

ESTUDO COMPARATIVO DO USO ISOLADO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS E COMBINADO COM CIMENTO DE ALFA-FOSFATO TRICÁLCICO NO REPARO ÓSSEO EM RATOS

COMPARATIVE STUDY ON USE OF PLATELET-RICH PLASMA ALONE AND IN COMBINATION WITH ALPHA-TRICALCIUM PHOSPHATE CEMENT FOR BONE REPAIR IN RATS

Alessandra Deise Sebben¹, Gabriela Hoff², Caroline Peres Klein³, Thiago Alexi de Freitas⁴, Camilla Assad⁴, Luís Alberto dos Santos⁵, Jefferson Braga Silva⁶

RESUMO

Objetivos: Avaliar o efeito do cimento α -TCP combinado com PRP sobre a osteogênese, comparando os resultados com PRP utilizado isoladamente. **Métodos:** Foi confeccionado defeito bilateral no fêmur de ratos e preenchido com um dos dois tipos de tratamentos (PRP ou α -TCP+PRP), sendo avaliado em quatro e oito semanas. As imagens radiográficas forneceram valores da área da lesão, e a histologia (coloração Picrosirius) indicou a área de neoformação óssea. **Resultados:** As médias referentes à área de lesão do grupo α -TCP+PRP ($2,64\text{mm}^2 \pm 2,07$ e $1,91\text{mm}^2 \pm 0,93$; quatro e oito semanas, respectivamente) demonstraram numericamente melhores resultados, porém não significativos ($p > 0,05$), em comparação com aqueles observados no grupo PRP ($5,59\text{mm}^2 \pm 2,69$ e $3,23\text{mm}^2 \pm 1,46$; quatro e oito semanas, respectivamente). As médias de neoformação óssea foram de $62,7\% \pm 12,1\%$ e $79,01\% \pm 6,25$ no grupo PRP, e $73,3\% \pm 12,7$ e $85,86\% \pm 10,45$ no grupo α -TCP+PRP, em quatro e oito semanas, respectivamente ($p > 0,05$). **Conclusão:** Os dados deste estudo sugerem que o tratamento com cimento α -TCP combinado com PRP não demonstra diferença significativa quando comparado ao PRP isolado. Entretanto, há um possível efeito precoce sobre a regeneração óssea quando os dois biomateriais são aplicados em conjunto.

Descritores – Animais; Substitutos Ósseos; Fatores de Crescimento

ABSTRACT

Objectives: To evaluate the effect of alpha-tricalcium phosphate (α -TCP) cement combined with platelet-rich plasma (PRP) on osteogenesis, and to compare the results with use of PRP alone. **Methods:** A bilateral defect was produced in rat femurs and was filled with one of two types of treatments (PRP or α -TCP + PRP). The outcomes were evaluated after four and eight weeks. Radiographic images provided values for the lesion area, and histology (picrosirius staining) indicated the area of new bone formation. **Results:** The means relating to the lesion area of the α -TCP + PRP group (2.64 ± 2.07 and $1.91 \pm 0.93 \text{ mm}^2$, after four and eight weeks, respectively) showed numerically better but non-significant results ($p > 0.05$) than those seen in the PRP group ($5.59 \text{ mm}^2 \pm 2.69$ and $3.23 \pm 1.46 \text{ mm}^2$, after four and eight weeks, respectively). The mean new bone formation rates were $62.7\% \pm 12.1$ and $79.01\% \pm 6.25$ in the PRP group, and $73.3\% \pm 12.7$ and $85.86\% \pm 10.45$ in α -TCP + PRP group, after four and eight weeks, respectively ($p > 0.05$). **Conclusion:** The data from this study suggest that treatment with α -TCP cement combined with PRP does not show any significant difference in comparison with PRP alone. However, there is a possible early effect on bone regeneration when the two biomaterials are applied together.

Keywords – Animals; Bone substitutes; Growth Factor

1 – Mestre em Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) – Porto Alegre, RS, Brasil.

2 – Doutora em Biociências Nucleares – Física Médica; Professora da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) – Porto Alegre, RS, Brasil.

3 – Graduada em Biomedicina, Universidade Feevale – Novo Hamburgo, RS, Brasil.

4 – Graduado(a) em Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) – Porto Alegre, RS, Brasil.

5 – Professor; Coordenador do Laboratório de Biomateriais; Chefe do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) Porto Alegre, RS, Brasil.

6 – Livre-Docente, Unifesp; Professor do Departamento de Cirurgia, FAMED, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS); Chefe do Serviço de Cirurgia da Mão e Microcirurgia Reconstructiva do Hospital São Lucas, PUCRS – Porto Alegre, RS, Brasil.

Trabalho realizado no Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica da PUCRS e no Laboratório de Biomateriais da UFRGS.

Correspondência: Av. Ipiranga, 6.690, prédio 64, Partenon, Porto Alegre, RS, Brasil. – 90610-000. E-mail: adsebben@gmail.com

Trabalho recebido para publicação: 25/05/2011, aceito para publicação: 31/07/2011.

Os autores declaram inexistência de conflito de interesses na realização deste trabalho / The authors declare that there was no conflict of interest in conducting this work

INTRODUÇÃO

Lesões musculoesqueléticas são consideradas uma das principais causas de dor grave e morbidade em todo o mundo. Esses danos frequentemente causam a incapacitação física e diminuem de maneira substancial a qualidade de vida de pessoas que por eles são acometidas^(1,2). Atividades esportivas e acidentes de trânsito são os principais geradores dessas lesões, provocando grande impacto socioeconômico e elevando os custos financeiros⁽²⁾.

A reconstrução de grandes segmentos ósseos, ocasionados por eventos patológicos, tais como trauma, inflamação e tratamento cirúrgico de tumores, continua sendo um importante problema clínico. O tecido ósseo lesado tem capacidade de retornar à sua estrutura original⁽³⁾; no entanto, se o defeito consistir em perda de massa óssea, a regeneração se torna limitada. Dentre as alternativas terapêuticas mais utilizadas para reconstrução de grandes lesões ósseas, está o transplante de enxerto ósseo (autólogo, homólogo e heterólogo) ou implantes de diferentes biomateriais⁽⁴⁾.

O enxerto autólogo é caracterizado por possuir alta capacidade osteoindutora, porém apresenta desvantagens como a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica para retirada do enxerto, possível morbidade no local e a escassez de tecido doador⁽⁵⁾. A fim de fornecer auxílio para acelerar a modulação do reparo do osso lesado e para superar as desvantagens do enxerto autólogo, os substitutos ósseos inorgânicos têm sido amplamente aplicados como biomateriais na ortopedia e odontologia⁽⁶⁾. Dentre os materiais inorgânicos, os cimentos de fosfato de cálcio, como o cimento alfa-fosfato tricálcico (α -TCP), são constantemente utilizados por cirurgias ortopédicas e bucomaxilofaciais, pois apresentam características de biocompatibilidade e osteocondutividade, além de serem considerados materiais biodegradáveis e bioativos, pois estabelecem ligações de natureza química com o tecido ósseo, facilitando a proliferação de fibroblastos, osteoblastos e outras células ósseas⁽⁷⁾.

A engenharia de tecidos propõe que um complexo de interações, envolvendo células osteoprogenitoras, mediadores osteoindutivos e matrizes osteocondutoras, seja a alternativa ideal para restauração tanto de tecidos moles quanto de tecidos duros⁽⁸⁾. Sabendo-se que proteínas indutoras, como os fatores de crescimento, regulam os eventos celulares que estimulam a neoformação óssea, a aplicação combinada destas com cimento de alfa-fosfato pode ser uma estratégia promissora para estimular a osteogênese em danos ósseos de difícil reparo.

Como fonte autóloga de fatores de crescimento, o plasma rico em plaquetas (PRP), o qual é caracterizado como um volume de plasma com concentração plaquetária de três a oito vezes acima dos níveis fisiológicos⁽⁹⁻¹¹⁾, apresenta-se como uma alternativa terapêutica para ser aplicada junto a substitutos ósseos como o cimento α -TCP. Segundo Marx⁽¹²⁾, o PRP libera um conjunto de sete fatores tróficos que possui como carreador o próprio coágulo sanguíneo. Dentre estes fatores, podemos citar as três isoformas de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de transformação alfa e beta (TGF- α e TGF- β), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e fator de crescimento epitelial (EGF).

As proteínas liberadas pelas plaquetas criam um microambiente favorável à cicatrização de tecidos, induzindo a quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular e remoção de restos teciduais. O PRP contém, ainda, proteínas como a fibrina, fibronectina e vitronectina que atuam como moléculas de adesão celular, favorecendo a osteocondução, além de serem essenciais na constituição da matriz óssea⁽¹³⁻¹⁵⁾. Alguns pesquisadores associam o plasma rico em plaquetas a outro biomaterial na tentativa de obter melhores resultados no reparo ósseo do que o seu uso isolado⁽¹⁶⁻¹⁸⁾.

Nesse contexto, a proposta deste estudo foi comparar o efeito do PRP, como fonte autóloga de fatores de crescimento, sobre a osteogênese quando aplicado isoladamente ou combinado com o cimento de α -TCP granuloso em defeitos cavitários em ratos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e grupos de experimentação

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Foram utilizados 14 ratos (*Rattus norvegicus*) da raça Wistar, machos, adultos, com aproximadamente 250 gramas de massa corporal, dos quais dois foram utilizados como doadores de sangue para obtenção do PRP. Os 12 animais restantes foram usados na realização do experimento, sendo distribuídos aleatoriamente em dois grupos de acordo com o período de avaliação, quatro e oito semanas.

Obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP)

Utilizaram-se dois ratos machos adultos como doadores de sangue, sendo estes previamente anestesiados com anestesia intraperitoneal com solução constituída por cloridrato de cetamina (50mg.kg⁻¹) e cloridrato de

clorpromazina ($5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) na mesma seringa. Seis mililitros de sangue foram puncionados da artéria carótida de cada animal e imediatamente transferidos para tubos contendo solução de ácido citrato dextrose-A (ACD-A) para evitar a coagulação.

O sangue foi submetido a duas centrifugações (200g por 10 minutos e 400g por 10 minutos) em uma centrífuga hematológica CELM – LS 3 PLUS no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital São Lucas da PUCRS (HLS), conforme protocolo adaptado⁽¹⁹⁾.

Após a segunda centrifugação, obteve-se o plasma pobre em plaquetas (PPP) na porção superior do tubo, o PRP na zona intermediária e um pequeno botão de hemácias no fundo do tubo. O PPP foi retirado do tubo e descartado. O PRP foi ativado com cloreto de cálcio (CaCl_2) e trombina misturados ($600\text{IU}/\text{mL}$ de trombina em 1mL de CaCl_2 $5,9\text{mg}/\text{mL}$ – Aventis Behring, São Paulo, BR) na proporção 1:2 de PRP. O gel de PRP foi aplicado isoladamente na cavidade direita ou misturado ao cimento de α -TCP granulado na cavidade esquerda de cada animal, imediatamente após a lesão óssea na quantidade de $100\mu\text{L}$.

Contagem de plaquetas

A quantificação das plaquetas do sangue normal dos ratos e das amostras de PRP foi realizada no contador de células automatizado SYSMEX modelo XT 1800 (Roche®), utilizado pelo Laboratório de Patologia Clínica do Hospital São Lucas da PUCRS, de acordo com especificações do fabricante.

Síntese do cimento de α -fosfato tricálcico granulado

O cimento α -TCP granulado utilizado nesta pesquisa foi sintetizado e fornecido pelo Laboratório de Biomateriais (BIOMAT) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, sendo constituído por 85% de α -TCP e 15% de sulfato de cálcio hemi-hidratado. Conforme recomendação do fabricante⁽²⁰⁾, o cimento foi misturado a um líquido contendo 2,5% de Na_2HPO_4 (acelerador) até alcançar a consistência desejada. O tamanho dos grânulos utilizados era entre 150 a $300\mu\text{m}$ e a quantidade aplicada em cada animal foi de 50mg.

Procedimentos cirúrgicos e anestésicos

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica da Faculdade de Medicina da PUCRS.

Foi administrada anestesia conforme protocolo citado anteriormente. Após a realização da tricotomia na área de acesso cirúrgico sobre os dois fêmures (esquerdo

e direito), os animais foram posicionados em decúbito lateral, sendo realizada uma incisão na pele da face lateral da coxa com 1,5cm. Os músculos reto lateral e bíceps da coxa foram divulsionados e o fêmur foi exposto. Na porção anterolateral da diáfise proximal do fêmur, foi criado um defeito cavitário (com uma broca modelo Carbide número 8) utilizando um motor de alta rotação e constante irrigação com solução fisiológica estéril. A lesão foi confeccionada pelo mesmo cirurgião em todos os animais ($5\text{mm} \times 2\text{mm}$) com profundidade suficiente para expor a cavidade medular do fêmur⁽²¹⁾, tomando especial cuidado para não comprometer a cortical medial, diminuindo, assim, a possibilidade de fratura do fêmur no pós-operatório (Figura 1). A cavidade no fêmur direito foi preenchida somente com PRP e a cavidade no fêmur esquerdo com PRP mais cimento de alfa-fosfato tricálcico granulado (α -TCP).

Posteriormente, procedeu-se a aproximação da fásia lata com sutura Prolene 5-0 (Ethilon® Johnson & Johnson, Brasil) e sutura da pele com fio mononylon 4-0 (Ethilon® Johnson & Johnson, Brasil).

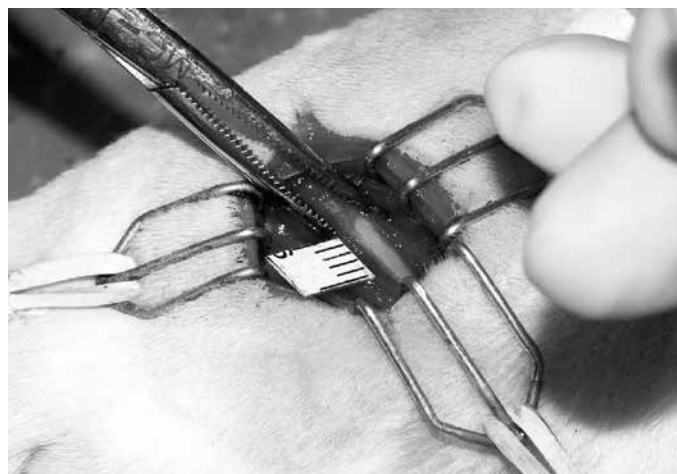


Figura 1 – Exposição do fêmur do rato para criação da lesão cavitária com 5mm de comprimento.

Pós-operatório

Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais após as cirurgias no mesmo biotério de origem. Para analgesia, foi aplicado cetoprofeno intraperitoneal na dose de $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Os animais foram monitorizados durante o pós-operatório imediato por uma equipe cirúrgica.

Análises radiográficas

No dia anterior à eutanásia dos animais (nos períodos de quatro e oito semanas) foram realizadas radiografias de todos os fêmures. Para a obtenção das imagens, os animais foram anestesiados e posicionados

em decúbito ventral, com auxílio do equipamento mamográfico Mamomat 3000 (Siemens®). Foram utilizados transdutores de imagens Image Plate (IP) (Fuji®), específicos para mamografia.

A técnica radiográfica consistiu em uma combinação alvo-trilha Mo-Mo, tensão aceleradora de tubo 28kVp e carga 14mAs (técnica ajustada para a visualização da lesão crítica no fêmur de ratos). As avaliações das imagens radiográficas digitalizadas foram realizadas por examinador devidamente capacitado e experiente, com o auxílio do programa Image J. Para garantir e testar a reprodutibilidade do processo de análise das imagens, foi desenvolvido um procedimento operacional padrão (POP) e aplicado o coeficiente de correlação intraclasse (ICC) entre dois grupos: um grupo sem experiência nesse tipo de análise, não apresentando familiaridade com o programa Image J nem com as características das lesões; e outro grupo, com pessoas capacitadas e experientes. Os valores do coeficiente adotados como referência foram: $ICC < 0,4$ – pobre; $0,4 \leq ICC < 0,75$ – satisfatória; $ICC \geq 0,75$ – excelente.

No momento de avaliação de cada lesão foi verificada a área da lesão (mm^2), bem como os valores médios do *pixel* e seu respectivo desvio padrão. O valor “0” (zero) representou a ausência de lesão observada através dos parâmetros acima descritos.

Preparação histológica

Após quatro e oito semanas, os animais experimentais foram anestesiados com o mesmo protocolo utilizado para os procedimentos cirúrgicos e eutanasiados com dose letal de Tiopental 100mg.kg^{-1} . Foi efetuada uma abordagem cirúrgica para a remoção dos fêmures direito e esquerdo. Seccionou-se o osso com auxílio da broca modelo Carbide nº 8, preservando o local da lesão com margens de 1mm em cada extremidade do defeito.

As amostras foram fixadas em formalina tamponada a 10%, desidratadas com soluções alcoólicas em graduações crescentes, clarificadas com xilol e descalcificadas com solução de ácido fórmico 50%. As lâminas foram confeccionadas no Laboratório de Patologia do Hospital São Lucas da PUCRS. Após a completa descalcificação, os fêmures foram incluídos em parafina e cortes de $5\mu\text{m}$ foram realizados em um micrótomo.

Para a avaliação da neoformação óssea, utilizou-se a coloração Picrosirius, que age através da precipitação de moléculas do corante Sirius Red que se depositam paralelamente às moléculas do colágeno, provocando

um aumento da birrefringência das fibras que conservam colágeno quando observadas à luz polarizada, evidenciando, assim, áreas de matriz óssea.

Após permanecer em uma estufa a 60°C por 24h, as lâminas foram desparafinizadas e hidratadas em água corrente. Subsequentemente, foi realizada a incubação em solução de Picrosirius na concentração de 1% por uma hora, seguida por uma lavagem em água corrente por 20 minutos.

As lâminas foram codificadas de maneira que o examinador não obtivesse conhecimento sobre a quais tratamentos pertenciam. Posteriormente, foram fotografadas para serem analisadas.

Análise das imagens – histomorfometria

A leitura das lâminas foi realizada pelo mesmo examinador em microscópio óptico Zeiss Axioskop 40 com uma objetiva de 5x. Para captura das imagens utilizou-se a câmera CoolSNAP™ Pro *cf* (Media Cybernetics, Inc.) acoplada ao microscópio e a um computador, produzindo aumento similar a uma objetiva de 10x; com isso, as imagens resultantes passaram a ter um aumento de 50x. Cada imagem foi capturada sob luz normal e luz polarizada, para posterior diferenciação e quantificação da área com presença de colágeno.

Foram selecionados dois campos por lâmina representando toda área de lesão. Para cada área com lesão, foi eleita, na mesma lâmina, uma região adjacente ao defeito com dimensões semelhantes, representando o osso normal (ideal: 100% de neoformação óssea).

Após o registro das imagens, as mesmas foram analisadas através do *software* Image ProPlus® versão 4.5.1 (Media Cybernetics, Inc.), o qual permitiu, através de uma contagem do número de *pixels*, mensurar a área em micrômetros correspondente a cada defeito e ao osso normal. Para diferenciar o colágeno, foi obtida a medida da razão do tecido birrefringente por unidade de tecido (*pixel*/ μm), utilizando as imagens capturadas com luz normal e luz polarizada.

A área em micrômetros foi transformada em porcentagem de neoformação através da comparação entre a área de tecido ósseo da lesão e a área de tecido ósseo normal da região adjacente, sendo esta estipulada como 100% de neoformação (ideal)^(22,23).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos em média e desvio padrão para variáveis de distribuição normal. Para a compara-

ção dos valores da área (mm^2), comprimento longitudinal (mm) e área de neoformação (%) da lesão, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. O nível de significância adotado foi de $\alpha = 0,05$.

RESULTADOS

Resultados clínicos

O protocolo anestésico empregado mostrou-se efetivo para a realização dos procedimentos cirúrgicos. As medicações administradas no pós-operatório foram suficientes para manter o bem-estar dos animais, não sendo observadas quaisquer dificuldades de movimentação nos membros operados. As feridas cirúrgicas cicatrizaram de maneira adequada e nenhum rato apresentou sinais de infecções ou complicações clínicas durante o estudo.

Contagem de plaquetas

O número de plaquetas no sangue normal, antes das centrifugações para obtenção de PRP, foi de 459.000 plaquetas/ μL e no PRP foi de 3.181.000 plaquetas/ μL . A quantidade de leucócitos também foi mais elevada no PRP quando comparada ao sangue normal (2.800 leucócitos/ μL). A concentração de hemácias encontradas no PRP foi de 730 unidades por μL , e no sangue normal foram quantificadas 7.420 hemácias/ μL . A alta concentração de plaquetas e leucócitos, bem como a presença de poucas hemácias no PRP, confirmaram a eficácia da técnica utilizada para a obtenção de PRP.

Resultados radiográficos e histológicos

No processo de validação das análises das imagens radiográficas, os dois avaliadores experientes apresentaram variações nas medidas de comprimento e área inferiores à dimensão de um *pixel*, com ICC = 0,8, o que demonstra a alta reprodutibilidade do processo entre pessoas devidamente capacitadas.

Numericamente, o tratamento PRP apresentou menor desempenho quando comparado ao α -TCP+PRP. Os valores das médias da área de ambos os grupos e seus respectivos desvios padrão estão expostos na Figura 2.

As imagens radiográficas analisadas (Figura 3) demonstraram diferenças na constituição óssea entre os dois tratamentos. Em oito semanas, a média da área de lesão do grupo PRP foi de $3,23\text{mm}^2 \pm 1,46$ e, no grupo α -TCP+PRP, $1,91\text{mm}^2 \pm 0,93$. Contudo, esta diferença não apresentou significância ($p = 0,388$).

Na observação das lâminas através de microscopia

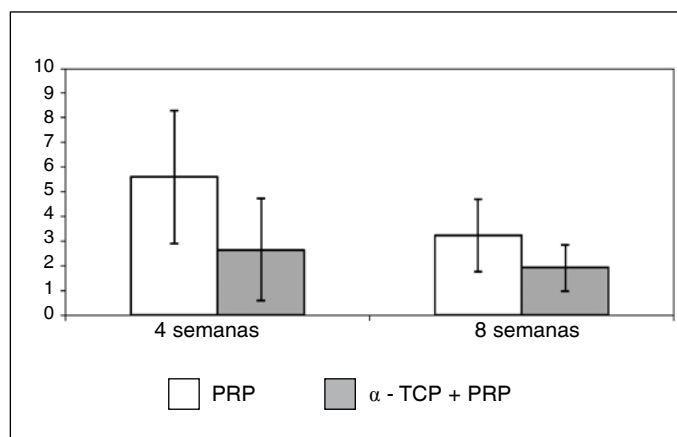


Figura 2 – Médias da área da lesão e respectivos desvios padrão, em quatro e oito semanas.



Figura 3 – Imagens radiográficas representando o osso neoformado na área da lesão no grupo PRP (direita) e α -TCP+PRP (esquerda), após oito semanas. Observa-se um melhor reparo no fêmur tratado com α -TCP+PRP.

óptica, não foi constatado nenhum sinal de inflamação ou necrose óssea ou de tecidos adjacentes. Em todos os casos, evidenciou-se tecido ósseo em neoformação em todas as áreas do defeito cirúrgico, tanto nas margens quanto na região central.

Após quatro semanas, observou-se formação de tecido conjuntivo desorganizado permeando as áreas de neoformação óssea que preenchem as cavidades cirúrgicas. Em oito semanas, percebeu-se as dimensões da lesão reduzidas, com uma discreta área de tecido conjuntivo organizado permeando as áreas de neoformação óssea que preenchem as cavidades cirúrgicas, sugerindo uma estrutura óssea em remodelamento. Sob luz polarizada, pode-se observar a presença de fibras de colágeno organizadas (Figura 4).

Na Tabela 1 é possível observar a evolução da cicatrização óssea no grupo PRP, através das médias de neoformação óssea. A diferença entre as médias obtidas

em quatro e oito semanas no grupo PRP isolado foi significativa ($p = 0,015$), ou seja, demonstra que, em quatro semanas, a área de osso neoformado era ainda imatura, ao contrário do grupo α -TCP+PRP (Figura 4).

Ao comparar as médias da área de neoformação óssea, independentemente do tempo analisado, constatou-se que a diferença entre os dois tratamentos tende a ser semelhante ($p = 0,779$). As médias de neoformação e respectivos desvios padrão podem ser visualizados no gráfico da Figura 5.

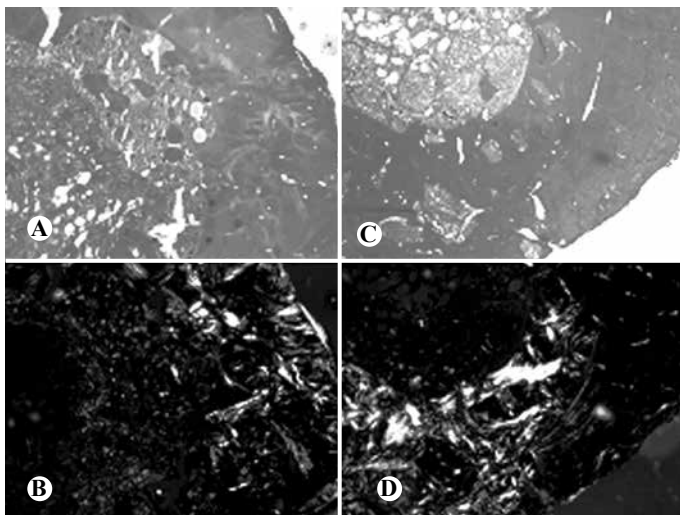


Figura 4 – Grupo PRP (A e B) e α -TCP+PRP (C e D) quatro semanas pós-cirúrgicas. Coloração Picrosirius Red sob luz normal (imagens superiores, A-C) e luz polarizada (imagens inferiores, B-D), mostrando colágeno mais abundante no grupo α -TCP+PRP, representado pelas regiões de coloração mais clara. Aumento 50x.

Tabela 1 – Diferenças das médias da área da lesão e área de neoformação óssea obtidas entre quatro e oito semanas.

Tratamento	Diferença entre quatro e oito semanas			
	Área (mm ²)	p	Neoformação (%)	p
PRP	2,36	0,089	16	0,015
TCP+PRP	0,74	0,447	13	0,067

Diferença estatisticamente significativa para $p \leq 0,05$.

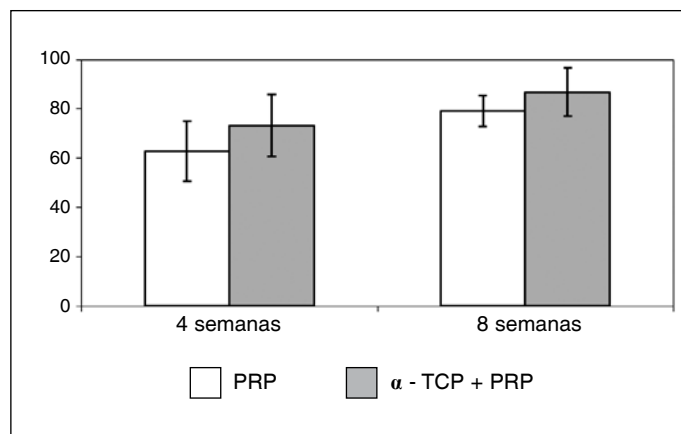


Figura 5 – Médias da área de neoformação óssea em quatro e oito semanas de avaliação, e respectivos desvios padrão.

DISCUSSÃO

O tratamento mais eficaz, considerado atualmente padrão ouro no reparo de danos teciduais ósseos de difícil recuperação, é o enxerto autólogo. Apesar de suas vantagens, das quais se destacam a histocompatibilidade e a grande capacidade osteoindutora e osteocondutora, o enxerto autólogo apresenta alguns inconvenientes. A quantidade limitada de tecido doador, a falha gerada na região de extração do enxerto e a difícil aceitação dos pacientes são algumas dessas limitações⁽²⁴⁻²⁷⁾.

Diversos biomateriais são constantemente pesquisados para substituir o tecido ósseo, a fim de encontrar uma alternativa que apresente os mesmos benefícios do enxerto autólogo, porém livre de suas desvantagens. O processo de reparo ósseo envolve uma série de elementos celulares, mediadores químicos e matrizes osteocondutoras, que regulam os eventos em nível molecular e estimulam a restauração tecidual. Acredita-se que a interação entre estes parâmetros promova a regeneração óssea^(8,28,29).

Para dar suporte ao crescimento celular e à diferenciação osteogênica, a utilização de *scaffolds* produzidos a partir de diferentes biomateriais é importante. Da mesma forma, fatores de crescimento são capazes de melhorar o potencial osteogênico de *scaffolds* como o TCP quando aplicados em conjunto. Alguns estudos afirmam que o cimento de α -TCP, além de biocompatível, é bi-condutor e bioativo^(20,25,30,31). Há evidências de que os fatores de crescimento obtidos do PRP podem regular a reconstrução e remodelação óssea fisiológica, sendo um potente tratamento no reparo de lesões^(10,18,32-35). Diante destes preceitos, a aplicação combinada de cimento de α -TCP e PRP parece se enquadrar nas propriedades ideais que caracterizam estas interações.

No presente estudo, a concentração de plaquetas no PRP dos ratos foi sete vezes acima dos níveis do sangue normal (PRP = 3.181.000 plaquetas/ μ L). A concentração terapêutica de plaquetas no PRP considerada ideal é de, aproximadamente, 1.000.000/ μ L⁽¹⁵⁾ em humanos. Trowbridge *et al*⁽³⁶⁾ afirmaram que a quantidade média de plaquetas em ratos é significativamente mais alta do que em humanos, enquanto que o volume médio de plaquetas é significativamente mais baixo que em humanos. Portanto, existem diferenças biológicas entre espécies que devem ser consideradas, e somente os protocolos de obtenção de PRP humanos estão padronizados, assim como a concentração de plaquetas e níveis de fatores de crescimento ideais. Deste modo, os níveis terapêuticos da concentração plaquetária e

as taxas de fatores de crescimentos em animais ainda necessitam ser definidos.

Na análise radiográfica aqui apresentada, observou-se um menor desempenho numérico no grupo tratado com PRP isolado; contudo, a diferença encontrada entre os tratamentos não foi significativa nos dois períodos analisados (Figura 2). O α -TCP+PRP apresentou as menores médias da área da lesão nos períodos de quatro e oito semanas, o que aponta para uma melhor reparação óssea.

Os resultados obtidos demonstraram que PRP estimula a remodelação óssea, semelhante aos resultados encontrados na literatura, em que o PRP foi aplicado na mesma espécie⁽³⁷⁾. Todos os defeitos em ambos os grupos avaliados, PRP isolado e α -TCP+PRP, apresentaram osso remodelado após oito semanas. Os dados histológicos sugerem um possível efeito precoce sobre a osteogênese quando o cimento de α -TCP e PRP são aplicados em conjunto, apresentando, em quatro semanas, média de $73,3\% \pm 12,7$, superior ao grupo PRP; em oito semanas, a média foi de $86,7\% \pm 9,8$, com 13 pontos percentuais de diferença entre os dois períodos analisados, sendo esta diferença não significativa (Tabela 1). Estudos comprovam que a combinação de PRP com biomateriais otimiza e acelera o processo de regeneração do tecido ósseo⁽³⁸⁾.

As análises histológicas também demonstraram a ausência de resposta inflamatória ou necrose em todos os animais, o que está de acordo com estudos destinados a avaliar a biocompatibilidade do cimento α -TCP^(39,40). Outra possível explicação para ausência de inflamação ou necrose óssea se dá pelo uso de irrigação constante com solução salina durante a criação dos defeitos e a esterilização do cimento e materiais cirúrgicos utilizados em todos os procedimentos.

Segundo Marx *et al*⁽¹⁰⁾, o PRP exerce uma influência sobre as células. Portanto, ao ser utilizado em combinação com substitutos ósseos sintéticos deveria apresentar um efeito sinérgico sobre a neoformação óssea. Porém, os benefícios do PRP dependem da quantidade de células osteoprogenitoras residentes no local implantado e da ação dos fatores de crescimento liberados pelas plaquetas⁽⁴¹⁾.

Na análise histomorfométrica, observou-se o cresci-

mento ósseo ao redor das partículas do cimento α -TCP, assim como a presença de colágeno. A bioatividade e a osteocondutividade dos grânulos de α -TCP podem favorecer a regeneração óssea. Sabe-se que a degradação parcial de cimentos de fosfato de cálcio causa liberação de íons de cálcio e fosfato no microambiente ósseo, que, em longo prazo, promovem a mineralização e aumentam a neoformação óssea⁽⁴²⁾. Kihara *et al*⁽⁴³⁾ observaram neoformação óssea sobre a superfície e no interior das partículas de α -TCP quando aplicados em defeito ósseo de coelhos, semelhante ao presente estudo. Estes dados dão suporte à afirmação de que o cimento α -TCP é um material osteocondutivo, permitindo que a matriz óssea se desenvolva através dele.

Para que os substitutos ósseos possam ser devidamente integrados ao tecido ósseo, é importante que sua forma seja preservada. Na execução do presente estudo, encontrou-se dificuldade no manuseio do cimento α -TCP em relação à sua solubilidade, que prejudicou sua adesão ao sítio cirúrgico, devido à presença em grande quantidade de estruturas líquidas (sangue e medula óssea). Contudo, tal limitação foi controlada com aspiração adequada e campo cirúrgico seco, a fim de evitar o deslocamento e o extravasamento do cimento após sua aplicação.

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo sugerem que o tratamento com cimento de α -TCP combinado com PRP não apresentou diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao PRP isolado. Quanto ao efeito de ambos os tratamentos sobre a osteogênese em defeitos cavitários em fêmur de ratos, os dados apontam para um possível efeito precoce quando o PRP e o cimento α -TCP são aplicados em conjunto, tendo atividades osteoindutoras possivelmente potencializadas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Prof. Dr. Vinicius Duval, Coordenador do Laboratório de Patologia do Hospital São Lucas da PUCRS, por todo o suporte e conhecimento durante as avaliações histológicas.

REFERÊNCIAS

1. Lysaght MJ, Nguy NA, Sullivan K. An economic survey of the emerging tissue engineering industry. *Tissue Eng.* 1998;4(3):231-8.
2. Lidgren L. The Bone and Joint Decade and the global economic and healthcare burden of musculoskeletal disease. *J Rheumatol Suppl.* 2003;67:4-5.
3. Remedios A. Bone and bone healing. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1999;29(5):1029-44.
4. Cancedda R, Giannoni P, Mastrogiacomo M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. *Biomaterials.* 2007;28(29):4240-50.

5. Chu TM, Warden SJ, Turner CH, Stewart RL. Segmental bone regeneration using a load-bearing biodegradable carrier of bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials*. 2007;28(3):459-67.
6. Hollinger JO, Brekke J, Gruskin E, Lee D. Role of bone substitutes. *Clin Orthop Relat Res*. 1996;(324):55-65.
7. Hench LL. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials*. 1998;19(16):1419-23.
8. Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: a harmony of optimal biology and optimal fixation? *Injury*. 2007;38(Suppl 4):S1-2.
9. 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(4):529-35.
10. 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.
11. Okuda K, Kawase T, Momose M, Murata M, Saito Y, Suzuki 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.
12. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent*. 2001;10(4):225-8.
13. 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.
14. Gandhi A, Doumas C, O'Connor JP, Parsons JR, Lin SS. The effects of local platelet rich plasma delivery on diabetic fracture healing. *Bone*. 2006;38(4):540-6.
15. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004;62(4):489-96.
16. Yamamiya K, Okuda K, Kawase T, Hata K, Wolff LF, Yoshie H. Tissue-engineered cultured periosteum used with platelet-rich plasma and hydroxyapatite in treating human osseous defects. *J Periodontol*. 2008;79(5):811-8.
17. Sammartino G, Tia M, Gentile E, Marenzi G, Claudio PP. Platelet-rich plasma and resorbable membrane for prevention of periodontal defects after deeply impacted lower third molar extraction. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009;67(11):2369-73.
18. Bi L, Cheng W, Fan H, Pei G. Reconstruction of goat tibial defects using an injectable tricalcium phosphate/chitosan in combination with autologous platelet-rich plasma. *Biomaterials*. 2010;31(12):3201-11.
19. Rossi Junior R, Negreiros RM, Elias FM, Jorge WA. Utilização de plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos para reparação de defeitos ósseos. *Rev Odonto Univ Cidade São Paulo*. 2008;20(3):295-300.
20. dos Santos L. Desenvolvimento de cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras para uso na área médico-odontológica [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2002.
21. Moreira ASB, Pastorelli MT, Damasceno LHF, Defino HLA. Estudo experimental da influência das dimensões dos grânulos de hidroxiapatita na integração óssea. *Acta Ortop Bras*. 2003;11(4):240-50.
22. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*. 1988;96(5):379-94.
23. Stein RS, Braga Silva J, Silva VD. Estudo comparativo da neoformação óssea utilizando-se o enxerto autógeno e três substitutos: defeitos ósseos em ratos. *Rev Bras Ortop*. 2009;44(4):330-5.
24. Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthop Relat Res*. 1996;(329):300-9.
25. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005;36(Suppl 3):S20-7.
26. Pollock R, Alceik I, Bhatia C, Chuter G, Lingutla K, Budithi C, et al. Donor site morbidity following iliac crest bone harvesting for cervical fusion: a comparison between minimally invasive and open techniques. *Eur Spine J*. 2008;17(6):845-52.
27. Seiler JG 3rd, Johnson J. Iliac crest autogenous bone grafting: donor site complications. *J South Orthop Assoc*. 2000;9(2):91-7.
28. Laurencin CT, Einhorn TA, Lyons K. Fracture repair: challenges and opportunities. *J Bone Joint Surg Am*. 2008;90(Suppl 1):1-2.
29. Pountos I, Georgouli T, Blokhuis TJ, Pape HC, Giannoudis PV. Pharmacological agents and impairment of fracture healing: what is the evidence? *Injury*. 2008;39(4):384-94.
30. Knabe C, Stiller M, Berger G, Reif D, Gildenhaar R, Howlett CR, et al. The effect of bioactive glass ceramics on the expression of bone-related genes and proteins in vitro. *Clin Oral Implants Res*. 2005;16(1):119-27.
31. Valerio P, Pereira MM, Goes AM, Leite MF. The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials*. 2004;25(15):2941-8.
32. Kasten P, Vogel J, Geiger F, Niemeyer P, Luginbühl R, Szalay K. The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects. *Biomaterials*. 2008;29(29):3983-92.
33. Döri F, Kovács V, Arweiler NB, Huszár T, Gera I, Nikolidakis D, et al. Effect of platelet-rich plasma on the healing of intrabony defects treated with an anorganic bovine bone mineral: a pilot study. *J Periodontol*. 2009;80(10):1599-605.
34. Nagata MJ, Melo LG, Messori MR, Bomfim SR, Fucini SE, Garcia VG, ET AL. Effect of platelet-rich plasma on bone healing of autogenous bone grafts in critical-size defects. *J Clin Periodontol*. 2009;36(9):775-83.
35. Findikcioglu K, Findikcioglu F, Yavuzer R, Elmas C, Atabay K. Effect of platelet-rich plasma and fibrin glue on healing of critical-size calvarial bone defects. *J Craniofac Surg*. 2009;20(1):34-40.
36. Trowbridge EA, Martin JF, Slater DN, Kishk YT, Warren CW, Harley PJ, et al. The origin of platelet count and volume. *Clin Phys Physiol Meas*. 1984;5(3):145-70.
37. Messori MR, Nagata MJ, Mariano RC, Dornelles RC, Bomfim SR, Fucini SE, et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodontol Res*. 2008;43(2):217-23.
38. Zhang YD, Wang G, Sun Y, Zhang CQ. Combination of platelet-rich plasma with degradable bioactive borate glass for segmental bone defect repair. *Acta Orthop Belg*. 2011;77(1):110-5.
39. dos Santos LA, Carrodéguas RG, Rogero SO, Higa OZ, Boschi AO, de Arruda AC. Alpha-tricalcium phosphate cement: "in vitro" cytotoxicity. *Biomaterials*. 2002;23(9):2035-42.
40. Biancon Filho LA, Primo BT, Gassen HT, Fontanella VR, Silva AN Jr. Evaluation of optical density of bone defects filled with calcium phosphate cement and bioactive glass in rats. *Acta Cir Bras*. 2011;26(1):2-6.
41. Pryor ME, Polimeni G, Koo KT, Hartman MJ, Gross H, April M, et al. Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: histologic and histometric observations. *J Clin Periodontol*. 2005;32(9):966-72.
42. LeGeros RZ. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chem Rev*. 2008;108(11):4742-53.
43. Kihara H, Shiota M, Yamashita Y, Kasugai S. Biodegradation process of alpha-TCP particles and new bone formation in a rabbit cranial defect model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2006;79(2):284-91.