

O GEL DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS PROPICIA A REGENERAÇÃO DA CARTILAGEM ARTICULAR DO JOELHO DE OVELHAS

PLATELET-RICH PLASMA GEL PROMOTES REGENERATION OF ARTICULAR CARTILAGE IN KNEES OF SHEEPS

MÁRCIO DE OLIVEIRA CARNEIRO¹, CLÁUDIO HENRIQUE BARBIERI¹, JOSÉ BARBIERI NETO¹

RESUMO

Objetivo: Avaliar a regeneração da cartilagem articular em defeitos osteocondrais do joelho induzidos pelo plasma rico em plaquetas (PRP) autógeno. **Métodos:** Defeitos osteocondrais produzidos no sulco troclear de ambos os joelhos de dez ovelhas foram preenchidos com PRP autógeno à direita e deixados vazios à esquerda. Avaliação macroscópica e histológica foram efetuadas 12 semanas mais tarde. Os resultados foram avaliados por um escore geral de ambas as avaliações macroscópica e histológica comparativamente entre os lados por meio do teste pareado de Wilcoxon. **Resultados:** o aspecto macroscópico não foi uniforme entre os animais, nem diferiu entre os joelhos direitos e esquerdos ($p=0,03125$); em nenhum caso o tecido regenerado se nivelou com a cartilagem normal circundante. Ao exame histológico, cartilagem aparentemente normal não foi detectada em nenhum joelho, mas uma cartilagem pouco diferenciada estava presente em sete joelhos direitos e em três joelhos esquerdos. Tecido fibrocartilaginoso estava presente nos joelhos restantes, com diferença significativa no escore geral entre os joelhos direitos e esquerdos ($p=0,0313$). **Conclusão:** o PRP como usado neste estudo tem propriedades reparativas da cartilagem articular no joelho de ovelhas, principalmente por estimular a formação de tecido fibrocartilaginoso. **Trabalho Experimental.**

Descritores: Joelho. Plasma Rico em Plaquetas. Cartilagem Articular. Ovinos.

ABSTRACT

Objective: To assess the regeneration of osteochondral defects in the joint cartilage of the knee induced by autologous platelet-rich plasma (PRP). **Methods:** Osteochondral defects produced in the trochlear groove of both knees of ten sheep; defects of the right knees were filled with autologous PRP and the left knees were left unfilled. **Macroscopic and microscopic evaluation** was carried out 12 week later. The results were evaluated by the total score of both macroscopic and microscopic evaluations comparing the two sides through the Wilcoxon paired test. **Results:** Macroscopic appearance was not uniform among animals, nor was it different between the right and left knees ($p=0.3125$), and in no case the regenerated tissue was equal to the normal surrounding cartilage. At histological examination, apparently normal cartilage was not detected in any knee, but a poorly differentiated cartilage was present in 7 right knees, compared to 3 left knees. Fibrocartilaginous tissue was present in most of the remaining knees, with a significant difference in the overall score between right and left knees ($p=0.0313$). **Conclusion:** The PRP as used in this study has reparative properties of the joint cartilage of sheep knees, mostly by stimulating the formation of a fibrocartilaginous tissue. **Laboratory Investigation.**

Keywords: Knee. Platelet-rich plasma. Articular cartilage. Sheep.

Citação: Carneiro MO, Barbieri CH, Barbieri Neto J. O gel de plasma rico em plaquetas propicia a regeneração da cartilagem articular do joelho de ovelhas. Acta Ortop Bras. [online]. 2013;21(2):80-6. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

Citation: Carneiro MO, Barbieri CH, Barbieri Neto J. Platelet-Rich plasma gel promotes regeneration of articular cartilage in knees of sheep. Acta Ortop Bras. [online]. 2013;21(2):80-6. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

INTRODUÇÃO

No século 18, no seu clássico artigo sobre a doença da cartilagem articular, Hunter relatou que uma úlcera da cartilagem articular era universalmente reconhecida como uma doença preocupante, pois era mais difícil de curar do que uma lesão óssea e, uma vez des-

truída, a cartilagem articular nunca recuperaria espontaneamente.¹ Apesar do grande progresso experimentado pela moderna cirurgia, lesões da cartilagem articular ainda representam um problema de difícil solução. Presentemente, sabemos que o estímulo cirúrgico da regeneração da cartilagem articular por meio de orifícios

Todos os autores declaram não haver nenhum potencial conflito de interesses referente a este artigo.

1. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Trabalho realizado no Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de Ribeirão Preto, SP, Brasil. Correspondência: Claudio Henrique Barbieri - FMRP-USP. Avenida dos Bandeirantes, 3900. 14049-900 Ribeirão Preto. SP. Brasil. E-mail: chbarbie@fmrp.usp.br

Artigo recebido em 02/11/2011, aprovado em 25/05/2012.

perfurados no osso subcondral produz apenas um tipo de tecido fibroso ou fibrocartilagenoso, com características bioquímicas e propriedades biomecânicas inferiores àquelas da cartilagem normal, tendendo a deteriorar mais rapidamente quando submetido à carga.^{2,3} Com base nisso, os especialistas investiram grandes esforços no desenvolvimento de procedimentos que pudessem induzir a regeneração da cartilagem articular, com opções de tratamento que incluíam tanto abordagens conservadoras como intervenções cirúrgicas.⁴ Entretanto, de acordo com McCormick et al.,⁵ nenhuma tentativa de tratar defeitos condrais ou subcondrais sem cirurgia, efetivamente produziu a reparação da cartilagem articular. Em um artigo de revisão, O'Driscoll apresentou duas estratégias para o tratamento cirúrgico de lesões condrais, objetivando prevenir a degeneração prematura da articulação: 1) aumentar a capacidade regenerativa intrínseca da cartilagem por meio da estimulação do osso subcondral (desbridamento, condroplastia por abrasão, condroplastia por microfraturas, estimulação elétrica, agentes farmacológicos e fatores de crescimento); e 2) transplante de tecidos como condrócitos autólogos e heterólogos, células condrogênicas (mosaicoplastia, enxerto pericondral) ou outros tecidos (enxerto periosteal) com capacidade de promover o crescimento de cartilagem nova.⁶ Mais tarde, Mithoefer et al.⁴ mencionaram uma terceira estratégia de tratamento cirúrgico centrada no uso de células-base, incluindo o transplante de condrócitos autólogos, a implantação de condrócitos combinada com uma armação, a implantação de enxertos de cartilagem, terapia gênica e células tronco. Com os avanços nas áreas de engenharia genética e de tecidos, novos métodos de tratamento tissular emergiram. Entre eles está o uso do plasma rico em plaquetas (PRP), que é um plasma de sangue autólogo com alta concentração de plaquetas, muito acima do sangue integral, obtido por centrifugação e cujo emprego foi referido na prática clínica para estimular a cicatrização de tecidos moles e de osso numa variedade de situações, sob a alegação de que ele carrega uma alta concentração de fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e de fator de crescimento transformador- β (β -TGF), ambos conhecidos por estimular o crescimento e a regeneração de diferentes tecidos.⁷

O PRP já tem sido usado por especialidades médicas, tais como a cirurgia plástica e reconstrutiva e a otolaringologia, e na odontologia, particularmente para estimular a hemóstase, a cicatrização de partes moles e do osso, a adesão de enxertos de pele, a integração de enxertos ósseos e a fixação de implantes nos osso chatos do crânio e da face.⁸⁻¹¹ Entretanto, apesar da evidência de que o PRP pode ser útil para estimular o reparo espontâneo de tecidos, o seu papel no reparo da cartilagem articular ainda é desconhecido e requer investigação específica.

Portanto, a hipótese de que o PRP estimula a regeneração da cartilagem articular foi testada experimentalmente num modelo de defeito osteocondral do joelho de ovelhas, com os resultados sendo avaliados pelo exame macroscópico e pela análise histológica usando um sistema de escores semi-quantitativos.

MÉTODOS

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da instituição de origem dos autores. Todos os animais foram manuseados de acordo com as recomendações do *Committee on Care and Use of Laboratory Animals* (National Research Council, 1996). O estudo foi conduzido em dez ovelhas fêmeas adulta saudáveis com idade entre 1 e 2 anos, pesando entre 30 e 50kg, e ambos os joelhos direito e esquerdo foram operados, para a criação de um defeito osteocondral no sulco troclear.

Procedimento operatório: Os animais eram deixados de jejum

por 24 horas e atropina (1%, 0,05mg/kg, via subcutânea) e xilazina (2%, 0,22mg/kg, via intramuscular) eram administradas como pré-medicação cerca de 15min antes da operação. A veia jugular era cateterizada para a coleta de 40ml de sangue utilizado na preparação do PRP. Terapia fluidica de suporte era feita com solução fisiológica a 0,9%, administrada no regime de 1 ml/min; 1.0g de cefalotina sódica era administrada por via endovenosa como antibioticoterapia profilática.

Os animais eram, então, anestesiados com uma combinação de xilazina (2%, 0,1 mg/kg) e ketamina (8 mg/kg) em volume suficiente para o animal desacordar. Quando necessário, metade da dose inicial era repetida. Não foi necessária a intubação, pois todo o procedimento cirúrgico era realizado em menos de 40 min, mas oxigênio puro era continuamente administrado por meio de um cateter inserido em uma narina.

Ambos os joelhos eram preparado rotineiramente (tricotomia, antissepsia com solução de álcool iodado a 20%, colocação de campos estéreis ao redor da área operatória) e a operação era iniciada no joelho esquerdo. A tróclea femoral era exposta através de uma incisão parapatelar medial envolvendo a pele, o tecido subcutâneo e a cápsula articular e a patela era luxada lateralmente. Um defeito osteocondral medindo 8mm de diâmetro era então produzido no meio do sulco troclear com uma broca manual, cuidado sendo tomado para não aprofundar o defeito além do osso subcondral, mas somente até que o sangramento fosse evidente. Os resíduos eram cuidadosamente removidos com solução salina e o defeito era deixado vazio. A patela era reduzida, a ferida era fechada por planos e um curativo levemente compressivo era aplicado. Em seguida, o joelho direito era submetido a um procedimento idêntico, mas o defeito era preenchido com o gel de PRP preparado imediatamente antes.

Preparação do PRP: O gel de PRP era preparado imediatamente de antemão, como se segue: o sangue total era coletado da veia jugular em duas seringas de 20ml, cada uma contendo 2,5ml de citrato de sódio a 10%. Em seguida, 1ml desse sangue era colocado em um tubo de teste de 5ml para contagem celular do sangue total usando um analisador automático (Coulter STKS Analyzer, Coulter Corporation, Hialeah, FL, USA). O sangue remanescente era dividido em seis porções iguais colocadas em seis tubos de teste e centrifugadas por 8 min a 1.800 rpm, após o que cada amostra era dividida em três camadas: uma superior, de cor amarelada (plasma); uma inferior, de cor avermelhada (hemácias); e uma intermediária, de cor esbranquiçada (leucócitos). O material entre a porção inferior da camada de plasma e da porção superior da camada de hemácias era pipetado (Figura 1) e transferido para dois outros tubos de teste de 5ml e centrifugado novamente por 8 min a 1.000 rpm, depois do que o plasma predominava em cada tubo, com apenas uma pequena camada de hemácias coberta por uma fina camada de leucócitos no fundo; 2ml da porção inferior do plasma eram coletados de cada tubo com uma pipeta e misturados, o material assim obtido sendo o PRP, por definição. As plaquetas foram contadas em 1ml desse material para assegurar que a concentração era mais alta do que no sangue total. A concentração variou de 120.000 a 250.000/ μ l, com 1.000.000/ μ l sendo detectadas em somente um animal, de modo geral correspondendo a um aumento de 2,57 vezes a concentração no sangue total (variação: 1,56 – 4,34 vezes). Esses valores estavam dentro da variação ótima para o PRP. Um ml de cloreto de cálcio a 10% era adicionado ao material restante para induzir a coagulação do plasma, resultando no chamado gel de PRP, o qual era então utilizado para preencher completamente o defeito osteocondral do

joelho direito (Figura 2). O gel de PRP tem propriedades adesivas e aderiu facilmente à lesão.^{12,13}

Estudos histológicos: Os animais eram mortos com uma dose excessiva de anestésico (pentobarbiturato de sódio a 2,5 %) administrado endovenoso, 12 semanas após a operação. A extremidade distal dos fêmures eram expostas e ressecadas, deixando as superfícies articulares intocadas, para o exame macroscópico e para a coleta do material para o exame histológico. O exame macroscópico era efetuado imediatamente, os parâmetros de análise sendo: adesão intraarticular, grau de restauração da superfície articular, erosão da cartilagem e aspecto do novo tecido formado dentro do defeito (Tabela 1).¹⁴

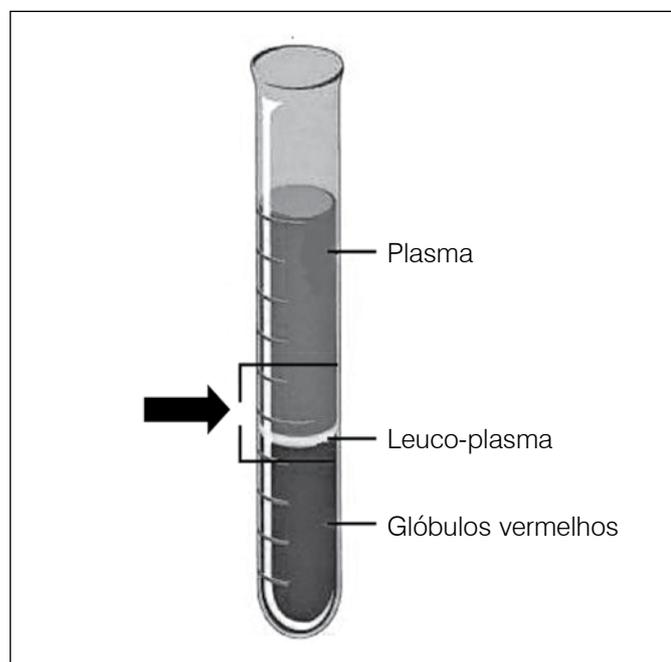


Figura 1. Desenho esquemático mostrando o arranjo das células sanguíneas no tubo de teste depois da primeira centrifugação e a região de onde o material foi pipetado para a segunda centrifugação.



Figura 2. Imagem do PRP inserido no defeito osteocondral.

Tabela 1. Escala de avaliação macroscópica.

Descrição	Escore
Adesão intra-articular	
Nenhuma	2
Minima	1
Grande	0
Restauração da superfície articular	
Completa	2
Parcial	1
Nenhuma	0
Erosão da cartilagem	
Nenhuma	2
Local do defeito	1
Defeito e cartilagem adjacente normal	0
Aspecto da cartilagem	
Translúcida	2
Opaca	1
Discolorida e/ou irregular	0

Os espécimes eram identificados, colocados em recipientes separados contendo uma solução aquosa a 10% de formaldeído por 48 horas para fixação e, então, individualmente descalcificados uma solução aquosa a 7,5% de ácido nítrico por outras 48 horas. Cada espécime era aparado para deixar apenas um bloco contendo inteiramente o local da lesão, com um anel de 5mm de largura de cartilagem normal circundante, e com uma camada de 5mm de espessura de osso trabecular por baixo do osso subcondral. Todos os blocos foram deixados em um banho de água corrente por 2 horas para remover qualquer resíduo de ácido, desidratado por imersão em soluções de álcool de concentração crescente (80, 85, 90 e 95%) por 1 hora cada, sendo depois montada em parafina, conforme procedimento de rotina. Foram obtidos cortes histológicos de 6 mm de espessura, corados alternativamente com hematoxilina de Harris (para análise do núcleo e de elementos ácidos), eosina-floxina (para análise de elementos básicos) e tricômico de Gomori (para análise de outros elementos). Todos os cortes foram examinados sob microscópio de luz por um patologista experiente (JBN) numa base duplo-cego, sendo analisados os seguintes parâmetros: natureza do tecido regenerado (semelhança com tecido fibroso, fibrocartilagem ou cartilagem), regularidade da superfície, integridade estrutural, união com a cartilagem adjacente e nivelamento do tecido neoformado (Tabela 2).¹⁵

A cada parâmetro era dado o escore 0, 1 ou 2, correspondendo a nenhum(a) restauração, a uma restauração intermediária ou à restauração completa, respectivamente, em comparação com a cartilagem normal; a natureza do tecido predominante recebeu o escore 0, 2 ou 4, correspondente ao tecido fibroso, à cartilagem pouco diferenciada ou à cartilagem normal, respectivamente. Os resultados foram avaliados pelo escore total das avaliações macroscópica e histológica e os dados foram analisados pela estatística descritiva (mediana e variação) e em termos de frequência absoluta e relativa. O escore total compreendendo ambas as análises foram comparados entre o joelho esquerdo (grupo controle) e o direito (grupo de estudo) pelo teste pareado de Wilcoxon com correção de dupla cauda e o nível de significância estabelecido em 5% ($p < 0,05$).

Tabela 2. Escala de avaliação microscópica.

Descrição	Escore
Natureza do tecido predominante	
Cartilagem normal	4
Cartilagem pouco diferenciada	2
Tecido fibroso	0
Regularidade da superfície	
Lisa e intacta	2
Parcialmente rompida	1
Completamente rompida	0
Integridade estrutural	
Intacta	2
Parcialmente separada	1
Completamente separada	0
União com a cartilagem adjacente	
Completa	2
Parcial	1
Ausente	0
Nível do tecido neoformado	
Igual cartilagem adjacente	2
50 a 100% da cartilagem normal	1
0 a 50% da cartilagem normal	0

RESULTADOS

Os animais toleraram muito bem tanto a anestesia como os procedimentos operatórios e retomaram a marcha tão logo se recuperaram da anestesia. A única complicação pós-operatória foi a infecção superficial e deiscência parcial da sutura cutânea do joelho direito observada em um único animal no 17º dia pós-operatório. Análise macroscópica: Adesão intra-articular não foi um problema, posto que não foi observada em nenhum joelho. Aspecto de cartilagem normal não foi observado em nenhum joelho direito ou esquerdo. Perda da coloração e irregularidade da superfície da cartilagem circundante normal foi observada em oito (8/10) joelhos esquerdos, enquanto que opacidade era evidente em seis (6/10). Restauração aparente da superfície articular do defeito (Figura 3) foi

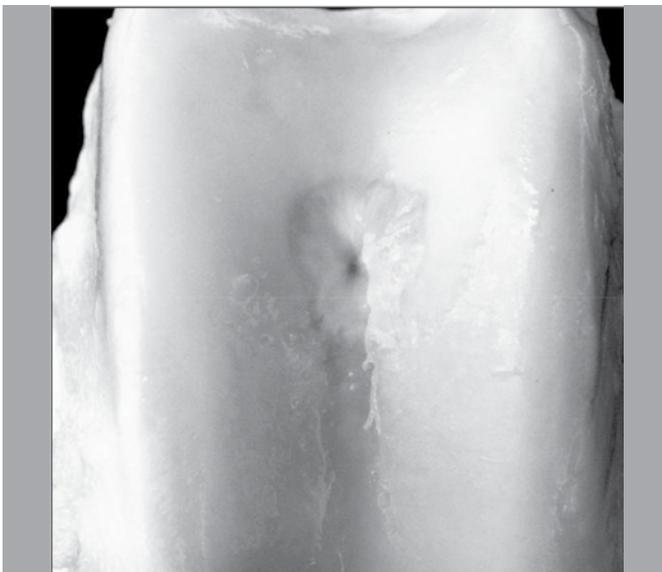


Figura 3. Fotografia mostrando a restauração completa na face articular do defeito.

apenas parcial em sete (7/10) joelhos esquerdos (controle), estando completamente ausente nos demais três; restauração completa era evidente em dois joelhos (2/10) joelhos direitos (grupo de estudo), mas era apenas parcial em quatro (4/10), nenhum sinal de restauração sendo observado nos quatro joelhos restantes. Erosão da cartilagem circundante normal foi observada em oito (8/10) joelhos esquerdos, mas estava ausente nos joelhos direitos, nos quais parecia circunscrita ao defeito em seis joelhos (6/10). O escore geral referente aos parâmetros macroscópicos foi 4,2 (variação: 2 - 6) para os joelhos esquerdos e 4,7 (variação: 2 - 7) para os joelhos direitos. (Tabela 3) As diferenças referentes aos achados macroscópicos entre os joelhos direitos e esquerdos não foram significantes ($p=0,3125$) para nenhuma comparação (Tabela 4).

Tabela 3. Escore geral dos parâmetros macroscópicos e histológicos para os joelhos direito e esquerdo

Joelho	direito	esquerdo
Macro	4,7 ± 1,7	4,2 ± 1,23
	(variação: 2 - 7)	(range: 2 - 6)
Histo	5,4 ± 2,32	3,6 ± 2,37
	(variação: 2 - 8)	(variação: 1 - 8)

Tabela 4. Resultados do teste pareado de Wilcoxon aplicado ao escore geral da análise macroscópica (n=10).

Joelho	média	mínimo	máximo	p
esquerdo	4,2	2	6	0,3125*
direito	4,7	2	7	

*não-significante

Análise microscópica

A restauração completa para uma cartilagem de aspecto normal não foi observada em nenhum joelho. Uma cartilagem pouco diferenciada foi observada em sete (7/10) joelhos direitos e um tecido francamente fibroso nos três restantes (3/10). Exatamente o oposto foi observado nos joelhos esquerdos, com três mostrando uma cartilagem pouco diferenciada em três (3/10) e sete mostrando um tecido francamente fibroso (7/10); detalhes dos aspectos correspondentes são mostrados nas Figuras 4A e 4B. A superfície do tecido regenerado parecia regular e lisa, quase normal, em um joelho esquerdo e em dois direitos. Nos remanescentes, a superfície estava interrompida, sendo parcialmente regular em cinco joelhos esquerdos e em seis joelhos direitos. Na sua porção interna, o tecido regenerado mostrava grandes fissuras em sete (7/10) joelhos esquerdos, mas em apenas dois joelhos direitos (2/10), pequenas fissuras sendo observadas em todos os demais joelhos (três esquerdos e oito direitos). A união entre o tecido regenerado e a cartilagem pré-existente era semelhante em ambos os grupos, parecendo completa em seis (6/10) e parcial em quatro (4/10) joelhos direitos e esquerdos. Em todos os joelhos, a superfície do tecido regenerado estava desnivelada em relação à cartilagem normal adjacente, apresentando uma depressão superficial. O desnivelamento era mais acentuado nos joelhos esquerdo, nos quais a espessura do tecido regenerado era menor do que 50% da cartilagem normal adjacente na maioria (6/10) dos espécimes, enquanto que nos joelhos direitos esta proporção variou entre 50% e 100% (Figura 5). O escore geral referente aos parâmetros histológicos foi 3,6 (variação: 1 - 8) para os joelhos esquerdos e 5,4 (variação: 2 - 8) para os joelhos direitos (Tabela 3). As diferenças entre os joelhos direitos e esquerdos foram significantes ($p=0,0313$) para todas as comparações (Tabela 5).

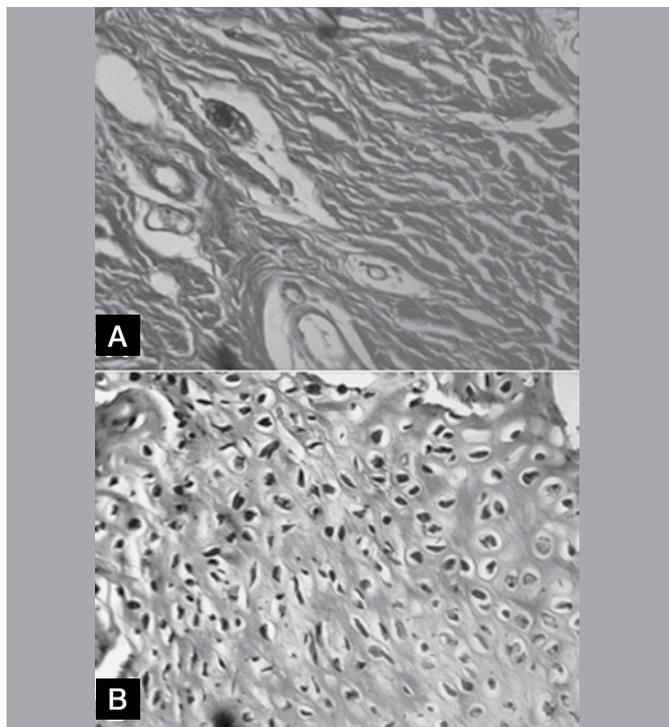


Figura 4. Fotomicrografia de luz mostrando o tecido do reparo do joelho esquerdo (A) e do joelho direito (B). Observar a presença de tecido cartilaginoso pouco diferenciado numa lesão preenchida com o PRP (B), em contraste com o tecido claramente fibroso num joelho que não recebeu o PRP (A) (Tricrômico de Gomori, 40x).

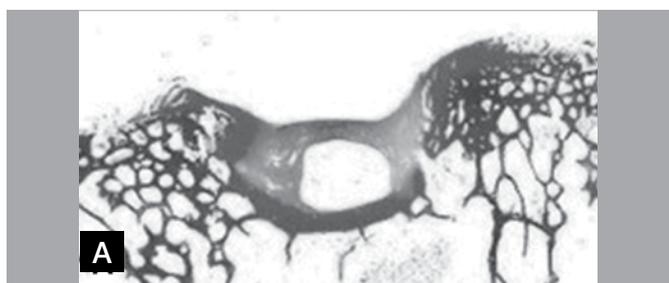


Figura 5A. Fotomicrografias de pouco aumento de um corte histológico do joelho esquerdo. Notar a falha e a separação do tecido neoformado em relação à cartilagem adjacente (Hematoxilina-eosina, 1X).

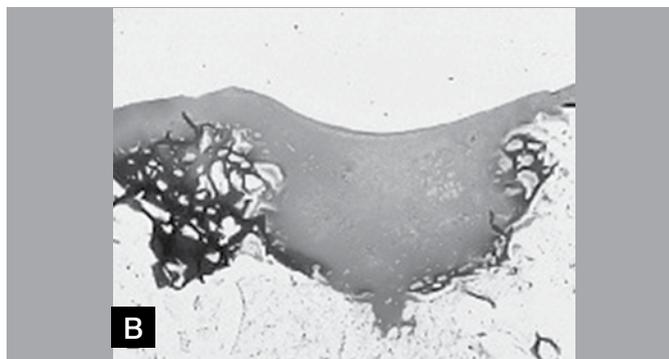


Figura 5B. Fotomicrografia de pequeno aumento de um corte histológico do joelho direito. Notar o nivelamento e a quase completa integração entre os tecidos (Hematoxilina-eosina, 1X).

Tabela 5. Resultados do teste pareado de Wilcoxon aplicado ao escore geral da análise microscópica (n=10).

Joelho	média	mínimo	máximo	p
esquerdo	3,6	1	8	0,0313
direito	5,4	2	8	

DISCUSSÃO

Apesar dos grandes avanços da moderna cirurgia ortopédica, a correção cirúrgica de defeitos osteocondrais, principalmente do joelho, representa um problema desafiado para o especialista. Enxertos livres de cartilagem podem ser uma possibilidade, mas as fontes de enxertos autógenos não são adequadas, pois nem sempre estão disponíveis na forma e dimensão desejadas, enquanto que os enxertos homogêneos ainda são apenas uma opção teórica por causa dos problemas imunológicos não resolvidos. Assim, a procura por novas alternativas de tratamento para promover a regeneração da cartilagem articular tornou-se um imperativo, dando origem a uma variedade de opções, a maioria das quais envolve algum tipo de procedimento cirúrgico. Idealmente, o tratamento deve envolver um procedimento minimamente invasivo e o tecido regenerado deve apresentar características histológicas e bioquímicas e propriedades biomecânicas similares às daquelas da cartilagem normal, incluindo a aderência à cartilagem normal circundante e ao osso subcondral.¹⁶ O primeiro aspecto já é possível por meio da artroscopia, mas o segundo está longe do ideal, pois o tecido regenerado induzido pela maioria dos métodos até agora desenvolvidos é invariavelmente inferior à cartilagem normal, por qualquer parâmetro de comparação.

De fato, a estimulação do osso subcondral por múltiplas perfurações ou escarificação é frequentemente utilizada para tentar estimular a regeneração da cartilagem, posto que resulta em sangramento, formação de um coágulo sanguíneo, uma resposta inflamatória e liberação local de fatores de crescimento, assim resultando num tecido de granulação que se origina da profundidade com potencial de regeneração.¹⁷ Entretanto, o tecido formado por meio dessa cascata de eventos depende da localização, idade e dimensão do defeito e quase invariavelmente aparece como um tecido fibroso ou fibrocartilaginoso sem nenhuma similaridade com a cartilagem circundante normal;¹⁸ esse tecido também tende a deteriorar rapidamente quando submetido a carga repetitiva.^{2,3} Apesar de alguns achados controversos, o PRP tem sido utilizado para reparar defeitos em diferentes tecidos, especialmente em cirurgia maxilofacial e odontologia, mas também no osso cortical do aparelho locomotor¹⁹ e, teoricamente, a cartilagem articular poderia se beneficiar das suas propriedades de estimulação da regeneração. Essa foi a motivação principal da presente investigação, na qual foi testada a hipótese de que o PRP localmente aplicado a uma lesão cartilaginosa profunda produziria pelo menos uma regeneração parcial da cartilagem perdida, comparado a uma lesão idêntica deixada vazia para regenerar espontaneamente.

O experimento foi conduzido num modelo de defeito osteocondral da cartilagem articular do sulco troclear do joelho de ovelhas adultas, as dimensões do qual, de cerca de 50% do joelho humano,²⁰ facilitaria grandemente os procedimentos cirúrgico e provavelmente corresponderia mais de perto a uma situação semelhante em humanos.²⁰⁻²² O defeito osteocondral foi produzido no sulco troclear pela simples razão de que o grau de manutenção do implante nesse local é maior¹⁸ devido à concavidade da superfície articular, especialmente no vértice.²³ O defeito foi criado de modo a atingir o osso subcondral para provocar algum sangramento

e consequente formação de coágulo sanguíneo e era fundo o suficiente para reter o gel de PRP no fundo, facilitado pelas propriedades normais de adesão do PRP e por não ser perturbado pelo deslizamento da patela no sulco troclear. O procedimento não pareceu causar desconforto duradouro aos animais, os quais eram capazes de retomar a marcha com carga total sobre os membros operados já na segunda semana pós-operatória. A única complicação observada foi um caso de infecção superficial, que curou completamente após tratamento com antibióticos, aparentemente sem interferir com o resultado final.

O complexo processo de morfogênese pelo qual os diferentes tecidos são formados e reparados ocorre pela diferenciação de células mesenquimais pluripotenciais estimuladas pelos diferentes fatores de crescimento. Estes são peptídios com a capacidade potencial de promover a diferenciação e o crescimento celular e tissular pela mediação da mitose, da quimiotaxia e do metabolismo, assim estimulando e regulando o processo de reparo dos vários tecidos,²⁴ com cada um dos fatores de crescimento estimulando o desenvolvimento de uma célula ou tecido específicos. Os fatores de crescimento derivados das plaquetas (PDGFs) têm sido relacionados à atividade mitótica das células sanguíneas e de vários tecidos em culturas sero-dependentes²⁵ e são conhecidos por iniciar a reparação espontânea dos tecidos conjuntivos, inclusive do osso, aumentando as mitoses (reparo celular), a angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos) e a atividade macrófágica (desbridamento). O processo natural de reparo de qualquer tecido é mediado por vários fatores de crescimento e usualmente começa com a formação do coágulo sanguíneo, caracterizado pelo acúmulo de plaquetas, as quais participam tanto do processo de coagulação do sangue como da resposta inflamatória inicial pela liberação de citocinas.^{26,27} Este processo pode também ocorrer na cartilagem articular desde que o osso subcondral seja lesado, causando algum sangramento e formação de coágulo seguido pela liberação dos fatores de crescimento, inclusive PDGFs.²⁸ Como os PDGFs são altamente instáveis e não duram muito depois de injetados na corrente sanguínea ou nos tecidos, o PRP teoricamente é um veículo adequado para aumentar a sua concentração dentro dos tecidos lesados.¹²

O PRP é definido como um concentrado contendo de quatro a seis vezes a quantidade de plaquetas presentes no sangue total normal. É obtido pela centrifugação e sua aparência e consistência é a de um gel, no qual há uma completa inversão da razão células nucleadas/plaquetas.^{13,29} De fato, em adição à concentração das plaquetas, a centrifugação também deve eliminar as células brancas, que inibem irreversivelmente a síntese da matriz cartilaginosa, lesando a estrutura da cartilagem.³⁰ O protocolo usado para obter o PRP^{7,31} utilizado no presente estudo é baseado na centrifugação, com separação do plasma e dos leucócitos das hemácias, em um primeiro passo, e com separação do plasma rico do plasma pobre em plaquetas, num segundo passo. Entretanto, baseado num teste-piloto, a separação dos componentes do sangue foi realizado de modo diferente daquele sugerido por autores precedentes. De fato, depois da primeira centrifugação, a parte do fundo do material centrifugado foi coletada e o precipitado contendo as hemácias e os leucócitos foi removido. Isso permitiu obter a inversão da razão celular e concentrar as plaquetas acima do nível da linha de base do sangue total. Também, o PRP obtido continha a menor quantidade possível de leucócitos.

Marx⁷ relatou que a concentração de plaquetas no PRP deve estar acima do valor da linha-base do sangue total, a concentração ideal sendo de 1.000.000/ μ l em humanos. Outros autores^{13,31,32}

relataram que a concentração ideal seria de 2 a 3 vezes maior do que aquela do sangue total. Essas definições estão baseadas na concentração normal de plaquetas que varia de 150.000 a 350.000/ μ l.³³ De acordo com dados da literatura, a concentração média de plaquetas no sangue total de ovelhas é de 100.000/ μ l³⁴, mas no presente estudo ela foi de 125.000/ μ l (variação: 34.100 – 512.000/ μ l), resultando numa concentração de plaquetas no PRP obtido variando de 1.56 a 4.34 vezes (média: 2.6 vezes) os valores normais. Portanto, o PRP obtido estava dentro dos limites de concentração muito bons e certamente apresentava propriedades de estimulação.

Há muito poucos estudos sobre o uso do PRP para reparar a cartilagem articular do joelho. Brehm et al. compararam quatro diferentes modalidades de molde (*scaffold*), inclusive o PRP, para a implantação de condrocitos autólogos dentro do defeito, e demonstraram um índice de retenção muito baixo do PRP depois de 4 semanas, apesar das suas propriedades de adesão.^{12,13} Nossos resultados indicam exatamente o contrário, com um alto índice de retenção do PRP dentro do defeito, devido à sua acentuada adesão. Entretanto, há evidências de que a estimulação do reparo ocorre bem cedo, durante a primeira semana, em resposta à liberação dos fatores de crescimento pela decomposição do PRP dentro das primeiras horas da implantação, como demonstrado por Marx.⁷ Portanto, não é imperativo que o PRP permaneça dentro do defeito por muito mais tempo do que alguns dias ou, mesmo, horas.

Os defeitos osteocondrais medindo mais do que 3 mm em diâmetro nos joelhos de ovelhas não cicatrizam espontaneamente, conforme relatado por Jackson et al.²¹ e, mais tarde, por Saw et al.³⁵ para defeitos de 4mm de diâmetro na tróclea femoral. No presente estudo, os defeitos de 8mm em diâmetro foram propositalmente utilizados para impedir qualquer reparo espontâneo no grupo controle e para determinar se o PRP pode, de fato, aumentar a quantidade e melhorar a qualidade do reparo tissular no grupo experimental. Esta hipótese foi confirmada, pois o completo preenchimento do defeito não ocorreu em nenhum joelho do grupo controle, enquanto que dois joelhos do grupo de estudo apresentaram completa restauração da superfície articular. Entretanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação aos parâmetros macroscópicos estudados. De fato, erosões e alterações da aparência da cartilagem circundante normal foram observadas em todos os joelhos dos dois grupos, provavelmente como consequência da abordagem cirúrgica utilizada (artrotomia medial), a qual predispõe ao desenvolvimento de alterações condrais da articulação entre a patela e a tróclea femoral, de acordo com Lane et al.²⁰

De acordo com a análise microscópica, a espessura do tecido de reparo foi menor do que a da cartilagem circundante em todos os joelhos, assim levando a um desnivelamento entre ambos. Entretanto, o desnivelamento foi mais pronunciado nos joelhos esquerdos, não tratados, nos quais a espessura do tecido neoformado foi menor do que 50% do valor normal na maioria dos espécimes. Por outro lado, para os joelhos direitos a espessura ficou entre 50 e 100% do normal na maioria dos espécimes (60%), resultando num desnivelamento menos pronunciado. Além disso, o aspecto histológico do tecido regenerado ficou mais próximo da cartilagem normal para a maioria dos joelhos direitos (7) do que para a maioria dos joelhos esquerdos, nos quais o tecido parecia francamente fibroso ou, no máximo, fibrocartilaginosa. Talvez por causa disso, a integridade estrutural foi mais completa para a maioria dos joelhos direitos, embora a união com a cartilagem normal circundante era similar para ambos os grupos. Não houve

diferença significativa entre os grupos no que se refere à avaliação individual de cada parâmetro macroscópico e histológico, mas os escores gerais da avaliação histológica foram significativamente diferentes entre os grupos. Não há uma explicação razoável para a formação de tecido fibroso ao invés de cartilagem articular após a estimulação do osso subcondral no processo de reparo tissular. Mas, fatores parácrinos do microambiente local do defeito osteocondral são possivelmente responsáveis pela formação de tecido fibroso ou pela inibição da formação de cartilagem normal.³⁵ Entretanto, nossos resultados indicam que o PRP de algum modo interfere positivamente com este mecanismo, pois a qualidade do tecido regenerado foi evidentemente melhor no joelho direito. Num estudo sobre a resposta da artrite degenerativa do joelho de

humanos à injeção intraarticular de PRP, Saito et al.³⁶ observaram uma melhora significativa de parâmetros clínicos (dor, amplitude de movimento), indicando que há perspectivas para o uso clínico do PRP em humanos e os nossos resultados parecem apontar na mesma direção.

CONCLUSÃO

Os autores concluem que o PRP tem propriedades reparativas da cartilagem articular do joelho de ovelhas, principalmente por estimular a formação de tecido fibrocartilaginoso e pode ter um papel de estimulação do reparo de defeitos osteocondrais do joelho de humanos, com a vantagem de que é um produto autólogo cuja preparação é um procedimento simples.

REFERÊNCIAS

- Hunter W. Of the structure and diseases of articulating cartilages. *Philos Trans.* 1742-1743;42:514-21.
- Alford JW, Cole BJ. Cartilage restoration, part 1: basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options. *Am J Sports Med.* 2005;33(2):295-306.
- Smith GD, Knutsen G, Richardson JB. A clinical review of cartilage repair techniques. *J Bone Joint Surg Br.* 2005;87(4):445-9.
- Mithoefer K, McAdams TR, Scopp JM, Mandelbaum BR. Emerging options for treatment of articular cartilage injury in the athlete. *Clin Sports Med.* 2009;28(1):25-40.
- McCormick F, Yanke A, Provencher MT, Cole BJ. Minced articular cartilage—basic science, surgical technique, and clinical application. *Sports Med Arthrosc.* 2008;16(4):217-20.
- O'Driscoll SW. The healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 1998;80(12):1795-812.
- Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.* 2001;10(4):225-8.
- Becker W, Lynch SE, Lekholm 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(11):929-40.
- Buckley RC, Breazeale EE, Edmond JA, Brzeziński MA. A simple preparation of autologous fibrin glue for skin-graft fixation. *Plast Reconstr Surg.* 1999;103(1):202-6.
- 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.
- Zechner W, Tangl S, Tepper G, Fürst G, Bernhart T, Haas R, et al. Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorphometric study in minipigs. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003;18(1):15-22.
- Freymler EG, Aghaloo TL. Platelet-rich plasma: ready or not? *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62(4):484-8.
- Arora NS, Ramanayake T, Ren YF, Romanos GE. Platelet-rich plasma: a literature review. *Implant Dent.* 2009;18(4):303-10.
- Cook SD, Patron LP, Salkeld SL, Rueger DC. Repair of articular cartilage defects with osteogenic protein-1 (BMP-7) in dogs. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85(Suppl 3):116-23.
- O'Driscoll SW, Keeley FW, Salter RB. The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *J Bone Joint Surg Am.* 1986;68(7):1017-35.
- Stone KR, Walgenbach AW, Freyer A, Turek TJ, Speer DP. Articular cartilage paste grafting to full-thickness articular cartilage knee joint lesions: a 2- to 12-year follow-up. *Arthroscopy.* 2006 Mar;22(3):291-9. Erratum in: *Arthroscopy.* 2006;22(4):A16.
- Buckwalter JA. Articular cartilage: injuries and potential for healing. *J Orthop Sports Phys Ther.* 1998;28(4):192-202.
- Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 1994;76(4):579-92.
- Wilson EMK, Barbieri CH, Mazzer N. Bone healing stimulation by platelet-rich plasma. An experimental study in rabbits. *Acta Ortop Bras.* 2006;14(4):208-12.
- Lane JG, Massie JB, Ball ST, Amiel ME, Chen AC, Bae WC, et al. Follow-up of osteochondral plug transfers in a goat model: a 6-month study. *Am J Sports Med.* 2004;32(6):1440-50.
- Jackson DW, Lalor PA, Aberman HM, Simon TM. Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study. *J Bone Joint Surg Am.* 2001;83(1):53-64.
- Brehm W, Aklın B, Yamashita T, Rieser F, Trüb T, Jakob RP, et al. Repair of superficial osteochondral defects with an autologous scaffold-free cartilage construct in a caprine model: implantation method and short-term results. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14(12):1214-26.
- Huibregtse BA, Samuels JA, O'Callaghan MW. Development of a cartilage defect model of the knee in the goat for autologous chondrocyte implantation research. *Trans Orthop Res Soc.* 1999; 24:797.
- The potential role of growth and differentiation factors in periodontal regeneration. *J Periodontol.* 1996;67(5):545-53.
- Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell.* 1986;46(2):155-69.
- 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(1):4-15.
- Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med.* 2009;37(11):2259-72.
- van den Berg WB, van der Kraan PM, Scharstuhl A, van Beuningen HM. Growth factors and cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res.* 2001;(391 Suppl):S244-50.
- Carlson NE, Roach RB Jr. Platelet-rich plasma: clinical applications in dentistry. *J Am Dent Assoc.* 2002;133(10):1383-6.
- Roosendaal G, Vianen ME, Marx JJ, van den Berg HM, Lafeber FP, Bijlsma JW. Blood-induced joint damage: a human in vitro study. *Arthritis Rheum.* 1999;42(5):1025-32.
- Landesberg R, Roy M, Glickman RS. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000;58(3):297-300.
- Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997;55(11):1294-9.
- George JN. Platelets. *Lancet.* 2000 Apr 29;355(9214):1531-9.
- Jakse N, Tangl S, Gilli R, Berghold A, Lorenzoni M, Eskici A, et al. Influence of PRP on autogenous sinus grafts. An experimental study on sheep. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14(5):578-83.
- Saw KY, Hussin P, Loke SC, Azam M, Chen HC, Tay YG, et al. Articular cartilage regeneration with autologous marrow aspirate and hyaluronic Acid: an experimental study in a goat model. *Arthroscopy.* 2009;25(12):1391-400.
- Saito M, Takahashi KA, Arai Y, Inoue A, Sakao K, Tonomura H, et al. Intra-articular administration of platelet-rich plasma with biodegradable gelatin hydrogel microspheres prevents osteoarthritis progression in the rabbit knee. *Clin Exp Rheumatol.* 2009;27:201-7.