboração na análise histomorfométrica.

À Renaide Rodrigues Ferreira pela realização da análise microbiológica

À Dra. Carmem Diva Saldiva de André, pelo profissionalismo e relevantes opiniões no tratamento estatístico.

À Diva da Silva de Godoi pelo pronto apoio prestado na revisão das referências bibliográficas.

Ao Dr. Raul Bollinger pela concessão ao uso das dependências do LIM-41 durante a realização dos procedimentos cirúrgicos.

A minha cunhada Luciana Camalione pela importante ajuda prestada durante a revisão de literatura.

Ao pessoal do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela provisão dos animais.

Ao Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial a Sra. Lourdes e Valéria pela excelência nos serviços prestados.

Aos amigos e colegas do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de convivência profissional e crescimento mútuo.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de

International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de quadros

Lista de anexos e apêndices

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	6
3. REVISÃO DA LITERATURA	8
3.1 O tecido ósseo	9
3.2 O transplante ósseo	11
3.3 O uso clínico dos enxertos	12
3.4 Evolução dos bancos de tecidos no Brasil	21
3.5 Histomorfometria	23
3.6 Fatores de crescimento	25
3.6.1 Plaquetas	26
3.6.2 Fator de crescimento derivado de plaquetas – PDGF	30
3.6.3 Fator de crescimento de transformação - TGF	32
3.6.4 O uso clínico dos fatores de crescimento	33
3.7 Plasma autólogo rico em plaquetas-PRP	36
3.7.1 Métodos de obtenção e uso clínico do PRP	37
3.7.1.1 O uso do PRP em humanos	39
3.7.1.2 O uso do PRP em modelos experimentais com animais	41
3.7.1.3 Estudos “in vitro” com o PRP	47
3.7.1.4 Revisões conceituais sobre o PRP	48
3.7.1.5 Outros métodos de obtenção do PRP	50
3.8 O modelo experimental em coelhos	52

4. MÉTODOS.....	55
4.1 Material	56
4.1.1 O modelo experimental.....	56
4.2 Método	58
4.2.1 Preparo pré-operatório	58
4.2.2 Obtenção dos aloenxertos homólogos	58
4.2.3 Processamento e criopreservação dos aloenxertos obtidos... ..	61
4.2.4 Protocolo de obtenção do plasma rico em plaquetas – PRP.....	62
4.2.5 Protocolo anestésico	66
4.2.6 Técnica cirúrgica para realização das falhas ósseas, aplicação do PRP e transplante dos aloenxertos.	67
4.2.7 Protocolo de eutanásia	70
4.2.8 Processamento histológico e avaliação histomorfométrica	71
4.2.8.1 Processamento histológico	71
4.2.8.2 Avaliação histomorfométrica.....	72
4.2.9 Tratamento estatístico	76
5. RESULTADOS.....	78
6. DISCUSSÃO.....	102
6.1 Considerações Finais.....	114
7. CONCLUSÃO	117
8. ANEXOS.....	119
9. REFERÊNCIAS	123
Apêndices	

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

°C	grau celsius
%	porcentagem
=	igual
µl	microlitro
AATB	American Association of Tissue Banks
ACD	ácido cítrico dextrose
AE	aloenxerto
ASBMR	American Society of Bone and Mineral Research
AVMA	American Veterinary Medical Association
BMP	bone morphogenetic protein
BV/TV	volume ósseo
Ca	cálcio
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa -
cm	centímetro
CNCDO	Centrais de Notificação e Captação de Órgãos e Tecidos
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
EATB	European Association of Tissue Banks
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FDBA	freeze-dried bone allografts
FGF	fibroblast growth factors
g	gramas
G	gravidades

GTR	guided tissue regeneration
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HE	hematoxilina eosina
HEPA	high efficiency particular air
IACUC	Institutional Animal Care and Use Committee
IC	intervalo de confiança
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
ICr	intracardíaco
IGF -I	fatores de crescimento símile à insulina I
IGF-II	fatores de crescimento símile à insulina II
IM	intramuscular
IOT	Instituto de Ortopedia e Traumatologia
IP	intraperitoneal
ISO	International Organization for Standardization
KDa	quilodalton
kg	kilograma
kGy	kilogray
LCSA	Laboratório de Controle Sanitário Animal
LI	lado 1
LII	lado 2
LIM	Laboratório de Investigação Médica
mEq	miliequivalente
mL	mililitro

mm	milímetro
mm³	milímetro cúbico
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
N.Ob	número de osteoblastos
N.Oc	número de osteoclastos
N.Ot	número de osteócitos
NBR	norma brasileira regulamentada
O.Th	espessura osteóide
OB	osteoblastos
Ob.S/BS	superfície osteoblástica
Oc.S/BS	superfície osteoclástica
OPG	osteoprotegerina
OR	osso receptor
OS/BS	superfície osteóide
OT	osteócitos
OV/BV	volume osteóide
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	platelet derived growth factor
ph	potencial hidrogeniônico
plaq	plaquetas
PPP	plasma pobre em plaquetas
PRP	plasma rico em plaquetas
RANK L	proteína transmembrana
rpm	rotações por minuto

Runx2	fator de transcrição
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SNT	Sistema Nacional de Transplantes
T.Ar	área total
Tb.N	número trabecular
Tb.Sp	separação trabecular
Tb.Th	espessura trabecular
TGF	transforming growth factors
α	alfa
β	beta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Delimitação do campo operatório e acesso à face lateral do côndilo femoral.....	60
Figura 2. Osteotomia e ressecção do côndilo femoral	60
Figura 3. Corte sagital no côndilo femoral	61
Figura 4. Dimensionamento dos blocos de aloenxertos	61
Figura 5. Tubos com sangue total acondicionados na centrífuga com 15 cm de raio e com cruzetas horizontais (8x15 mL) posicionadas de forma oposta e eqüidistantes ao centro	63
Figura 6. Apresentação da amostra após a primeira centrifugação, evidenciando as três camadas: plasma (1), zona de névoa (2) e série vermelha (3).....	64
Figura 7. Apresentação após a segunda centrifugação e o isolamento de um mL de plasma (1) acrescido do botão de PRP (2).	65
Figura 8. Apresentação do “gel” de PRP já ativado pela trombina de coelho	66
Figuras 9a e 9b. Realização da falha óssea (6x6mm) com o uso de broca, trefina e formão	69
Figura 10. Realização do teste de dimensão do aloenxerto	69
Figura 11. Aplicação do gel de PRP nas falhas ósseas provocadas no Lado 2.....	69
Figura 12. Implante do aloenxerto sobre a falha.....	69
Figura 13. Sutura com pontos isolados.....	69

Figura 14. Modelo dos espécimes envoltos por bloco de metilmetacrilato e lâminas preparadas para análise histomorfométrica.....	72
Figura 15. Representação do quadro ampliado em 125x na análise histomorfométrica evidenciado: área analisada delimitada em nove campos, interface de aplicação do PRP, posição do aloenxerto implantado e placa epifisária de crescimento	73
Figura 16. Equipamento utilizado para análise histomorfométrica (microscópio acoplado a placa digitalizadora e software Osteomeasure®)....	74
Figura 17- <i>Box-plots</i> para as variáveis estruturais nos dois lados e diferença entre os lados.....	81
Figura 18- Diagramas de dispersão das variáveis estruturais nos dois lados	82
Figura 19- <i>Box-plots</i> para as variáveis de formação nos dois lados e diferença entre os lados.....	84
Figura 20- Diagramas de dispersão das variáveis de formação nos dois lados	85
Figura 21- <i>Box-plots</i> para as variáveis de reabsorção nos dois lados e diferença entre os lados.....	87
Figura 22- Diagramas de dispersão das variáveis estruturais nos dois lados	88
Figura 23- <i>Box-plots</i> para as variáveis estruturais nos dois lados e diferença entre os lados – medidas na interface.....	90
Figura 24- Diagramas de dispersão das variáveis estruturais nos dois lados – medidas na interface	91
Figura 25- <i>Box-plots</i> para as variáveis de formação nos dois lados e diferença entre os lados – medidas na interface.....	93

Figura 26- Diagramas de dispersão das variáveis de formação nos dois lados – medidas na interface	94
Figura 27- <i>Box-plots</i> para as variáveis de reabsorção nos dois lados e diferença entre os lados – medidas na interface.....	95
Figura 28- Diagramas de dispersão das variáveis de reabsorção nos dois lados – medidas na interface.....	96
Figura 29- <i>Box-plots</i> para as variáveis Número de osteoblastos/área total e Número de osteoblastos/perímetro ósseo nos dois lados e diferença entre os lados – medidas na interface.....	97
Figura 30- Diagramas de dispersão das variáveis Número de osteoblastos/área total e Número de osteoblastos/perímetro ósseo nos dois lados – medidas na interface.....	98
Figura 31a e 31 b. Evidência macroscópica do tecido conjuntivo denso neoformado sobre a área de aplicação do aloenxerto associado ao PRP (Lado 2)	100
Figura 32. Corte histológico (HE – 10x) mostrando células osteoblásticas na interface dos aloenxertos. (AE: aloenxerto; OR: osso receptor; matriz osteóide : setas).....	101
Figura 33. Corte histológico (HE – 10x) mostrando a presença de osteoblastos, osteócitos e matriz osteóide nos aloenxertos implantados ...	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Médias, desvios padrão (DP), mínimos, medianas e máximos observados das variáveis estruturais nos fêmures tratados pelas técnicas correspondentes ao Lado 1 e Lado 2 e das diferenças entre os dois lados (lado 1 – lado 2)	80
Tabela 2 - P-valores obtidos pelo teste de Friedman para a comparação das medianas das variáveis estruturais nos dois lados.....	83
Tabela 3 - Médias, desvios padrão (DP), mínimos, medianas e máximos observados das variáveis de formação nos fêmures tratados pelas técnicas correspondentes ao Lado 1 e Lado 2 e das diferenças entre os dois lados (lado 1 – lado 2)	83
Tabela 4 - P-valores obtidos pelo teste de Friedman para a comparação das medianas das variáveis de formação nos dois lados	86
Tabela 5 - Médias, desvios padrão (DP), mínimos, medianas e máximos observados das variáveis de reabsorção nos fêmures tratados pelas técnicas correspondentes ao Lado 1 e Lado 2 e das diferenças entre os dois lados (lado 1 – lado 2).....	86
Tabela 6- P-valores obtidos pelo teste de Friedman para a comparação das medianas das variáveis de reabsorção nos dois lados	88
Tabela 7- Médias, desvios padrão (DP), mínimos, medianas e máximos observados das variáveis estruturais nos fêmures tratados pelas técnicas correspondentes ao Lado 1 e Lado 2 das diferenças entre os dois lados (lado 1 – lado 2) – medidas na interface.....	89
Tabela 8- P-valores obtidos pelo teste de Friedman para a comparação das medianas das variáveis estruturais nos dois lados – medidas na interface	91

Tabela 9- Médias, desvios padrão (DP), mínimos, medianas e máximos observados das variáveis de formação nos fêmures tratados pelas técnicas correspondentes ao Lado 1 e Lado 2 e das diferenças entre os dois lados (lado 1 – lado 2) – medidas na interface.....	92
Tabela 10- P-valores obtidos pelo teste de Friedman para a comparação das medianas das variáveis de formação nos dois lados – medidas na interface.....	94
Tabela 11- Médias, desvios padrão (DP), mínimos, medianas e máximos observados das variáveis de reabsorção nos fêmures tratados pelas técnicas correspondentes ao Lado 1 e Lado 2 e das diferenças entre os dois lados (lado 1 – lado 2).....	95
Tabela 12- P-valores obtidos pelo teste de Friedman para a comparação das medianas das variáveis de reabsorção nos dois lados – medidas na interface.....	96
Tabela 13- Médias, desvios padrão (DP), mínimos, medianas e máximos observados do Número de osteoblastos/área total e Número de osteoblastos/perímetro ósseo nos fêmures tratados pelas técnicas correspondentes ao Lado 1 e Lado 2 e das diferenças entre os dois lados (lado 1 – lado 2) - medidas na interface	97
Tabela 14- P-valores obtidos pelo teste de Friedman para a comparação das medianas das variáveis Número de osteoblastos/área total e Número de osteoblastos/perímetro ósseo nos dois lados– medidas na interface.....	98

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação dos enxertos de acordo com sua natureza	11
Quadro 2. Protocolos simplificados para obtenção do PRP	38
Quadro 3. Distribuição e estratificação da amostra estudada. O Lado 1 corresponde ao uso do aloenxerto criopreservado a – 80 °C e o Lado 2 ao uso do aloenxerto criopreservado a – 80 °C associado ao plasma rico em plaquetas-PRP.....	57

LISTA DE ANEXOS E APÊNDICES

Anexo 1 - Formulário de coleta de dados e evolução clínica120

Anexo 2 - Laudo com resultado da análise microbiológica dos aloenxertos....121

Apêndice 1 - Protocolo de terapia intravenosa do IOT- HC-FMUSP

RESUMO

Santos LAU. *Efeito da utilização de plasma rico em plaquetas na osteointegração dos enxertos ósseos homólogos criopreservados: estudo histomorfométrico em coelhos* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 140p.

As perdas ósseas em alguns seguimentos do sistema músculoesquelético têm sido motivo de grande preocupação na área da Ortopedia e Traumatologia. Propostas de tratamentos com uso de enxertos e fatores de crescimento são descritas ao longo dos anos. Neste estudo avaliamos o efeito do plasma rico em plaquetas – PRP na fase inicial do processo de osteointegração de enxertos ósseos homólogos criopreservados a – 80 °C, em forma de blocos, implantados no côndilo femoral de coelhos. Operamos 19 animais (38 fêmures), onde ambas as técnicas foram aplicadas no mesmo animal em lados alternados. De um lado aplicamos o aloenxerto isolado (Lado 1) e no outro associamos o aloenxerto ao PRP (Lado 2). Após 15 dias, os animais foram sacrificados e os côndilos femorais com as áreas de enxertia analisados pela histomorfometria com o método semi-automático. Não observamos efeito do plasma rico em plaquetas nas áreas de enxertias dos aloenxertos, pois a comparação dos parâmetros histomorfométricos estruturais, de formação e reabsorção não mostraram diferenças significativas.

Descritores: 1.Plasma rico em plaquetas 2.Transplante homólogo 3.Banco de tecidos 4.Músculo esquelético/transplante 5.Criopreservação/métodos 6. Coelhos

SUMMARY

Santos LAU. *Effects of platelet rich plasma in osteointegration of cryopreserved homologous bone grafts: histomorphometric study in rabbits* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2007. 140p.

Bone loss, in some segments of the muscle-skeleton system, are of great concern in the fields of Orthopedics and Traumatology. There are several options of treatment by means of bone grafts and growth factors. In this study we evaluate the effect of platelet rich plasma (PRP) in the initial phase of osteointegration of cryopreserved (- 80 °C) homologous bone grafts, in blocks, implanted in the femoral condyles of rabbits. We operated 19 animals (38 femurs). Both techniques were applied in the same animal in alternate sides. In one side we applied isolated allograft (side 1) and on the contralateral side we added PRP to the allograft (side 2). After 15 days, the animals were sacrificed and the femoral condyles, with the receptor area, were analyzed histomorphometrically (semi-automatic method). We found no effect of the PRP in the receptor. The comparison between the histomorphometric parameters of structural, formation and bone resorption showed no significant differences.

Descriptors: 1.Platelet-rich plasma 2.Homologous transplantation 3.Tissue banks 4.Skeletal muscle/transplantation 5. Cryopreservation/methods.

1. INTRODUÇÃO

Há algum tempo a área de Ortopedia e Traumatologia vem enfrentando um problema de proporção cada vez maior: as perdas ósseas que acometem algumas regiões do esqueleto. Estas lesões levam à formação de cavidades em determinados segmentos e estruturas ósseas, o que interfere e compromete o desempenho da função do aparelho locomotor de um número crescente de pessoas. A causa mais comum destas lesões é o processo de osteólise local desencadeado pela resposta fisiológica ao aparecimento de tumores, infecções e mais freqüentemente aos “debris” de materiais de implante soltos contra o osso hospedeiro. Outras causas menos freqüentes estão relacionadas com doenças reumáticas, metabólicas, endócrinas e idiopáticas.

Os primeiros estudos propondo o uso de substitutos ósseos para reposição destas falhas tiveram início nas décadas posteriores a 1860. (Ollier, 1867 apud Fischer, 1998; MacEwen, 1878 apud Giovani, 2005 e Tomford, 2000; Albee, 1912 apud Giovani, 2005; Carrel, 1912; Groves, 1917; Bush, Garber, 1948; Axhausen, 1956 apud Lemos, 2002; Sharrard, Collins, 1961; Urist, 1965).

Após a constatação das desvantagens no uso dos tecidos autólogos com essa finalidade, como o aumento da morbidade do doador, maior risco de lesão de nervos e de infecção inerente ao segundo procedimento

cirúrgico e limitação na disponibilidade do tecido em quantidade e variedade, a utilização do tecido homólogo torna-se outra opção que gradativamente passa a ser indicada (Cunningham, Reddi, 1992; Tomford, 2000).

Surgem então os primeiros bancos de ossos e estudos que analisam seu emprego clínico como também sua segurança são relatados ao longo dos anos (Carr, Hyatt, 1955; Sharrard, Collins, 1961; Urist, 1965; Parrish, 1973; Enneking et al., 1975).

Mais tarde, o risco biológico do seu uso, principalmente pelo advento da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) leva a reestruturação dos protocolos de obtenção e seleção de doadores, permitindo a disponibilização de enxertos com mais qualidade e menores riscos na transmissão de doenças (Tomford et al., 1981, Buck et al., 1989, Nather, 1991, Michaud, Drabu, 1994). No Brasil, a oficialização dos bancos de tecidos em 1997 é o resultado da reestruturação do sistema nacional que controla a busca e distribuição de órgãos e tecidos para transplantes. Os bons resultados no uso clínico dos aloenxertos motivam seu uso em escala crescente nos últimos anos (Associação Brasileira de Transplantes – ABTO¹), porém a publicação de trabalhos científicos em nosso meio sobre seu emprego ainda é escassa.

Um outro assunto de interesse nesta área é o estudo de substâncias capazes de desempenhar um papel auxiliar no processo de reparação dos tecidos, hoje denominados como fatores de crescimento (Urist, 1992). Estas substâncias produzidas por vários tipos celulares, promovem o crescimento

¹ Registro Brasileiro de Transplantes; Órgão oficial da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos-ABTO: 2000 - 2007

e a proliferação celular, e seu uso como forma de modular os eventos celulares no tecido ósseo passa a ser mostrada na literatura (Centrella et al., 1989; Heldin, Westermarck, 1999; Alberts et al., 2004).

Entre estas substâncias, encontra-se o Fator de crescimento derivado de plaquetas – PDGF e o Fator de crescimento de transformação – TGF, produzidos e liberados pelas plaquetas, e são descritos como capazes de atuar como mitógenos para as células do tecido ósseo, favorecendo o processo de osteogênese e osteointegração de enxertos e implantes (Hart et al., 1988; Centrella et al., 1989, Ostman et al., 1992; Graves, Cochran, 1994; Sumner et al., 1995; Marx et al., 1998, Alberts et al., 2004).

Uma opção segura e simples de obter o PDGF e TGF é através da técnica de dupla centrifugação do plasma rico em plaquetas-PRP. O plasma autólogo rico em plaquetas é um hemoderivado atóxico, não imunorreativo, obtido através de técnicas simplificadas de seqüestração e concentração de plaquetas após múltiplas centrifugações de amostras sanguíneas. É descrito como um método de baixo custo e aplicação clínica muito factível (Marx, 1998; Anitua, 1999; Lozano et al., 1999; Okuda et al., 2003).

Seu efeito no tecido ósseo tem sido alvo de investigação pelos pesquisadores em estudos com modelos distintos e associado a diferentes substitutos ósseos aplicados em humanos (Shanaman et al., 2001; Camargo et al., 2002; Feres Junior, 2003; Mazor et al., 2004) em modelos experimentais com animais (Kim et al., 2002a; Aghaloo et al., 2002; Furst et al., 2003; Wilson, 2003; Croci et al., 2003a; Wiltfang et al., 2004; Roldán et al., 2004; Zhang et al., 2004; Butterfield et al., 2005; Fennis et al., 2005; Tamae,

2005; Jung et al., 2005; Dallari et al., 2006) e em estudos “in vitro” (Gruber et al., 2002; Weibrich et al., 2002b; Efeoglu et al., 2004; Kanno et al., 2005).

Assim, o presente estudo tem por objetivo analisar o efeito do plasma rico em plaquetas – PRP no processo inicial da osteointegração de aloenxertos captados, processados e criopreservados conforme o protocolo do Banco de Tecidos Músculoesqueléticos do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo IOT-HCFMUSP, de referência nacional, possibilitando ampliar os conhecimentos referentes ao uso destes fatores de crescimento.

Embora o PRP seja utilizado amplamente na área odontológica, percebemos ainda uma escassez de literatura analisando seu uso associado aos enxertos homólogos. Outros fatores que estimularam a escolha pelo PRP foram a facilidade de obtenção, o baixo custo, a segurança e a aplicabilidade clínica factível para a maioria dos centros transplantadores de tecidos no País.

O modelo experimental adotado foi em coelhos pelo fato de o animal apresentar características favoráveis ao desenvolvimento deste modelo experimental, já constatado por outros autores (Gameiro, 1997; Costa, 1999; Wilson, 2003; Silva, 2003; Colmanetti, 2004; Zhang, 2004; Butterfield et al., 2005; Jung et al., 2005; Tamae, 2005).

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo é comparar os resultados dos processos iniciais de osteointegração através da histomorfometria entre os enxertos criopreservados a -80°C com e sem a associação de plasma rico em plaquetas (PRP), ambos implantados nas falhas ósseas provocadas em epífises femorais de coelhos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Esta revisão é subdividida em subcapítulos para facilitar o entendimento dos trabalhos que servem de base ao presente estudo.

3.1 O tecido ósseo

Para avaliação do comportamento complexo das células e minerais que atuam no tecido ósseo é necessário primeiramente descrever um pouco de sua morfologia.

O tecido ósseo é composto por duas porções: 1. Orgânica, constituída por células próprias do osso (osteoblastos, osteoclastos e osteócitos) e pela matriz orgânica por elas sintetizada; 2. Inorgânica, constituída pela hidroxiapatita, depositada de uma forma amorfa em uma fase inicial e que em curto espaço de tempo é convertida em outra hidroxiapatita cristalina. A matriz orgânica corresponde a 35% do volume ósseo e a matriz inorgânica a 65%.

Apesar da resistência e dureza, o tecido ósseo é muito plástico e possui uma alta capacidade de se remodelar mediante diversas situações a que é submetido, tais como fraturas, lesões e perdas ósseas. O processo de regeneração do tecido ósseo se inicia a partir de importantes reações biológicas, desencadeadas pela própria lesão do tecido. A enxertia

desencadeia um mecanismo de migração das células ósseas pertencentes ao leito receptor para o interior do enxerto, com a finalidade de reabsorvê-lo e substituí-lo por osso neoformado.

As células pertencentes ao tecido ósseo são os osteoblastos, os osteócitos e osteoclastos.

Os osteoblastos são células cubóides e alongadas de origem mesenquimal que estão localizadas nas margens ósseas; sua função é produzir a matriz orgânica do tecido ósseo. Em menor atividade estas células assumem uma forma mais delgada. Os osteócitos são osteoblastos encapsulados, que após a maturação ficaram presos dentro da matriz mineralizada, mas que ainda mantém contato com outras células através de ramificações do citoplasma, mantendo assim uma funcionalidade fisiológica do tecido (Junqueira, Carneiro, 1999). Esse contato com células da superfície como os osteoblastos e “*lining cells*” está relacionado com a manutenção da estrutura óssea e com as respostas fisiológicas que levam à formação ou reabsorção do tecido (Aubin et al., 2006).

Os osteoclastos são células gigantes, com múltiplos núcleos e sua função é relacionada à reabsorção. Em sinergia com os osteoblastos promovem a remodelação óssea.

Denomina-se a interação e o sinergismo entre as células ósseas “*creeping substitution*”, e esta ocorre mediante três eventos celulares essenciais: a osteogênese (evento celular que propicia a síntese da matriz óssea pelos osteoblastos), a osteoindução (capacidade de induzir a migração de células mesenquimais e sua diferenciação em osteoblastos) e a osteocondução (capacidade do tecido servir de molde ou guia para os processos celulares envolvidos na reparação do tecido ósseo).

Além disso, assim como outras, as células ósseas passam pelas etapas do ciclo celular, que compreendem desde a formação até a divisão celular (mitose). A mitose está susceptível às interferências externas, podendo a célula assumir um estado de repouso ou continuar a dividir-se ciclicamente (Urist, 1965; Enneking et al., 1975; Junqueira, Carneiro, 1999; Perren, Claes, 2002).

3.2 O transplante ósseo

O termo transplante não é muito empregado pela comunidade científica para se referir ao uso do tecido ósseo. Comumente, usa-se o termo enxertia óssea. O enxerto ósseo pode receber uma nomenclatura e ser classificado dependendo da origem de sua obtenção e de onde será implantado (Quadro 1).

Quadro 1. Classificação dos enxertos de acordo com sua natureza

Enxerto autólogo ou auto-enxerto	Enxerto de tecidos no mesmo indivíduo de um local para outro
Isoenxerto	Enxerto entre pessoas com características geneticamente idênticas (homozigotos; p.ex. gêmeos idênticos)
Aloenxerto ou enxerto homólogo	Enxerto de um indivíduo de uma mesma espécie com características genéticas distintas
Xenoenxerto ou enxerto heterólogo	Enxerto de um indivíduo de uma espécie para outra

Fonte: Drumond, 2000

3.3 O uso clínico dos enxertos

O uso do tecido ósseo para reposição de perdas ósseas não é um procedimento recente. Desde o século retrasado há relatos do uso destes tecidos em humanos e em experimentações com animais.

Nestes trabalhos, muitos tratamentos com o uso de enxertos ósseos de natureza autóloga e homóloga são propostos ao longo dos anos (Ollier, 1867 apud Fischer, 1998; MacEwen, 1878 apud Giovani, 2005; Albee, 1912 apud Giovani, 2005; Carrel, 1912; Groves, 1917; Bush, Garber, 1948; Axhausen, 1956 apud Lemos, 2002; Sharrard, Collins, 1961; Urist, 1965).

O primeiro transplante de osso homólogo é descrito por William MacEwen em 1878 (Giovani, 2005). Nessa época o tratamento das osteomielites é realizado por ressecções cirúrgicas dos segmentos infectados. O autor utiliza segmentos tibiais homólogos (obtidos de pacientes submetidos a osteotomias) na reconstrução de uma falha óssea causada pela ressecção de parte do úmero de um jovem garoto portador de osteomielite (apud Tomford, 2000).

MacEwen continua nesta mesma linha de pesquisa e investiga os fatores osteogênicos inerentes ao uso dos enxertos ósseos homólogos. O autor apresenta resultados encorajadores, mostrando a consolidação dos enxertos ao leito receptor em mais dois trabalhos nos anos de 1887 e 1909, motivando assim os pesquisadores da época. Nesse período, não há consenso de quais ossos especificamente podem ser utilizados para transplante. Os tecidos são captados aleatoriamente de doadores vítimas de

fraturas, ressecções e amputações. Para o armazenamento e processamento destes tecidos, são utilizados protocolos e equipamentos que hoje não são os mais adequados para esta finalidade (Tomford, Mankin, 1999; Tomford, 2000). Grande parte destes trabalhos possui hoje apenas valor histórico em respeito ao pioneirismo desses pesquisadores.

O uso clínico de aloenxertos durante esse período acontece em baixa demanda, e em caráter experimental, por alguns centros espalhados pelo mundo. Com a disponibilidade da antibioticoterapia, ocorrem alterações na indicação destes tecidos, e pacientes portadores de osteomielites são então submetidos a tratamentos farmacológicos, em detrimento aos atos cirúrgicos (Tomford, 2000). Assim, as ressecções cirúrgicas de segmentos infectados deixam de ser prioritárias e os aloenxertos são então utilizados nas reconstruções de falhas ósseas causadas por ressecções de tumores. Essa mudança faz com que os estudos da época também evoluam, e relatem com mais detalhes os processos celulares envolvidos na osteointegração dos enxertos.

Carr e Hyatt (1955) evidenciam as vantagens no uso de aloenxertos criopreservados, como a disponibilidade da quantidade de tecido necessário e diminuição da morbidade pós-operatória.

Axhausen (1956) apud Lemos (2002) descreve detalhes deste processo após avaliação clínica e histológica em zonas de reparo do tecido músculoesquelético, evidenciando as principais etapas do processo de reparação. Nesse estudo são relatadas algumas diferenças no processo de vascularização dos enxertos de osso cortical e esponjoso. No osso cortical,

a reparação é iniciada pela ação de osteoclastos e no osso esponjoso, pelos osteoblastos. Outra diferença está no tempo de revascularização, que é mais lento para osso cortical e mais rápido para o osso esponjoso.

Sharrard e Collins (1961) descrevem a utilização de enxertos homólogos captados e descalcificados na reparação de falhas ósseas localizadas em segmentos da coluna vertebral em crianças portadoras de escoliose. Os resultados demonstram neoformação óssea local em seis semanas após o ato operatório.

Urist (1965) descreve que as células osteoprogenitoras responsáveis pelo processo de reparação óssea são derivadas de monócitos, presentes em número elevado na zona de reparação procedente da medula óssea. Ainda nesse estudo, mostra que a osteointegração de enxertos é alcançada, uma vez que células primitivas ainda não diferenciadas podem se diferenciar em osteoblastos viáveis a partir de substâncias osteoindutoras.

Na década de 1970, mediante alguns resultados insatisfatórios como fraturas por fadiga e não consolidação, alguns pesquisadores passam a não indicar o uso de aloenxertos como primeira escolha nas reconstruções de falhas ósseas causadas por ressecções tumorais (Parrish, 1973; Enneking et al., 1975).

Mais tarde, a partir da década de 1980, o advento da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) levanta discussão sobre a segurança no uso clínico dos tecidos homólogos. O risco biológico de transmissão de doenças entre doadores e receptores de tecidos é o tema de maior relevância no período. Os bancos de tecidos existentes na época revisam

seus protocolos de seleção dos doadores com o objetivo de evitar a transmissão destas doenças. Este fato propicia a elaboração de “*Standards*” desenvolvidos pelas principais Associações de bancos de tecidos (Associação Americana de Bancos de Tecidos – AATB e Associação Européia de Bancos de Tecidos – EATB), o que contribui para o ganho de qualidade dos tecidos disponibilizados por estes bancos (Tomford et al., 1981; Buck et al., 1989; Nather, 1991; Michaud, Drabu, 1994; Tomford, Mankin, 1999; Woolf, Gross, 2001; Galea, Kearney, 2005).

Com a disponibilidade de enxertos mais confiáveis pelos bancos de tecidos, seu uso, comportamento biológico e sua indicação pelos cirurgiões aparecem na literatura.

Urist et al. (1983) relatam que células mesenquimais perivasculares se desagregam e migram para a área de enxertia, onde novamente se reagregam, proliferam e diferenciam para formar osso novo.

Rudelli et al. (1992) avaliam o uso de enxerto ósseo nas revisões com prótese do quadril não cimentada e híbrida. De um total de 53 próteses revisadas, os autores utilizam uma associação de enxerto homólogo e autólogo em 18 casos. No restante, apenas o enxerto autólogo obtido do ilíaco é empregado. Após um seguimento médio de 43 meses relatam perfeita integração do enxerto em todos os casos e então indicam o uso dos enxertos com otimismo.

Thies et al. (1992) afirmam que, semelhante ao processo de reparação nas fraturas e no desenvolvimento do sistema músculoesquelético, a osteointegração dos enxertos acontece após uma seleção de células

primordiais que são diferenciadas em osteoblastos sob a influência de fatores osteogênicos.

Lindhe et al. (1997) ressaltam que o principal objetivo esperado no uso dos enxertos é a capacidade de induzir seletivamente os eventos primordiais do processo de integração (osteoidução, osteocondução e osteogênese).

Segundo Tomford e Mankin (1999), para que ocorra a incorporação dos enxertos corticais ósseos aos leitos receptores, obrigatoriamente deve haver a revascularização do mesmo. Quando este processo não ocorre, a área de reparo perde o equilíbrio na reabsorção e eventualmente o enxerto sofre fraturas por fadiga. Os enxertos esponjosos são consolidados mais rapidamente.

Taga et al. (2000) realizam um experimento em cobaias e avaliam o comportamento dos enxertos autógenos e alógenos desmineralizados em falhas ósseas provocadas em calvárias de 50 cobaias. Neste modelo experimental, a análise histológica evidencia sinais de reabsorção na borda dos enxertos alógenos desmineralizados. Em duas semanas observam, em alguns casos, a neoformação óssea e fusão do enxerto.

Boldt et al. (2001) avaliam o uso do enxerto ósseo congelado em 173 reconstruções acetabulares e 79 femorais em humanos. Cabeças femorais obtidas de um banco de ossos local são particuladas e impactadas nas falhas. Após um seguimento médio de quatro anos relatam estabilidade clínica acetabular em 97,2 % dos casos, incorporação do enxerto em 74% nos acetábulo e 61% nos fêmures, segundo a análise radiológica.

Concluem que os resultados obtidos com o uso dos enxertos impactados são promissores, exceto para a reconstrução de defeitos acetabulares tipo três, onde um “cage” de reforço é recomendado.

Janssen et al. (2001) estudam o uso de anéis corticais homólogos obtidos da diáfise femoral para reconstrução de discos intervertebrais da coluna lombar em 137pacientes. Os resultados mostram que a artrodese foi alcançada em 94% dos casos e não relatam sinais de reabsorção.

Wilson et al. (2002) publicam um estudo que avalia a adesão de cirurgiões ortopédicos ao uso de aloenxertos na Escócia. Durante um ano, 126 cirurgiões são entrevistados e 73% utilizam enxertos ósseos principalmente nos casos de reposição de perdas ósseas nas revisões de artroplastia do quadril. Estes resultados são maiores do que aqueles encontrados em estudo similar realizado pelo mesmo autor em 1995, mostrando uma tendência de crescimento do uso de aloenxertos disponibilizados pelos bancos de tecidos.

Croci et al. (2003) analisam histologicamente enxertos ósseos criopreservados em banco de tecidos. Mesmo apresentando uma perda de viabilidade celular, seu uso não é contra-indicado pelos autores.

Weyts et al. (2003) analisam amostras de cabeças femorais coletadas após a artroplastia primária de dois doadores humanos. Os tecidos são criopreservados a – 80 °C por um período mínimo de seis meses, de acordo com os protocolos da Associação Americana e Européia de Bancos de Tecidos. Após este período, são realizadas biópsias nestes tecidos e submetidas a cultura celular (para observação da sobrevivência)

e PCR (*polymerase chain reaction*) para o mapeamento genético. Os resultados mostram a presença de células vivas e próprias dos doadores nas amostras analisadas.

Cabrita (2004) estuda o tratamento das artroplastias infectadas do quadril com e sem o uso do espaçador de cimento com antibiótico. Para a reconstrução do estoque ósseo, utiliza o enxerto homólogo maciço e particulado em 60,9% dos pacientes tratados e não relata complicações relacionadas ao uso dos mesmos.

Lavernia et al. (2004) pesquisam a adesão do uso de aloenxertos por cirurgiões ortopédicos em 340 hospitais nos Estados Unidos. O enxerto congelado procedente de banco de tecidos certificados pela Associação Americana de Bancos de Tecidos – AATB é o mais utilizado pelos ortopedistas para o tratamento de perdas ósseas do joelho e quadril.

Schreurs et al. (2004) analisam o emprego do enxerto ósseo em 23 artroplastias primárias e 19 revisões. Nas reconstruções primárias é utilizado o enxerto autólogo de íliaco em três casos e cabeça femoral autóloga nos outros vinte. Para as revisões, utilizam apenas enxerto autólogo em quatro casos, enxerto autólogo e homólogo em outros dois e apenas o enxerto homólogo de banco de tecidos nos 13 casos restantes. As análises mostram bons índices alcançados na avaliação funcional pós-operatória pelo “*Harris hip score*” e na análise de sobrevida pelo método de “*Kaplan-Meier*”. Os autores concluem afirmando que as reconstruções acetabulares com o uso de enxerto ósseo impactado e taça acetabular cimentada é uma técnica segura e durável.

Schreurs et al. (2005) realizam outro estudo similar, agora para avaliar o uso do enxerto ósseo homólogo procedente de um banco de tecidos na reconstrução de 33 falhas femorais. A impactação do enxerto ósseo precede a fixação da haste femoral. Após um seguimento mínimo de oito anos há melhora funcional da articulação pelo “*Harris hip score*” (de 49 para 85 pontos do pré ao pós-operatório) e boa sobrevida segundo o método de “*Kaplan-Meier*”. Embora quatro pacientes tenham sofrido fratura femoral, os autores concluem que a técnica de impactação de enxerto e uso de haste femoral cimentada resulta em excelente sobrevida por oito a treze anos.

Em uma revisão de conceitos, Giannoudis et al. (2005) ressaltam as vantagens no uso dos enxertos ósseos na área de ortopedia e traumatologia. Descrevem os eventos celulares presentes na literatura que envolvem o processo de osteointegração dos enxertos autólogos, homólogos e dos substitutos sintéticos biocompatíveis. Ressaltam a característica osteoindutiva dos enxertos frescos e osteocondutiva dos enxertos congelados e liofilizados.

Heyligers e Kleim (2005) constataam a presença de células vivas com potencial de crescimento em amostras de cabeças femorais criopreservadas a – 80 °C, por um período mínimo de seis meses. Os autores ressaltam a importância da discussão sobre o potencial osteoindutor dos enxertos e destacam a necessidade de investigar o papel destas células sobreviventes do tecido congelado no processo de formação óssea após a sua implantação.

Além das células ósseas, outras células e fatores inflamatórios possuem um papel fundamental no processo de reparação óssea. Os macrófagos e substâncias como interleucina um, seis, onze (IL-1, IL-6, IL-11), RANKL e osteoprotegerina (OPG) são encontradas durante os três primeiros dias após a lesão (Junqueira, Carneiro, 1999; Gerstenfeld, Einhorn, 2006).

Em relação aos macrófagos, Knighton et al. (1982) esclarecem que estas células estão presentes na zona de reparo e são capazes de produzir fatores de crescimento, que por sua vez, estimulam a neovascularização, proliferação e migração de outros tipos celulares, como por exemplo, os fibroblastos.

Outros autores mostram os efeitos da hipóxia no aumento da síntese do fator de crescimento endotelial pelos osteoblastos (Warren et al., 2001; Khan et al., 2000).

Salim et al. (2004) investigam ainda mais a influência do gradiente de oxigênio em outro estudo *in vitro*. Após a realização de cultura de osteoblastos obtidos de calvárias de ratos, submetem estas células a microambientes em hipóxia (gradiente de oxigênio a 2% e 21%) e anóxia (gradiente de oxigênio < 0.02%). Após análise com o uso das técnicas de “*microarray*” e “*western blot*” concluem que somente a situação de anóxia inibe *in vitro* a formação óssea e a deposição de cálcio na matriz extracelular. A análise da viabilidade celular revela que este efeito não é causado pela morte celular e sim pela interferência direta no gene “*Runx2*”, que é um fator de transcrição que regula a diferenciação dos osteoblastos e ativa os genes que participam da formação do osso.

3.4 Evolução dos bancos de tecidos no Brasil

Considerando os resultados satisfatórios no uso de aloenxertos captados de multidoadores de órgãos e tecidos com morte encefálica, um número cada vez maior de cirurgiões ortopédicos e dentistas optam atualmente pelo uso de enxertos homólogos, fato este percebido nas estatísticas dos últimos anos (Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos – ABTO²). Este fato é corroborado pelas desvantagens já conhecidas no uso dos tecidos autólogos, tais como o aumento da morbidade do doador, maior risco de infecção inerente ao segundo procedimento cirúrgico necessário para sua obtenção, risco de lesão nervosa e limitação da quantidade e variedade do enxerto obtido (Smith et al., 1984; Cunningham, Reddi, 1992; Drumond, 2000).

Esta tendência, aliada ao número crescente de pacientes portadores de perdas ósseas que procuram os serviços especializados de ortopedia e odontologia, impulsiona a criação de alguns Bancos de Tecidos no País de forma experimental.

Em 1997, com a reorganização do sistema de captação de órgãos, a valorização dos transplantes de tecidos no Brasil e o maior destaque aos transplantes de tecidos, fez-se necessária maior discussão sobre o tema.

O recém-criado Sistema Nacional de Transplantes – SNT, do Ministério da Saúde, discute e elabora juntamente com comissões técnicas, as primeiras legislações contemplando o uso de tecidos pela comunidade

² Registro Brasileiro de Transplantes; Órgão oficial da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos-ABTO: 2000 - 2007

médica³. Mais tarde, legislações especificamente voltadas para as atividades de um banco de tecidos são publicadas⁴ e passam a servir de diretriz na estruturação de novos bancos e a reestruturação daqueles existentes.

As diretrizes são embasadas nos protocolos já desenvolvidos em caráter experimental por alguns centros e nos “*standards*” desenvolvidos por Associações internacionais (European Association of Tissue Banks – EATB e American Association of Tissue Banks-AATB), que há décadas se dedicam ao desenvolvimento de pesquisas e padronização de técnicas que garantam a qualidade e viabilidade dos múltiplos tecidos obtidos pelos bancos.

Essa evolução na legislação promove a criação dos primeiros centros de referência na captação, processamento e distribuição em larga escala de tecidos musculoesqueléticos. Assim, os primeiros trabalhos nacionais relatando a experiência na reestruturação de um banco de tecidos são publicados (Amatuzzi et al., 2000, Amatuzzi et al., 2004).

Os Bancos de Tecidos credenciados pelo SNT recebem notificações de potenciais doadores das vinte e três centrais de notificação e captação de órgãos e tecidos – CNCDO, logisticamente espalhadas pelo País. Além disso, a legislação permite também a criação de equipes satélites em localidades com ausência de um banco de tecidos.

Dados e amostras biológicas relacionadas ao processo de obtenção, triagem dos doadores e uso dos tecidos são obrigatoriamente disponibilizados pelos bancos de tecidos, por um período de até 25 anos, tornando possível assim sua rastreabilidade.

³ Lei n.9434 de 5 de fevereiro de 1997, Decreto n. 2268 de 20 de junho de 1997.

⁴ Portaria n.1686 de 20 de setembro de 2002

Um banco deve possuir uma estrutura mínima composta por: sala cirúrgica para processamento dos tecidos ISO classe 5, com controle rigoroso de partículas suspensas, equipada com sistema de filtragem por filtros HEPA (*high efficiency particular air*) e módulo de fluxo laminar. Deve também possuir ultrafreezers que atinjam temperaturas de 80 a 110 graus negativos, vestiários de barreira, sistema de monitorização de temperatura ininterrupto, soroteca, instrumentais específicos, manuais de procedimentos atualizados, programas de validação de todos os equipamentos e procedimentos praticados e equipe de profissionais capacitados com disponibilidade diuturna.

Nos últimos anos, os bancos de tecidos oficiais no País assumem a responsabilidade de captar, processar e disponibilizar tecidos com qualidade e com baixo risco na transmissão de doenças. Além disso, com o aprimoramento das técnicas de transplantes de tecidos e o conhecimento mais apurado sobre a ação dos fatores de crescimento, surge a necessidade de conhecer, sintetizar e associar estas substâncias aos enxertos como forma de controlar e garantir melhores resultados nos tratamentos.

3.5 Histomorfometria

A histomorfometria visa analisar a morfologia óssea e seus componentes (medidas de volume, área, perímetro etc.). Esta técnica é desenvolvida primordialmente para a análise de rochas, e atualmente é

empregada para analisar comportamentos celulares dos tecidos a partir de sua conformidade estrutural, expressa em finas fatias sobre uma lâmina. A leitura histológica e a definição dos elementos que compõem a microtextura óssea é o principal objetivo deste procedimento. O método pode ser manual, semi-automático e automático. No primeiro, utiliza-se um microscópio acoplado a uma régua micrométrica. Na versão semi-automática o microscópio é acoplado a um computador, que por sua vez utiliza um software que permite gravar e analisar quantitativamente as imagens de uma lâmina, vista pelas lentes do microscópio, que são projetadas a uma placa digitalizadora e desenhadas manualmente. A definição de cada estrutura histológica cabe a um profissional. Por último, a técnica automática permite capturar as imagens do microscópio com o uso de câmeras de vídeo e a definição de cada estrutura é determinada pelo próprio computador, que analisa automaticamente a coloração de cada estrutura. Embora esta última seja a técnica mais veloz, é também a de menor sensibilidade (Garrahan et al., 1986 apud Jorgetti, 2003; Aaron, Shore, 2003).

A histomorfometria analisa parâmetros primários ou estáticos (extensão, número e distância) e os parâmetros derivados, que são divididos em estruturais (analisam estrutura óssea) e cinéticos (analisam a dinâmica do tecido ósseo). Embora grande parte dos estudos histomorfométricos sobre o tecido ósseo envolvendo animais sejam realizados em ratos, alguns autores optam pelo uso do coelho devido ao seu porte e morfologia óssea favorável para a realização dos mesmos (Gameiro, 1997; Jorgetti et al., 2000, Butterfield et al., 2005; Jung et al., 2005; Tamae, 2005).

3.6 Fatores de crescimento

Após a década de 1980, ocorrem avanços significativos no estudo de substâncias que possam assumir um papel coadjuvante no processo de reparação do tecido ósseo e na osteointegração dos enxertos. Estas substâncias são denominadas fatores de crescimento, e atuam como indutores e mediadores da resposta celular em sinergismo com as células pertencentes ao tecido ósseo (Centrella et al., 1989; Urist, 1992).

Fatores de crescimento são proteínas compostas por cadeias polipeptídicas (100 a 200 aminoácidos) e se apresentam na forma monomérica, dimérica ou trimérica. Possuem atuação na regulação do crescimento celular, síntese de proteínas, divisão, proliferação, migração e diferenciação celular. Cada grupo destas proteínas é produzido por linhagens celulares específicas (plaquetas, fibroblastos, células endoteliais, macrófagos, monócitos etc.) e possuem distintas propriedades de ação local. Estes polipeptídeos se ligam aos receptores de membrana celular específicos e agem como reguladores locais da função celular através dos mecanismos de estimulação ou inibição (Riley et al., 1996).

No tecido ósseo se encontram alguns dos fatores de crescimento que atuam em sua reparação e manutenção. Entre os mais citados estão as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), fatores de crescimento símile à insulina I e II (IGF-I e IGF – II), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fatores de crescimento de transformação (TGF) e o fator de crescimento derivados das plaquetas – PDGF (Solheim, 1998).

As BMPs despertam grande interesse entre os pesquisadores. Estudos que avaliam seu efeito nos tecidos musculoesqueléticos tornam-se mais freqüentes, porém sua aplicabilidade clínica é comprometida pela complexidade e onerosidade de sua purificação em laboratório. Além disso, a pouca quantidade de BMP no tecido ósseo (1 a 2 µg BMP/Kg de osso cortical) impõe o uso de grandes porções de osso para sua extração, em quantidades que sejam aplicáveis clinicamente (Tuominen, 2001).

Outras destas substâncias com fontes mais disponíveis são também purificadas em laboratório e disponibilizadas sob a forma recombinante. A exemplo disso, a produção e uso dos recombinantes de PDGF e TGF extraídos de plaquetas fomenta mais estudos que busquem alternativas efetivas que auxiliem no processo de reparo do tecido ósseo.

Uma explanação mais complexa sobre as plaquetas e os fatores de crescimento por ela sintetizados são apresentados a seguir.

3.6.1 Plaquetas

As plaquetas são isoladas pioneiramente por Zimmermann (1860), Max Schultz (1865) e Osler (1874), que descrevem as primeiras características morfológicas, embora não reconheçam sua devida importância. Mais tarde, Hayem (1878) relata que as plaquetas se desenvolvem e se diferenciam em hemácias.

A função das plaquetas é descrita por Bizzozzero em 1882 (apud Bithell, 1998) que descreve sua qualidade adesiva e participação no processo de coagulação do sangue de coelhos e cobaias.

As plaquetas são consideradas células incompletas, por serem formadas apenas por fragmentos citoplasmáticos de células que lhes dão origem – os megacariócitos. Possuem formato discóide, são anucleadas, com tamanho heterogêneo (entre dois a três μm de diâmetro). No sangue, o número circulante dessas células está entre 200 a 400.000 unidades por mm^3 . As plaquetas são liberadas do citoplasma dos megacariócitos medulares e chegam até a circulação sanguínea, onde possuem uma vida média de oito a dez dias (Lorenzi, 2003).

Vermeylen et al. (1983) apud Melende (2003) e Lorenzi (2003) descrevem a arquitetura das plaquetas em regiões:

- a) Zona periférica: Camada mais externa da plaqueta onde se situam elementos (antígenos, glicoproteínas e enzimas) que interagem com o meio externo (com a parede dos vasos ou com outras células). Algumas proteínas plasmáticas e fatores de coagulação ficam aderidos nesta camada até que entrem em atividade quando estimulados. Nesta porção se encontram também alguns receptores de membrana que exercem função regulatória ou inibitória.
- b) Zona Gelatinosa ou Citoplasmática (Zona Gel): é constituída de microfilamentos e proteínas relacionadas ao processo de contração da organela e emissão de pseudópodos. Sua arquitetura é composta por proteínas arranjadas, também chamadas de microtúbulos. Esses microtúbulos são cilindros ocos, rígidos e resistentes que se conectam a microfilamentos e dão origem ao citoesqueleto das

plaquetas. Os microtúbulos são constituídos por uma proteína chamada tubulina, que tem a capacidade de promover uma contração estrutural, conforme a polimerização (repouso) e despolimerização (ativação). Por sua vez, os microfilamentos são formados por actina que também participam do mecanismo de contração. Na extremidade destes filamentos, ocorre remodelação pela associação e dissociação de suas subunidades, fazendo com que o citoesqueleto mude de forma. A contração das plaquetas possibilita a secreção de seus produtos, presentes nos corpos densos, grânulos alfa e lisossomas. Eventualmente, complexos de Golgi estão situados nesta região e podem acumular PDGF no seu interior (Ostman et al.,1992).

- c) Sistema de membranas: São invaginações da membrana plasmática formando um canalículo conectado à superfície e tem como função ampliar a área de contato, comunicar o endoplasma com o meio externo e permitir a saída de produtos.
- d) Zona de Organelas: Nessa porção se encontram várias estruturas chamadas de grânulos alfa, corpos densos e lisossomas. Os grânulos alfa contêm muitas proteínas, incluindo o fator de crescimento derivado de plaquetas – PDGF e fator transformador de crescimento - TGF. Podemos também encontrar nessas estruturas outros constituintes, como os fatores de coagulação (fator V, fibrinogênio, fator VIII) e proteínas adesivas (integrinas, fibronectina, vitronectina e fator de Von Willebrand). Nas plaquetas, as integrinas participam do processo de agregação plaquetária. Nos lisossomas podemos encontrar as enzimas, como fosfatase ácida, glucosaminidase, galactosidase.

Na circulação, as plaquetas não ativadas são encontradas agrupadas ou isoladas. A ativação pode ocorrer por processo físico, como no caso de um vaso lesado, ou por processo químico, ocasionado pelas substâncias coaguladoras como a trombina. Após a ativação, as plaquetas se ligam ao colágeno através de receptores presentes na membrana externa. Sua forma é alterada passando da forma discóide para a forma irregular. Essa alteração de forma é fundamental em sua interação com o meio extracelular e sua agregação com outras estruturas e células. Este processo de agregação plaquetária é facilitado por substâncias ligantes chamadas de integrinas. As integrinas mediam as interações entre o citoesqueleto e a matriz extracelular necessárias para sua fixação. A presença de íons de cálcio permite a formação de um complexo chamado de protrombinase (associação plaquetas, fator V e Ca^{++}). A protrombinase é clivada posteriormente em trombina, que por sua vez, cliva as moléculas de fibrinogênio, transformando-o em fibrina por meio das ligações arginina-glicina. A fibrina propicia maior estabilidade da agregação plaquetária (coágulo). Outra função dos íons de cálcio é induzir a emissão de pseudópodos pela membrana. Isto porque a presença de trombina induz o influxo maciço de íons de cálcio para dentro do citosol, induzindo o prolongamento dos filamentos de actina e formação de ramificações do citoplasma. Possibilita também a migração dos grânulos e subprodutos no citoplasma, que são secretados durante a contração das plaquetas (Lorenzi, 2003; Alberts et al., 2004).

As plaquetas, como todas as células de um organismo multicelular, dividem-se quando há necessidade de mais células. Geralmente tal necessidade é determinada por sinais ou estímulos extracelulares de outras células ou de mitógenos.

3.6.2 Fator de crescimento derivado de plaquetas – PDGF

O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) é um dos primeiros mitógenos descritos na literatura. É composto por dois peptídeos, A e B, que são codificados por diferentes genes (PDGFA e PDGFB). Essa proteína pode ser encontrada na forma homóloga como PDGF-AA e PDGF-BB ou heteróloga - PDGF-AB (Ostman et al., 1992; Graves, Cochran, 1994; Alberts et al., 2004).

O peso molecular pode variar entre 28 e 35 kDa. O PDGF é encontrado nas plaquetas, especificamente em seus grânulos-alfa. O PDGF pode ser sintetizado por vários tipos celulares como fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, macrófagos, porém, grande estoque deste fator de crescimento é encontrado nos grânulos plaquetários. A ação do PDGF é exercida sobre uma célula pela ativação de dois receptores de membranas (α e β) que possuem atividade tirosina-quinase e que promovem a ativação dessas vias de sinalização intracelular pela ação da enzima PI3-quinase. Esta enzima ativa outras proteíno-quinases, resultando no aumento da tradução de mRNA e estimulando o crescimento e proliferação celular (Centrella et al., 1989; Heldin, Westermark, 1999; Alberts et al., 2004).

Centrella et al. (1989) em um estudo “in vitro” analisam o efeito do PDGF em culturas de osteoblastos obtidas de fetos de ratos e ressaltam a participação direta do PDGF no aumento da replicação e síntese das proteínas envolvidas no processo de formação óssea, pela interação como receptores de membranas. O efeito atribuído ao PDGF ocorre mesmo com a ausência de outros fatores de crescimento.

Marx e colaboradores (1998) descrevem as atividades mais importantes do PDGF: mitogênese (multiplicação celular de agentes reparadores), angiogênese (mitose endotelial em capilares) e ativação de macrófagos (ação fagocitária).

Solheim (1998) descreve que o dímero PDGF-BB e PDGF-AB atuam como fatores de crescimento sistêmicos e que o PDGF-AA atua como um fator de crescimento local no osso.

O PDGF é o primeiro fator de crescimento presente em uma ferida, liberado pelas plaquetas após a coagulação do sangue. Estimula a divisão celular em diversos tipos celulares, inclusive os fibroblastos, durante o processo de cicatrização do tecido conjuntivo (Heldin, Westermark, 1999; Alberts et al., 2004).

Muitos dos tipos celulares que respondem à ação do PDGF necessitam aderir a um determinado substrato presente na matriz extracelular para iniciar o crescimento e proliferação, caso contrário podem até entrar em apoptose. Assim, estas células são dependentes de um fenômeno denominado *ancoragem-dependente*.

As integrinas possuem papel fundamental neste fenômeno, pois ao estarem presentes na superfície celular e aderidas aos filamentos de actina do citoesqueleto, suas ligações a moléculas presentes na matriz extracelular resultam em ancoragem da mesma. A ligação das integrinas promove também a ativação da enzima PI3-quinase, responsável pela emissão de sinais mitogênicos (Heldin, Westermark, 1999; Alberts et al., 2004).

3.6.3 Fator de crescimento de transformação - TGF

Este fator de crescimento pertence à família das proteínas morfogenéticas ósseas (BMP). É constituído por um grupo de polipeptídeos composto por duas subunidades α e β unidas por ponte dissulfídrica. O TGF é produzido pelos megacariócitos e, mais tarde, com a formação plaquetária, é incorporado e armazenado nos grânulos alfa. Este fator de crescimento pertence também ao grupo dos mitógenos. É liberado pelos grânulos plaquetários durante sua degranulação, evento este induzido por sua ativação na presença da trombina. Pode também ser secretado pelos macrófagos (Marx, 1998, Alberts et al., 2004).

Canalis et al. (1993) relatam que o PDGF BB associado ao TGF β possui potente ação mitogênica, sendo necessário para o restabelecimento da população celular no processo da cicatrização.

Estudos têm demonstrado efeito positivo do TGF β no processo de reparação dos tecidos, na diferenciação de células mesenquimais. No tecido ósseo, o TGF atua como um potente regulador da atividade celular, participando de vários estágios da formação óssea (Centrella et al., 1994;

Riley et al., 1996) porque possui a capacidade de modular a diferenciação e proliferação de osteoblastos e condrócitos, os quais são precursores no processo de reparação óssea (Aufdemorte, 1992, Lind et al., 1996, Marx et al., 1998, Lane et al., 1999).

Nos osteoclastos, o TGF pode induzir ou inibir sua atividade, promovendo assim um efeito regulatório da reabsorção (Centrella et al., 1994; Sumner et al., 1995).

3.6.4 O uso clínico dos fatores de crescimento

Conforme já citado, a evolução no estudo dos fatores de crescimento promove o desenvolvimento de técnicas que permitem o isolamento e a purificação laboratorial destas substâncias, e estudos que avaliam seus efeitos no tecido ósseo em modelos experimentais com animais são apresentados:

Lynch et al. (1991) associam o PDGF ao fator de crescimento similar à Insulina-IGF e os aplicam ao redor de implantes de titânio fixados em regiões mandibulares de cães da raça “beagles”. Após a análise dos resultados, concluem que o grupo tratado com o PDGF/IGF apresenta uma quantidade superior de osso neoformado quando comparado ao grupo controle. Concluem que os fatores de crescimento estimulam a regeneração do tecido ósseo e aceleram o processo de osteointegração dos implantes.

Aufdemorte et al. (1992) avaliam o efeito do TGF associado ao gel de metilcelulose ao redor de implantes fixados na tíbia de babuínos. Após 22 dias, a análise histomorfométrica mostra um efeito substancial do TGF no aumento da atividade e proliferação de osteoblastos.

Giannobile et al. (1994) repetem a associação do PDGF com o IGF e avaliam os resultados desta aplicação em defeitos periodontais em primatas e cães e comparam os resultados encontrados em ambos os modelos experimentais. Relatam que a quantidade de osso neoformado e a resposta óssea ao estímulo é superior no grupo tratado com o PDGF e IGF nos dois modelos. A quantidade de osso neoformado é superior nos primatas (64,1%) em relação aos caninos (51,4%), porém a resposta óssea ao estímulo é mais relevante nos caninos (65%) quando comparado aos primatas (21,6%). Concluem que a associação do PDGF e IGF tem efeito consistente no processo de regeneração óssea nos dois modelos estudados.

Em outro estudo, Giannobile et al. (1996) comparam o uso isolado e associado do PDGF e IGF em defeitos periodontais realizados em primatas. A análise dos resultados mostra que a aplicação isolada do IGF não tem efeito relevante no processo de cicatrização, enquanto que o PDGF é isoladamente mais eficiente na neoformação óssea. No entanto, os efeitos mais expressivos no processo de cicatrização e osteogênese são encontrados no uso das duas substâncias associadas.

Lind et al. (1996) relatam o efeito estimulatório do TGF em experimento com dez cães labradores. O fator de crescimento foi aplicado ao redor de implantes de titânio no côndilo femoral dos animais. Cada animal recebe dois implantes, sendo um com a aplicação de 0.3 µg de rhTGF-β1 e o outro sem o fator de crescimento. Após seis semanas, a análise histomorfométrica evidenciou um aumento de 59% na taxa de crescimento ósseo no grupo tratado com TGF em relação ao grupo controle (sem o TGF).

Stefani et al. (2000) aplicam o PDGF associado ao IGF ao redor de implantes fixados nas cavidades provocadas após a exodontia em cães. Relatam que a associação do PDGF/IGF tem participação ativa no processo de reparação óssea expressa pela constatação de maior porcentagem de osso e maior contato do implante ao leito receptor.

Khan et al. (2000) em uma revisão sobre os recombinantes de fatores de crescimento confirmam o envolvimento do PDGF com o tecido ósseo pela ativação dos receptores do tipo PDGF- β detectados na membrana de osteoclastos por imunohistoquímica. Ressaltam que embora estas substâncias ainda não sejam utilizadas no uso clínico mostram-se como um potente meio de estimular o crescimento ósseo.

Embora o efeito positivo seja descrito e evidenciado por alguns trabalhos envolvendo animais, outras soluções mais simples, seguras e com menor custo são destacadas.

Marx (1998) propõe o uso dos fatores de crescimentos na forma “in natura” presentes do plasma autólogo rico em plaquetas - PRP. Seu preparo através de um protocolo simplificado, diferente do método mais complexo realizado pelos bancos de sangue, motiva novos estudos sobre o tema.

O uso do PRP e os métodos de obtenção são apresentados a seguir:

3.7 Plasma autólogo rico em plaquetas-PRP

O plasma autólogo rico em plaquetas é um hemoderivado atóxico, não imunorreativo, obtido através de técnicas simplificadas de seqüestração e concentração de plaquetas após múltiplas centrifugações de amostras sanguíneas coletadas momentos antes de sua preparação. Contém fatores de crescimento produzidos e liberados pelos grânulos plaquetários, tais como o fator de crescimento derivado de plaquetas – PDGF e fatores de crescimento de transformação –TGF (Marx, 1998; Anitua, 1999; Lozano et al., 1999; Okuda et al., 2003).

A separação do PRP ocorre pela diferença de densidade e tamanho das células que constituem o sangue. Após a centrifugação, as células mais pesadas, como as hemáceas, ficam retidas no fundo do tubo. Logo acima será depositada uma camada visivelmente mais clara denominada plasma, que por sua vez se divide em duas camadas. Na primeira (porção mais inferior) se encontra a denominada “buffy coat”, que é rica em plaquetas e leucócitos (PRP). Logo acima, verifica-se a segunda camada, o plasma com plaquetas dispersas (plasma pobre em plaquetas-PPP). No momento da utilização, a geleificação do PRP é feita através da ativação da cascata de coagulação pela adição de solução de tromboplastina e cloreto de cálcio (via extrínseca).

3.7.1 Métodos de obtenção e uso clínico do PRP

Como já abordado, em 1998, Marx et al. publicam os resultados animadores de um trabalho que apresenta uma metodologia simplificada de obtenção do PRP. O processo consiste em centrifugar a 5600 rpm amostras de sangue total acrescido do anticoagulante citrato de sódio. Assim, a diferença de densidade permite a divisão do plasma em Plasma Rico em Plaquetas – PRP (situado na porção inferior da bolsa) e Plasma Pobre em Plaquetas – PPP (situado na porção superior). Afirmam que o processo aumenta a concentração de plaquetas em 330% do nível normal do sangue. No mesmo trabalho o autor realiza a aplicação do PRP associado a enxertos autógenos retirados do íliaco posterior. São comparados dois grupos. No primeiro, 44 defeitos mandibulares são tratados apenas com enxerto autólogo e outros 44 são tratados com enxerto autólogo associado ao PRP. Após seis meses, são realizadas avaliações radiográficas e histomorfométricas dos locais de enxertia. Os dados mostram um volume superior e maior taxa de maturação óssea no grupo tratado com PRP e concluem que seu uso associado ao enxerto autólogo é uma disponível e prática ferramenta, que resulta em maior formação óssea.

Motivados pela possibilidade prática de obtenção dos fatores de crescimento presentes no PRP, diversos estudos apresentam e reproduzem outros protocolos (Quadro 2):

Quadro 2. Protocolos simplificados para obtenção do PRP

AUTOR	MATERIAL	CENTRIFUGAÇÃO	ANTICOAGULANTE	RESULTADO
Lozano et al., 1999	bolsa	1900 G por 3' + 500 G por 5'	edta	0.86×10^9 plaq/mL ou 860.000 plaq/ μ l
Sonnleitner et al., 2000	tubo	160 G por 20' + 400 G por 15'	citrato sodio	2×10^6 plaq/250 μ l
Kim et al., 2001	tubo	400 G por 40' + 5000 G por 15'	acido cítrico dextrose-ACD	1.48×10^9 plaq/mL ou 1487.000 μ l
Lemos et al., 2002	tubo	800 rpm por 10' + 1300 rpm por 10'	citrato sodio	1.2×10^9 plaq/mL ou 1.200.000 μ l
Aghaloo et al., 2002	tubo	1500 rpm por 10' + 3000 rpm por 10'	acido cítrico dextrose-ACD	Proporção da contagem: 1:100 (1 μ l PRP:100 μ l oxalato de amônio 1%) $1,5 \times 10^9$ /mm ³ (1:100)
Okuda et al., 2003	tubo	2400 rpm por 10 ' + 3600 rpm por 15'	acido cítrico dextrose-ACD	$0,70 \times 10^9$ plaq/mL ou 700.000 plaq/ μ l
Furst et al., 2003	bolsa	2890 G por 6' + 153 G por 12'	acido cítrico dextrose-ACD	1.04×10^9 plaq/mL ou 1040.000 plaq/ μ l
Wilson, 2003	tubo	1800 rpm 15'	citrato sódio	Proporção 1:200 (20 μ l PRP : 2000 μ l oxalato. 111.000 a 1.700.000 plaq/mm ³
Efeoglu et al., 2004	tubo	300 G por 10' + 5000 G por 5'	edta	3.134.500 plaq/ μ l
Butterfield et al., 2005	tubo	150 G 20' + 400 G 10'	acido cítrico dextrose-ACD	$2.061.000 \pm 854.000$ /mm ³
Tamae, 2005	tubo	200 rpm 20' + 400 G 10'	acido cítrico dextrose-ACD	Proporção da contagem: (10 μ l PRP:200 μ l oxalato de amônio 1%) $1,62$ a $1,84 \times 10^9$ plaq/mL ou 1.612.000 a 1.846.000 plaq/ μ l

A evidente facilidade de obtenção e aplicabilidade clínica do PRP motiva seu uso em escala crescente. Vários trabalhos ao longo dos anos investigam o efeito dos fatores de crescimento presentes no PRP durante o processo de reparação do tecido ósseo. Na odontologia o uso do PRP é mais freqüente e sua aplicação ocorre principalmente nas áreas de implantodontia, periodontia e bucomaxilofacial. Com o intuito de disponibilizar mais uma opção de tratamento das perdas ósseas ou da melhor integração de enxertos e materiais de implantes, estudos em humanos, “in vitro” e com modelos experimentais em animais são desenvolvidos com o uso do PRP isolado ou associados a enxertos autógenos, xenoenxertos, biomateriais, materiais de implantes, entre outros.

3.7.1.1 O uso do PRP em humanos

Shanaman et al. (2001) analisam os efeitos do PRP na técnica de regeneração óssea guiada (*guided bone regeneration* - GBR), em defeitos de cristas alveolares com perdas ósseas horizontais e verticais. A adição de PRP não mostra diferenças na qualidade e quantidade de osso neoformado em comparação com o grupo tratado sem a adição de PRP.

Camargo et al. (2002) utilizam o PRP associado a enxerto bovino com a técnica GTR (*guided tissue regeneration*) e o comparam ao uso isolado de GTR em 18 pacientes portadores de defeito ósseo periodontal. Os moldes acrílicos são utilizados para mensurar os defeitos ósseos antes e seis meses após a realização do procedimento cirúrgico. Os resultados mostram benefícios clínicos e estatísticos no efeito regenerativo do GTR quando este

é associado ao enxerto bovino e PRP. Os autores relatam ainda que a combinação de mais de uma técnica cirúrgica garante maior potencial de melhora nos resultados clínicos em relação à técnica utilizada isoladamente.

Feres Junior (2003) avalia o índice de sucesso de implantes osteointegrados com e sem o uso do PRP preparado com a técnica de centrifugação. É realizada pesquisa em 1267 prontuários, totalizando 1572 implantes, sendo que em 642 pacientes foi utilizado o PRP. Com base nos dados obtidos, conclui que o uso de PRP associado à fixação de implantes conduz à menor perda dos mesmos, aumentando o índice de percentual de sucesso de maneira geral, principalmente nos implantes maxilares.

Mazor et al. (2004) tratam 105 pacientes portadores de falhas ósseas maxilares. Os defeitos são preenchidos com um preparado de enxerto composto por osso autógeno (30 a 40%) e osso xenógeno Bio-Oss® (60 a 70%). O enxerto é associado a 10mL de PRP preparado com 50mL de sangue autólogo. Após seis meses, a análise radiográfica mostra uma aceleração do processo de cicatrização óssea e de partes moles. Os autores relatam também a facilidade de manuseio cirúrgico dos enxertos quando associados ao PRP.

Dori et al. (2007) investigam o efeito do PRP na cicatrização de defeitos periodontais de 30 pacientes portadores de doença periodontal. Os defeitos são tratados com ou sem a associação do PRP com a matriz óssea bovina (BioOss®) e membrana reabsorvível de colágeno (BioGide Perio®). O PRP é preparado conforme o método de Curasan®. Durante um ano, os pacientes são submetidos a avaliação clínica e alguns parâmetros são

comparados (índice de placa, índice gengival, hemorragia durante a sondagem, profundidade de sondagem, quantidade de recessão gengival e o nível clínico de inserção). Ao final, os autores não evidenciam diferenças significantes nos parâmetros analisados com o uso do PRP.

3.7.1.2 O uso do PRP em modelos experimentais com animais.

Kim et al. (2002a) associam o PRP ao enxerto de osso humano desmineralizado e os implantam em defeitos provocados na crista ilíaca de 10 cães. Em cada animal, três falhas são realizadas e os implantes de titânio são fixados isoladamente (controle), associados ao enxerto (grupo 2) e associados ao enxerto e PRP (grupo 3). Na análise histomorfométrica observam uma porcentagem maior de contato entre o enxerto e o osso receptor no grupo tratado com o PRP.

Estes mesmos autores (2002b) realizam novo estudo em cães com a intenção de observar diferenças na reparação de defeitos ósseos ao redor de implantes de titânio. O primeiro grupo é tratado apenas com matriz de gesso Paris, o segundo com este substituto ósseo associado ao PRP e um terceiro grupo sem qualquer tipo de tratamento (controle). Após seis e doze semanas as amostras são submetidas à avaliação histológica e histomorfométrica. Os resultados mostram maior neoformação óssea ao redor dos implantes pertencentes aos grupos um e dois, sendo que neste último (PRP e matriz) observa-se maior porcentagem de contato entre implante e osso hospedeiro, além de neorfomação óssea mais generalizada.

Aghaloo et al. (2002) publicam um estudo que utiliza o PRP em defeitos ósseos provocados em crânio de 15 coelhos. A amostra foi estratificada em três grupos com análise em um, dois e quatro meses após a cirurgia. Em cada animal são realizados quatro defeitos, depois tratados com PRP isolado, PRP associado ao osso autólogo, osso autólogo e nenhum tratamento (controle). Os resultados mostram um significativo aumento na densidade óssea nos grupos tratados com osso autólogo e osso autólogo associado ao PRP quando comparados ao grupo controle, porém não houve significantes alterações na comparação osso autólogo mais PRP versus osso autólogo em nenhum dos períodos analisados. Os autores destacam a importância de dois detalhes no estudo: o número pequeno de amostras (cinco animais por período) e a utilização de osso cortical, diferindo dos demais estudos similares.

Furst et al. (2003) estudam a associação do PRP à matriz de hidroxiapatita bovina utilizada no preenchimento de seios maxilares de 12 porcos. De um lado, o seio é preenchido com o enxerto associado ao PRP e o do outro apenas o enxerto. Dois implantes metálicos são fixados bilateralmente sobre a área enxertada. Os animais são sacrificados após três, seis e doze semanas. A análise histomorfométrica mostra um percentual de contato osso-implante menor no grupo tratado com PRP e sua associação à matriz de hidroxiapatita bovina não leva a resultados superiores.

Wilson (2003) estuda a estimulação da consolidação óssea pelo PRP aplicado nas falhas diafisárias provocadas no rádio de coelhos. Após uma análise radiográfica e histológica a autora conclui que o PRP apresenta

propriedades osteogênicas e osteoindutivas e possui potencial para aplicabilidade clínica em humanos.

Croci et al. (2003a) analisam o efeito do concentrado de plasma em falhas ósseas de dois milímetros em fêmures de 10 camundongos isogênicos. O sangue periférico é coletado e submetido à técnica de centrifugação simplificada para separação do PRP. Dois grupos são comparados. No grupo I (controle) as falhas não recebem tratamento e no grupo II, o concentrado de plasma é aplicado. Após duas semanas, os animais são sacrificados, e as peças enviadas para análise anatomopatológica. Concluem que o concentrado não leva à estimulação da formação do calo ósseo, porém ressaltam uma tendência de formação de matriz óssea no grupo tratado com PRP.

Wiltfang et al. (2004) analisam o efeito do PRP em falhas ósseas provocadas no osso frontal de 24 suínos. O PRP é preparado com o uso de dois diferentes *Kits* (Curasan - Kleinostheim, Germany e 3i- Deutschland, Hanau, Germany). As falhas são tratadas com enxerto autógeno, enxerto autógeno associado ao PRP, Cerasorb® (grânulos de fosfato tricálcico), blocos de BioOss® (osso esponjoso bovino) e Colloss® (blocos esponjosos de colágeno bovino). Após duas, quatro e doze semanas, amostras são submetidas à análise histomorfométrica. Concluem que o uso de PRP não traz benefício quando associado a substitutos ósseos, porém apresenta efeito significativo na regeneração óssea quando associado ao enxerto autógeno.

Roldán et al. (2004) investigam o efeito do PRP associado ao enxerto bovino aplicado na região mandibular de ratos Wistar e não encontram

efeitos significativos na formação óssea. Os autores correlacionam o resultado à ausência de osteoblastos no enxerto.

Zhang et al. (2004) realizam uma experimentação em 24 coelhos Nova Zelândia. Tratam falhas ósseas provocadas na porção superior do rádio com substituto ósseo poroso cerâmico com e sem PRP. Após duas, quatro, oito e doze semanas realizam avaliação histomorfométrica, por microscopia óptica e eletrônica. Os resultados mostram maiores porcentagens de osso neoformado na segunda semana do pós-operatório no grupo tratado com PRP. Sugerem o uso do PRP no tratamento ortopédico de defeitos em ossos longos e ressaltam a necessidade de mais estudos sobre o efeito do PRP no tecido ósseo.

Butterfield et al. (2005) analisam o efeito do enxerto autólogo associado ao PRP na elevação de seios maxilares em 12 coelhos. O número de plaquetas obtidas no PRP preparado com a técnica de dupla centrifugação é superior a dois milhões de unidades. Os animais são sacrificados após duas, quatro e oito semanas, sendo as amostras submetidas à análise histomorfométrica e por tomografia computadorizada. Os autores relatam que o uso de coelhos é um apropriado modelo para investigação do PRP, pois suas características hematológicas são similares às dos humanos. Ao final do trabalho, não encontram evidências de ação estimulatória do PRP na cicatrização de enxertos autólogos. Pela histomorfometria não são evidenciados aumentos significantes na taxa de formação óssea e na densidade com a aplicação do PRP.

Fennis et al. (2005) estudam o efeito do PRP associado a enxertos autólogos particulados colocados em um arcabouço de osso irradiado a 50 kGy em falhas mandibulares de cabras. Os resultados levantados neste experimento pelas análises radiográfica e histológica são comparados aos dados de outros trabalhos do autor com modelo experimental idêntico, mas que não utiliza o osso irradiado. Assim, os grupos são formados: Grupo I (osso não irradiado + enxerto autólogo particulado); Grupo II (osso não irradiado + PRP e enxerto autólogo particulado) e Grupo III (osso irradiado + PRP e enxerto autólogo particulado). Na conclusão, relatam que as falhas tratadas no Grupo III apresentam cicatrização óssea inferior ao Grupo II, mas que o PRP colabora compensando as desvantagens causadas pela irradiação.

Tamae (2005) realiza um trabalho sobre o efeito do PRP no processo de neoformação óssea em alvéolos dentários de coelhos após exodontia. Os alvéolos são tratados com a aplicação de PRP e avaliados após três, quatro e oito semanas por microscopia convencional e por fluorescência. O autor conclui que a aplicação do PRP resulta em melhor neoformação óssea de forma quantitativa e qualitativa.

Jung et al. (2005) comparam os efeitos do PRP com outros substitutos ósseos e fatores de crescimento comercialmente disponíveis em defeitos ósseos provocados na calvária de 16 coelhos Nova Zelândia. A amostra é estratificada em: Grupo 0 (sem tratamento ou controle); Grupo 1 (uso isolado da matriz de fibrina ou Tissucol®); Grupo 2 (uso isolado do PRP); Grupo 3 (uso do Tissucol® associado ao fator de crescimento rhBMP-2);

Grupo 4 (uso do PRP associado ao rhBMP-2). Após quatro semanas, a análise histomorfométrica não mostra diferenças significantes tanto com o uso do PRP quanto da matriz de fibrina em relação ao grupo controle. Ambos, porém, se mostram como eficazes sistemas de liberação da proteína morfogenética (rhBMP-2).

Dallari et al. (2006) analisam o tratamento de falhas ósseas de 6mm de diâmetro provocadas na porção distal femoral de 48 coelhos divididos em quatro grupos. No Grupo I comparam o efeito do PRP versus o efeito do aspirado de medula obtida da crista ilíaca; no Grupo II comparam o efeito do PRP e do aspirado de medula associados ao enxerto autólogo liofilizado e irradiado à 25 KGy(*freeze-dried bone allografts*-FDBA); no Grupo III comparam o uso do FDBA isolado versus a associação do PRP com o aspirado de medula e, por último, no Grupo IV comparam o uso da FDBA associado ao PRP e ao aspirado de medula versus nenhum tratamento (controle). Amostras são obtidas após duas, quatro e doze semanas e submetidas às análises histológica e histomorfométrica. Os resultados mostram uma taxa de cicatrização óssea superior nos defeitos tratados com PRP associado ao aspirado de medula; no PRP associado ao FDBA; no FDBA associado ao aspirado e também no FDBA associado ao PRP e aspirado. São descritas evidências de cicatrização óssea no modelo adotado em duas semanas. Embora não seja atribuído ao PRP um efeito exclusivo neste processo, os autores concluem que a combinação dos três elementos (PRP, FDBA e aspirado de medula) acelera a cicatrização e remodelação do tecido ósseo. O efeito crítico das falhas de 6 mm também é relatado.

3.7.1.3 Estudos “in vitro” com o PRP

Gruber et al. (2002) avaliam “in vitro” a resposta mitogênica de células ósseas obtidas de amostras de osso trabecular humano em meios de cultura contendo PRP. Observam que as plaquetas aumentam a proliferação dessas células e reforçam a hipótese de que as mesmas possuem um efeito local que regula o processo de regeneração óssea.

Weibrich et al. (2002b) realizam um experimento com amostra de sangue total de humanos e analisam a quantidade de plaquetas e concentração de fatores de crescimento presentes no sangue total e no PRP obtido por plasmaférese. A quantificação de PDGF, TGF e IGF são realizadas pelo método ELISA. Após a análise dos valores obtidos, não correlacionam a quantidade de plaquetas presentes tanto no sangue total quanto no PRP com a concentração de fatores de crescimento obtidos. Alertam que uma predição dos níveis de fatores de crescimento baseada no número de plaquetas presentes no sangue ou no PRP não são confiáveis.

Efeoglu et al. (2004) realizam análise “in vitro” do PRP obtido de amostras de sangue de coelhos e preparado com a técnica simplificada de dupla centrifugação. Para a coleta das amostras é realizada punção da veia marginal da orelha. Após a primeira e segunda centrifugação (330 G por 10 minutos e 5000 G por 5 minutos respectivamente) realizam a contagem do número de plaquetas presentes na metade superior do plasma (plasma pobre em plaquetas - PPP) e na metade inferior (PRP). No PPP os valores médios de plaquetas são de 1.061.000/ μ l e no PRP 3.134.500/ μ l. Segundo os autores, não há correlação do gênero com o

número de plaquetas alcançado e ressaltam as facilidades encontradas no uso deste modelo animal.

Kanno et al. (2005) avaliam os efeitos “in vitro” do PRP na proliferação e diferenciação em duas linhagens de células obtidas de osteossarcoma humano (HOS- Gibco, Grand Island , NY e SaOs-2). Para tal, analisam a atividade da fosfatase alcalina, da expressão de pró-colágeno tipo I e os níveis de *mRNA* para osteopontina e osteoprotegerina. O PRP é preparado a partir de amostras de sangue de quatro voluntários (dois homens e duas mulheres) com a técnica de dupla centrifugação (2000 rpm/5 minutos; 2000 rpm/20 minutos). O autores salientam que mesmo obtendo um número baixo de plaquetas no PRP em relação a outros trabalhos ($60,8 \times 10^4$ plaq/mL) o mesmo foi capaz de aumentar significativamente a proliferação celular. Concluem que o PRP “in vitro” tem um efeito favorável na diferenciação dos osteoblastos e atua tanto como estimulador da regeneração óssea quanto como ativador do processo de cicatrização de lesões.

Durante a publicação dos estudos mostrando diversas modalidades no uso do PRP, alguns autores realizam revisões conceituais sobre o tema.

3.7.1.4 Revisões conceituais sobre o PRP

Schliephake (2002) publica uma revisão sobre a ação do PRP e fatores de crescimento (BMPs, IGFs, PDGF) aplicados nas reconstruções maxilofaciais. Conclui que até aquela data não há literatura com parâmetros suficientes para indicar o uso do PRP e ressalta a necessidade de novos estudos bem delineados para melhor conhecimento e indicação.

Anitua et al. (2004) em outra revisão, analisam e discutem o uso do concentrado de plaquetas em cirurgias plásticas, odontológicas, ortopédicas e oftalmológicas. Concluem relatando que o concentrado de plaquetas possui efeitos terapêuticos, pois acelera a ossificação e estabilização de implantes de titânio em cirurgias odontológicas. Nas cirurgias plásticas e ortopédicas acelera o processo de cicatrização muscular e tendinosa.

Marx (2004), preocupado com os mitos e verdades em relação ao uso do PRP, publica mais uma revisão de conceitos. Chama a atenção para os procedimentos de obtenção do PRP e para a necessidade de realizá-los em ambientes adequados, sendo este um fator importante na validação da efetividade e qualidade do PRP preparado. Reafirma as propriedades mitogênicas e estimulatórias do PRP, principalmente quando associado aos enxertos ósseos, e critica os estudos com resultados pouco satisfatórios, propondo uma análise criteriosa da qualidade do PRP utilizado e a presença de grupos controle nos estudos. Ainda nessa revisão apresenta resultados positivos com o uso de PRP associado a enxertos autógenos e em tratamentos de áreas doadoras de pele. Acompanhando seus próprios trabalhos anteriores, conclui indicando o PRP por seus efeitos, segurança e aplicabilidade.

Garcia et al. (2004) também revisam a literatura sobre a utilização do PRP na Implantodontia. Relatam que apesar de muitos estudos mostrarem bons resultados com o uso do PRP, seus efeitos na regeneração óssea ainda não estão muito claros e alertam para a necessidade de mais trabalhos experimentais sobre o tema. Ressaltam também que o PRP é considerado uma inovação na odontologia e que os cirurgiões devem se familiarizar com seu uso.

3.7.1.5 Outros métodos de obtenção do PRP

Outros protocolos de obtenção do PRP são apresentados com a finalidade de alcançar maior eficiência no isolamento plaquetário e dos fatores de crescimento nelas contido. Procedimentos envolvendo a aférese realizada em ambiente cirúrgico permitem a obtenção de volumes maiores de PRP, através de um separador celular que captura plaquetas em volumes correntes de 50mL/min.

São também desenvolvidos aparatos automatizados que utilizam a técnica de centrifugação, porém de maneira mais fácil e com menor manipulação. Todos estes métodos podem processar quantidades pequenas de amostras de sangue e obter de 5 a 6 mL de PRP por ciclo. Ainda que eficazes, estes métodos encontram restrições na aplicabilidade clínica cotidiana devido ao alto custo.

Weibrich et al. (2002a) comparam dois métodos de obtenção do PRP (Curasan[®], Kleinostheim, Germany e Platelet concentrate collection system - PCCS[®], 3i Implant Innovations, USA). No método do PCCS[®], 60 mL de sangue total foram acondicionados em uma bolsa própria e centrifugados no aparelho a 3.000 rpm por 3 minutos e 45 segundos. A segunda centrifugação é a 3000 rpm por 13 minutos, resultando em 10 mL de PRP. Os autores atribuem a este método a vantagem de menor manipulação das plaquetas, o que pode explicar sua maior efetividade. No método de Curasan[®], tubos de 8,5 mL contendo citrato são centrifugados a 2400 rpm por 10 minutos. A segunda centrifugação a 3600 rpm por 15 minutos resulta em 0,4 mL de PRP. Concluem que o método PCCS[®] é mais aceitável, pois

além de fácil manuseio resulta em maior número de plaquetas (2.209.000/ μ l) quando comparado ao método de Curasan® (1.075.000/ μ l).

Ainda em 2002, Appel et al. encontram uma quantidade maior de plaquetas no método Curasan® (Curasan AG, Kleinostheim, Germany) igual a 2.520×10^3 plaquetas/ μ l contra 1074×10^3 plaquetas/ μ l encontradas no método 3i PCC® (3i Implant Innovations Inc., Palm Beach Gardens, USA)

Weibrich et al. (2003) realizam outro experimento, agora comparando outros dois métodos semi-automáticos. Amostras de 54 doadores são utilizadas para o preparo do PRP. No primeiro método (Smart PReP® - Harvest Technologies, Munich, Germany) 48 a 52 mL de sangue com 2 mL de anticoagulante (ácido cítrico dextrose – ACD) são acondicionados no sistema onde dois ciclos de centrifugação são realizados em 12 minutos. No outro método (Friadent-Sschutze® - Friadent, Viena, Áustria) tubos contendo 8,5 mL são centrifugados também em dois ciclos. Todas as amostras são quantificadas em números de plaquetas e de fatores de crescimento. Ao final, concluem que o método Smart PReP é superior não somente pela maior eficiência na concentração de plaquetas e fatores de crescimento, mas pela facilidade no manuseio do equipamento.

Gerard et al. (2006) aplicam o PRP preparado pelo sistema Smart PReP® (Harvest Technologies, Munich, Germany) em lesões mandibulares de 13 caninos. Um animal serve de controle, onde a lesão do lado direito é tratada com PRP e do lado esquerdo é mantida sem tratamento. Este animal é sacrificado seis meses após a cirurgia. Outros 12 animais são tratados com PRP associado a osso autógeno (retirado do íliaco) de um lado e

apenas o enxerto autógeno do outro. Os animais são sacrificados um, dois, três e seis meses após a cirurgia. As análises radiográficas e histológicas mostram que após um e dois meses, os enxertos sem a adição de PRP são mais densos, enquanto que os enxertos com PRP apresentam maior perda óssea e maior taxa de osso neoformado. Após três e seis meses não há diferença significativa entre os grupos. O animal controle apresentou cicatrização óssea incompleta aos seis meses, evidenciando assim que o defeito realizado no estudo é crítico. Os autores concluem que o PRP exerce uma função inicial no processo de cicatrização, pois aumenta a velocidade de remoção do enxerto não viável e a taxa de formação óssea na fase inicial. Tardamente, o PRP não altera a taxa de osso novo formado e não aumenta a densidade trabecular.

3.8 O modelo experimental em coelhos

O uso do modelo experimental em coelhos para avaliar os eventos celulares no tecido ósseo é relatado por outros autores. Entre estes, destacamos alguns estudos que também avaliaram o processo de osteointegração de enxertos e outros tipos de fatores de crescimento, diferentes daqueles já citados e que destacaram as facilidades no uso deste animal.

Gameiro (1997) utiliza o modelo experimental em coelhos e a técnica da histomorfometria para avaliar o efeito do fator de crescimento insulínico

similar-II (IGF-II) no tecido ósseo. Falhas ósseas provocadas no côndilo femoral lateral são preenchidas com implantes de hidroxiapatita associadas ou não ao IGF-II. Ao final do experimento, relata facilidades no manuseio desses animais, além do que, o modelo permite a observação dos eventos celulares como osteointegração e mineralização dos enxertos.

Costa (1999) utiliza 15 coelhos na avaliação do efeito da matriz óssea desmineralizada na reparação de lesões osteocondrais. O autor relata as facilidades obtidas com o uso deste animal, tais como ausência de infecções e boa mobilidade articular pós-operatória. A análise histológica revela a presença de tecido de reparação com características de neoformação óssea em todos os grupos, inclusive no grupo acompanhado por duas semanas.

Silva et al. (2003) utilizam 31 coelhos para avaliar o processo de osteointegração de matriz óssea desmineralizada enxertadas em falhas corticais localizadas no rádio dos animais. Na análise histológica, observa-se eventos celulares relacionados ao processo de reparação e osteointegração de enxertos como osteogênese, osteocondução e remodelação.

Colmanetti et al. (2004) avaliam o processo de neoformação óssea em enxertos sintéticos de polivinilpirrolidona aplicado em falhas tibiais de 10 coelhos. Neste modelo experimental, observa-se com a análise histomorfométrica, formações osteóides e mineralização do tecido.

Rimondini et al. (2005) também utilizam a área do côndilo femoral de coelhos para estudar o processo de cicatrização óssea. Defeitos de 6mm são mantidos sem tratamento de um lado (controle) e do outro recebem um substituto ósseo a base de polímeros. Após 90 dias os animais são

sacrificados e as amostras submetidas à análise histomorfométrica. Os autores relatam que não há cicatrização espontânea no grupo controle durante o período estudado e comprovam a natureza crítica do defeito.

Saito et al. (2006) realizam um experimento para avaliar os efeitos das BMPs no processo de reparo de falhas ósseas corticais diafisárias provocadas no rádio de 14 coelhos. Os autores relatam a ausência de infecção em todos os animais submetidos ao processo cirúrgico e a formação de osso novo já nas duas primeiras semanas.

4. MÉTODOS

4.1 Material

O estudo foi aprovado pela Comissão de ética para análise de projetos de pesquisa - CAPPesq do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o número 242/04.

4.1.1 O modelo experimental

Foram utilizados 25 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia, fêmeas, com peso corpóreo entre 3.500 G a 5000 G, disponibilizados pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo conforme projeto registrado⁵.

Durante o período de aclimação no Biotério do Instituto de Ortopedia - HCFMUSP LIM-41, os animais foram identificados e alojados em gaiolas individuais providas de bebedouro e comedouro.

A alimentação e hidratação foram “ad libitum” com ração animal própria para coelhos e água filtrada. O local era equipado com sistema automático de controle de iluminação, possibilitando que os animais permanecessem por 12 horas em um ambiente claro e outras 12 horas em ambiente escuro.

⁵ Projeto Biotério Central – FMUSP nº 045/051.

Inicialmente, cinco animais serviram de fonte para obtenção dos enxertos homólogos utilizados neste trabalho.

Foram operados os membros inferiores de 20 animais, sendo os lados divididos em dois grupos. O **Lado 1** corresponde ao uso isolado do aloenxerto criopreservado a -80°C e o **Lado 2** ao uso do aloenxerto criopreservado a -80°C associado ao plasma rico em plaquetas – PRP autólogo, preparado imediatamente antes ao procedimento cirúrgico. Durante a preparação das lâminas foi descartada uma das amostras devido à fratura do enxerto, restando assim, **19** animais. As cirurgias foram realizadas na face lateral dos côndilos femorais, alternando-se os membros direito e esquerdo, totalizando-se 38 fêmures operados (Quadro 3).

Quadro 3. Distribuição e estratificação da amostra estudada. O Lado 1 corresponde ao uso do aloenxerto criopreservado a -80°C e o Lado 2 ao uso do aloenxerto criopreservado a -80°C associado ao plasma rico em plaquetas-PRP.

ANIMAL	FÊMUR DIREITO	FÊMUR ESQUERDO
Receptor 1	LADO 1	LADO 2
Receptor 2	LADO 2	LADO 1
Receptor 3	LADO 1	LADO 2
Receptor 4	LADO 2	LADO 1
Receptor 5	LADO 1	LADO 2
Receptor 6	LADO 2	LADO 1
Receptor 7	LADO 1	LADO 2
Receptor 8	LADO 2	LADO 1
Receptor 9	LADO 1	LADO 2
Receptor 10	LADO 2	LADO 1
Receptor 11	LADO 1	LADO 2
Receptor 12	LADO 2	LADO 1
Receptor 14	LADO 2	LADO 1
Receptor 15	LADO 1	LADO 2
Receptor 16	LADO 2	LADO 1
Receptor 17	LADO 1	LADO 2
Receptor 18	LADO 2	LADO 1
Receptor 19	LADO 1	LADO 2
Receptor 20	LADO 2	LADO 1

4.2 Método

4.2.1 Preparo pré-operatório

No pré-operatório os animais (doadores e receptores) foram pesados, higienizados com água e sabão e encaminhados à sala cirúrgica do Laboratório de Biomecânica do IOT-HCFMUSP (LIM-41/FMUSP), equipada com fluxo laminar.

4.2.2 Obtenção dos aloenxertos homólogos

Os blocos de aloenxertos foram retirados do côndilo femoral de cinco animais (doadores) após o sacrifício. O procedimento de eutanásia aplicado neste estudo seguiu os critérios estabelecidos pela Associação Americana de Medicina Veterinária,⁶ os quais foram aprovados pelo *Institutional Animal Care and Use Committee* - IACUC⁷. Segundo as normas consideradas aceitáveis, os animais receberam uma sobredosagem de barbitúricos (Thionembutal[®]): 100mg/kg IV ou 150 mg/kg IP, e uma vez anestesiados, foi administrado Cloreto de Potássio (1 a 2 meq/kg) IV ou IC, conforme orientações descritas por outros autores e de consenso internacional⁸ (Hatch, 1987).

⁶ Report of the AVMA panel on euthanasia. Journal of the American veterinary medical association. 2001; 218(5):669.

⁷ Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals. Department of Health and Human Services, Bethesda, MD; 1986

⁸ The Biomedical Investigator's Handbook. Foundation for Biomedical Research, Washington, DC; 1997

Os protocolos de captação, processamento e criopreservação dos aloenxertos captados de coelhos doadores foram os mesmos empregados pelo Banco de Tecidos do IOT-FMUSP. Estes seguem as diretrizes estabelecidas pela legislação brasileira (Portaria n.1686 de 20 de setembro de 2002) e pelo “standards”^{9,10} da *European Association of Tissue Banks* (EATB) e *American Association of Tissue Banks* (AATB).

O acesso à porção distal do fêmur e articulação fêmoro-tíbio-patelar foi realizado através de incisão lateral baseada na técnica de Brinker¹¹, como descrito a seguir (Figura 1):

- Incisão cutânea curvilínea parapatelar, estendendo-se desde a tuberosidade tibial até a altura da patela.
- Incisão semelhante na fáscia subcutânea, expondo as fáscias lata e retinacular lateral.
- Incisão na fáscia lata ao longo da margem cranial do bíceps femoral, continuando distalmente através da fáscia retinacular lateral.
- Retração caudal do bíceps femoral e fáscia lata, permitindo incisão parapatelar da cápsula articular. Com a articulação em extensão, a patela e o quadríceps foram luxados medialmente, permitindo assim um amplo acesso ao côndilo femoral.
- Osteotomia e ressecção do côndilo femoral com o uso de serras sob irrigação de solução fisiológica (Figura 2).

⁹ American Association of Tissue Banks. Standards for Tissue Banking. 10th ed. McLean : American Association of Tissue Banks; 2005.

¹⁰ European Association of Tissue Banks. Common Standards for Tissues and Cells Banking: Berlin: European Association of Tissue Banks; 2004.

¹¹ Guide to the care and use of experimental animals. – Canadian Council on Animal Care, 1984

Figura 1. Delimitação do campo operatório e acesso à face lateral do côndilo femoral

Figura 2. Osteotomia e ressecção do côndilo femoral

4.2.3 Processamento e criopreservação dos aloenxertos obtidos

Foi realizada a fragmentação padronizada do tecido ósseo em blocos, com uso de trefina e formão medindo 5 x 5 mm. Cada côndilo femoral recebeu um corte sagital e os blocos foram retirados da face lateral dos côndilos pela inserção da trefina (direção lateral para medial) na área delimitada, fora da zona da placa epifisária de crescimento (Figuras 3 e 4).

Figura 3. Corte sagital no côndilo femoral

Figura 4. Dimensionamento dos blocos de aloenxertos

De cada animal doador foram obtidas amostras de medula e espécimes, as quais foram acondicionadas em frascos, no primeiro contendo o meio *Brain Heart Infusion*- BHI para a pesquisa de bactérias aeróbias e anaeróbias e no segundo contendo o meio *Agar Sabouraud* para a pesquisa de fungos. As análises microbiológicas foram realizadas pelo Laboratório de Controle Sanitário Animal (LCSA) do Instituto de Ciências Biomédicas – ICB da Universidade de São Paulo.

A seguir, os tecidos de cada animal foram processados separadamente e passaram por um processo de lavagem com solução fisiológica estéril a 0,9%. Amostras deste líquido foram adicionadas aos tubos de cultura que continham medula e espécimes coletados anteriormente.

Cada bloco foi acondicionado e identificado em triplos invólucros estéreis resistentes a baixas temperaturas (confeccionados em nylon e polietileno com 0,5 mm de espessura). Logo após, foram encaminhados à sala de criopreservação do Banco de Tecidos – IOT-HCFMUSP, onde permaneceram em quarentena por um período mínimo 40 dias e máximo de 130 dias. Durante esta etapa os tecidos foram mantidos a – 80 °C, em *ultrafreezer* equipado com backup de CO₂, sistema de controle de temperatura e alarme.

- Mediante o resultado da análise microbiológica, os tecidos foram utilizados para o experimento.

4.2.4 Protocolo de obtenção do plasma rico em plaquetas – PRP

O preparo do PRP seguiu metodologia simplificada com dupla centrifugação já proposta por Lemos et al. (2002).

O plasma autólogo de cada animal foi preparado imediatamente antes ao procedimento cirúrgico. A técnica de obtenção de amostra de sangue seguiu as diretrizes do Protocolo de Terapia Intravenosa do IOT-HCFMUSP (Apêndice 1). Foi realizada punção periférica da veia marginal da orelha, com dispositivo agulhado de 25 Gauges e seringa graduada descartável de 10 mL. Quando não houve sucesso de coleta na primeira tentativa de

punção, uma segunda ou terceira tentativas foram realizadas. Neste caso, a nova punção foi realizada em porção preservada na direção da base da orelha (porção proximal da veia) ou optamos pela punção da veia marginal contra-lateral à veia já puncionada.

Após a coleta de nove mL de sangue, este foi cuidadosamente transferido para dois tubos de vidro estéreis e descartáveis de 4,5 mL contendo Citrato de Sódio. Os tubos foram encaminhados ao Banco de Tecidos para o preparo do Plasma Rico em Plaquetas em ambiente com controle ambiental de partículas. A preparação do PRP foi realizada por um único profissional com paramentação cirúrgica (avental, gorro, máscara e luvas e óculos) de acordo com as recomendações propostas por Marx, 2004. Para tal, obedecemos as etapas:

- Acondicionamento dos tubos em uma centrífuga digital automática (Figura 5).

Figura 5. Tubos com sangue total acondicionados na centrífuga com 15 cm de raio e com cruzetas horizontais (8x15 mL) posicionadas de forma oposta e equidistantes ao centro

- Primeira centrifugação a 800 rpm durante 10 minutos e constatação da precipitação de porção rica em hemácias e leucócitos no fundo do tubo (série vermelha) e do plasma rico em plaquetas sobrenadante (Figura 6).

Figura 6. Apresentação da amostra após a primeira centrifugação, evidenciando as três camadas: plasma (1), zona de névoa (2) e série vermelha (3)

- Pipetagem de um mL da “zona de névoa” e acondicionamento em tubo único.

- Segunda centrifugação a 1300 rpm por 10 minutos e ressuspensão do PRP (Figura 7).

Figura 7. Apresentação após a segunda centrifugação e o isolamento de um mL de plasma (1) acrescido do botão de PRP (2).

No momento da utilização, o “gel” de PRP foi obtido pela ativação da via extrínseca da cascata de coagulação pela adição de 0,2 mL de solução reidratada de tromboplastina de cérebro de coelho e cuidadosa agitação manual por 15 a 30 segundos. Com a ativação da coagulação, o plasma assume uma consistência mais firme denominada neste estudo como “gel” rico em plaquetas (Figura 8).

Figura 8. Apresentação do “gel” de PRP já ativado pela trombina de coelho

4.2.5 Protocolo anestésico

Como medicação pré-anestésica, os animais receberam inicialmente uma droga tranquilizante, acepromazina a 0,2% na dose de 0,75 mg/kg IM, permitindo manuseio e preparo (higienização e tricotomia) para o ato cirúrgico experimental (Green, 1979; Clifford, 1984; Flecknell, 1987).

A indução e manutenção anestésica foram obtidas através da associação de quetamina a 10% na dose de 25 a 35 mg/kg e xilazina na dose de 3mg/kg (Short, 1987; Muir et al., 1989). As drogas foram administradas com agulha de pequeno diâmetro (20 X 0,5mm) após contenção, seguindo o método descrito por Harkness e Wagner (1993). Foi realizada também infiltração local de xylocaína® a 2% no local da incisão visando obter analgesia extra, bem como hemostasia.

4.2.6 Técnica cirúrgica para realização das falhas ósseas, aplicação do PRP e transplante dos aloenxertos

A abordagem cirúrgica inicial foi a mesma empregada nas cirurgias de obtenção dos enxertos homólogos já descrita.

O primeiro lado operado foi aquele pertencente ao **Lado 2** (com aplicação do PRP) devido a maior complexidade do procedimento. O acesso à porção distal do fêmur e articulação fêmoro-tíbio-patelar foi realizada através de incisão lateral baseada na técnica de Brinker¹² também já descrita, e executadas as seguintes etapas:

- Para cada animal, foram destinados dois blocos de aloenxertos de um mesmo coelho doador, retirados do *ultrafreezer* minutos antes da utilização e encaminhados a sala de cirurgia sob refrigeração em geladeira portátil com gelo seco;
- Abertura asséptica das embalagens contendo os aloenxertos e descongelamento pela imersão dos tecidos em solução fisiológica à temperatura ambiente por 20 minutos;
- Incisão na fáscia lata ao longo da margem cranial do bíceps femoral, continuando distalmente através da fáscia retinacular lateral;
- Elevação periosteal com descolador de Freer e delimitação da região;

¹² Guide to the care and use of experimental animals. – Canadian Council on Animal Care, 1984

- Realização de falha óssea na região lateral do côndilo femoral acima da placa epifisária de crescimento de aproximadamente 6x6 mm, com a utilização de trefina, formão e perfurador com broca de titânio de dois milímetros de diâmetro sob irrigação de solução salina a 0,9 % (Figuras 9a e 9b);
- Teste e comparação da dimensão do aloenxerto com a falha realizada. Quando necessário, um ajuste do enxerto ósseo foi realizado com o uso de lâmina de bisturi e perfurador, sempre com irrigação (Figura 10);
- Para o Lado 1, o aloenxerto foi implantado aplicando-se leve compressão sob o mesmo contra a falha. Para o Lado 2, o PRP foi ativado pela adição da trombina e cerca de 1 mL do “gel” foi aplicado no interior da cavidade com o uso de alça bacteriológica e pinça. Logo em seguida, o aloenxerto foi implantado sobre o mesmo (Figuras 11 e 12);
- Sutura dos tecidos moles por planos com fio mononylon 4.0 com pontos isolados (Figura 13).

Figuras 9a e 9b. Realização da falha óssea (6x6mm) com o uso de broca, trefina e formão

Figura 10. Realização do teste de dimensão do aloenxerto

Figura 11. Aplicação do gel de PRP nas falhas ósseas provocadas no Lado 2

Figura 12. Implante do aloenxerto sobre a falha

Figura 13. Sutura com pontos isolados

- limpeza externa com gaze e solução fisiológica e aplicação de pomada à base de neomicina;

Ao término do procedimento cirúrgico, os animais foram avaliados quanto à necessidade de hidratação e receberam paracetamol gotas na dose de 0,2mg/kg como droga de ação analgésica bem aceita pelos animais e de fácil administração (Clifford, 1984, Plumb, 1999).

Todos os procedimentos cirúrgicos foram registrados em instrumento de coleta de dados próprio para o estudo (Anexo 1).

4.2.7 Protocolo de eutanásia

Todos os animais foram sacrificados após 15 dias de tratamento conforme programação prévia (Anexo 1).

O protocolo de eutanásia e a técnica de ressecção foram as mesmas descritas no tópico 4.2.2.

Após o sacrifício foram ressecados os côndilos femorais dos Lados 1 e 2, sendo acondicionados individualmente em frascos identificados contendo álcool etílico a 70% e encaminhados para processamento histológico e avaliação histomorfométrica.

4.2.8 Processamento histológico e avaliação histomorfométrica

4.2.8.1 Processamento histológico

O processamento histológico dos côndilos femorais, assim como as análises histomorfométricas foram realizadas no Laboratório de Osteodistrofia da Faculdade de Medicina da USP - SP (Laboratório de Fisiopatologia Renal - LIM 16). As amostras do tecido ósseo foram fixadas em Etanol 70% e processadas conforme as seguintes etapas:

- permanência no Etanol - 70% por sete dias;
- permanência no Etanol - 100% por sete dias;
- permanência no Tolueno por um dia;
- permanência na solução A (75% de metilmetacrilato acrescido de 25% de dibutilftalato) por sete dias;
- permanência na solução A acrescido de peróxido de benzoíla (1%) por sete dias;
- permanência na solução A acrescido de peróxido de benzoíla (2%) por sete dias;
- transferência do tecido para um frasco molde juntamente com solução A e 2% de peróxido de benzoíla para uma estufa a 37 °C, por 24 horas, até a polimerização da solução. O tecido envolto pelo bloco polimerizado foi preparado para microtomia (Figura 13);
- de cada bloco foram obtidos quatro cortes histológicos de cinco micras distribuídos em duas lâminas com dois cortes em cada uma, corados com Azul de Toluidina (pH 6,4) para a análise histomorfométrica. Todos os cortes foram obtidos em micrótomo de impacto com navalha de tungstênio tipo D (Figura 14).

Figura 14. Modelo dos espécimes envoltos por bloco de metilmetacrilato e lâminas preparadas para análise histomorfométrica

4.2.8.2 Avaliação histomorfométrica

Os parâmetros histomorfométricos foram mensurados com ampliação de 125 vezes. A escolha da área de análise considerou a superfície de contato do osso receptor com o aloenxerto para o Lado 1 e o contato do osso receptor com o PRP e aloenxerto para o Lado 2.

Assim, uma faixa em formato de “U” envolvendo um total de nove campos abrangendo as duas interfaces e a área central dos aloenxertos foi mensurada para ambos os lados estudados (Figura 15).

Para conhecimento mais amplo sobre o processo de osteointegração presente apenas na interface, realizou-se uma análise exclusiva para esta área.

Figura 15. Representação do quadro ampliado em 125x na análise histomorfométrica evidenciado: área analisada delimitada em nove campos, interface de aplicação do PRP, posição do aloenxerto implantado e placa epifisária de crescimento

Para a quantificação dos parâmetros histomorfométricos estáticos estruturais, de formação e reabsorção do tecido ósseo, foi utilizado um microscópio equipado com objetiva, régua micrométrica, cursor, placa digitalizadora e o software semi-automático de análise de imagens (Osteomeasure® – Osteometrics, Inc., Atlanta, GA, Estados Unidos). As análises foram realizadas por um único examinador e o mesmo não tinha conhecimento do tratamento empregado em cada lado (Figura 16).

Figura 16. Equipamento utilizado para análise histomorfométrica (microscópio acoplado a placa digitalizadora e software Osteomeasure®)

Os parâmetros histomorfométricos estáticos analisados foram:

PARÂMETROS ESTRUTURAIS

- Área total (**T.Ar** mm²): área total mensurada;
- Volume Ósseo (**BV/TV** %): percentual de tecido ósseo constituído por osso trabecular, mineralizado ou não;
- Espessura da trave óssea (**Tb.Th** µm): a espessura das trabéculas ósseas expressa em micra;
- Número trabecular (**Tb.N/mm**): o número de trabéculas ósseas, por milímetro de tecido, sendo também um índice que expressa a densidade trabecular;

- Separação trabecular (**Tb.Sp** μm): a distância entre as trabéculas ósseas expressa em micra;
- Número de osteócitos (**N.Ot**): número de osteócitos presentes na área do tecido ósseo avaliado.

PARÂMETRO DE FORMAÇÃO

- Volume osteóide (**OV/BV** %): percentual de matriz osteóide em relação ao osso trabecular;
- Superfície osteóide (**OS/BS** %): percentual da superfície trabecular recoberta por matriz osteóide;
- Superfície osteoblástica (**Ob.S/BS** %): percentual da superfície trabecular que apresenta osteoblastos;
- Espessura osteóide (**O.Th** μm): a espessura da matriz osteóide depositada nas trabéculas ósseas, expressa em micra;
- Número de osteoblastos (**N.Ob**): número absoluto de osteoblastos presentes na área mensurada;
- Número de osteoblastos por área de tecido (**N.Ob/T.Ar**): número de osteoblastos por área de tecido analisada, expressa em milímetros quadrados;
- Número de osteoblastos por perímetro ósseo (**N.Ob/B.Pm**): número de osteoblastos por perímetro ósseo analisado, expresso em milímetros.

PARÂMETRO DE REABSORÇÃO

- Superfície osteoclástica (**Oc.S/BS%**): percentual da superfície trabecular que apresenta osteoclastos;
- Número de osteoclastos (**N.Oc**): número de osteoclastos presentes na área do tecido ósseo avaliado;
- Superfície de reabsorção (**ES/BS %**): porcentagem da superfície que apresenta lacunas de reabsorção óssea com a presença ou não de osteoclastos.

Os parâmetros histomorfométricos foram apresentados conforme a nomenclatura recomendada *pela American Society of Bone and Mineral Research –ASBMR* (Parfitt et al., 1987).

4.2.9 Tratamento estatístico

Com o objetivo de resumir os resultados obtidos no estudo foi inicialmente feita uma análise descritiva de todas as variáveis consideradas, na qual foram construídas tabelas apresentando as médias, desvios padrão, mínimos, medianas e máximos dessas variáveis observados nos fêmures tratados pelas duas técnicas (Lado 1 e Lado 2) e das diferenças entre os mesmos. Também foram construídos *box-plots* de cada variável segundo o lado, e das diferenças entre os dois lados. Os valores observados em cada lado de um mesmo animal foram representados em diagramas de dispersão de cada variável nos dois lados.

Nesses gráficos, cada ponto corresponde às observações dos dois lados de um mesmo animal, sendo em cada gráfico representada a reta: Lado 1 = Lado 2. Pontos que se distanciam dessa reta correspondem a animais que apresentaram medidas diferentes nos dois fêmures.

A comparação entre os dois lados foi feita por meio do teste de Friedman (Neter et al., 1996). Este teste considera que existe um pareamento nas medidas fornecidas pelas duas técnicas, pois são obtidas em um mesmo animal. A razão da escolha de um teste não paramétrico deveu-se à assimetria e/ou presença de valores aberrantes observados nos *box-plots* das diferenças entre as observações dos dois lados. Foi considerado o nível de significância de 0,05.

A análise está dividida em duas partes: medidas feitas na área considerada previamente e medidas feitas na interface.

5. RESULTADOS

Os *box-plots* representados nas Figuras 17, 19, 21, 23, 25, 27 e 29 e os resultados das Tabelas 1, 3, 5, 7, 9, 11 e 13 demonstram que as variáveis analisadas no estudo apresentam comportamentos semelhantes em ambos os tratamentos empregados. De fato, o teste de Friedman detectou diferenças significativas somente entre as medianas da espessura das traves na interface do aloenxerto ($p=0,039$). A mediana desse parâmetro era maior no Lado 1 que no Lado 2. Os valores de p para as demais variáveis estão descritos nas Tabelas 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14, sendo todos maiores que 0,05.

Os diagramas de dispersão representados nas Figuras 18, 20, 22, 24, 26, 28 e 30 mostram que as medidas realizadas nos dois lados de alguns animais são bastante variáveis, com exceção da área total.

Os resultados da superfície de reabsorção (ES/BS) não estão apresentados nas tabelas e gráficos, pois exceto em um caso no Lado 1, o valor foi de 0,35%. Nas demais amostras não observamos reabsorção óssea.

Tabela 1- Médias, desvios padrão (DP), mínimos, medianas e máximos observados das variáveis estruturais nos fêmures tratados pelas técnicas correspondentes ao Lado 1 e Lado 2 e das diferenças entre os dois lados (lado 1 – lado 2)

Variável	Lado	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
Área total (mm ²)	1	3,26	0,61	3,09	3,11	5,77
	2	3,27	0,61	3,09	3,12	5,77
	diferença (1 - 2)	0,00	0,01	-0,03	0,00	0,02
Volume ósseo (%)	1	43,24	8,50	31,03	44,58	57,09
	2	45,61	14,87	25,31	43,47	77,45
	diferença (1 - 2)	-2,37	12,20	-27,04	0,16	17,37
Espessura traves (μm)	1	95,98	24,17	49,42	90,16	136,84
	2	100,61	30,08	57,40	99,52	173,11
	diferença (1 - 2)	-4,63	36,75	-105,50	-5,55	62,61
Número trabéculas/mm	1	4,76	1,36	2,39	4,55	6,77
	2	4,74	1,63	2,39	4,52	8,26
	diferença (1 - 2)	0,02	1,37	-3,57	0,21	2,77
Separação trabecular (μm)	1	133,10	57,70	66,30	117,30	281,10
	2	133,90	71,80	34,60	135,60	286,00
	diferença (1 - 2)	-0,74	49,00	-102,70	1,53	101,90
Número de osteócitos	1	463,30	214,50	194	389	1096
	2	464,60	291,40	133	355	1280
	diferença (1 - 2)	-1,37	271,70	-865	33	369

Figura 17- Box-plots para as variáveis estruturais nos dois lados e diferença entre os lados

Figura 18- Diagramas de dispersão das variáveis estruturais nos dois lados

Tabela 2- P-valores obtidos pelo teste de Friedman para a comparação das medianas das variáveis estruturais nos dois lados

Variável	p
Área total (mm ²)	0,655
Volume ósseo (%)	0,819
Espessura traves	0,491
Número trabéculas/mm	0,637
Separação trabecular	0,819
Número de osteócitos	0,251

Tabela 3- Médias, desvios padrão (DP), mínimos, medianas e máximos observados das variáveis de formação nos fêmures tratados pelas técnicas correspondentes ao Lado 1 e Lado 2 e das diferenças entre os dois lados (lado 1 – lado 2)

Variável	Lado	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
Volume osteóide (%)	1	0,78	0,99	0,00	0,35	4,09
	2	0,56	0,51	0,01	0,41	1,58
	diferença (1 - 2)	0,22	0,73	-0,79	0,14	2,51
Superfície osteóide (%)	1	13,61	12,12	0,29	9,74	40,83
	2	14,45	8,32	0,20	15,53	27,32
	diferença (1 - 2)	-0,84	13,31	-20,67	-0,20	21,99
Superfície (osteoblástica) (%)	1	20,12	13,10	0,23	20,95	47,89
	2	0,27	0,34	0,00	0,15	0,99
	diferença (1 - 2)	-0,68	13,43	-24,30	0,57	24,97
Espessura osteóide (µm)	1	4,03	1,39	1,68	4,17	6,02
	2	3,46	1,63	0,71	3,42	5,89
	diferença (1 - 2)	0,57	1,95	-3,06	0,04	4,91
Número de osteoblastos	1	392,50	321,60	3	323	1159
	2	367,30	303,30	5	263	984
	diferença (1 - 2)	25,20	294,70	-508	2,00	665

Figura 19- Box-plots para as variáveis de formação nos dois lados e diferença entre os lados

Figura 20- Diagramas de dispersão das variáveis de formação nos dois lados

Tabela 4- P-valores obtidos pelo teste de Friedman para a comparação das medianas das variáveis de formação nos dois lados

Variável	p
Volume osteóide	0,157
Superfície osteóide	0,819
Superfície (osteoblástica)	0,819
Espessura osteóide	0,819
Número de osteoblastos	0,819

Tabela 5 - Médias, desvios padrão (DP), mínimos, medianas e máximos observados das variáveis de reabsorção nos fêmures tratados pelas técnicas correspondentes ao Lado 1 e Lado 2 e das diferenças entre os dois lados (lado 1 – lado 2)

Variável	Lado	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
Superfície Osteoclástica (%)	1	0,34	0,55	0,00	0,14	1,91
	2	0,27	0,34	0,00	0,15	0,99
	diferença (1 - 2)	0,07	0,68	-0,88	0,00	1,91
Número de osteoclastos	1	3,63	5,45	0	2	23
	2	3,16	4,09	0	2	15
	diferença (1 - 2)	0,47	6,89	-10	0	23

Figura 21- *Box-plots* para as variáveis de reabsorção nos dois lados e diferença entre os lados

Figura 22- Diagramas de dispersão das variáveis estruturais nos dois lados

Tabela 6- P-valores obtidos pelo teste de Friedman para a comparação das medianas das variáveis de reabsorção nos dois lados

Variável	P
Superfície osteoclástica	1,000
Número de osteoclastos	0,617

Parte II – Análise da interface

Tabela 7- Médias, desvios padrão (DP), mínimos, medianas e máximos observados das variáveis estruturais nos fêmures tratados pelas técnicas correspondentes ao Lado 1 e Lado 2 das diferenças entre os dois lados (lado 1 – lado 2) – medidas na interface

Variável	Lado	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
Área total (mm ²)	1	1,38	0,60	1,23	1,24	3,84
	2	1,39	0,60	1,23	1,24	3,84
	diferença (1 - 2)	0,00	0,01	-0,01	0,00	0,01
Volume ósseo (%)	1	50,55	9,19	35,33	50,89	69,75
	2	45,45	13,35	25,14	44,24	76,20
	diferença (1 - 2)	5,11	12,10	-17,39	8,26	23,92
Espessura traves (µm)	1	99,62	33,64	48,65	90,83	178,52
	2	83,76	27,85	44,00	76,00	157,66
	diferença (1 - 2)	15,86	28,36	-29,09	13,07	100,55
Número de osteócitos	1	251,50	122,30	99	204	540
	2	245,70	154,70	78	198	642
	diferença (1 - 2)	5,79	131,20	-444	19	220

Figura 23- Box-plots para as variáveis estruturais nos dois lados e diferença entre os lados – medidas na interface

Figura 24- Diagramas de dispersão das variáveis estruturais nos dois lados – medidas na interface

Tabela 8- P-valores obtidos pelo teste de Friedman para a comparação das medianas das variáveis estruturais nos dois lados – medidas na interface

Variável	p
Área total (mm²)	0,317
Volume ósseo(%)	0,251
Espessura traves	0,039
Número de osteócitos	0,491

Tabela 9- Médias, desvios padrão (DP), mínimos, medianas e máximos observados das variáveis de formação nos fêmures tratados pelas técnicas correspondentes ao Lado 1 e Lado 2 e das diferenças entre os dois lados (lado 1 – lado 2) – medidas na interface

Variável	Lado	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
Volume osteóide (%)	1	0,93	0,98	0,00	0,54	3,34
	2	0,83	1,04	0,01	0,41	3,62
	diferença (1 - 2)	0,10	0,70	-0,93	-0,09	1,94
Superfície osteóide (%)	1	17,46	14,96	0,00	14,37	50,57
	2	15,51	13,64	0,36	11,38	56,85
	diferença (1 - 2)	1,95	18,87	-41,42	1,24	40,47
Superfície osteoblástica (%)	1	22,26	14,61	0,00	23,42	59,39
	2	23,03	14,76	0,78	21,33	52,25
	diferença (1 - 2)	-0,77	14,57	-23,83	4,24	24,77
Espessura osteóide	1	4,17	1,85	1,02	4,45	8,58
	2	3,73	1,67	1,15	3,66	6,20
	diferença (1 - 2)	0,44	2,45	-5,03	0,23	6,82
Número de osteoblastos	1	222,10	200,40	0	176	768
	2	199,60	166,40	5	155	678
	diferença (1 - 2)	22,50	145,20	-165	32	327

Figura 25- Box-plots para as variáveis de formação nos dois lados e diferença entre os lados – medidas na interface

Figura 26- Diagramas de dispersão das variáveis de formação nos dois lados – medidas na interface

Tabela 10- P-valores obtidos pelo teste de Friedman para a comparação das medianas das variáveis de formação nos dois lados – medidas na interface

Variável	p
Volume osteóide	0,637
Superfície osteóide	0,491
Superfície (osteoblástica)	0,491
Espessura osteóide	0,108
Número de osteoblastos	0,491

Tabela 11- Médias, desvios padrão (DP), mínimos, medianas e máximos observados das variáveis de reabsorção nos fêmures tratados pelas técnicas correspondentes ao Lado 1 e Lado 2 e das diferenças entre os dois lados (lado 1 – lado 2)

Variável	Lado	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
Superfície Osteoclástica (%)	1	0,31	0,53	0,00	0,00	1,92
	2	0,23	0,37	0,00	0,00	1,24
	diferença (1 - 2)	0,08	0,55	-0,82	0,00	1,62
Número de osteoclastos	1	1,84	2,27	0	1	6
	2	1,68	2,29	0	1	8
	diferença (1 - 2)	0,16	2,85	-6	0	6

Figura 27- Box-plots para as variáveis de reabsorção nos dois lados e diferença entre os lados – medidas na interface

Figura 28- Diagramas de dispersão das variáveis de reabsorção nos dois lados – medidas na interface

Tabela 12- P-valores obtidos pelo teste de Friedman para a comparação das medianas das variáveis de reabsorção nos dois lados – medidas na interface

Variável	P
Superfície osteoclástica	1,000
Número de osteoclastos	0,796

Tabela 13- Médias, desvios padrão (DP), mínimos, medianas e máximos observados do Número de osteoblastos/área total e Número de osteoblastos/perímetro ósseo nos fêmures tratados pelas técnicas correspondentes ao Lado 1 e Lado 2 e das diferenças entre os dois lados (lado 1 – lado 2) - medidas na interface

Variável	Lado	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
Nº osteoblastos/área total	1	160,30	142,20	0,00	136,80	618,00
	2	151,30	133,80	4,01	112,70	545,60
	diferença (1 - 2)	8,97	101,80	-131,80	25,80	217,50
Nº osteoblastos/perímetro ósseo	1	16,95	11,87	0,00	16,74	46,06
	2	16,06	10,96	0,55	14,87	36,68
	diferença (1 - 2)	0,883	11,59	-20,03	4,13	19,14

Figura 29- Box-plots para as variáveis Número de osteoblastos/área total e Número de osteoblastos/perímetro ósseo **nos dois lados e diferença entre os lados – medidas na interface**

Figura 30- Diagramas de dispersão das variáveis Número de osteoblastos/área total e Número de osteoblastos/perímetro ósseo **nos dois lados** – medidas na interface

Tabela 14- P-valores obtidos pelo teste de Friedman para a comparação das medianas das variáveis Número de osteoblastos/área total e Número de osteoblastos/perímetro ósseo nos dois lados– medidas na interface

Variável	P
Nº osteoblastos/área total	0,491
Nº osteoblastos/perímetro ósseo	0,491

Embora nossa proposição seja apresentar os resultados encontrados na análise histomorfométrica, julgamos importante relatar outros resultados observados durante o experimento, sem que estes tenham interferido na conclusão do mesmo:

As amostras coletadas assepticamente em sala controlada permaneceram estéreis após o processamento. O resultado da análise microbiológica mostrou que não houve crescimento bacteriano tanto em ambientes aeróbios quanto anaeróbios. Não foi detectado também o crescimento de fungos durante o tempo de incubação (Anexo 2).

A ativação do PRP com a trombina de coelhos resultou em um composto denominado neste estudo como “gel”. A obtenção deste gel foi possível em todas as amostras, confirmando a reprodutibilidade do protocolo adotado. O PRP, nesta apresentação, foi de fácil manuseio e aplicabilidade cirúrgica.

A manipulação dos coelhos no período de aclimação no centro cirúrgico e pós-operatório se deu sem intercorrências.

Em 19 animais, no Lado 2 (uso do PRP) observamos a formação de tecido conjuntivo fibroso e denso sobre o local de implante do aloenxerto onde aplicamos o PRP. No Lado 1 este fato não foi observado (Figuras 31a e 31b).

Figura 31a e 31 b. Evidência macroscópica do tecido conjuntivo denso neoformado sobre a área de aplicação do aloenxerto associado ao PRP (Lado 2)

Na análise histológica, observamos células ósseas ativas nos aloenxertos implantados. Observamos osteoblastos, osteócitos e matriz osteóide em toda a extensão do mesmo.

O aloenxerto, independente da presença de PRP, atraiu células, tornando evidente o processo de osteocondução. Não observamos diferenças entre o uso ou não do PRP (Figura 32 e 33).

Figura 32. Corte histológico (HE – 10x) mostrando células osteoblásticas na interface dos aloenxertos. (AE: aloenxerto; OR: osso receptor; matriz osteóide : setas)

Figura 33. Corte histológico (HE – 10x) mostrando a presença de osteoblastos, osteócitos e matriz osteóide nos aloenxertos implantados (OB: osteoblastos; OT: osteócitos; matriz osteóide : setas)

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho, estudamos a interação do aloenxerto criopreservado com o plasma rico em plaquetas, ambos aplicados em falhas ósseas.

Ao longo dos tempos, o tecido ósseo é alvo de interesse em diferentes áreas da ciência. Na ortopedia, neurologia, cirurgia plástica, assim como na odontologia são vários os trabalhos que utilizaram o tecido ósseo como alternativa para substituir perdas ósseas de determinadas regiões do esqueleto (Ollier, 1867 apud Fischer, 1998; McEwen, 1878 apud Giovani, 2005; Tomford, 2000; Albee, 1912 apud Giovani, 2005; Carrel, 1912; Groves, 1917; Bush e Garber, 1948; Axhausen, 1956 apud Lemos, 2002, Sharrard e Collins, 1961; Urist, 1965).

Embora o emprego do enxerto autólogo seja vantajoso, pois contém células próprias do indivíduo e não expõe o receptor aos riscos de transmissão de doenças, algumas desvantagens são relevantes (risco de lesão nervosa, de infecção e maior morbidade). Essas desvantagens poderiam interferir e limitar seu uso clínico. (Cunningham, Reddi, 1992; Smith et al., 1984; Drumond, 2000). Esses fatos têm levado a comunidade científica a estudar e propor outros substitutos, como enxertos xenólogos, biomateriais e o enxerto homólogo ou aloenxerto (Tomford, 2000).

Nos últimos anos, o emprego dos aloenxertos, principalmente em cirurgias ortopédicas mostram resultados promissores (Boldt, 2001; Janssen, 2001; Nesse et al., 2003; Lavernia et al., 2004; Schreurs et al., 2004; Schreurs et al., 2005). No Brasil, o uso deste tipo de enxerto, ainda de forma experimental, ocorre até 1997 e foi oficializado após a criação de um sistema nacional que controla a captação e distribuição de órgãos e tecidos no território nacional (Sistema Nacional de Transplantes-SNT). Este fato facilitou e conseqüentemente aumentou a aplicação clínica dos aloenxertos. A reestruturação dos bancos de tecidos musculoesqueléticos existentes foi determinada por legislações específicas¹³ elaboradas com base na experiência clínica e científica de instituições nacionais e internacionais.

Nos últimos sete anos, observou-se que o emprego dos aloenxertos (captados, processados e criopreservados a – 80 °C) tem aumentado gradativamente, muito embora ainda persista a relutância por parte de alguns profissionais, principalmente da área odontológica no uso destes enxertos (Fonte : ABTO¹⁴). Acreditamos que isso se deva pela escassez de estudos sobre o tema em nosso meio. Alguns trabalhos que encontraram bons resultados ressaltam a importância de se conhecer melhor as características biológicas desses enxertos e defendem seu uso de forma otimista (Rudelli et al., 1992; Croci et al., 2003b; Cabrita, 2004). Em consonância com estes pesquisadores e considerando a atual realidade, escolhemos como objeto de estudo o enxerto homólogo.

¹³ Lei n.9434 de 5 de fevereiro de 1997, Decreto n.2268 de 30 de junho de 1997, Portaria n.1686 de 20 de setembro de 2002.

¹⁴ Registro Brasileiro de Transplantes; Órgão oficial da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos-ABTO: 2000 - 2007

O uso de fatores de crescimento, como agentes coadjuvantes, no processo de reparação do tecido ósseo foi outro ponto de interesse estudado, principalmente nos anos 80 (Lane et al., 1999; Lemos, 2002; Garcia et al., 2004).

Estudos evidenciam que certos grupos celulares são capazes de produzir e liberar substâncias que atuam como reguladores da atividade celular e interferem nos processos de síntese, divisão, proliferação, migração e diferenciação celular (Riley et al., 1996; Solheim, 1998; Centrella et al., 1989).

O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento de transformação (TGF) são exemplos destas substâncias, uma vez que atuam como mitógenos de células osteoindutoras e osteogênicas (Centrella et al., 1989, Ostman et al., 1992; Graves, Cochran, 1994; Sumner et al., 1995; Marx et al., 1998; Alberts et al., 2004).

A purificação do PDGF e TGF e sua aplicação em animais mostrou efeito positivo na reparação do tecido ósseo, o que foi evidenciado por alguns autores (Lynch et al., 1991; Aufdemorte et al., 1992; Giannobile et al., 1994, 1996; Lind et al., 1996; Stefani et al., 2000). Entretanto, essa purificação exige técnicas complexas e de custo elevado, dificultando seu uso. A busca por técnicas efetivas e de baixo custo tem sido muito estimulada.

O isolamento do plasma rico em plaquetas - PRP pela técnica simplificada de dupla centrifugação é um procedimento seguro, de baixo custo e boa aplicabilidade clínica. (Marx, 1998; Anitua, 1999; Lozano et al., 1999;

Sonnleitner et al., 2000; Kim et al., 2001; Lemos et al., 2002; Aghaloo et al., 2002; Okuda et al., 2003).

O PRP é descrito como uma substância capaz de interferir no processo de reparação óssea pela ação do PDGF e TGF liberado na zona de reparo tão logo o mesmo seja geleificado pela ativação da coagulação (Marx et al, 1998; Marx, 2001; Gruber et al., 2002; Mazor et al., 2004).

Levando em conta estas características e a frequência com que este hemoderivado é empregado na área odontológica, optamos por incluí-lo em nosso estudo. O uso do PRP com substitutos ósseos e enxertos autógenos está bem descrito na literatura, porém observamos uma raridade em estudos que associam seu uso aos aloenxertos criopreservados a - 80° C, captados e processados em banco de tecidos.

O animal adotado no nosso estudo foi o coelho (*Oryctolagus cuniculus*), uma vez que esses animais se prestam ao desenvolvimento de modelo para análise do tecido ósseo (Gameiro, 1997; Costa, 1999; Wilson, 2003; Silva, 2003; Colmanetti, 2004; Zhang, 2004, Butterfield et al., 2005; Jung et al., 2005; Tamae, 2005).

Durante os experimentos, pôde-se garantir os cuidados necessários aos animais no que se refere à higiene, bem-estar, anestesia e procedimentos cirúrgicos, bem como ao acompanhamento pós-operatório, empregando analgésicos. Seguimos as normas éticas para manuseio e manutenção de animais em laboratório estabelecidas por pesquisadores

(Harkness e Wagner, 1993), entidades internacionais¹⁵ e nacionais (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA).

A escolha do côndilo femoral levou em conta a presença de grande quantidade de osso trabecular e fácil acesso cirúrgico, já constatado em outros trabalhos (Gameiro, 1997; Costa, 1999; Dallari et al., 2006). O tamanho da falha provocada foi de 6x6mm, já adotada em outros estudos com coelhos (Jung et al., 2005) e descrita como um defeito crítico (Le Guehennec et al., 2005; Rimondini et al., 2005; Dallari et al., 2006).

O desenho do estudo não permitiu validar o defeito crítico, uma vez que não foi nossa proposição, daí não utilizamos grupos controle, sem tratamento. Entretanto, julgamos favorável esta medida para a realização das cirurgias, pois a extensão do côndilo femoral destes animais não permite falhas maiores sem atingir a cartilagem de crescimento, o que para o nosso estudo seria prejudicial na recuperação dos animais.

O uso dos aloenxertos em blocos levou em consideração o aporte biomecânico imediato do aloenxerto estruturado e não apenas o preenchimento cavitário, semelhante ao que ocorre nas cirurgias ortopédicas.

Um ponto fundamental nos estudos que empregam histomorfometria é a garantia de que as amostras dos diferentes grupos possuam dimensões e características morfológicas semelhantes. Tal proposição é difícil, neste modelo, uma vez que exige técnicas que permitem o preparo de blocos com dimensões idênticas, necessitando de instrumentais muito sensíveis.

¹⁵ The Biomedical Investigator's Handbook. Foundation for Biomedical Research, Washington, DC; 1997

Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals. Department of Health and Human Services, Bethesda, MD; 1986

Guide to the care and use of experimental animals. - Canadian Council on Animal Care, 1984

Neste estudo empregamos instrumentais específicos e padronizamos o local de retirada (mesma região e mesmo animal doador), demonstrado pela média da área analisada, muito semelhante nos dois lados: Lado 1 – Lado 2 = 0,00, Tabela 1, Figura 17 e pela análise dos gráficos de dispersão, onde todos os pontos que representam cada animal se concentraram sobre a reta Lado1 = Lado2. (Figura 18).

A estratificação adotada na etapa cirúrgica com alternância de lados (Quadro 3) e a aplicação de ambas as técnicas de reconstrução (Lado1 e 2) em um mesmo animal, visou afastar interferências inerentes entre um animal e outro, tais como idade, fisiologia peculiar, nutrição, ação hormonal e complicações pós-operatórias. Tal metodologia foi também adotada por outros autores (Aghaloo et al., 2002; Croci et al., 2003). De fato, a análise dos gráficos de dispersão (Figuras 18, 20, 22, 24, 26, 28 e 30) mostrou uma variabilidade entre os animais, fato que não interferiu em nossos resultados.

Trabalhos em humanos mostram que o PRP traz vantagens na regeneração de defeitos periodontais, levando a menor perda de implantes e acelerando a cicatrização de falhas maxilares (Camargo et al., 2002; Feres Junior, 2003; Mazor et al., 2004), embora isso não tenha sido observado por Shanaman et al., 2001.

Nos estudos com animais, essa controvérsia também é observada. Em diferentes animais usados como modelo experimental (cães, ratos, porcos, cabras) o tratamento de defeitos ósseos em áreas distintas do esqueleto (crista ilíaca, crânio, diáfise do rádio, fêmur, região frontal, mandíbulas, calvária) mostra que o PRP possui efeitos positivos (Kim et al.,

2002a, 2002b; Fennis et al., 2005), diferentemente do que outros autores observaram (Crocì et al., 2003a; Furst et al., 2003; Wiltfang et al., 2004; Roldán et al., 2004).

Em coelhos, assim como em outros trabalhos, não evidenciamos efeitos positivos do PRP na reparação do tecido ósseo (Butterfield et al., 2005; Jung et al., 2005; Dallari et al., 2006), embora relatem o contrário, pois a adição de PRP trouxe benefícios como aceleração da cicatrização e maior neoformação óssea em falhas provocadas (Aghaloo et al., 2002; Wilson, 2003; Zhang et al., 2004; Tamae, 2005).

Ainda que haja similaridade com alguns trabalhos em relação ao modelo experimental adotado, não encontramos descrição na literatura da associação do PRP com osso homólogo congelado.

Considerando a atividade mitogênica do PRP e seu efeito positivo na regeneração óssea observados em estudos *in vitro* e em revisões conceituais (Gruber et al., 2002; Anitua et al., 2004; Marx, 1998, 2004; Kanno et al., 2005) esperávamos encontrar um efeito nos parâmetros de formação óssea, o que não ocorreu. As diferenças nas porcentagens de volume e superfície osteóide, número de osteoblastos e superfície osteoblástica indicariam uma aceleração no processo de osteointegração, fato este não evidenciado pelos resultados da análise histomorfométrica (Tabela 3 e 4, Figura 19).

Realizamos ainda uma análise isolada da interface do enxerto com o osso receptor, levando em conta que as primeiras interações celulares ocorrem naquele local (Habal, Reddi, 1992). Assim, mais uma vez a análise

histomorfométrica não revelou diferenças na comparação dos parâmetros de formação analisados (Tabela 9, 10, 13 e 14, Figura 25 e 29). Desta forma, não atribuímos ao PRP um efeito no processo de formação do tecido ósseo.

A ausência de osteoblastos ou sua chegada tardia ao local de reparo é destacada por alguns trabalhos como motivo da inatividade do PRP no tecido ósseo (Roldan et al., 2004; Wiltfang et al., 2004), fato não observado em nosso experimento, pois embora não tenhamos encontrado diferença no número destas células entre um lado e outro, sua presença foi evidente. Talvez outros trabalhos com metodologia distinta da empregada por nós, como a imunohistoquímica e a biologia molecular, possam esclarecer melhor esse aspecto.

Em relação ao volume ósseo dos enxertos implantados, também não evidenciamos diferenças, uma vez que as medidas aferidas foram muito semelhantes nos dois lados (Médias : 44,58% e 43,47% para o Lado 1 e 2). Vale ressaltar o baixo número de osteoclastos encontrados em toda a área de reparo analisada, inclusive nas interfaces (mediana=2, Tabela 5, Figuras 21 e 27) onde também não encontramos áreas de reabsorção. Praticamente 100% das trabéculas estavam recobertas por matriz osteóide.

A análise mais apurada da interface revelou um único parâmetro estrutural com significativo resultado comparativo. A espessura da trave na interface do enxerto pertencente ao Lado 1 foi superior ao Lado 2 ($P=0,039$). Preferimos não atribuir este dado ao efeito do PRP, pois o mesmo pode ter sido causado pela sobreposição de matriz osteóide e também pelo fato de não ter sido mensurada a taxa de aposição mineral.

Dessa forma, no nosso modelo não encontramos efeitos positivos do PRP. Alguns aspectos merecem comentários, entre eles :

1- A obtenção do PRP. Alguns estudos correlacionam o efeito do PRP (mitogênese e aceleração do processo de reparação óssea) com o número de plaquetas presentes (Marx et al., 2001, 2004). Assim, na tentativa de se obter um número cada vez maior de plaquetas, uma variedade de protocolos simplificados (Quadro 2) e até com aparatos automatizados são descritos (Weibrich et al., 2002a, 2003; Gerard et al., 2006).

2- O efeito do PRP depende não só do número de plaquetas, mas também de sua capacidade adesiva em estabilizar o enxerto no local de implante (Freymler, Aghaloo, 2004) ou da qualidade e integridade dessas plaquetas presentes no PRP, pois a manipulação inadequada pode ativá-las levando a degranulação precoce antes mesmo de sua aplicação na zona de reparo (Marx et al., 2004). Em nosso estudo a preparação do PRP foi realizada por um único profissional devidamente paramentado, em ambiente controlado no Banco de Tecidos, conforme recomendações de Marx, 2004.

Segundo Weibrich et al. (2002b) não há relação entre a quantidade de fatores de crescimento dosados e o número de plaquetas presentes no PRP. Por um lado é possível encontrar trabalhos com altos índices de plaquetas presentes no PRP que não encontraram evidências sobre seu efeito no tecido ósseo (Furst et al., 2003; Dori et al., 2007) e por outro lado, um recente trabalho descreve baixo número de plaquetas, mas relata um efeito desejável (Kanno et al., 2005).

Considerando que estas questões são controversas e que ainda não há consenso sobre o assunto, preferimos não realizar a contagem do número de plaquetas no PRP e utilizamos em nosso trabalho um protocolo de obtenção freqüentemente adotado por odontólogos, já validado pelo autor neste aspecto (Quadro 2). Além do que, não foi a proposição deste estudo validar a reprodução de um protocolo de obtenção de PRP, ou seja, se o mesmo foi efetivo em concentrar um número cada vez maior de plaquetas, e sim se as plaquetas e fatores de crescimento ali presentes atuaram no processo inicial de osteointegração dos aloenxertos criopreservados.

Ainda em relação aos protocolos de obtenção, alguns autores não encontram evidências da influência do sexo e idade no número de plaquetas presentes no PRP (Weibrich et al., 2002b), mesmo assim utilizamos neste estudo apenas animais de um gênero, com idade e peso semelhantes.

O período definido no estudo para avaliação da fase inicial da osteointegração foi de 15 dias. Estudos sobre o processo inicial de reparação em modelos animais mostram uma atividade celular osteoblástica aos 10 dias (Ferraro, 2002) e sinais claros de revascularização, osteointegração e neoformação óssea em duas semanas (Barros Filho et al., 1989; Costa, 1999; Taga et al., 2000; Croci et al., 2003; Zhang et al., 2004; Dallari et al., 2006).

Além disso, outros fundamentos encontrados na literatura contribuíram para a escolha do período. Os fatores de crescimento são degranulados pelas plaquetas presentes no PRP logo após sua coagulação e atuam na fase inicial do processo de reparo (Marx, 2001, 2004; Tsay, 2005).

Contudo, ainda são descritos trabalhos que não evidenciam efeito do PRP mesmo em períodos mais prolongados (Aghaloo et al., 2004; Butterfield et al., 2005; Gerard et al., 2006)

O tamanho da amostra adotada (n=19 por lado; 19 animais) está de acordo com outros trabalhos que estudam o tecido ósseo em animais (Aghaloo et al., 2002; Kim et al., 2002a; Furst et al., 2003; Croci et al., 2003a; Butterfield et al., 2005; Fennis et al., 2005; Jung et al., 2005). Contudo, destacamos que um número maior de amostras permitir-nos-ia avaliar o efeito do PRP em diferentes fases do processo de osteointegração, podendo até mesmo avaliar seu efeito durante a fase de remodelação, embora não coincida com nosso objetivo, que é o de estudar o efeito do PRP no processo de osteointegração dos aloenxertos em sua fase inicial.

Nossos resultados não permitiram atribuir ao PRP um efeito osteogênico e osteoindutivo na osteointegração dos aloenxertos. Julgamos importante ressaltar que não contra-indicamos seu uso. O fato de obtermos um PRP de consistência gelatinosa, o qual nos propiciou facilidade no manuseio clínico e aplicação nas cavidades ósseas, nos leva a considerá-lo um excelente veículo adesivo autólogo que pode ser utilizado na estabilização e fixação de enxertos, fato também relatado por outros autores (Camargo et al., 2002; Freymiller, Aghaloo, 2004) e que se mostra primordial para a regeneração do tecido (Kleinschmidt, Hollinger, 1992). Em contrapartida, não indicamos seu uso com essa finalidade para a fixação de enxertos estruturados em cirurgias de grande porte, como reconstruções acetabulares e articulares na área de ortopedia e traumatologia, uma vez

que esta é alcançada de forma mais efetiva com os materiais de síntese comumente utilizados (placas, parafusos, anéis de reforço, telas etc.).

Outros estudos bem recentes atribuem também ao PRP outros efeitos menos importantes, como compensação das desvantagens causadas pela irradiação a 50 kGy em enxertos autólogos e irradiados (Fennis et al., 2005) e a eficácia como um sistema de liberação de proteínas morfogenéticas (Jung et al., 2005).

6.1 Considerações Finais

Ainda que o objetivo principal do presente estudo seja o de avaliar o efeito do Plasma Risco em Plaquetas-PRP sob o aloenxerto, isoladamente, as zonas de reparo, apenas com o emprego do aloenxerto criopreservado (Lado 1) mostraram alguns eventos celulares muito interessantes. Ao final de 15 dias foi impossível macroscopicamente, distinguir o local exato da zona de reparo. Encontramos osteoblastos em franca atividade (cubóides) em toda a área do aloenxerto, com valores medianos de 323 osteoblastos/área (Tabela 3, Figura 35). A presença de matriz osteóide também foi notada em toda a extensão do bloco enxertado, com média de espessuras superiores a 4,0 μm tanto na área total (Tabela 3, Figura 19) como na interface com o osso receptor (Tabela 9, Figura 25). A exuberância no número de osteócitos, chegando a um valor mediano de 389 células/área (Tabela 1, Figura 35) revelou um

tecido ósseo vitalizado e em atividade celular, fato também observado por Dallari et al. (2006).

Consideramos que o modelo adotado não nos permite afirmar se as células observadas na zona de reparo são procedentes do leito receptor ou próprias do aloenxerto criopreservado, como relatado em alguns estudos que destacam a presença de células vivas e com potencial de crescimento no tecido ósseo criopreservados a -80°C (Weyts et al, 2003; Heyligers, Kleim, 2005). Entretanto, foi evidente que a matriz enxertada serviu de molde para a sobrevivência das células durante a fase inicial da reparação do tecido lesado.

Além dos efeitos no tecido ósseo, alguns autores relatam a atuação do PRP como mitógenos para outros tipos celulares presentes nos tecidos moles (Heldin e Westermarck, 1999). Neste caso, são descritos efeitos estimulatórios do PRP e PDGF na síntese de colágeno, na proliferação de fibroblastos e aceleração no processo de reparação e cicatrização de feridas (Marx et al, 2004; Wang et al., 2004). Em nosso experimento, constatamos macroscopicamente a formação de um tecido conjuntivo denso sobre o local de enxertia dos aloenxertos associados ao PRP (Lado 2) em todos os 19 fêmures operados. Efeito este, não observado nos fêmures pertencentes aos Lados 1.

Sugerimos que outros trabalhos possam analisar a participação dos fatores de crescimento presentes no PRP em partes moles e esclarecer o evento observado. Ressaltamos também a necessidade de mais estudos sobre o PRP e outros métodos e fontes de obtenção dos PDGF e TGF, com

destaque a investigações com os métodos de imunohistoquímica e biologia molecular, que possam elucidar alguns aspectos ainda não claros na literatura, tais como:

- ✓ Dosagem de fatores de crescimento necessária para um efeito desejável;
- ✓ Em que fase do processo de reparação dos aloenxertos a aplicação destes fatores poderia garantir melhores resultados e como mediar seus efeitos.

7. CONCLUSÃO

1. A presença do plasma rico em plaquetas nas áreas de enxertias dos aloenxertos criopreservados a -80°C não altera os parâmetros histomorfométricos estruturais, de formação e reabsorção durante a fase inicial do processo de osteointegração.

8. ANEXOS

ANEXO 1. FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS E EVOLUÇÃO CLÍNICA

ANIMAL: _____

Horário: _____

Cirurgia : Início: _____ **h Anestésicos:** _____FEMUR D → LADO : ☐ I (Crio) ☐ II (PRP)FEMUR E → LADO : ☐ I (Crio) ☐ II (PRP)**FOLLOW - UP**

DIA	DATA	PROCEDIMENTO	PESO	EVOLUÇÃO/ OBS
O	___/___/___	cirurgia		
1º				
2º				
3º				
4º				
5º				
6º				
7º				
8º				
9º				
10º				
11º				
12º				
13º				
14º				
15º	___/___/___	sacrifício		

ANEXO 2. LAUDO COM RESULTADO DA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DOS ALOENXERTOS. **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO****Instituto de Ciências Biomédicas****Biotério Central****LAUDO BACTERIOLÓGICO**

Origem do Material: Faculdade de Medicina/FMUSP.

Responsável: Luiz Augusto U. Santos.

Data: 22/08/05

MEIO	MATERIAL ENVIADO	CRESCIMENTO 24 HORAS (Anaerobiose)	CRESCIMENTO 48 HORAS (Anaerobiose)	MICROORGANISMO ISOLADO
BHI (Brain Heart Infusion)	Medula + espécime Coelho 1	Negativo	Negativo	Negativo
BHI (Brain Heart Infusion)	Medula + espécime Coelho 2	Negativo	Negativo	Negativo
BHI (Brain Heart Infusion)	Medula + espécime Coelho 3	Negativo	Negativo	Negativo
BHI (Brain Heart Infusion)	Medula + espécime Coelho 4	Negativo	Negativo	Negativo
BHI (Brain Heart Infusion)	Medula + espécime Coelho 5	Negativo	Negativo	Negativo
BHI (Brain Heart Infusion)	Lavado Coelho 1	Negativo	Negativo	Negativo
BHI (Brain Heart Infusion)	Lavado Coelho 2	Negativo	Negativo	Negativo
BHI (Brain Heart Infusion)	Lavado Coelho 3	Negativo	Negativo	Negativo
BHI (Brain Heart Infusion)	Lavado Coelho 4	Negativo	Negativo	Negativo
BHI (Brain Heart Infusion)	Lavado Coelho 5	Negativo	Negativo	Negativo

MEIO	MATERIAL ENVIADO	CRESCIMENTO 20 dias	CRESCIMENTO 40 dias	MICROORGANISMO ISOLADO
Agar Sabouraud	Lavado Coelho 1	Negativo	Negativo	Negativo
Agar Sabouraud	Lavado Coelho 2	Negativo	Negativo	Negativo
Agar Sabouraud	Lavado Coelho 3	Negativo	Negativo	Negativo
Agar Sabouraud	Lavado Coelho 4	Negativo	Negativo	Negativo
Agar Sabouraud	Lavado Coelho 5	Negativo	Negativo	Negativo
Agar Sabouraud	Medula + espécime Coelho 1	Negativo	Negativo	Negativo
Agar Sabouraud	Medula + espécime Coelho 2	Negativo	Negativo	Negativo
Agar Sabouraud	Medula + espécime Coelho 3	Negativo	Negativo	Negativo
Agar Sabouraud	Medula + espécime Coelho 4	Negativo	Negativo	Negativo
Agar Sabouraud	Medula + espécime Coelho 5	Negativo	Negativo	Negativo

9. REFERÊNCIAS

Aaron JE, Shore PA. Bone histomorphometry: concepts and common techniques. In: An YH, Martin KL. Handbook of histology methods for bone and cartilage. New Jersey: Humana Press; 2003. p. 331-51.

Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: a pilot study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002; 60:1176-81.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Biologia molecular da célula. Tradução de Ana Beatriz Gorini da Veiga, et al. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2004. Cap.15-19, p.871-1116. Comunicação, citoesqueleto, ciclo, morte e divisão celular.

Amatuzzi MM, Croci AT, Giovani AMM, Santos LAU. Banco de tecidos:estruturação e normatização. *Rev Bras Ortop.* 2000; 35(5):165-72.

Amatuzzi MM, Croci AT, Giovani AMM, Santos LAU, Maragni GG, Shinzato JC. Banco de tecidos:estruturação e normatização. In: Amatuzzi, Joelho:articulação dos membros inferiores. São Paulo:Roca; 2004. p.687-99.

American Association of Tissue Banks. Standards for Tissue Banking. 10th ed. McLean : American Association of Tissue Banks; 2005.

Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999; 14:529-535.

Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost.* 2004; 91:4-15.

Appel TR, Potzsch B, Muller J, Vvon Lindern JJ, Berge SJ, Reich RH. Comparison of three different preparations of platelet concentrates for growth factor enrichment. *Clin Oral Implants Res.* 2002 Oct; 13(5): 522-8.

Aubin JE, Lian JB, Stein GS. Bone formation: maturation and functional activities of osteoblast lineage cells. In: American Society for Bone and Mineral Research. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. 6th ed. Washington: ASBMR; 2006. p.20-9.

Aufdemorte TB, Fox WC, Holt GR, McGuff HS, Ammann AJ, Beck LS. An intraosseous device for studies of bone-healing. *J Bone Joint Surg Am.* 1992; 74:1153-61.

Barros Filho TEP, Rossi JDMBA, Rodrigues CJ, Lage LA, Reis PR. Poder osteogênico dos enxertos ósseos: estudo experimental comparativo entre enxertos autólogo, homólogo irradiado e homólogo AAA. *Rev Bras Ortop.* 1989; 24(1-2):36-40.

Bithell TC. Plaquetas e megacariócitos. In: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN. Hematologia clínica. São Paulo: Manole; 1998. p.555-86.

Boldt JG, Dilawari P, Agarwal S, Drabu KJ. Revision total hip arthroplasty using impaction bone grafting with cemented nonpolished stems and charnley cups. *J Arthroplasty.* 2001; 16(8):943-52.

Brasil, Leis etc. Lei n.9434 de 5 de fevereiro de 1997. Dispõe sobre a remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para fins de transplantes e tratamento. *Diário Oficial da União*, Brasília (DF). 1997 5 fev; seção 1:25.

Brasil, Leis etc. Decreto n.2268 de 30 de junho de 1997. Dispõe sobre a remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para fins de transplantes e tratamento. *Diário Oficial da União*, Brasília (DF). 1997 30 jun; seção 1:1.

Brasil, Leis etc. Portaria n.1686 de 20 de setembro de 2002. Dispõe sobre a regulamentação para funcionamento de banco de tecidos músculo esqueléticos. *Diário Oficial da União*, Brasília (DF). 2002 24 jul; seção 1:1.

Buck BE, Malinin TI, Brown MD. Bone transplantation and human immunodeficiency virus. An estimate of risk of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Clin Orthop Relat Res*. 1989; 240:129-36.

Bush LF, Garber CZ. The bone bank. *JAMA*. 1948; 137(7):588-94.

Butterfield KJ, Bennett J, Gronowicz G, Adams D. Effect of platelet-rich plasma with autogenous bone graft for maxillary sinus augmentation in a rabbit model. *J Oral Maxillofac Surg*. 2005; 63(3):370-6.

Cabrita HBA. *Estudo comparativo do tratamento das artroplastias infectadas do quadril sem e com o uso do espaçador de cimento com antibiótico* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004.

Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Vasilic N, Madzarevic M, Kenney B. Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *J Periodont Res*. 2002; 37:300-6

Canalis E, Pah J, Gabbitas B, Rydziel S, Varghese S. Growth factors regulate the synthesis of insulin-like growth factor-1 in bone cell cultures. *Endocrinology*. 1993; 133(1):33-8.

Carrel A. The preservation of tissues and its applications in surgery. 1912. *Clin Orthop Relat Res*. 1992; 278:2-8

Carr CR, Hyatt GW. Clinical evaluation of freeze-dried bone grafts. *J Bone Joint Surg Am*. 1955; 37(3):549-614.

Centrella M, Mc-Carthy TL, Canalis E. Platelet- derived growth factor enhances deoxyribonucleic acid and collagen synthesis in osteoblast – enriched cultures from fetal rat parietal bone. *Endocrinology*. 1989; 125(1):13-9.

Centrella M, Horowitz MC, Wozney JM, McCarthy TL. Transforming growth factor-beta gene family members and bone. *Endocr Rev.* 1994; 15(1):27-39.

Clifford DH. *Preanesthesia, Anesthesia, Analgesia and Euthanasia in Laboratory Animal Medicine*. Orlando: Academic Press; 1984.p.528-62

Colmanetti A, Pereira KF, Chopard RP. New bone formation in the female rabbit tibia. *Braz Oral Res.* 2004; 18(3):224-7.

Costa AJF. *O uso da matriz óssea desmineralizada na reparação de lesões osteocondrais: estudo experimental em coelhos* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1999.

Croci AT, Camargo OP, Bitar G, Pereira SLB, Moreira M, Freitas Junior, S. Efeito do concentrado de plasma em falhas ósseas provocadas em fêmures de camundongos como estimulação de formação óssea. Estudo experimental. *Acta Ortop Bras.* 2003a; 11(4):230-9.

Croci AT, Camargo OP, Oliveira CRGC, Baptista AD, Sorrilha A. Estudo histológico dos enxertos ósseos homólogos humanos. *Acta Ortop Bras.* 2003b; 11(4):220-4.

Cunningham N, Reddi AH. Biologic principles of bone induction: application to bone grafts. In: Habal MB, Reddi AH. *Bone grafts and bone substitutes*. Philadelphia: W.B . Saunders C; 1992. p.93-8.

Dallari D, Fini M, Stagni C, Torricelli P, Nicoli Aldini N, Giavaresi G, Cenni E, Baldini N, Cenacchi A, Bassi A, Giardino R, Fornasari PM, Giunti A. In vivo study on the healing of bone defects treated with bone marrow stromal cells, platelet-rich plasma, and freeze-dried bone allografts, alone and in combination. *J Orthop Res.* 2006; 24(5):877-88.

Dori F, Huszar T, Nikolidakis D, Arweiler NB, Gera I, Sculean A. Effect of platelet-rich plasma on the healing of intra-bony defects treated with a natural bone mineral and a collagen membrane. *J Clin Periodontol*. 2007; 34(3):254-61.

Drumond SN. Transplantes ósseos. In: Pereira WA. *Manual de transplantes de órgãos e tecidos*. 2a ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2000. p.359-80.

Efeoglu C, Akçay YD, Erturk A. A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004; 62:1403-7.

Enneking WF, Burchardt H, Puhl JL, Piotrowski G. Physical and biological aspects of repair in dog cortical-bone transplants. *J Bone Joint Surg Am*. 1975; 57:237-52.

European Association of Tissue Banks. Common Standards for Tissues and Cells Banking: Berlin: European Association of Tissue Banks; 2004.

Fennis JPM, Stoelinga PJW, Jansen JA. Mandibular reconstruction: a histological and histomorphometric study on the use of autogenous scaffolds, particulate cortico-cancellous bone grafts and platelet-rich plasma in goats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2004; 33:48-55.

Fennis JPM, Stoelinga PJW, Jansen JA. Reconstruction of the mandible with an autogenous irradiated cortical scaffold, autogenous corticocancellous bone-graft and autogenous platelet-rich-plasma: na animal experiment. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2005; 34:158-66.

Feres Junior F. *Análise comparativa do índice de sucesso dos implantes osteointegrados com e sem a utilização de PRP, no protocolo de fixação* [dissertação]. Bauru: Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2003.

Ferraro AQ. Análise comparativa, histológica e imuno-histoquímica, da reparação de alvéolos tratados ou não com o fator de crescimento pdgf-bb. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2002.

Fischer LP, Fischer-Athiel C, Fischer BS. One hundred years of bone surgery in the Lyons Teaching Hospitals (1897-1997). *Ann Chir.* 1998; 52(3):264-78.

Flecknell PA. *Laboratory animal anesthesia. an introduction for research workers and technicians.* London: Academic Press; 1987.

Freymler EG, Aghaloo TL. Platelet-rich plasma: ready or not?. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 62(4): 484-8.

Furst G, Gruber R, Tangl S, Zechner W, Haas R, Mailath G, et al. Sinus grafting with autogenous platelet-rich plasma and bovine hydroxyapatite. A histomorphometric study in minipigs. *Clin Oral Implants Res.* 2003; 14:500-8.

Galea G, Kearney. Clinical effectiveness of processed and unprocessed bone. *Transfus Med.* 2005; 15(3):165-74.

Gameiro VS. *A osteointegração no implante de hidroxiapatita e hidroxiapatita associada ao fator de crescimento insulínico similar- II (IGF-II), em tecido ósseo: estudo experimental em coelhos [tese].* São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1997.

Garcia GV, Corral I, Bascones MA. Plasma rico en plaquetas y su utilización em implantología dental. *Av Periodon Implantol.* 2004; 16(2):81-92.

Gerard D, Carlson ER, Gotcher JE, Jacobs M. Effects of platelet-rich plasma on the healing of autologous bone grafted mandibular defects in dogs. *J Oral Maxillofac Surg.* 2006; 64(3):443-51.

Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Fracture healing: the biology of bone repair and regeneration. In: American Society for Bone and Mineral Research. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. 6th ed. Washington: ASBMR; 2006. p.42-48.

Giannobile W, Finkelamn RD, Lynch SE. Comparison of canine and non-human primate animal models for periodontal regenerative therapy: results following a single administration of PDGF/IGF-I. *J Periodontol*. 1994; 65(12): 1158-68.

Giannobile W, Hernandez RA, Finkelamn RD, Ryan S, Kiritsy CP, D'Andrea M, et al. Comparative effects of platelet-derived growth factor-BB and insulin-like growth factor-I, individually and in combination, on periodontal regeneration in *Macaca fascicularis*. *J Periodontal Res*. 1996; 31(5):301-12.

Giannoudis PV, Dinapoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005; 36S:S20-27.

Giovani AMM. *Estudo comparativo entre o tecido ósseo criopreservado e o conservado em glicerol a 98%* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005.

Graves DT, Cochran DL. Periodontal regeneration with polypeptide growth factors. *Curr Opin Periodontol*. 1994; 178-86.

Green CJ. *Animal Anesthesia* Laboratory Animals Ltd. London: The British Council; 1979.

Groves EWH. Methods and results of transplantation of bone in the repair of defects caused by injury or disease. *Br J Surg*. 1917; 5(18):185-242.

Gruber R, Varga F, Fischer MB, Watzek G. Platelets stimulate proliferation of bone cells: involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes. *Clin Oral Implants Res*. 2002; 13:529-35.

Habal MB, Reddi AH. *Bone grafts and bone substitutes*. Philadelphia: W.B. Saunders C; 1992.

Harkness JE, Wagner JE. *The Biology and medicine of rabbits and rodents*. 3rd ed. Philadelphia: Lea and Febiger; 1993.

Hatch RC. Agentes utilizados na eutanásia. In: Jones M, Booth NH, McDonald LE. *Farmacologia e terapêutica em veterinária*. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1987. p.927-32.

Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev*. 1999;79(4):578-83.

Heyligers IC, Klein-Nulend J. Detection of living cells in non-processed but deep-frozen bone allografts. *Cell Tissue Bank*. 2005; 6 :25-31.

Janssen ME, Lam C, Beckham R. Outcomes of allogenic cages in anterior and posterior lumbar interbody fusion. *Eur Spine J*. 2001; 10(Suppl 2):158-68.

Jorgetti V, Lugero GG,orgetti V, Koniger B, Caparbo VF, Guzzo ML. Histomorphometric evaluation of titanium implants in osteoporotic rabbits. *Implant Dent*. 2000; 9(4):303-9.

Jorgetti V. Biópsia óssea e análise histomorfométrica. Manual Fleury de diagnóstico de doenças ósteo-metabólicas. 2003. Disponível em: <http://www.fleury.com.br/htmls/cdrom/capitulo5.htm>.

Jung RE, Schmoekel HG, Zwahlen R, Kokovic V, Hammerle CHF, Weber FE. Platelet-rich plasma and fibrin as delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Clin Oral Implants Res*. 2005; 16(6):676-82.

Junqueira LC, Carneiro J. Histologia básica. 9a ed. Rio de Janeiro :Guanabara-Koogan; 1999. Cap.8, p.111-28: Tecido ósseo.

Junqueira LC, Carneiro J. Histologia básica. 9a ed. Rio de Janeiro :Guanabara-Koogan; 1999. Cap.11, p.192-205: Células do sangue.

Kanno T, Takahashi T, Tsujisawa T, Ariyoshi W, Nishihara T. Platelet-rich plasma enhances human osteoblast-like cell proliferation and differentiation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005; 63:362-9.

Khan SN, Bostrom MP, Lane JM. Bone growth factors. *Orthop Clin North Am.* 2000; 31(3):375-88.

Kim SG, Kim W, Park J, Kim H. A comparative study of osseointegration of avana implants in a desmineralized freeze-dried bone alone or with platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002a; 60:1018-25.

Kim SG, Chung CH, Kim YK, Park JC, Lim SC. Use of particulate dentin-plaster of paris combination with/without platelet-rich plasma in the treatment of bone defects around implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2002b; 17(1): 86-94.

Kleinschmidt JC, Hollinger JO. Animal models in bone research. In: Habal MB, Reddi AH. Bone grafts and bone substitutes. Philadelphia: W.B . Saunders C; 1992. p.133-46.

Knighton DR, Hunt TK, Thakral KK, Goodson WH 3rd. Role of platelets and fibrin in the healing sequence: an in vivo study of angiogenesis and collagen synthesis. *Ann Surg.* 1982; 196 (4): 379-88.

Lane JM, Tomin E, Bostrom MP. Biosynthetic bone grafting. *Clin Orthop Relat Res.* 1999; (367Suppl):S107-17.

Lavernia CJ, Malinin TI, Temple HT, Moreyra CE. Bone and tissue allograft use by orthopaedic surgeons. *J Arthroplasty.* 2004; 19(4):430-35.

Le Guehennec L, Goyenvallée E, Aguado E, Houchmand-Cuny M, Enkel B, Pilet P, Daculsi G, Layrolle P. Small-animal models for testing macroporous ceramic bone substitutes. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005;72(1):69-78.

Lemos JJ, Rossi Junior R, Píspico R. Utilização de plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos – proposta de um protocolo de obtenção simplificado. [periódico on line]. 2002 [citado Nov 2002]. Disponível em: <http://www.odontologia.com.br/artigos.asp?id=225> e <http://www.plaquetas.net/>

Lind M, Overgaard S, Ongpipattanakul B, Nguyen T, Bünger C, Soballe K. Transforming growth factor- β 1 stimulates bone on growth to weight-loaded tricalcium phosphate coated implants: an experimental study in dogs. *J Bone Joint Surg Br*. 1996; 78:377-81.

Lindhe J, Karring T, Lang NP. Tratamento periodontal regenerativo. Tratado de periodontia clínica e implantologia oral. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;1997. p.428-62.

Lozano M, Estebanell E, Cid J, Diaz-Ricart M, Mazzara R, Ordinas A, et al., Platelet concentrates prepared and stored under currently optimal conditions: minor impact on platelet adhesive and cohesive functions after storage. *Transfusion*. 1999; 39(9):951-9

Lorenzi TF. *Manual de hematologia: propedêutica e clínica*. 3a ed. São Paulo: Medsi; 2003. p.1-191.

Lynch SE, Buser D, Hernandez RA, Weber HP, Stich H, Fox CH, et al. Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *J Periodontol*. 1991; 62(11):710-16.

Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998; 85(6):638-46.

Marx RE. Platelet-rich plasma (prp): what is PRP and what is not PRP?. *Implant Dent.* 2001;10(4):225-28.

Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 62(4):489-96.

Mazor Z, Garg AK, Peleg M, Luboshitz J. Platelet-rich plasma for bone graft enhancement in sinus floor augmentation with simultaneous implant placement: patient series study. *Implant Dent.* 2004; 13(1):65-72.

Melende SD. *Estudo in vitro da integridade plaqueta humana quando submetida a criopreservação e descongelamento em soluções contendo estabilizadores de citoesqueleto* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2003.

Michaud RJ, Drabu KJ. Bone allograft banking in the United Kingdom. *J Bone Joint Surg Br.* 1994; 76(3):350-1.

Muir WW, Hubbel JA, Skarda RT. *Handbook of veterinary anesthesia*. 3a.ed. St. Louis: Mosby; 2000.

Nather A. Organisation, operational aspects and clinical experience of National University of Singapore Bone B. *Ann Acad Med Singapore.* 1991; 20(4):453-7.

Nesse E, Nielsen EW, Bastian D. Cemented versus cementless revision femoral stems using morselized allograft--a prospective, randomized study with 5 years follow-up. *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* 2003; 141(6):678-83

Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. *Applied Linear Statistical Models*. 4th ed. Chicago: Irwin; 1996.

Okuda K, Kawase T, Momose M, Murata M, Saito Y, Susuki H, et al. Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J Periodontol*. 2003; 74(6):849-57.

Ostman A, Thyberg J, Westermark B, Heldin CH. PDGF-AA and PDGF-BB biosynthesis: proprotein processing in the Golgi complex and lysosomal degradation of PDGF-BB retained intracellularly. *J Cell Biol*. 1992; 118(3): 509-19.

Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*. 1987; 2(6):595-610

Parrish FF. Allograft replacement of all or part of the end of a long bone following excision of a tumor: report of twenty-one cases. *J Bone Joint Surg Am*. 1973; 55(1):1-22.

Perren SM, Claes L. Biologia e biomecânica no manejo de fraturas. In: Rüed TP, Murphy WM. *Princípios AO do tratamento de fraturas*. Tradução de Jacques Vissoky. Porto Alegre: Artmed; 2002. p.7-30.

Plumb DC. Veterinary drug handbook. 3rd ed. St. Louis: Iowa State University Press; 1999.

RBT- Registro Brasileiro de Transplantes [on line] São Paulo: Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos; 2007. Disponível em: <http://www.abto.org.br/profissionais/profissionais.asp>.

Riley EH. Bone Morphogenetic protein-2: biology and applications. *Clin Orthop Relat Res*. 1996; (324):39-46.

Rimondini L, Nicoli-Aldini N, Fini M, Guzzardella G, Tschon M, Giardino R. In vivo experimental study on bone regeneration in critical bone defects using an injectable biodegradable PLA/PGA copolymer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005; 99(2): 48-54.

Roldan JC, Jepsen S, Miller J, Freitag S, Rueger DC, Acil Y, Terheyden H. Bone formation in the presence of platelet-rich plasma vs. bone morphogenetic protein-7. *Bone*. 2004; 34(1):80-90.

Rudelli S, Honda E, Angeli JA. Uso de enxerto ósseo nas revisões com prótese total do quadril não cimentada e híbrida. *Rev Bras Ortop*. 1992; 27(5):281-8.

Saito A, Suzuki Y, Kitamura M, Ogata SI, Yoshihara Y, Masuda S, et al. Repair of 20-mm long rabbit radial bone defects using BMP-derived peptide combined with an alpha-tricalcium phosphate scaffold. *J Biomed Mater Res A*. 2006; 77(4):700-6.

Salim A, Nacamuli RP, Morgan EF, Giaccia AJ, Longaker MT. Transient changes in oxygen tension inhibit osteogenic differentiation and Runx2 expression in osteoblasts. *J Biol Chem*. 2004; 279(38):40007-16.

Schliephake H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2002; 31:469-84.

Schreurs BW, Busch VJ, Welten ML, Verdonschot N, Slooff TJ, Gardeniers JW. Acetabular reconstruction with impaction bone-grafting and a cemented cup in patients younger than fifty years old. *J Bone Joint Surg Am*. 2004; 86(11):2385-92.

Schreurs BW, Arts JJ, Verdonschot N, Buma P, Slooff TJ, Gardeniers JW. Femoral component revision with use of impaction bone-grafting and a cemented polished stem. *J Bone Joint Surg Am.* 2005; 87(11):2499-507.

Shanaman R, Filstein MR, Danesh-Meyer MJ. Localized ridge augmentation using GBR and platelet-rich plasma: case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2001; 21(4):345-55.

Sharrard WJW, Collins DH. The fate of human decalcified Bone grafts. *Proc R Soc Med.* 1961; 54:1101-2.

Short CE. *Principles and practice of veterinary anesthesia.* Baltimore: Williams and Wilkins; 1987.

Silva AM, Del Carlo RJ, Vilorio MIV. Matriz óssea homóloga desmineralizada na preparação de falhas ósseas segmentares produzidas no rádio de coelhos. *Cienc Rural.* 2003; 33 (3):539-45

Smith SE, DeLee JC, Ramamurthy S. Ilioinguinal neuralgia following iliac bone-grafting. Report of two cases and review of the literature. *J Bone Joint Surg Am.* 1984;66(8):1306-8.

Solheim E. Growth factors in bone. *Int Orthop.* 1998; 22:410-16.

Sonnleitner D, Huemer P, Sullivan DY. A simplified technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate for intraoral bone grafting techniques: a technical note. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2000;15:879-82.

Stefani CM, Machado MA, Sallum EA, Sallum AW, Toledo S, Nociti FH Jr. Platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-1 combination and bone regeneration around implants placed into extraction sockets: a histometric study in dogs. *Implant Dent.* 2000; 9(2):126-32.

Warren SM, Steinbrech DS, Mehrara BJ, Saadeh PB, Greenwald JA, Spector JA, Bouletreau PJ, Longaker MT. Hypoxia regulates osteoblast gene expression. *J Surg Res.* 2001; 99:147-51.

Sumner DR , Turner TM, Purchio AF, Gombotz WR, Urban RM, Galante JO. Enhancement of bone ingrowth by transforming growth factor- β . *J Bone Joint Surg Am.* 1995; 77:1135-47.

Taga R, Cestari TM, Taga EM, Tavano O, Granjeiro JM. Evolução de enxertos ósseos autógenos e alógenos colocados em defeitos ósseos de tamanho crítico em calvária de cobaias. *Rev Bras Cir Impl.* 2000; 7(26):37-42.

Tamae PE. *Avaliação da neoformação óssea do alvéolo dentário com plasma rico em plaquetas (PRP) em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)* [dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2005.

Thies RS, Bauduy M, Ashton BA, Kurtzberg L, Wozney JM, Rosen V. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 induces osteoblastic differentiation in w-20-17 stromal cells. *Endocrinology.* 1992; 130(3):1318-24.

Tomford WW, Starkweather RJ, Goldman MH. A study of the clinical incidence of infection in the use of banked allograft bone. *J Bone Joint Surg Am.* 1981; 63(2):244-8.

Tomford WW, Mankin HJ. Bone Banking: Update on methods and materials. *Orthop Clin North Am.* 1999; 30:565-70.

Tomford WW. Bone allografts: past, present and future. *Cell Tissue Bank.* 2000; 1:105-9.

Tsay RC, Vo J, Burke A, Eisig SB, Lu HH, Landesberg R. Differential growth factor retention by platelet-rich plasma composites. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005; 63(4):521-8.

Tuominen T. *Native bovine bone morphogenetic protein in the healing of segmental long bone defects* [dissertação]. Oulu: Division of Orthopaedic and Trauma Surgery, University of Oulu; 2001.

Urist MR. Bone formation by auto induction. *Science*.1965; 50:893-99.

Urist MR, DeLange RJ, Finerman GA. Bone cell differentiation and growth factors. *Science*.1983; 220(4598):680-6.

Urist MR. Bone morphogenetic protein. In: Habal MB, Reddi AH. Bone grafts and bone substitutes. Philadelphia: W.B . Saunders C; 1992. p.70-83.

Wang H, Pappert TD, Castelli WA, Chiego Jr DJ, Shyr Y, Smith BA. The effect of platelet-derived growth factor on the cellular response of the periodontium: an autoradiographic study on dogs. *J Periodontol*. 1994; 65 (5): 429-36.

Weibrich G, Kleis WKG. Curasan PRP kit vs. PCCS PRP system. Collection efficiency and platelet counts of two different methods for the preparation of platelet-rich plasma. *Clin Oral Implant Res*. 2002a Ago;13:437-43.

Weibrich G, Kleis WKG, Hafner G. Hitzler WE. Grow factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Oral Maxillofac Surg*. 2002b; 30:97-102.

Weibrich G, Kleis WK, Buch R, Hitzler WE, Hafner G. The Harvest Smart PRePTM system versus the Friadent-Schutze platelet-rich plasma kit. *Clin Oral Implants Res*. 2003; 14(2):233-9.

Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone*. 2004; 34:665-71.

Weyts FA, Bos PK, Dinjens WN, van Doorn WJ, van Biezen FC, Weinans H, Verhaar JA. Living cells in 1 of 2 frozen femoral heads. *Acta Orthop Scand*. 2003; 74(6): 661-4.

Wiltfang J, Kloss FR, Kessler P, Nkenke E, Schultze-Mosgau S, Zimmermann R, Schlegel KA. Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects: an animal experiment. *Clin Oral Implants Res*. 2004; 15:187-193.

Wilson CJ, Tait GR, Gálea G. Utilisation of bone allograft by orthopaedic surgeons in Scotland. *Cell Tissue Bank*. 2002; 3: 49-53.

Wilson EMK. *Estimulação de consolidação pela utilização de plasma rico em plaquetas autógenas. Estudo experimental com coelhos* [tese] Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2003.

Woolf SK, Gross RH. Perceptions of allograft safety and efficacy among spinal deformity surgeons. *J Pediatr Orthop*. 2001; 21(6):767-71.

Zhang CQ, Yuan T, Zeng BF. Experimental study of the effect of platelet-rich plasma on osteogenesis in rabbit. *Chin Med J (Engl)*. 2004; 117(12):1853-55.

Apêndices

APÊNDICE 1: PROTOCOLO DE TERAPIA INTRAVENOSA DO IOT-HC-FMUSP

INSTITUTO DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA- HC-FMUSP DIVISÃO DE ENFERMAGEM

PROTOCOLO PARA TERAPIA INTRAVENOSA

Grupo Terapia Intravenosa - G.T.I.V do Instituto de Ortopedia do HCFMUSP

O presente protocolo segue as diretrizes do *Guideline for Prevention Of Intravascular Device-related Infections - C.D.C - 2002*. Abaixo, destacamos a categorização:

CATEGORIA IA	Fortemente recomendado para implementação e fortemente embasado por estudos experimentais, clínicos ou epidemiológicos bem elaborados.
CATEGORIA IB	Fortemente recomendado para implementação e fortemente embasado por alguns estudos experimentais, clínicos ou epidemiológicos e uma racionalidade teórica forte.
CATEGORIA IC	Exigido por regulamentações, regras ou padronizações estatais ou federais.
CATEGORIA II	Sugerido para a implementação e embasado por estudos clínicos sugestivos ou epidemiológicos ou uma racionalidade teórica
Tema não resolvido	Práticas para as quais a evidência não é suficiente ou não há consenso em relação à existência de eficácia.

CATETERES PERIFÉRICOS

Punção venosa periférica: utilização de cateter agulhado (ex Butterfly®) ou cateter sobre agulha (ex:Jelco®,Abbocath®,etc)

Dispositivo Indicado: Cateter Sobre Agulha

1 - PRÉ - PUNÇÃO

- Higienizar as mãos, realizando a técnica com água e sabão contendo anti-séptico ou utilizar álcool-gel. (**Categoria 1A**) [43, 70, 04, 05]
- Preparar o material necessário para a punção e manutenção da permeabilidade do acesso: o cateter agulhado é indicado para medicações de dose única, coleta de exames e terapia com duração de 24 horas. (**Giovani**)[13]
- →Soluções e ou medicações com PH **menor que 5** ou **maior que 9**, ou medicações com osmolaridade maior que **600 mOsm/l**
- Evitar as áreas de flexão

2 - PUNÇÃO

- Higienizar as mãos, realizando a técnica com água e sabão contendo anti-séptico ou utilizar álcool-gel. A higienização das mãos deverá ocorrer antes e após palpar o local de inserção do cateter como em outras situações tais como antes e depois de inserir, trocar ou fazer o curativo do cateter intravascular. **Categoria 1A**
- Não realizar a palpação do local de inserção após a aplicação do anti-séptico, a menos que a técnica asséptica seja assegurada (uso de luvas estéreis). **Categoria 1A** [10, 14, 04,05]
- O uso de luvas de procedimento não estéril é aceitável para inserção de cateter intravasculares periféricos se a técnica asséptica puder ser mantida. As luvas estéreis devem ser usadas para inserção de cateteres centrais - **Categoria 1A** [06, 07]
- O uso de luvas não substitui a necessidade de higienização das mãos - **Categoria 1A** [10, 30, 34]
- Uso da técnica asséptica deverá ser mantida desde a inserção até o cuidado de cateteres intravasculares - **Categoria 1A** [22, 28, 06, 01]

- Faça a anti-sepsia com clorexidina degermante alcoólica (0,5 %) ou álcool a 70 % - **Categoria 1A [19, 12, 16, 23]**
- **Aguarde a secagem do anti-séptico aplicado na pele (álcool / clorexidina) antes da inserção do cateter. Categoria-1B [19, 12, 16, 23]**
- Faça a punção e mantenha a via permeável

3-FIXAÇÃO

- **Ideal:** filme transparente
- Para a fixação do cateter utilize curativo transparente semi-permeável - **Categoria - 1A[21, 03, 18]**
- Opção: sutura de pele (Steri - Strip®- estéril, porém não é possível visualizar o sítio de inserção) **Categoria 1A**
- Pior opção: esparadrapo e micropore.(não são estéreis e também não possibilitam a visualização do sítio de inserção)
- Utilizar a técnica de tunelização do cateter, evitando assim contato com o meio exterior
- Façam anotações no prontuário utilizando como diretriz o "card" adotado na instituição
- Seguir diluição, tempo de administração do medicamento e uso ou não da B.I, conforme a prescrição de Enfermagem.

4-MANUTENÇÃO DO ACESSO VENOSO:

- Fazer troca dos equipos, inclusive de duas vias a cada 24 horas (para o uso do sistema aberto).
- Fazer a troca dos equipos,inclusive de duas vias a cada 72 horas(para uso do sistema fechado de infusão) **Categoria 1A**

- Ao utilizar injetor lateral ou dispositivos valvulares para fechar o sistema, realizar desinfecção dos mesmos com álcool a 70% - **Categoria-1A[17, 26, 31]**
- Pacientes que recebem medicações intermitentes, sem a necessidade de soro de manutenção (protocolo do 1º B), heparinizar o sistema da seguinte forma:
Qualquer cateter intravascular cuja permanência não seja mais necessária, realizar a pronta remoção - **Categoria 1A[15, 25]**
- Realizar a avaliação do ponto de inserção a cada plantão, e anotar em prontuário e na ficha de seguimento de acessos intravasculares. Mediante qualquer sinal de complicações (flebites, infiltração, dor à infusão, etc.), remover o acesso e puncionar em outra região, anotar em prontuário e na ficha GTIV a nova punção.

DEFINIÇÕES (C.D.C)

COLONIZAÇÃO LOCALIZADA DO CATETER: crescimento significativo de microorganismo maior que 15 UFC, da ponta do cateter, segmento subcutâneo do cateter ou hub do cateter.

INFECÇÃO DO LOCAL DO CATETER: eritema ou enduração dentro de 02 centímetros ao redor do cateter na ausência de concomitante infecção da corrente sanguínea e sem purulência concomitante.

INFECÇÃO DA CORRENTE SANGUINEA ASSOCIADA À SOLUÇÃO: crescimento do mesmo microorganismo na solução intravenosa e em hemoculturas (preferencialmente colhidas percutâneamente) com nenhuma outra fonte de infecção identificada.

INFECÇÃO DA CORRENTE SANGUINEA ASSOCIADA A CATETERES: bacteremia/ fungemia em paciente com cateter intravascular com pelo menos 01 hemocultura positiva e com manifestações clínicas de infecções (febre, calafrios e/ou hipotensão) e nenhuma outra fonte aparente de infecção da corrente sanguínea, exceto o cateter ou qualquer um dos seguintes:

1. Culturas Semi Quantitativas positivas (maior que 15 UFC) ou Quantitativas (maior que 100000 UFC) com o mesmo microorganismo (espécie e antibiograma) na ponta do cateter e hemocultura;
2. Hemoculturas quantitativas simultâneas com uma proporção $\geq 5:1$ (cateter venoso central X periférico);
3. Intervalo de tempo de positividade da cultura no sangue de cateter venoso central X hemocultura periférica de mais de 02 horas.

TROCA ACESSOS VENOSOS PERIFÉRICOS

Acessos venosos periféricos puncionados em unidades de emergência ou fixados de maneira inadequada, deverão ser trocados imediatamente após a estabilização do quadro ou no máximo 24 horas após a punção.