

ESTIMULAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO ÓSSEA PELO PLASMA AUTÓGENO RICO EM PLAQUETAS. ESTUDO EXPERIMENTAL EM COELHOS

BONE HEALING STIMULATION BY PLATELET-RICH AUTOGENOUS PLASMA. AN EXPERIMENTAL STUDY IN RABBITS

ELISABETE MITIKO KOBAYASHI WILSON¹, CLÁUDIO HENRIQUE BARBIER², NILTON MAZZER³

RESUMO

O plasma sanguíneo autólogo com alta concentração de plaquetas obtido por centrifugação (plasma rico em plaquetas, ou PRP) tem sido utilizado na prática clínica para estimular a cicatrização óssea numa variedade de situações, sob alegação de que ele carrega uma elevada concentração de fatores de crescimento derivados da plaqueta e β -transformadores, os quais sabidamente estimulam o crescimento e regeneração de diferentes tecidos. No presente estudo, o PRP foi utilizado para reparar uma falha óssea diafisária segmentar de meia espessura e 2 cm de comprimento produzida no rádio de coelhos Nova Zelândia. O perióstio foi ressecado na circunferência do local da falha e a cavidade medular foi selada com cera óssea em todos os animais para bloquear a chegada de celular regeneradoras que não fossem do próprio osso, mas dos tecidos vizinhos. Três grupos de 15 animais cada foram planejados, de acordo com o procedimento realizado: 1) falha deixada vazia; 2) falha preenchida com o PRP; e 3) falha preenchida com um material inerte (Gelfoam[®]). Em cada grupo os animais foram distribuídos em três subgrupos de acordo com o período de observação pós-operatória, de 4, 8 e 12 semanas, respectivamente, depois do qual os animais foram mortos e o rádio, ressecado para os estudos histológicos. Radiografias e cintilografias foram obtidas a intervalos de 4 semanas, começando na quarta semana pós-operatória. Cicatrização completa e remodelação foram observadas no grupo 2 já na 8^a semana, enquanto que nos grupos 1 e 3 esse processo era apenas parcial na 12^a. A captação do tecnécio estava aumentada em todos os grupos, assim permanecendo durante todo o período de observação nos grupos 1 e 3, mas diminuindo da 8^a para a 12^a semana no grupo 2, acompanhando o processo de remodelação, com diferenças significantes entre os grupos ($p < 0,05$).

Descritores: Osso e ossos; Plaquetas; Cintilografia

INTRODUÇÃO

A reparação espontânea dos diferentes tecidos do corpo humano, inclusive do osso, é mediada por diferentes fatores de crescimento, num processo que se inicia pela formação do coágulo sanguíneo e continua pela degranulação subsequente das plaquetas, a qual libera os fatores de crescimento^(1,2,3). Vários fatores de crescimento têm sido relacionado ao processo reparativo do osso: fatores de crescimento derivados das plaquetas (PDGFs, platelet-derived growth factors), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF, vascular endothelium growth factor), fatores de crescimento transformadores α e β (TGF- α and TGF- β , transforming growth factors

SUMMARY

The autogenous blood plasma with high platelet concentration obtained through centrifugation (platelet-rich plasma, or PRP) has been used in clinical practice to stimulate bone healing in a number of situations, allegedly because of its ability to carry a high concentration of platelet-derived and β -transformer growth factors, which are well known to stimulate different tissues growth and repair. In the present study, PRP was used to repair a half-thick, 2-cm long segmental diaphyseal bone gap produced on New Zealand rabbits' radius. Periosteum was dried at the circumference of the gap site and the spinal cord cavity was sealed with bony wax in all animals in order to block the entrance of repairing cells other than the ones from the bone itself, but from surrounding tissues. Three groups of 15 animals each were designed, according to the procedure performed: 1) gap left empty; 2) gap filled with PRP; and 3) gap filled with an inert material (Gelfoam[®]). In each group, the animals were deployed into three subgroups according to postoperative follow-up period, of 4, 8, and 12 weeks, respectively, after which animals were sacrificed and the radius was dried for histological study purposes. X-rays and scintiscan were taken within 4 weeks intervals, starting from the fourth postoperative week. Full healing and remodeling were seen in group 2 as soon as the 8th postoperative week, while in groups 1 and 3, that process was only partial at the 12th week. Technetium uptake was increased in all groups, remaining as such throughout the whole follow-up period in groups 1 and 3, but showing reduction between the 8th and 12th week in group 2, accompanying remodeling process, with significant differences between groups ($p < 0.05$).

Keywords: Bone and bones; Blood platelets; Radionuclide imaging

α e β), fatores de crescimento dos fibroblastos ácido e básico (aFGF e bFGF, acid e basic fibroblast growth factors), fator de crescimento epidérmico (EGF, epidermal growth factor), fatores de crescimento semelhantes à insulina I e II (IGF-I e IGF-II, insulin-like growth factors I e II), fatores de crescimento derivados do cimento (CGF, cement-derived growth factor), proteínas relacionadas ao hormônio paratireoideano (PTHrP, parathyroid hormone related proteins) e proteínas morfogenéticas do osso 1 a 12 (BMPs 1-12, bone morphogenetic protein 1 a 12)^(4,5). Alguns desses fatores de crescimento, como os PDGFs (aa, bb e ab), TGFs β 1 e β 2, VEGF e EGF estão contidos dentro dos grânulos α das plaquetas⁽⁶⁾.

Trabalho realizado no Programa de Pós-graduação em Ortopedia e Reabilitação, Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Endereço para correspondência: Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Campus Universitário - CEP: 14049 - Ribeirão Preto - SP - Brasil - E.mail: chbarbie@fmrp.usp.br

1 - Ortopedista, aluna do curso de pós-graduação nível doutorado.

2 - Ortopedista, professor titular, orientador.

3 - Ortopedista, professor associado, co-orientador.

Trabalho recebido em 16/02/06 aprovado em 29/05/06

Embora produzidos pelas plaquetas, os PDGFs não são detectados normalmente no plasma sanguíneo e sua concentração cai rapidamente (menos de dois minutos) a quase zero quando injetados diretamente na corrente sanguínea, devido ao seu caráter hidrofóbico e altamente catiônico⁽⁷⁾. Por outro lado, os PDGFs são muito fáceis de obter, pois sua concentração teoricamente aumenta com a concentração das plaquetas por centrifugação, no chamado plasma rico em plaquetas (PRP). O coágulo sanguíneo normal contém cerca de 95% de hemácias, 5% de plaquetas e menos de 1% de células brancas; no PRP, o quociente entre hemácias e plaquetas se inverte, estas últimas ocupando cerca de 95% do volume total. Na realidade, o processo de preparação do PRP consiste da separação das plaquetas, cuja concentração pode aumentar até seis vezes por volume, em comparação com o sangue normal.

O PRP já tem sido utilizado em várias especialidades médicas (cirurgia plástica reconstrutiva, otorrinolaringologia) e em odontologia para produzir hemostasia, estimular a cicatrização de tecidos moles e do osso, a adesão de enxertos de pele, integração de enxertos ósseos e a fixação de implantes nos ossos chatos do crânio e da face^(5,8,9,10), mas, apesar das evidências de que o PRP pode ser útil nessas situações, não há unanimidade sobre o seu papel na cicatrização óssea^(11,12). Além disso, há poucos relatos sobre efeitos benéficos na cicatrização dos ossos longos do aparelho locomotor, embora "substancial neoformação óssea", maior invasão vascular e melhor remodelação do enxerto ósseo tenham sido demonstrados em ossos metatarsianos de ovelhas, nos quais foi produzido um defeito crítico, preenchido com uma combinação de enxerto homólogo, células-tronco e PRP⁽¹³⁾.

Considerando o grande potencial de aplicação clínica do PRP, é necessário que mais evidência de que ele realmente estimula a neoformação e cicatrização óssea seja produzida. Foi o objetivo da presente investigação estudar o papel desempenhado pelo PRP na cicatrização de uma falha óssea diafisária longitudinal de meia circunferência produzida no rádio de coelhos.

MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP). Foram utilizados 45 coelhos machos da raça Nova Zelândia, de 8 – 10 semanas de idade, divididos em três grupos^(1,2e3) de 15 animais cada, de acordo com o procedimento realizado. Os animais de cada grupo foram distribuídos em três subgrupos de cinco animais cada, de acordo com o período de observação pós-operatória, de quatro (subgrupo a), oito (subgrupo b) e 12 semanas (subgrupo c). Todos os animais foram mantidos em gaiolas individuais durante todo o experimento, sob rigorosas condições de higiene e alimentados com ração-padrão para coelhos e água ad libitum.

Procedimento operatório

Sob anestesia geral (Cloridrato de ketamina, 35 mg/kg*; Xylazina, 9 mg/kg**) administrada por via intramuscular e com um torniquete aplicado no segmento umeral do membro anterior, o segmento antebraquial era preparado para operação de maneira rotineira (tricotomia, anti-sepsia com álcool iodado a 20%, campos cirúrgicos envolvendo o campo operatório). O rádio era exposto através de uma incisão retilínea longitudinal na borda medial do segmento antebraquial. O espaço entre os grupos musculares extensor e flexor

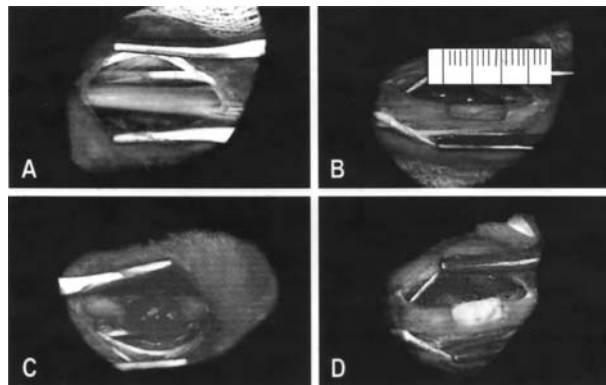


Figura 1 - Detalhes da operação: o segmento de 4 cm de comprimento do rádio exposto, com o periosteio já ressecado (A); a falha óssea resultante da osteotomia de ressecção de 2 cm de comprimento e meio diâmetro (B); a falha preenchida com o PRP (C) e com o material inerte (D).

era dissecado, dando ampla visão do rádio, cujo periosteio era inteiramente ressecado num segmento de 4 cm de comprimento. Com uma serra motorizada delicada eram feitas as osteotomias longitudinais e transversais necessárias para remover uma janela semi-circunferencial de 2 cm de comprimento do osso, deixando aberta uma falha óssea correspondente. O canal medular era bloqueado com cera óssea (Ethicon®) acima e abaixo da falha, que era deixada vazia no grupo 1, preenchida com o PRP autólogo no grupo 2 e com um material inerte (Gelfoam®) no grupo 3 (Figura 1).

Preparação do PRP autólogo

Com o animal já anestesiado, colhia-se por meio de uma punção cardíaca uma amostra de 4,5 ml de sangue, que era colocada em um tubo de ensaio apropriado e centrifugada por 15 minutos a 1800 rpm. As hemácias, mais pesadas, coletavam-se no fundo do tubo, com o plasma acima, como de hábito. Do fundo para o topo do tubo, a primeira camada plasmática (cerca de 100 µl), incluindo uma camada de cerca de 1 mm de espessura ainda contendo hemácias, era o plasma muito rico em plaquetas (pmrp); a segunda camada, indivisível da primeira (cerca de 500 µl) era o plasma rico em plaquetas (prp), enquanto a terceira camada, igualmente indivisível da segunda (cerca de 500 µl), era o plasma de conteúdo médio em plaquetas (pmp). Uma quarta camada era a de conteúdo pobre em plaquetas (ppp). A primeira e a segunda camadas ocupavam um segmento de 13 mm de comprimento do tubo, logo acima da camada das hemácias, e eram aspiradas juntas com uma pipeta, constituindo, então, o PRP, o qual era depositado num segundo tubo e adicionado de 10 µl de uma solução de cloreto de cálcio a 10% para induzir a coagulação. Uma vez coagulado, o PRP estava pronto para preencher a falha óssea no grupo 2. Todo o procedimento de preparo do PRP era realizado sob condições rigorosamente estéreis.

As plaquetas eram contadas no sangue total e no PRP de cada animal, para assegurar que a concentração obtida com a centrifugação estava dentro do necessário para haver qualquer estimulação. No sangue total, a concentração média foi de 324.000 plaquetas/mm³ (variação: 248.000 – 634.000 plaquetas/mm³) e no PRP, de 1.239.000 plaquetas/mm³ (variação: 740.000 – 2.250.000 plaquetas/mm³), significando um aumento médio de quatro vezes.

Avaliação pós-operatória

Consistiu de radiografias convencionais, cintilografia com tecnécio e análise histológica do osso operado, ressecado após o sacrifício dos animais com quatro, oito e 12 semanas, de acordo com o subgrupo em cada grupo.

Radiografias convencionais: o segmento radial do membro anterior era rigorosamente mantido nas posições estabelecidas para facilitar a comparação e os achados radiográficos eram graduados de acordo com seu aspecto, como se segue: 0. ausência completa de cicatrização; 1. neoformação óssea irregular (sinais indefinidos de cicatrização); 2. esclerose e reação ósseas; 3. cicatrização parcial; e 4. cicatrização completa/remodelação.

Cintilografia óssea: obtida imediatamente (fase de equilíbrio) e três horas (fase de impregnação) após uma injeção endovenosa de um preparado de tecnécio (metileno-difosfonato de Tc99m, 8 µCu), logo depois que as radiografias convencionais haviam sido tomadas. Os resultados eram registrados em contagens por minuto e era calculado o quociente dos valores registrados para

* Dopalen®; ** Rompun®

o rádio direito, operado, e o esquerdo, intocado, denominado quociente de atividade (quociente D/E).

Estudos histológicos: os animais eram mortos com quatro, oito e 12 semanas de pós-operatório de acordo com o subgrupo em cada grupo, com uma injeção endovenosa de uma dose maciça de anestésico geral, para uma morte rápida e indolor. O rádio direito era removido pela desarticulação no nível do cotovelo, inteiramente limpo das partes moles circundantes e imerso em formol a 10% por cinco dias para fixação; em seguida, era descalcificado numa solução aquosa de ácido nítrico a 5% por outros cinco dias. Uma vez descalcificado, as duas epífises eram ressecadas, deixando apenas o segmento intermediário com o local operado, o qual era dividido em três segmentos (proximal, intermediário e distal) de comprimento semelhante. Cada um desses segmentos eram incluído em blocos de parafina, deles obtendo-se cortes histológicos de 6 µm de espessura, montados em lâmina e corados com a hematoxilina-eosina (HE). Os cortes eram examinados com um microscópio de luz (Zeiss Axio-photo) equipado com uma câmara de vídeo e conectado a um computador para captura, armazenamento e manipulação das imagens. Os resultados referentes ao reparo da falha óssea eram graduados de acordo com a quantidade de tecido ósseo neoformado, como se segue: 0. ausência de osteoclastos e osteoblastos; 1. mínima quantidade de osso neoformado; 2. ilhas esparsas de agrupamentos de osteoblastos; 3. agrupamentos de osteoblastos mais organizados e trabéculas ósseas jovens; 4. trabéculas ósseas entremeadas com espaços medulares.

Os dados referentes às análises radiográfica, cintilográfica e histológica foram submetidos a análise estatística pelo teste t de Student e pela análise da variância (ANOVA), no nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

Os procedimentos anestésico e operatório e o confinamento nas gaiolas foram bem tolerados por todos os animais. Não ocorreu nenhuma fratura, mas algum encurvamento do rádio operado foi observado em alguns animais, em todos os grupos.

Avaliação radiográfica

Os resultados graduados como descrito acima permitiram uma avaliação semiquantitativa e a análise estatística correspondente. Neoformação óssea irregular, caracterizada por áreas de aparente calo ósseo jovem entremeadas

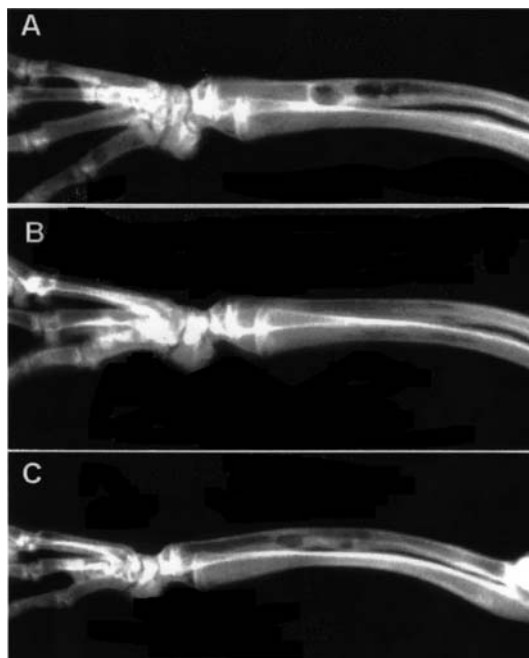


Figura 2 - Aspecto radiográfico do local operado com 12 semanas: cicatrização incompleta da falha nos grupos 1 (A) e 3 (C), com neoformação reacional neste último. Cicatrização completa no grupo 2 (B).

Grupo	Período pós-operatório (semanas)		
	4	8	12
1	1.18 (1.05-1.30)	1.25 (1.12-1.45)	1.28 (1.16-1.48)
2	1.61 (1.47-1.68)	1.54 (1.43-1.62)	1.28 (1.21-1.35)
3	1.20 (1.09-1.33)	1.29 (1.19-1.36)	1.31 (1.21-1.41)

Tabela 1 - Distribuição dos quocientes de atividade (média e variação) de acordo com os grupos e os períodos de observação.

nenhum período ($>0,05$).

Na fase tardia de impregnação, o quociente médio de atividade aumentou progressivamente nos grupos 1 e 3, sendo, respectivamente, 1,18 e 1,2 com quatro, 1,25 e 1,29 com oito e 1,28 e 1,31 com 12 semanas, sem diferença significativa entre os subgrupos e os grupos ($>0,05$). Para o grupo 2, o quociente médio de atividade

foi de 1,61 com quatro semanas, diminuindo para 1,54 com oito e para 1,28 com 12 semanas, as diferenças entre os períodos sendo significativa ($p < 0,05$). Já, as diferenças entre o grupo 2 e os grupos 1 e 3 foram significantes com quatro e oito semanas ($p < 0,05$), mas não com 12 ($p > 0,05$) (Tabela 1, Figura 3).

Avaliação cintilográfica

Os valores das contagens da captação do radioisótopo não foram regulares, tanto no membro operado como no intocado, entre os animais de todos os grupos e subgrupos. Na verdade, eles diferiam substancialmente, mas eram consistentemente mais elevados no membro operado, como ficou evidente pelo quociente de atividade. Quocientes de atividade ligeiramente aumentados, variando entre 1,1 e 1,07, mas mostrando uma tendência a diminuir com o tempo, foram observados em todos os subgrupos na fase de equilíbrio, com quatro, oito e 12 semanas, indicando que havia ocorrido uma acomodação no desarranjo vascular causado pelo procedimento operatório. As diferenças entre os grupos não foram significantes nessa fase em

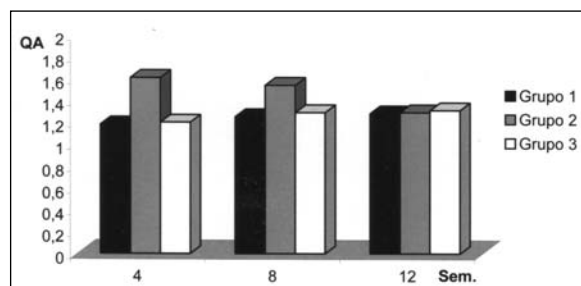


Figura 3 - Gráfico do comportamento dos quocientes de atividade (QA) nos diferentes grupos, mostrando que a captação do isótopo estava ainda aumentando nos grupos 1 e 3, em consequência do processo de neoformação óssea ainda ativo, enquanto no grupo 2 estava em franco declínio, significando que a falha cicatrizada já estava em remodelação.

Avaliação macroscópica

Praticamente nenhuma reação tecidual era evidente nos tecidos ao redor da falha nos grupos 1 e 2, mas sim no grupo 3, no qual algum espessamento e fibrose da musculatura eram notados. A falha em si estava preenchida com calo

ósseo no grupo 2 já com quatro semanas, assim permanecendo com oito e com 12 semanas. No grupo 1, com quatro semanas não havia virtualmente nenhum calo ósseo dentro da falha, que estava preenchida com tecido fibroso, assim permanecendo nos períodos subsequentes. No grupo 3, parecia haver um pouco de tecido ósseo dentro da falha, a partir de oito semanas, ficando mais evidente com 12. Cerca da metade dos raios estavam levemente arqueados, mas nenhum deles estava evidentemente fraturado.

Estudos histológicos

No grupo 1, com quatro semanas, a falha estava virtualmente vazia de qualquer tecido (grau 0) e o espaço medular estava aparecia preenchido com tecido adiposo com células hematogênicas esparsas. Com oito semanas, alguns osteoblastos (grau 1) já eram vistos, particularmente na periferia da falha, embora com muito pequena atividade osteogênica. Aspecto semelhante era visto com 12 semanas (graus 1 e 2).

No grupo 2, com quatro semanas, muitos agrupamentos de osteoblastos, já delineando trabéculas jovens, e vasos neoformados ocupavam a falha (grau 3), mas mais concentrados na periferia. Com oito semanas, as trabéculas ósseas jovens eram mais numerosas e evidentes (graus 3 e 4), com muitos osteoblastos esparsamente distribuídos no interior da nova matriz óssea calcificada. Com 12 semanas, a neoformação óssea era mais compacta, com trabéculas ósseas já melhor organizadas e calcificadas, às vezes circundadas por osteoclastos, evidenciando o processo de remodelação (grau 4). As trabéculas ósseas delimitavam espaços medulares preenchidos por tecido hematogênico abundante, semelhante ao osso normal.

No grupo 3, com quatro semanas, nenhuma atividade osteoblástica era evidente dentro da falha (grau 0), o espaço medular aparecendo ocupado por células adiposas, poucos vasos sanguíneos e um material amorfo, remanescente do material utilizado para preencher a falha. Com oito semanas, alguns poucos agrupamentos de osteoblastos (grau 1) eram visíveis na periferia do defeito, como se circundando o material amorfo já parcialmente reabsorvido, mas ainda presente. Com 12 semanas, o material amorfo tinha quase completamente desaparecido; ao redor dos seus restos apareciam alguns agrupamentos de osteoblastos e poucos vasos sanguíneos neoformados (grau 2) (Figura 4).

DISCUSSÃO

Apesar dos grandes avanços da moderna cirurgia ortopédica, a correção cirúrgica das falhas ósseas resultantes de trauma ou outras causas ainda é um problema desafiador para o ortopedista, particularmente quando acomete a diáfise dos ossos longos. Os enxertos ósseos autólogos convencionais e, às vezes, vascularizados são os procedimentos mais utilizados, mas as fontes de enxertos autólogos não são infinitas, de modo que o ortopedista pode ter que utilizar outros materiais ou técnicas para resolver casos complicados que requeiram múltiplos procedimentos de enxertia. Os enxertos homólogos são uma opção, mas seu emprego depende da existência de um banco de osso, disponível somente em grandes centros especializados, ao mesmo tempo em que esses enxertos podem representar uma ameaça adicional ao paciente com as doenças transmissíveis, como a

AIDS e a hepatite tipo C. Assim, a procura por novas alternativas de transplantes tissulares autógenos é de grande valor e é aqui que a estimulação da neoformação óssea com os PDGFs e o PRP se encaixa.

A morfogênese é um processo complexo pelo qual os diferentes tecidos do corpo humano, inclusive o osso, são formados, a partir de células mesenquimais multi-potenciais, mediados pelos diferentes fatores de crescimento. Estes são polipeptídeos que têm a potencialidade de promover a diferenciação e o crescimento das células e tecidos, mediando mitoses, quimiotaxia e metabolismo; eles também estimulam e regulam o processo cicatricial dos diferentes tecidos (Marx, 1996). Cada fator de crescimento estimula o desenvolvimento de células e tecidos específicos e os PDGFs têm sido relacionados à atividade mitótica das células sanguíneas, sendo responsáveis pelo crescimento de vários tecidos em culturas sero-dependentes⁽⁷⁾. Eles também parecem ser responsáveis pelo começo da reparação espontânea dos tecidos conjuntivos, inclusive do osso, aumentando as mitoses (células reparativas), a angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos) e a atividade macrofágica (desbridamento).

Como os PDGFs são altamente instáveis e não duram muito em estado livre na corrente sanguínea, o PRP teoricamente é um veículo adequado para aumentar sua concentração nos tecidos lesados. A liberação lenta dos PDGFs pela degradação das plaquetas proveria concentração suficiente para desencadear a estimulação do crescimento tissular. Apesar de alguns dados controversos, efeitos benéficos do PRP foram demonstrados, particularmente no campo da cirurgia buco-maxilofacial e da odontologia, mas os mesmos benefícios com o seu uso isolado ou em associação com outros materiais para estimular o reparo dos ossos longos do aparelho locomotor ainda não foram suficientemente demonstrados. De fato, considerando que os ossos longos e os chatos resultam de tipos diferentes de ossificação, será possível que os primeiros respondam tão bem quanto os últimos, como a maxila e a mandíbula, ao PRP?

Os resultados obtidos nesta investigação indicam que o PRP realmente estimula uma reação favorável dos ossos longos. A avaliação radiográfica a intervalos de quatro semanas mostrou que a falha óssea já estava cicatrizada no grupo 2 (preenchida com o PRP) bem antes do que nos grupos 1 (deixada vazia) e 3 (preenchida com material inerte) e que já estava sendo remodelada quando, nos outros grupos, estava ainda em cicatrização, com oito e 12

semanas. Este fato foi confirmado pela avaliação cintilográfica, que mostrou que a neoformação óssea era intensa com quatro semanas, no grupo 2, com a captação do isótopo no osso operado cerca de 60% acima do osso intacto, diminuindo ligeiramente com oito semanas (54%) e acentuadamente com 12 (28%), um comportamento típico do osso em remodelação⁽¹⁴⁾. Por outro lado, nos grupos 1 e 3 a captação do isótopo aumentou suave e gradativamente no mesmo período, significando que o organismo ainda estava se empenhando em cicatrizar a falha. A avaliação histológica confirmou que a neoformação óssea era mais intensa e avançada no grupo 2 do que nos controles, com trabéculas ósseas maduras já presentes com quatro semanas e diferenciação em osso cortical com oito, enquanto que nos grupos 1 e 3 a neoformação óssea estava ainda começando nesses períodos.

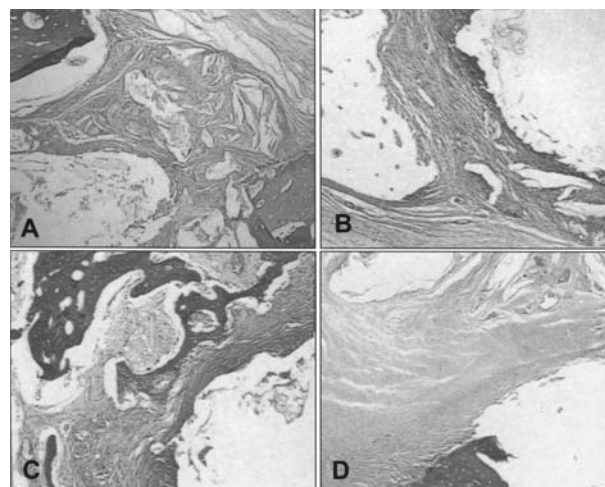


Figura 4 - Fotomicrografias de cortes histológicos (hematoxilina-eusina) de espécimes dos diferentes grupos, com 12 semanas da operação. Reação inflamatória endosteal e fibrose no grupo 1 (A, 100x); uma nova trabécula óssea em formação, com osteoblastos jovens indiferenciados no grupo 2 (B, 40x); trabécula óssea madura com intensa atividade osteoblástica no grupo 2 (C, 100x); tecido fibroso invadindo o canal medular no grupo 3 (40x).

A preparação do PRP em si é muito simples, ao alcance de qualquer cirurgião que disponha da infra-estrutura de um banco de sangue e de um hematologista para manipular o sangue do próprio paciente. Como o PRP é uma preparação autógena, não há risco de contaminação para o paciente, inclusive de infecções no local operatório, desde que sejam utilizados tubos e instrumentos esterilizados e técnicas cuidadosas. Além disso, o PRP pode ser utilizado em associação com enxertos ósseos autógenos ou homólogos, ou outro material substitutivo. A concentração normal de plaquetas no sangue total de coelhos é, em média, de cerca de 450.000 por mm³, muito próxima dos valores medidos antes da preparação do PRP nesta investigação. O método de centrifugação utilizado aqui foi capaz de multiplicar a concentração aproximadamente por quatro,

que está dentro da faixa considerada adequada para estimular a neoformação óssea, de modo que o mesmo procedimento poderia ser eventualmente adotado em situações clínicas em humanos. Em conclusão, o PRP realmente estimula o processo de cicatrização dos ossos longos do aparelho locomotor e parece ter um potencial ilimitado de aplicação clínica, em qualquer situação que requeira enxertia óssea maciça ou procedimentos repetidos de enxertia em humanos, com a vantagem de que as hemácias podem ser devolvidas ao paciente, na forma de papa. A propósito, já há notícias da utilização do PRP para preencher falhas ósseas em humanos, como, por exemplo, o acetábulo expandido, em associação com enxerto ósseo autógeno ou homólogo, em operações de revisão de prótese do quadril e outras*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg.* 1994; 21:429-35.
2. Reddi AH. Bone morphogenesis and modeling: soluble signals sculpt osteosomes in the solid state. *Cell.* 1997; 89:159-61.
3. Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nature Biotech.* 1998; 16:247-52.
4. Marx RE. The potential role of growth and differentiation factors in periodontal regeneration. *J Periodontol.* 1996; 67:545-53.
5. 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; 85:638-46.
6. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.* 2001; 10:225-8.
7. Roos R, Raines EW, Bowen-Pope DF. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell.* 1986; 46:155-69.
8. Becker W, Lynch SE, Leckholm U, Becker BE, Caffesse R, Donath K et al. A comparison of ePTFE membranes alone or in combination with platelet-derived growth factors and insulin-like growth factor-I or demineralized freeze-dried bone in promoting bone formation around immediate extraction socket implants. *J Periodontol.* 1992; 63:929-40.
9. Buckley RC, Breazeale EE, Edmond JA, Brzeziński MA. A simple preparation of autologous fibrin glue for skin-graft fixation. *Plast Rec Surg.* 1999; 103:202-6.
10. Zechner W, Tangl S, Tepper G, Furst G, Bernhart T, Haas R, Mailath G et al. Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorphometric study in minipigs. *Intl J Oral Maxillofac Implants.* 2003; 18: 15-22.
11. Aghallo TL, Moy PK, Frey M. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects. A pilot study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002; 15:1176-81.
12. Sanchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? *Current Review. Intl J Oral Maxillofac Implants.* 2003; 18:93-103.
13. Lucarelli E, Fini M, Beccheroni A, Giavaresi G, DiBella C, Aldini NN et al. Stromal stem cells and platelet-rich plasma improve bone allograft integration. *Clin Orthop Relat Res.* 2005; (435):62-68.
14. Janowski EM, Mazzer N, Barbieri CH, Gonçalves RP. The effect of venous occlusion on the integration of vascularized cortical bone graft. *J Reconstr Microsurg.* 1993; 9: 219-24.

* Comunicação pessoal, Dr. Bruno Batiston, Departamento de Ortopedia e Traumatologia, Università degli Studi di Turin, Itália.