
**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA CIRÚRGICA**

**EFEITO DE CIMENTO DE ALFA-FOSFATO
TRICÁLCICO E PLASMA RICO EM
PLAQUETAS NA REGENERAÇÃO DE
TECIDO ÓSSEO**

ALESSANDRA DEISE SEBEN

PORTO ALEGRE

2010

ALESSANDRA DEISE SEBEN

**EFEITO DE CIMENTO DE ALFA-FOSFATO TRICÁLCICO E PLASMA
RICO EM PLAQUETAS NA REGENERAÇÃO DE TECIDO ÓSSEO**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do Grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

Orientador

Prof. Dr. Jefferson Luís Braga da Silva

Co-orientador

Prof. Dr. Luís Alberto dos Santos

PORTO ALEGRE

2010

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

S443e Sebben, Alessandra Deise

Efeito de cimento de alfa-fosfato tricálcico e plasma rico em plaquetas na regeneração de tecido ósseo / Alessandra Deise Sebben. Porto Alegre: PUCRS, 2010.

137 f.: il. gráf. tab.

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Luís Braga da Silva.

Coorientador: Prof. Dr. Luís Alberto dos Santos.

Dissertação (Mestrado)—Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande Sul. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de Concentração: Clínica Cirúrgica.

1. OSTEOGÊNESE. 2. PEPTÍDEOS E PROTEÍNAS DE SINALIZAÇÃO INTERCELULAR. 3. PLASMA RICO EM PLAQUETAS. 4. FOSFATOS DE CÁLCIO. 5. MATERIAIS BIOCOMPATÍVEIS. 6. TRANSPLANTE AUTÓLOGO. 7. FÊMUR. 8. PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS. 9. RATOS ENDOGÂMICOS WKY. 10. MODELOS ANIMAIS. 11. ANIMAIS DE LABORATÓRIO. I. Silva, Jefferson Luís Braga da. II. Santos, Luís Alberto dos. III. Título.

C.D.D. 617.695

C.D.U. 611-018.4:599.323.4(043.3)

N.L.M. WE 200

Rosária Maria Lúcia Prenna Geremia
Bibliotecária CRB 10/196

Aos meus pais José Antonio Sebben (in memmorian) e Maria Claudete Gouveia Sebben, a quem eu devo tudo o que sou e que conquistei. Obrigada pelo amor incondicional, por ensinar-me a lutar e persistir, por me tornar um ser humano digno. Esta conquista, mais do que minha, é de vocês.

Aos meus irmãos Daniela, Luciana, Antonio e Bruna. Sem vocês jamais seria possível a concretização deste trabalho. Obrigada por participarem das minhas escolhas, das minhas conquistas e por me apoiarem nos momentos difíceis.

Ao Nicolas Eugenio Mascarello, pela paciência, incansável apoio, amor e por sua presença em todos os momentos, tornando minha caminhada mais feliz. É meu maior incentivador e compartilho contigo esta vitória.

Amo todos vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Professor Dr. Jefferson Luís Braga da Silva**, pela contribuição inestimável para a realização deste projeto. Por acreditar em minha capacidade, me concedendo a oportunidade de trabalhar sob sua orientação e por proporcionar meu amadurecimento tanto profissional, como pessoal.

Ao meu co-orientador, **Professor Dr. Luís Alberto dos Santos**, pelo conhecimento sobre Engenharia de Biomateriais e pela colaboração imprescindível a esta pesquisa.

À **Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**, em especial ao **Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde**, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado e pela infra-estrutura.

Ao **CNPq**, pela bolsa concedida e pelo incentivo à pesquisa.

A toda equipe do **Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica da PUCRS**, onde encontrei além de bons colegas, grandes amigos.

Aos acadêmicos **Camilla Assad, Caroline Klein, Thiago Alexi, Leonardo Kuhl e Felipe Loss**, pela cooperação na execução deste trabalho.

À **Profa. Viviane Matzenbacher**, pela dedicação e pela imensurável contribuição nas análises radiográficas.

Ao **Prof. Dr. Vinícius Duval**, por conceder as dependências do **Laboratório de Patologia do Hospital São Lucas da PUCRS** para a realização dos procedimentos histológicos e, especialmente, por compartilhar seu conhecimento científico.

Ao **Tiago Giuliani**, técnico em histologia, por todo apoio nos procedimentos histológicos.

Ao **Dr. João Luís Dias de Oliveira**, chefe do setor de **Mamografia do Hospital São Lucas da PUCRS**, pela disponibilização da estrutura e serviços na realização das imagens radiográficas dos animais.

Ao **Felipe Roxo**, técnico em radiologia, pelo auxílio na definição e descrição da técnica utilizada nas imagens dos animais.

Ao amigo chileno, **Javier Roman**, pela amizade, pelo apoio pessoal e científico, e por dividir seu conhecimento.

À **família Mascarello**, por toda generosidade e carinho. Vocês iluminam meus dias.

À **Camila Telles**, amiga de longos anos, pela colaboração indispensável na finalização deste trabalho.

A todos os **amigos** que de alguma forma, mesmo sem saber, colaboraram para mais esta conquista na minha vida.

A todos os **colegas do curso de Mestrado e Doutorado** que cruzaram por mim nesta jornada e tornaram-se cúmplices nestes dois anos de estudos.

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito de cimento de alfa-fosfato tricálcico (α -TCP) e plasma rico em plaquetas (PRP) sobre a osteogênese, quando utilizados isoladamente ou em conjunto, comparando os resultados com o padrão-ouro (enxerto autólogo).

Material e Métodos: Trinta e quatro ratos Wistar-Kyoto foram utilizados no estudo. Foi criado um defeito cavitário bilateral no fêmur e cada cavidade foi preenchida com um dos 4 tipos de tratamentos (enxerto autólogo; cimento α -TCP; PRP; cimento α -TCP+PRP), sendo avaliados em 4 e 8 semanas. No grupo controle não foi aplicado nenhum preenchimento. As imagens radiográficas forneceram valores da área e do comprimento longitudinal da lesão, e as imagens histológicas indicaram a área de neoformação óssea.

Resultados: Quanto ao efeito dos tratamentos sobre a lesão óssea independentemente do tempo, os resultados radiográficos encontrados não forneceram dados suficientes para comprovar diferenças significativas nas duas variáveis analisadas, área e comprimento ($p=0,08$). Na histomorfometria, foi observado um melhor desempenho do tratamento com enxerto autólogo, apresentando diferenças significativas quanto à área de neoformação óssea, independente do tempo, em relação aos grupos PRP ($p=0,05$) e controle ($p=0,041$). Em contrapartida, não foram verificadas diferenças com significância entre enxerto autólogo e os grupos cimento α -TCP+PRP e cimento α -TCP ($p>0,05$). Os tratamentos PRP, cimento α -TCP e cimento α -TCP+PRP não diferiram significativamente do grupo controle, assim como não foram evidenciadas diferenças quando comparados entre si.

Conclusão: Os dados do presente estudo sugerem que os tratamentos com cimento α -TCP e PRP, aplicados isoladamente ou em conjunto, não demonstram efeito positivo sobre o reparo ósseo.

Palavras-chave: Modelo experimental. Substitutos ósseos. Plasma rico em plaquetas. Fatores de crescimento.

ABSTRACT

Objective: This study evaluates the effect of alpha-tricalcium phosphate cement (α -TCP) and platelet-rich plasma (PRP) on osteogenesis, when used alone or together, comparing to the gold-standard (autologous graft).

Material and Methods: Thirty-four Wistar-Kyoto rats were used in this study. A bilateral femur defect was created, and each hole was filled with one of the four types of treatments (autologous bone graft, α -TCP cement, PRP and α -TCP cement+PRP) and evaluated in 4 and 8 weeks. In the control group no filling was applied. The X-ray images provided values of area and longitudinal length of the defect, and the histological images, indicated the new bone formation area.

Results: Regarding the effect of the treatments on the bone defect, independently of the time, the X-ray results did not provide sufficient data to confirm important differences in both variables analyzed – area and length ($p=0,08$). In the histomorphometry, it was observed a better performance of the treatment with autologous bone graft, and it presented significant differences regarding the new bone formation area, independently of the time, compared to the PRP ($p=0,05$) and control ($p=0,041$). On the other hand, there were no important differences between autologous graft and the groups α -TCP cement+PRP and α -TCP cement ($p>0,05$). The treatments PRP, α -TCP cement and α -TCP cement+PRP did not differ significantly from the control group, as well as when they were compared to each other.

Conclusion: The data of this study suggest that the treatments with α -TCP cement and PRP, when applied alone or together, do not present positive effect on bone healing.

Keywords: Experimental Model; Osteogenesis; Bone substitutes; Platelet-rich plasma; Growth factors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Abordagem cirúrgica da artéria carótida do rato, para punção do sangue e posterior obtenção do plasma rico em plaquetas.	34
Figura 2 - Sangue do rato após 2ª centrifugação. Porção superior à zona de névoa corresponde ao plasma pobre em plaquetas e porção inferior ao botão de hemácias. Na zona de névoa estão depositadas as plaquetas e os leucócitos que após serem ressuspensos e ativados dão origem ao PRP	35
Figura 3 - Cimento de alfa-fosfato tricálcico (α -TCP) em grânulos entre 150 e 300 μ m.	37
Figura 4 - Exposição do fêmur e localização da região para criação do defeito de 5mm	38
Figura 5 - Lesão cavitária no fêmur do rato, com dimensões de 5mm de comprimento realizada com broca Carbide nº 8.	39
Figura 6 - Rato anestesiado em posição ventral no equipamento para captura das imagens radiográficas dos fêmures dos ratos.....	41
Figura 7 - Equipamento mamográfico Mamomat 3000 (Siemens®) disponibilizado pelo setor de Mamografia do Hospital São Lucas da PUCRS, para a obtenção das radiografias do fêmur dos ratos.	42
Figura 8 - Programa Image ProPlus® usado para medir a área total (circundada pela linha verde) do defeito através da coloração de Picrosirius sob luz normal.	45
Figura 9 - Programa Image ProPlus® usado para medir a área de neoformação óssea (circundada pela linha verde) no defeito através da coloração de Picrosirius sob luz polarizada.	46
Figura 10 – Gráfico comparando a concentração de plaquetas no sangue normal e no PRP (plaquetas/) μ L.	49
Figura 11 - Fêmur esquerdo fraturado, observado no período de 4 semanas.	49
Figura 12 - Tratamento com cimento de α -TCP no fêmur direito. No detalhe o	

material extravasado, depositando-se longitudinalmente ao osso.....	50
Figura 13 - Gráfico representando as médias da área da lesão e respectivos desvios-padrões, em 4 e 8 semanas.....	54
Figura 14 - Gráfico representando as médias do comprimento longitudinal da lesão e respectivos desvios-padrões, em 4 e 8 semanas.	54
Figura 15 - Imagens histológicas do grupo controle em 4 semanas (esquerda) e 8 semanas (direita), com coloração picosirius observada com luz normal (acima) e sob luz polarizada (abaixo). Aumento 50X. Sob luz polarizada, pode-se observar a presença de fibras de colágeno, representadas por tons de amarelo a vermelho. Em 8 semanas há uma evolução no fechamento do defeito, porém com aspecto de osso ainda em remodelamento.	55
Figura 16 - Imagens histológicas do grupo enxerto autólogo em 4 semanas (esquerda) e 8 semanas (direita), com coloração picosirius observada com luz normal (acima) e sob luz polarizada (abaixo). Aumento 50X. Sob luz polarizada, observa-se uma grande quantidade de fibras de colágeno, representadas por tons de amarelo a vermelho.....	56
Figura 17 - Imagens histológicas do grupo cimento α -TCP em 4 semanas (esquerda) e 8 semanas (direita), com coloração picosirius observada com luz normal (acima) e sob luz polarizada (abaixo). Aumento 50X. Em 8 semanas, sob luz polarizada, percebe-se o fechamento parcial da lesão, com uma estrutura de neoformação já organizada, indicando a integração do cimento de α -TCP ao osso.	56
Figura 18 - Imagens histológicas do grupo PRP em 4 semanas (esquerda) e 8 semanas (direita), com coloração picosirius observada com luz normal (acima) e sob luz polarizada (abaixo). Aumento de 50X. Em 8 semanas o tecido ósseo apresenta aspecto de osso imaturo, com discreta área permeada por fibras de colágeno.....	57
Figura 19 - Imagens histológicas do grupo cimento α -TCP+PRP em 4 semanas (esquerda) e 8 semanas (direita), com coloração picosirius observada com luz normal (acima) e sob luz polarizada (abaixo). Aumento de 50X. Em 8 semanas o osso já apresenta-se consolidado, com pequenas regiões	

em remodelamento.	57
Figura 20 - Gráfico com as médias da área de neoformação óssea em 4 e 8 semanas de avaliação, e respectivos desvios-padrões.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição dos grupos experimentais de acordo com período de avaliação.	34
Tabela 2 – Distribuição dos animais conforme aplicação dos tratamentos.	40
Tabela 3 - Valores do coeficiente de correlação Intraclasse entre os dois grupos, experiente e não experiente.	51
Tabela 4 - Diferenças das médias da área e comprimento da lesão óssea obtidas entre 4 e 8 semanas.	52
Tabela 5 - Médias da área da lesão e desvios-padrões (DP) dos tratamentos e controle nos dois períodos analisados.	53
Tabela 6 - Médias do comprimento longitudinal da lesão e desvios-padrões (DP) dos tratamentos e controle, nos dois períodos analisados.	53
Tabela 7 - Médias da área de neoformação óssea e desvios-padrões (DP) dos tratamentos e controle, nos dois períodos de avaliação.	58

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

ACD	Ácido citrato dextrose
BMP	Proteína Morfogenética Óssea
C	Carbono
Ca	Cálcio
CFC	Cimento de Fosfato de Cálcio
CTM	Células-tronco mesenquimais
DP	Desvio-padrão
EGF	Fator de crescimento epitelial
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
g	Gramas
G	Gravidade
h	Hora
H	Hidrogênio
HA	Hidroxiapatita
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IP	Image Plate
IU	Unidades internacionais
kg	Quilograma
kvp	Quilovolt pico
mVA	Miliamperes
mg	Miligramas
mL	Mililitro

mm	Milímetro
mm²	Milímetro quadrado
Mo-Mo	Molibdênio-Molibdênio
O	Oxigênio
P	Fósforo
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	Potencial hidrogeniônico
POP	Procedimento Operacional Padrão
PRP	Plasma rico em plaquetas
TCP	Fosfato tricálcico
TGF	Fator de crescimento de transformação
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
%	Porcento
α	Alfa
β	Beta
°C	Graus Celsius
μm	Micrômetro
®	Marca Registarda
>	Maior
<	Menor

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 Tecido Ósseo.....	19
2.1.1 Histologia Óssea.....	19
2.1.2 Anatomia Óssea.....	21
2.2 Dinâmica do Tecido Ósseo	22
2.2.1 Osteogênese no Processo de Regeneração.....	22
2.3 Plasma Rico em Plaquetas.....	23
2.4 Fatores de Crescimento	25
2.5 Substitutos Ósseos.....	26
2.6 Cimento de Alfa-Fosfato de Tricálcio.....	28
3 JUSTIFICATIVA	30
4 HIPÓTESES	31
4.1 Hipótese Operacional	31
4.2 Hipótese Conceitual	31
5 OBJETIVO	32
5.1 Objetivos Primários.....	32
5.2 Objetivos Secundários.....	32
6 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
6.1 Delineamento	33
6.2 Animais e Grupos de Experimentação	33
6.3 Obtenção do Plasma Rico em Plaquetas	34
6.3.1 Contagem de Plaquetas.....	36
6.4 Obtenção do Enxerto Autólogo	36

6.5 Síntese do Cimento α -Fosfato Tricálcico	36
6.6 Procedimentos Cirúrgicos.....	37
6.6.1 Procedimento Anestésico.....	38
6.6.2 Técnica Cirúrgica	38
6.6.3 Pós-operatório	40
6.6.4 Eutanásia.....	41
6.7 Análises Radiográficas	41
6.8 Avaliações Histológicas	43
6.8.1 Remoção e fixação dos fêmures.....	43
6.8.2 Confeção das lâminas histológicas.....	43
6.8.3 Coloração Picrosirius.....	44
6.8.4 Técnica de coloração	44
6.8.5 Análises das Imagens - Histomorfometria.....	44
6.9 Análises Estatísticas	46
6.10 Aspectos Bioéticos	46
7 RESULTADOS	48
7.1 Resultados Clínicos e Cirúrgicos.....	48
7.2 Resultado Contagem Plaquetas.....	48
7.3 Resultados Radiográficos	49
7.4 Resultados Histológicos - Histomorfometria.....	54
8 DISCUSSÃO	60
CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS.....	66
ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS.....	77
ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS	99

ANEXO A. Carta de Aprovação do Comitê de Ética para o Uso de Animais	122
ANEXO B. Procedimento Operacional Padrão	123

1 INTRODUÇÃO

Lesões musculoesqueléticas são consideradas uma das principais causas de dor severa e morbidade em todo o mundo. Esses danos diminuem de maneira substancial a qualidade de vida de pessoas que por eles são acometidas, incluindo a incapacitação física que origina importantes conseqüências econômicas.¹

Conforme Lidgren,² a prevalência de doenças crônicas ortopédicas vem crescendo significativamente devido ao aumento da expectativa de vida da população mundial. Atualmente, entre as origens mais comuns dessas injúrias estão as atividades esportivas e os acidentes de trânsito, gerando grande impacto sócio-econômico e elevando os custos financeiros, evidenciando assim a gravidade desses problemas.

O período compreendido entre 2000 e 2010 foi denominado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como a década dos ossos e articulações, sendo essa uma iniciativa internacional para promover o avanço de pesquisas sobre prevenção, diagnóstico e tratamento.³

Lesões ósseas são originadas através de processos traumáticos, degenerativos e cirúrgicos.⁴ Diferente de outros tecidos, quando lesado, o osso tem a capacidade de retornar à estrutura tecidual original, sem a formação de tecido cicatricial fibroso permanente.⁵ Apesar dessa característica, nos casos onde há grande perda de massa óssea, a regeneração se torna limitada. Os defeitos ósseos são rapidamente preenchidos pelo tecido conjuntivo circunjacente, que possui uma velocidade de proliferação e migração celular maior do que a do tecido ósseo, e cuja matriz extracelular apresenta substâncias que inibem a proliferação de células osteoprogenitoras.⁶ O comprometimento do reparo tecidual faz com que a regeneração óssea necessite de auxílio em várias ocasiões, como em consolidações

retardadas, não-consolidações, fraturas múltiplas ou cominutivas, osteotomias, artrodeses e no preenchimento de cavidades ou defeitos segmentares extensos.⁷

Entre as alternativas mais utilizadas no tratamento de lesões ósseas, os transplantes autólogos são considerados atualmente o padrão ouro. Isso se deve, principalmente, por sua capacidade de osteocondução, osteoindução e imunocompatibilidade. O enxerto de osso autólogo, contudo, apresenta limitações como a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica, possível morbidade e escassez de tecido doador.⁸ Comumente, também são usados osso alogênico, xenogênico e sintéticos como materiais para enxertia. No entanto, possuem inconvenientes individuais que comprometem sua eficácia; assim, nenhum é capaz de satisfazer totalmente às demandas clínicas.⁹

Uma matriz que restabeleça estruturalmente e funcionalmente o defeito ósseo vem sendo o objetivo de diversos pesquisadores. A finalidade principal dessas investigações é a obtenção de estímulo osteogênico e a substituição de tecidos ósseos lesados por diferentes patologias ou danos ortopédicos e odontológicos.^{10,11}

O objetivo deste estudo foi avaliar a regeneração óssea utilizando o cimento de α -TCP granulado e o PRP, aplicados em conjunto ou isoladamente em defeitos cavitários em ratos, e comparar seus efeitos sobre a osteogênese com o padrão-ouro (enxerto autólogo).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Tecido Ósseo

O osso é um tecido dinâmico e metabolicamente ativo que depende de um contínuo processo de renovação e reabsorção para desempenhar adequadamente suas funções.¹² Fornece suporte estrutural e proteção a órgãos, além de ser o principal depósito de cálcio e fosfato do organismo. Esses minerais são essenciais na regulação do pH corporal, bem como na transmissão e condução de impulsos elétricos em nervos e músculos.¹³ O tecido ósseo pode ser classificado de acordo com sua morfologia histológica e anatômica.

2.1.1 Histologia Óssea

O osso é um tipo de tecido conjuntivo especializado constituído por células, água e matriz óssea, sendo essa composta por uma parte orgânica (35%) e outra mineral (65%).¹⁴

A matriz extracelular orgânica representa 30% da massa óssea e é formada principalmente por colágeno tipo I (90%), sendo o restante (10%) composto por proteínas não colágenas, das quais se destacam as proteoglicanas e glicoproteínas. As fibras colágenas apresentam-se como um arranjo ordenado alternando sua orientação. Entre as proteínas não colagenosas estão a osteocalcina, osteopontina, osteonectina e sialoproteína óssea, cada uma exercendo atividades específicas durante a mineralização.¹⁵ A matriz inorgânica ou mineral representa 70% do peso total do osso e é composta por cálcio e fósforo altamente organizados em uma estrutura na

forma de cristais de hidroxiapatita – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.¹⁶ A deposição de hidroxiapatita ocorre ao longo das fibras colágenas em locais específicos, através de um processo associativo com participação de proteínas não colágenas. Outros íons como sódio, potássio, magnésio e flúor também estão presentes no tecido ósseo, porém em menores quantidades.^{15,17}

As principais células que compõe o osso são os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, fundamentais desde o processo de osteogênese até a remodelação.¹⁴

Osteoblastos são células cuboidais responsáveis pela síntese, glicosilação e secreção de proteínas, atuando constantemente na reposição da matriz óssea.¹⁵ São componentes indispensáveis para a mineralização óssea, apresentando grande capacidade de concentrar fosfato de cálcio. Linhagens osteoblásticas originam-se a partir de células mesenquimais pluripotentes presentes na medula óssea, as quais são também precursoras de miócitos, adipócitos, fibroblastos e condroblastos.¹⁸

Os osteoblastos secretam também fatores de crescimento envolvidos na ossificação, em especial os membros da família de proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs).¹⁵ A membrana plasmática dessas células é altamente enriquecida com uma isoforma específica para o osso da enzima fosfatase alcalina. Essa enzima participa da mineralização óssea através da catalisação da hidrólise do pirofosfato.¹⁹

O osteoclasto é a principal célula envolvida na reabsorção do osso. Ele deriva de precursores da linhagem celular monócito-macrófago da medula óssea, que desvia para uma via progenitora osteoclástica. É uma célula gigante, altamente móvel e multinucleada, possuindo mais de 30 núcleos.¹⁵

Após aderir à matriz, os osteoclastos geram um ambiente ácido capaz de promover a reabsorção óssea. Essas células desempenham uma função essencial na remodelação do tecido a partir da remoção da matriz extracelular em vários locais, sendo posteriormente substituída por novo osso.¹⁵

Outro importante tipo celular da linhagem óssea são os osteócitos, que são derivados dos osteoblastos maduros após a matriz óssea sofrer mineralização. Essas células residem em lacunas no interior da matriz óssea e são fundamentais na integridade da mesma, porém com menor atividade metabólica.¹⁷

Os osteócitos interconectam-se através de longos prolongamentos que atravessam os canalículos ósseos, estando relacionados com a transferência de íons,

principalmente de cálcio e fósforo, do interior para o exterior das unidades ósseas e para o líquido extracelular.¹⁷

2.1.2 Anatomia Óssea

Macroscopicamente o osso é dividido em dois tipos de tecidos: o trabecular (esponjoso) e o cortical (compacto). O osso trabecular representa 20% da massa óssea total, delimitando os espaços intertrabeculares. Esses espaços são preenchidos por medula óssea vermelha ou, após o amadurecimento, por medula óssea amarela. Devido à sua maior superfície em relação ao volume, o osso trabecular é metabolicamente mais ativo que o cortical.¹³

O osso cortical é mais rígido, bem vascularizado e mineralizado, correspondendo a 80% da massa óssea. É formado por lamelas ósseas concêntricas que se localizam ao redor de um canal vascular central. O conjunto desses canais é denominado sistema de Harvers ou ósteon. Os canais centrais contendo os nervos e vasos sanguíneos comunicam-se entre si e com a cavidade medular óssea por meio dos canais de Volkmann. O osso compacto é encontrado nas diáfises de ossos longos e nas superfícies externas de ossos chatos, tendo como uma das principais funções, devido à sua rigidez, fornecer suporte ao organismo.¹³

Os ossos longos são subdivididos em epífise, que possui uma camada de osso cortical envolvendo uma porção de osso trabecular, e diáfise, caracterizada por apresentar uma camada espessa de osso cortical. A região de transição entre as duas porções corresponde à metáfise. O espaço trabecular é praticamente envolvido pela cavidade medular. Protegendo externamente o osso existe uma fina camada de tecido conjuntivo com grande potencial osteogênico, chamada de periósteo. Da mesma forma, porém internamente, essa existe uma camada denominada endósteo.¹⁷

2.2 Dinâmica do Tecido Ósseo

2.2.1 Osteogênese no Processo de Regeneração

Ao contrário de alguns tecidos que se reparam pela formação de um tecido fibroso permanente, o osso tem grande capacidade de regeneração. Essa habilidade é atribuída, essencialmente, à atividade dos osteoblastos e dos osteoclastos.¹²

Os osteoblastos secretam sua matriz e formam tecido ósseo através de dois processos distintos de ossificação: intramembranosa e endocondral. A ossificação intramembranosa provém de um tecido mesenquimal vascularizado, ocorrendo quando o segmento ósseo está estabilizado mecanicamente, ou durante o desenvolvimento de alguns ossos crânio-faciais e partes da clavícula. As células mesenquimais diferenciam-se diretamente em células osteoprogenitoras e, posteriormente, em osteoblastos.^{15, 17}

A ossificação endocondral ocorre na presença de um ambiente biomecanicamente instável, ou no desenvolvimento de ossos longos e vértebras. O tecido ósseo é formado por intermédio de uma matriz contendo componentes característicos da cartilagem quando a área é pouco vascularizada. A proliferação dos condrócitos contribui para o crescimento de precursores ósseos.²⁰

O processo de reparo ósseo ocorre através de uma seqüência de eventos que inicia com migração de células indiferenciadas através de quimiotaxia, proliferação e diferenciação de células da linhagem óssea, formação e mineralização da matriz óssea e remodelação.²¹

Segundo Einhorn,²² baseado em um modelo experimental, a cicatrização de uma fratura envolve uma combinação dos dois tipos de ossificação: intramembranosa e endocondral. A ossificação intramembranosa inicia sob o perióstio em poucos dias após a lesão. Os eventos da ossificação endocondral ocorrem adjacentes ao local danificado e estende-se por um período acima de 28 dias.

Na fase inicial da fratura, forma-se um coágulo pela hemorragia local provocada pela lesão do perióstio e dos vasos sanguíneos. O hematoma formado é uma fonte de moléculas sinalizadoras que vão dar início a uma cascata de eventos

celulares importantes para a cicatrização.^{23, 24} Sem o processo inflamatório não seria possível o reparo ósseo. As moléculas sinalizadoras mais envolvidas no controle da cascata inflamatória, são a interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6),²⁵ além de fatores tróficos, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento de transformação beta (TGF- β), liberados pelas plaquetas.²³

As células inflamatórias, fibroblastos e células-tronco são atraídos para o local da fratura, seguindo com a degradação da matriz e morte das células ósseas. O coágulo formado, *debris* celulares e resíduos da matriz óssea são reabsorvidos e um tecido conjuntivo começa a se proliferar principalmente através de células do periósteo.¹⁷

Devido à baixa pressão de oxigênio na porção externa da lesão, o processo de formação óssea inicia através da diferenciação de células osteoprogenitoras em condroblastos, formando cartilagem. Posteriormente, a cartilagem sofre calcificação, sendo gradualmente absorvida e substituída por tecido ósseo (ossificação endocondral), formando um calo ósseo. Esse calo é constituído por osso imaturo e desordenado, o qual une temporariamente as extremidades do osso fraturado. Simultaneamente a esse processo ocorre a ossificação intramembranosa, caracterizada pela diferenciação direta de células indiferenciadas em osteoblastos. Após a reabsorção do calo ósseo, o osso é remodelado, retornando à sua estrutura original.^{17, 22}

2.3 Plasma Rico em Plaquetas

O plasma é a fração líquida do sangue que contém sais minerais e compostos orgânicos, como aminoácidos, lipídios, vitaminas, proteínas e hormônios. Na ausência de anticoagulantes, os elementos celulares do sangue juntamente com proteínas plasmáticas, principalmente o fibrinogênio, formam um coágulo sanguíneo, componente importante na cicatrização de tecidos danificados.¹⁵

As plaquetas são células anucleadas, presentes no plasma sanguíneo, derivadas de fragmentos citoplasmáticos de megacariócitos formados na medula. São caracterizadas por possuir forma redonda ou oval com dimensões de aproximadamente 2 μ m de diâmetro. Embora as plaquetas sejam anucleadas,

apresentam organelas e estruturas como mitocôndrias, microtúbulos e grânulos (α , δ e λ).^{15, 17}

A concentração plaquetária normal no plasma sanguíneo humano varia de 140.000 a 400.000 plaquetas/mm³. As plaquetas permanecem na circulação, em média, por dez dias. Posteriormente, são removidas por macrófagos.²⁶

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um hemoderivado autólogo, caracterizado como um pequeno volume de plasma com uma concentração plaquetária de três a oito vezes acima dos níveis fisiológicos. É conhecido por ser uma fonte autóloga de fatores de crescimento, consistindo em um tratamento alternativo de baixo custo para diversas aplicações clínicas.^{27, 28} Por ser um material autólogo, o PRP está naturalmente livre de doenças transmissíveis como HIV e hepatite,²⁹ bem como de reações de histocompatibilidade.

A utilização do PRP é de grande interesse de áreas que utilizam enxertos ósseos, demonstrando ser benéfico na regeneração de cartilagem³⁰ e de osso.³¹ Quando ativadas em resposta aos danos teciduais, as plaquetas formam um coágulo sanguíneo que proporciona a hemostase.³² O PRP age via degranulação dos grânulos alfa das plaquetas, os quais são responsáveis pela liberação dos fatores de crescimento e de diversas proteínas bioativas. Esses componentes protéicos desempenham importantes funções biológicas em distintos eventos fisiológicos, incluindo o reparo de tecidos lesados.³³

As proteínas liberadas pelas plaquetas criam um microambiente favorável à cicatrização de tecidos, induzindo a quimiotaxia, proliferação, diferenciação celular e remoção de restos teciduais.^{26, 29}

Segundo Marx,²⁹ o PRP libera uma combinação de sete fatores de crescimento que tem como carreador o próprio coágulo sanguíneo. Entre esses fatores podemos citar três isoformas de PDGF, fator de crescimento de transformação alfa (TGF- α) e TGF- β , fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e fator de crescimento epitelial (EGF). O PRP contém, ainda, proteínas que atuam como moléculas de adesão celular, que favorecem a osteocondução, além de serem essenciais na constituição da matriz óssea. As principais moléculas de adesão são a fibrina, fibronectina e vitronectina.²⁹

Uma correlação linear tem sido apresentada na literatura entre a quantidade de plaquetas presentes no PRP e os níveis de fatores de crescimento.^{34,35} Esses dados corroboram a afirmação de que o PRP é considerado uma fonte autóloga desses fatores.^{27,36} Ressalta-se que a diferenciação dos osteoblastos é mediada principalmente por fatores de crescimento e de transcrição como, por exemplo, os membros da família de BMPs e TGF- β .¹⁵

2.4 Fatores de Crescimento

No tecido ósseo encontram-se alguns fatores de crescimento que são essenciais para o seu reparo e manutenção. Entre os principais fatores envolvidos diretamente nesses processos, além da BMP, TGF- β e PDGF, estão incluídos o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e VEGF.^{37,38}

O TGF- β é um peptídeo multifuncional que controla a proliferação, diferenciação e outras funções de diversos tipos de células. É integrante da superfamília de Fatores de Crescimento Transformador, cujos membros exercem função inibitória ou estimulatória sobre as células, dependendo do estágio de diferenciação celular.³⁹ Os componentes dessa superfamília são particularmente importantes na diferenciação, crescimento e remodelação condrogênica e osteogênica.^{40, 41}

TGF- β está presente no osso e nas plaquetas numa proporção em torno de 100 vezes maior do que nos demais tecidos ⁴² e é liberado pelas próprias plaquetas sob forma latente. Desta forma, exerce um efeito prolongado uma vez que é mantido dentro da matriz de fibrina. Esse fator é ativado através de hidrólises que ocorrem durante a dissolução da fibrina.⁴³

A angiogênese é fundamental para aumentar a distribuição de oxigênio e nutrientes necessários no processo reparatório de danos ósseos.⁴⁴ O VEGF, um potente fator de crescimento angiogênico, vem sendo amplamente aplicado como uma alternativa terapêutica na restauração de tecidos vascularizados,⁴⁵ por induzir fisiologicamente a formação de vasos novos sanguíneos.⁴⁶

Segundo Zelzer et al.,⁴⁷ o VEGF endógeno é importante durante a ossificação endocondral. A expressão dessa proteína é percebida antes mesmo que os vasos sanguíneos sejam detectados no desenvolvimento dos ossos em camundongos, estando fortemente associada aos osteoblastos. A inibição do VEGF conduz à expansão da zona hipertrófica, perda de vascularização metafisária e formação danificada de osso trabecular em camundongos,⁴⁸ e primatas⁴⁹, sendo extremamente essencial para a vascularização tecidual.

O PDGF é uma proteína glicolítica liberada pelas plaquetas e por outras células que estimula o crescimento de células de origem mesenquimal, como por exemplo, cartilagem óssea, tecido vascular e tecido conjuntivo. O PDGF tem um alto potencial mitogênico e quimiocinético, desempenhando importante função na promoção da regeneração tecidual através do estímulo de fibroblastos, osteoblastos e condrócitos.⁴

O IGF é um polipeptídeo com alta similaridade estrutural à pró-insulina, compartilhando 49% de homologia.⁵⁰ A matriz óssea, assim como células tronco mesenquimais (CTM), osteoblastos, condrócitos e macrófagos são responsáveis pela liberação de IGF. Esse fator de crescimento é uma molécula mitogênica que está envolvida na diferenciação de CTM e células de linhagens condrogênicas e osteogênicas.³⁸ O IGF-1 mostrou-se eficaz na formação óssea em defeito crítico em osso calvária de ratos irradiados.⁵¹

2.5 Substitutos Ósseos

Diante da necessidade de manter ou auxiliar a capacidade reparadora do osso, os substitutos ósseos são amplamente utilizados como biomateriais, agregados ou não a matrizes biológicas osteoindutoras, na ortopedia e odontologia.⁵² Biomateriais são substâncias de origem natural ou sintética que são toleradas de forma transitória ou permanente quando implantadas em diversos tecidos ou órgãos que compõe os seres vivos.⁵³

Osteogênese, osteoindução e osteocondução, juntamente com a ligação entre o osso hospedeiro e o material de enxertia (osteointegração), são elementos fundamentais na regeneração óssea.⁵⁴ Portanto, os substitutos ósseos devem

apresentar características como biocompatibilidade, atoxidade e resistência à deformação, além da resistência ou não à reabsorção de acordo com a aplicação desejada. Caso esses materiais sejam reabsorvíveis, devem ser metabolizados pelo organismo ou excretados por vias fisiológicas naturais.^{55, 56}

Conforme Hench e Wilson,⁵⁷ os biomateriais podem ser classificados de acordo com seu comportamento fisiológico como:

Biotoleráveis – São apenas tolerados pelo organismo, sendo isolados dos tecidos adjacentes por uma camada envoltória de tecido fibroso. O material induz a formação dessa camada através da liberação de compostos químicos, íons e produtos de corrosão. Os polímeros sintéticos e os metais constituem a maior parte dos materiais biotoleráveis.

Bioinertes – Materiais também tolerados pelo organismo, sendo mínima a formação da camada de fibrose. Os mais utilizados são alumina, zircônia, ligas de titânio e carbono.

Bioativos – Quando os materiais estabelecem ligações de natureza química com o tecido (osteointegração) sem formação intermediária de tecido conjuntivo. Em função da similaridade química entre esses materiais e a parte mineral do osso, os tecidos ósseos se ligam a ele por meio do revestimento por células ósseas. Os principais materiais dessa classe são os vidros e vitrocerâmicas à base de fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita (HA) e os compostos de fosfato de cálcio.

Bioabsorvíveis – São os materiais que ao entrarem em contato com os tecidos, após determinado período de tempo, acabam sendo degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo, como o fosfato tricálcico (TCP) e o poli (ácido lático).

Enxertos autólogos, também denominados autógenos ou auto-enxertos são obtidos através da remoção de tecido do próprio indivíduo. Podem ser constituídos por osso cortical ou medular e de diferentes regiões do organismo, como calota craniana, fibula, tíbia e crista íliaca, sendo um dos mais utilizados.⁵⁸ Dentre as vantagens na sua aplicação estão a imunocompatibilidade, o alto potencial de osteocondução e suas propriedades osteogênicas, o que o torna padrão ouro.⁵⁴

O enxerto autólogo, porém, apresenta importantes desvantagens, especialmente quanto à quantidade limitada de tecido doador, a necessidade de uma nova intervenção cirúrgica e aumento de morbidade. Além de resultar em despesas maiores e trauma adicional ao paciente, sua aplicação também está associada com aproximadamente 20% de complicações pós-cirúrgicas, como formação de hematoma e hérnia, perda de sangue, lesões nervosas e vasculares, infecção, fratura, instabilidade pélvica, defeitos estéticos e ocorrências de dor crônica no sítio doador.⁵⁹⁻⁶³ Nesse contexto, diversos pesquisadores vêm buscando um substituto ósseo que seja eficaz, com relativo baixo custo, e que possa satisfazer às necessidades clínicas. Atualmente, muitos materiais vêm sendo investigados com a finalidade de serem aplicados na substituição e reparo ósseos, incluindo cerâmicas, polímeros e metais.⁶⁴⁻⁶⁷ Devido à composição do tecido ósseo apresentar 70% de componentes inorgânicos e 30% orgânicos (principalmente apatita e colágeno), as cerâmicas são os materiais mais utilizados na regeneração de tecido ósseo.⁶⁸

2.6 Cimento Alfa-Fosfato de Tricálcico

Entre os diversos biomateriais utilizados para o tratamento de danos ósseos, os cimentos de fosfato de cálcio (CFC) vêm despertando grande interesse dos pesquisadores desde a década de 80. CFCs são constituídos por um pó (sal de fosfato de cálcio) e um líquido, que ao serem misturados formam uma pasta que endurece espontaneamente à temperatura ambiente ou corporal como resultado da precipitação de fosfatos de cálcio.⁶⁹

Apesar da existência de diversos sistemas de CFC estudados, os baseados em alfa-fosfato tricálcico (α -TCP) são de especial interesse em função de sua obtenção ocorrer durante a reação de pega de uma fase de hidroxiapatita (HA) deficiente em

cálcio, similar à hidroxiapatita óssea: $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5\text{OH}$. A hidroxiapatita favorece o crescimento ósseo em locais nos quais ela está presente, estabelecendo ligações de natureza química entre a hidroxiapatita e o tecido ósseo (bioativo), permitindo a proliferação de fibroblastos, osteoblastos e outras células ósseas, sendo que as células não distinguem entre a hidroxiapatita e a superfície óssea, o que é uma indicação de alta similaridade química superficial.⁷⁰

O α -TCP apresenta pH entre 6,5 e 8,0 e à temperatura corporal há um aumento de sua resistência mecânica durante a pega, quando comparadas às obtidas em temperatura ambiente. Tal característica é devido à elevação da velocidade da reação de pega.⁵⁶

Embora a maioria dos fatores de crescimento seja transportada por carreadores produzidos a partir de polímeros naturais ou sintéticos, materiais inorgânicos se tornaram uma alternativa para transportar proteínas e outras drogas, sendo amplamente utilizados no favorecimento do crescimento ósseo em lesões musculoesqueléticas. Esses materiais são sintetizados com a finalidade de veicular fatores de crescimento. O CFC se caracteriza por apresentar um grande potencial como carreador na engenharia de tecido ósseo, devido à sua biocompatibilidade, degradação e osteocondutividade. O CFC forma HA em ambientes fisiológicos através de processos miméticos, sendo muito semelhante à apatita biológica, o que lhe atribui comportamento osteocondutivo. Este tipo de biomaterial possui efeitos sinérgicos sobre a osteogênese quando usado como carreador para fatores de crescimento.^{4, 56}

Em estudo experimental com um cimento bifásico (85% α -TCP e 15% beta fosfato ricálcico - β -TCP), verificou-se através de exames radiográficos, após três meses de implantação, que o α -TCP transformou-se em hidroxiapatita. A avaliação histológica demonstrou que a presença do cimento estimulou o crescimento ósseo quando comparado ao controle sem cimento.⁷¹

Segundo Santos,⁵⁶ a inserção de fibras poliméricas na composição do α -TCP aumenta a resistência à tração e a tenacidade à fratura do cimento, com valores próximos aos do osso cortical humano. Na avaliação biológica *in vivo* e *in vitro* demonstrou a característica de biocompatibilidade dos compostos obtidos, ampliando as possíveis aplicações médicas e odontológicas no reparo de defeitos ósseos.

3 JUSTIFICATIVA

Faz-se necessária a busca por alternativas que sejam eficazes no reparo de lesões que não cicatrizam espontaneamente. Essa busca tem como objetivo otimizar a regeneração óssea através de tratamentos eficientes, de baixo custo, de fácil manipulação e que sejam minimamente invasivos. Os materiais inorgânicos são amplamente utilizados na Medicina e Odontologia. Entretanto, seus resultados ainda não são completamente satisfatórios, o que estimula a contínua procura por alternativas que possam agregar o uso desses materiais a componentes biológicos. A combinação de cimento de alfa-fosfato tricálcico com plasma rico em plaquetas pode ser um tratamento eficaz, pois ambos apresentam características biocompatíveis e osteoindutoras, podendo ser um auxílio no processo de reparo ósseo.

4 HIPÓTESES

4.1 Hipótese Operacional

Não existe diferença, quanto à formação de matriz óssea mineralizada, entre a utilização ou não de cimento de alfa-fosfato tricálcico (α -TCP) acrescido de plasma rico em plaquetas (PRP) no reparo de defeito cavitário em fêmur de rato.

4.2 Hipótese Conceitual

Existe diferença entre a utilização ou não de cimento α -fosfato tricálcico acrescido de plasma rico em plaquetas.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Primário:

Avaliar o efeito do cimento de alfa-fosfato tricálcico (α -TCP) junto ao plasma rico em plaquetas (PRP) no reparo de defeito cavitário em fêmur de rato.

5.2 Objetivos Secundários:

1. Comparar o efeito sobre a regeneração óssea de ambos os tratamentos quando utilizados isoladamente ou combinados, analisando se existe diferença entre as duas formas.
 2. Comparar os tratamentos com um padrão-ouro de reparo ósseo (enxerto autólogo).
 3. Comparar os tratamentos com um controle negativo (sem preenchimento).
 4. Analisar as imagens radiográficas e a histomorfometria das amostras de tecido regenerado nos diferentes grupos.
-

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Delineamento

Estudo experimental, controlado, comparado e cego.

6.2 Animais e Grupos de Experimentação

Foram utilizados 34 ratos (*Rattus norvegicus*) da raça Wistar e linhagem Kyoto, machos, adultos com 250 gramas de massa corporal, dos quais 4 foram utilizados como doadores de sangue para obtenção do PRP, e de osso para o enxerto autólogo. Os outros 30 animais foram usados na realização do experimento. A linhagem Kyoto foi escolhida por ser representada por animais isogênicos, evitando assim possíveis reações imunogênicas.

Os ratos eram provenientes do Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica da PUCRS. Os animais foram mantidos com controle de luz (ciclo claro-escuro de 12h), à temperatura controlada de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, com água e alimentação *ad libitum*, antes e após os procedimentos cirúrgicos.

Os 30 ratos utilizados no experimento foram distribuídos randomicamente em 2 grupos de acordo com o período de avaliação, 4 e 8 semanas. Devido à adoção de um modelo de lesão bilateral, o número de unidades experimentais (lesão) foi o dobro do número de animais utilizados (Tabela 1).

Tabela 1 – Descrição dos grupos experimentais de acordo com período de avaliação.

Grupo	Descrição
4 semanas	15 ratos com 30 unidades experimentais, sendo 2 por cada espécime
8 semanas	15 ratos com 30 unidades experimentais, sendo 2 por cada espécime

6.3 Obtenção do Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

Utilizaram-se 4 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 (5mg.kg^{-1}) na mesma seringa. Seis mililitros de sangue foram puncionados da artéria carótida de cada animal (Figura 1) e imediatamente transferidos para tubos contendo solução de ácido citrato dextrose-A (ACD-A) para evitar a coagulação.

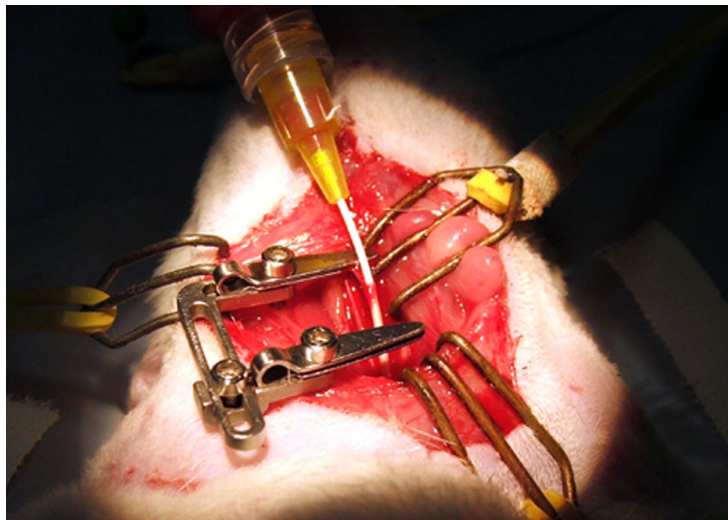


Figura 1. Abordagem cirúrgica da artéria carótida do rato doador, para punção do sangue e posterior obtenção do plasma rico em plaquetas.

O sangue foi centrifugado por 10 minutos a 200G (temperatura ambiente) em uma centrífuga hematológica CELM – LS 3 PLUS no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital São Lucas da PUCRS (HLS), conforme protocolo adaptado.⁷² Subseqüentemente, a fração de plasma, plaquetas e leucócitos (porção superior até o limite de névoa) foi pipetada cuidadosamente e transferida para um novo tubo.

Uma segunda centrifugação foi efetuada por mais 10 minutos a 400G, resultando no plasma pobre em plaquetas (PPP), no PRP e um pequeno botão de hemácias no fundo do tubo (Figura 2). O PPP foi retirado do tubo e descartado.

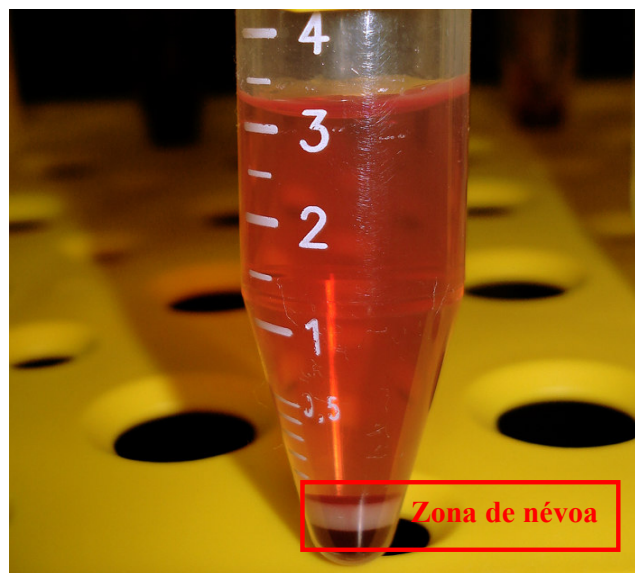


Figura 2. Sangue do rato após 2ª centrifugação para a obtenção do PRP. Porção superior à zona de névoa corresponde ao plasma pobre em plaquetas e porção inferior ao botão de hemácias. Na zona de névoa estão depositadas as plaquetas e os leucócitos, que após serem ressuspensos e ativados dão origem ao gel de PRP.

O PRP foi pipetado e colocado em outro tubo, onde foi ativado com cloreto de cálcio (CaCl_2) e trombina misturados (600 IU/mL de trombina em 1mL de CaCl_2 5,9mg/mL –Aventis Behring, São Paulo/BR) na proporção 1:2 de PRP. O gel de PRP foi aplicado isoladamente e misturado ao cimento de α -TCP granulado, na

quantidade de 100µL para cada animal, imediatamente após a lesão óssea. Alíquotas de PRP e sangue normal foram encaminhadas para posterior contagem de plaquetas.

6.3.1 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.

6.4 Obtenção do Enxerto Autólogo

Os mesmos ratos utilizados como doadores para a aquisição do plasma rico em plaquetas foram usados na obtenção do enxerto autólogo. Desses animais, retirou-se fragmentos do osso ilíaco, sendo posteriormente particulados e aplicados como enxerto autólogo.

6.5 Síntese do Cimento de α -Fosfato Tricálcico Granulado

O α -TCP granulado utilizado nesta pesquisa foi sintetizado e fornecido pelo Laboratório de Biomateriais (LABIOMAT) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, sendo constituído por 85% α -TCP e 15% de sulfato de cálcio hemiidratado. Tal cimento de fosfato de cálcio possui um sistema de presa hidráulica dupla. A presa inicial é obtida pela reação de hidratação do sulfato de cálcio ($\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e a presa final dada pela reação de hidratação do α -fosfato tricálcico ($\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5\text{OH}$), que produz hidroxiapatita deficiente em cálcio, similar à hidroxiapatita biológica. Em ambos os casos, o material reagido produz cristais em forma de agulhas que travam a estrutura e proporcionam resistência mecânica.

O sulfato de cálcio hemihidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$) foi adicionado à composição de cimento de fosfato de cálcio objetivando-se: 1) obtenção de composições com tempo de presa inicial e final reduzidos; 2) melhoria dos valores de pH das composições isentas de sulfato de cálcio que possuem valores ligeiramente ácidos para aplicações clínicas; 3) solubilização *in vivo* do sulfato de cálcio dihidratado, gerando poros no cimento que facilitam a osteocondução dos tecidos. O material desenvolvido é parte dos resultados da tese de doutoramento de Santos.⁷³

O cimento foi misturado a um líquido contendo 2,5% de Na_2HPO_4 (acelerador de presa) até alcançar a consistência desejada. O cimento endurecido foi grosseiramente moído em almofariz de porcelana e passado em peneiras de aço inoxidável padronizadas de forma a obter grânulos entre 150 a 300 μm , sendo que a quantidade aplicada em cada animal foi de 50 mg (Figura 3).



Figura 3. Cimento de alfa-fosfato tricálcico (α -TCP) em grânulos entre 150 e 300 μm .

6.6 Procedimentos Cirúrgicos

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

6.6.1 Procedimento Anestésico

Foi administrada anestesia com solução constituída por Cloridrato de Cetamina (50mg.kg^{-1}) e Clorpromazina (5mg.kg^{-1}) na mesma seringa via intraperitoneal por profissional capacitado. A manutenção anestésica foi empregada com a mesma associação, porém na metade da dose de indução.

6.6.2 Técnica Cirúrgica

Após a realização da tricotomia na área de acesso cirúrgico (face lateral da coxa esquerda e direita), os animais foram posicionados em decúbito lateral, sendo realizada incisão na pele de aproximadamente 1,5 cm. Os músculos reto lateral e bíceps da coxa foram divulsionados e o fêmur foi exposto (Figura 4).

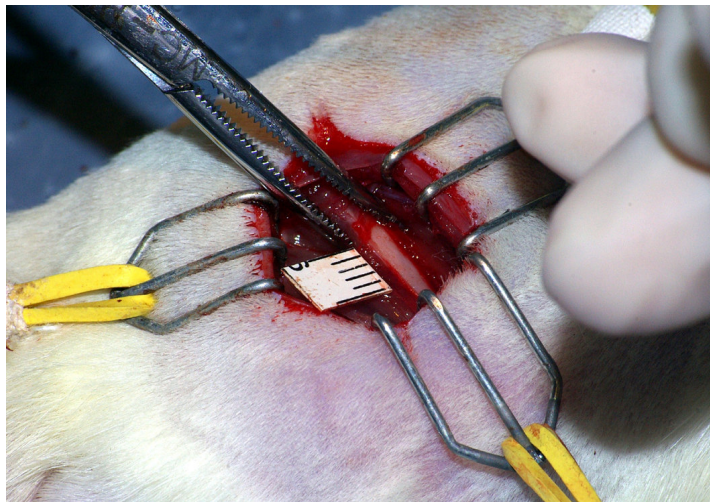


Figura 4. Exposição do fêmur e localização da região para criação do defeito de 5mm.

Na porção antero-lateral da diáfise proximal do fêmur, foi criado um defeito cavitário (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 mm X 2 mm) com profundidade suficiente para expor a cavidade medular do fêmur,⁷⁴ tomando especial cuidado para não comprometer a cortical medial, diminuindo assim a possibilidade de fratura do fêmur no pós operatório (Figura 5).

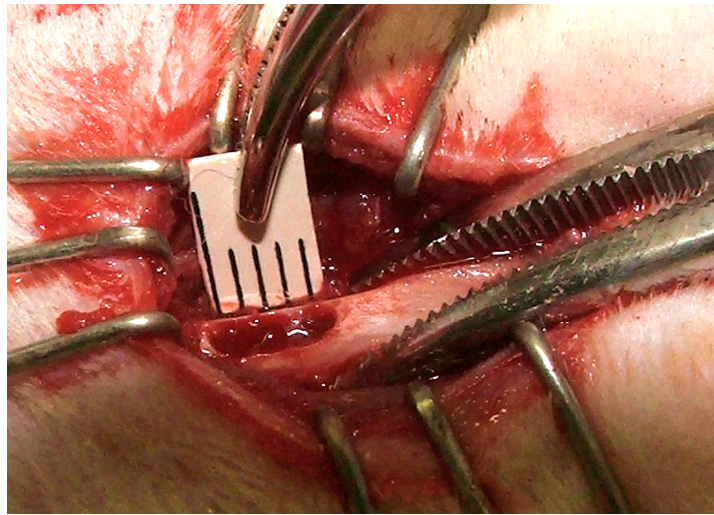


Figura 5. Lesão cavitária no fêmur do rato, com dimensões de 5mm de comprimento realizada com broca Carbide nº 8.

Cada cavidade criada (nos fêmures direito ou esquerdo) foi preenchida com um dos 4 tipos de tratamentos (enxerto autólogo - padrão ouro; cimento de alfa-fosfato tricálcico granulado (α -TCP); plasma rico em plaquetas; cimento de α -TCP granulado e PRP combinados). No grupo controle não foi aplicado nenhum preenchimento após a lesão.

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

O número de animais utilizados e a distribuição dos tratamentos seguiram o princípio da redução (minimizar o número de animais experimentais). Portanto, quando o PRP foi requerido planejou-se agrupar os animais que receberam este

tratamento numa mesma data cirúrgica, considerando que para a obtenção de uma quantidade de plasma suficiente era necessário o sacrifício de outro animal isogênico, doador do volume total de sangue.

Os animais nos quais o defeito cavitário foi preenchido com cimento de α -TCP granulado+PRP, receberam no outro lado o tratamento com PRP isolado. A aplicação de PRP em ambos os lados teve a finalidade de tentar evitar um possível efeito do PRP sobre o processo de osteogênese no lado contralateral.

Assim, a distribuição dos grupos experimentais ficou constituída conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Distribuição dos animais conforme aplicação dos tratamentos.

Grupo	Número de ratos	Fêmur direito	Fêmur esquerdo
4 semanas	6	Cimento α -TCP + PRP	PRP
	3	Cimento α -TCP	Enxerto autólogo
	3	Cimento α -TCP	Controle
	3	Enxerto autólogo	Controle
8 semanas	6	Cimento α -TCP + PRP	PRP
	3	Cimento α -TCP	Enxerto autólogo
	3	Cimento α -TCP	Controle
	3	Enxerto autólogo	Controle

6.6.3 Pós-operatório

Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais após as cirurgias no mesmo laboratório de origem. Para analgesia, foi aplicado cetoprofeno via subcutânea (5mg/kg^{-1}) a cada 24h por dois dias. Os animais foram monitorizados durante o pós-operatório imediato por uma equipe cirúrgica.

6.6.4 Eutanásia

Após 4 e 8 semanas os animais experimentais foram anestesiados e eutanasiados com dose letal de Tiopental 100mg.kg^{-1} através de injeção intracardiaca.

6.7 Análises Radiográficas

No dia anterior à eutanásia dos animais foram realizadas radiografias de todos os fêmures. Para a obtenção das imagens, os animais foram anestesiados e posicionados em decúbito ventral (Figura 6), sendo utilizado o equipamento mamográfico Mamomat 3000 (Siemens®) (Figura 7). Foram usados transdutores de imagens Image Plate (IP) (Fuji®), específicos para mamografia.



Figura 6. Rato anestesiado em posição ventral no equipamento para captura das imagens radiográficas dos fêmures dos ratos.



Figura 7. Equipamento mamográfico Mamomat 3000 (Siemens®) disponibilizado pelo setor de mamografia do Hospital São Lucas da PUCRS, para a obtenção das radiografias do fêmur dos ratos.

A técnica radiográfica consistiu em uma combinação alvo-trilha Molibdênio-Molibdênio (Mo-Mo), tensão aceleradora de tubo 28 kVp e carga transportada no tubo de 14 mAs (técnica ajustada para a visualização da lesão cavitária no fêmur de ratos). Após a leitura dos IP, as imagens foram salvas em formato dicom, sendo identificado o grupo e número de cada rato, bem como a semana de avaliação (4^a ou 8^a semanas).

As avaliações das imagens radiográficas digitalizadas foram realizadas por examinador devidamente capacitado e experiente, com o auxílio do programa Image J.

Para garantir a reprodutibilidade do processo de análise das imagens, foi desenvolvido um Procedimento Operacional Padrão (POP), que pode ser observado no Anexo B e foi 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.

No momento de avaliação de cada lesão foram verificadas a área (mm²) e o comprimento longitudinal da lesão (mm), bem como os valores médios do pixel e

seu respectivo desvio-padrão. O valor “0” (zero) representa a ausência de lesão observada através dos parâmetros acima descritos.

Desta forma, dois tipos de lesões foram verificados: um com imagem clara na lesão, que representa a adição de cimento de α -TCP, cimento de α -TCP + PRP ou enxerto autólogo; e outro com imagem mais escura, correspondente aos demais tratamentos (PRP e controle).

6.8 Avaliação Histológica

6.8.1 Remoção e fixação dos fêmures

Após a eutanásia dos animais, foi efetuada a mesma abordagem cirúrgica para a remoção dos fêmures direito e esquerdo. Seccionou-se o osso com auxílio de uma broca Carbide nº 8, preservando somente o local da lesão com margens de 1mm em cada extremidade do defeito.

As amostras foram imediatamente fixadas em formalina tamponada a 10% por um período de 36 horas. Posteriormente, foram desidratadas com soluções alcoólicas em graduações crescentes, e clarificadas com xilol.

A descalcificação foi realizada com solução de ácido fórmico na concentração de 50% e citrato de sódio a 40%, misturando as duas soluções na proporção de 1:1. As amostras de osso imersas na solução foram mantidas em estufa a 37°C por um período de aproximadamente duas semanas, realizando a troca da solução a cada três dias.

6.8.2 Confeção das lâminas histológicas

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 μ m foram realizados em um micrótomo. As amostras foram desbastadas até a região central da lesão. Foi confeccionada uma lâmina histológica

representativa para cada fêmur, com 3 a 5 cortes em cada.

6.8.3 Coloração Picrosirius

Para a avaliação histológica, utilizou-se a coloração Picrosirius (descrita a seguir), 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. A técnica de coloração Picrosirius em conjunto com a microscopia de polarização constitui um método histoquímico específico para percepção de estruturas compostas por moléculas de colágeno orientadas, evidenciando assim, áreas de matriz óssea. A matriz extracelular orgânica do tecido ósseo abrange 90% de colágeno Tipo I em sua composição.

6.8.4 Técnica de coloração

Após permanecer em estufa a 60°C por 24h, as lâminas foram desparafinizadas (xilol – 2 vezes por 5 minutos; álcool absoluto – 4 vezes por 2 minutos) 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.

Quando secas, as lâminas foram desidratadas em álcool absoluto (4 X por 2 minutos), clarificadas em xilol (2 X por 5 minutos) e montadas com bálsamo de Canadá e lamínula. As lâminas foram codificadas de maneira que o examinador não obtivesse conhecimento sobre a quais grupos pertenciam. Posteriormente foram fotografadas para serem analisadas.

6.8.5 Análise das Imagens - Histomorfometria

A leitura das lâminas foi realizada 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 um 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 (Figuras 8 e 9).

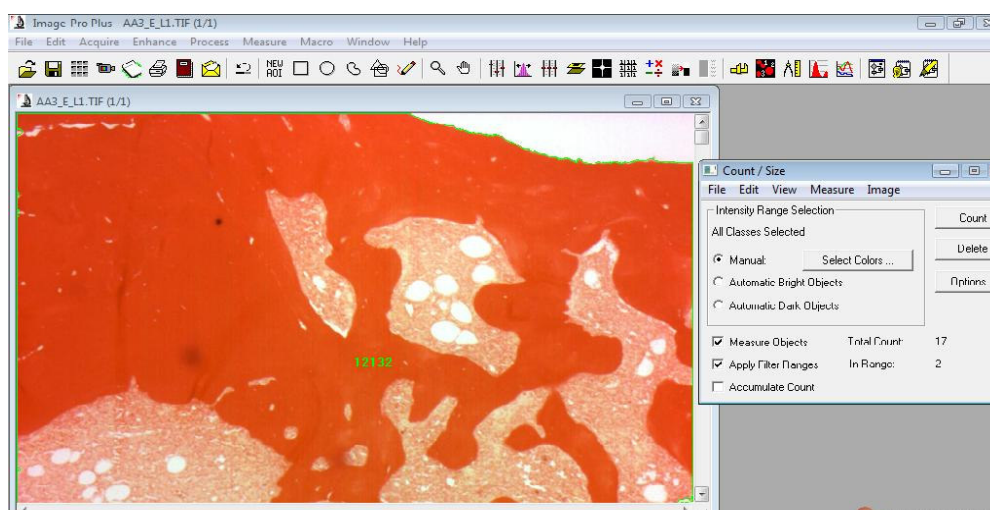


Figura 8. Programa Image ProPlus® usado para medir a área total (circundada pela linha verde) do defeito através da coloração de Picosirius sob luz normal.

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.⁷⁵

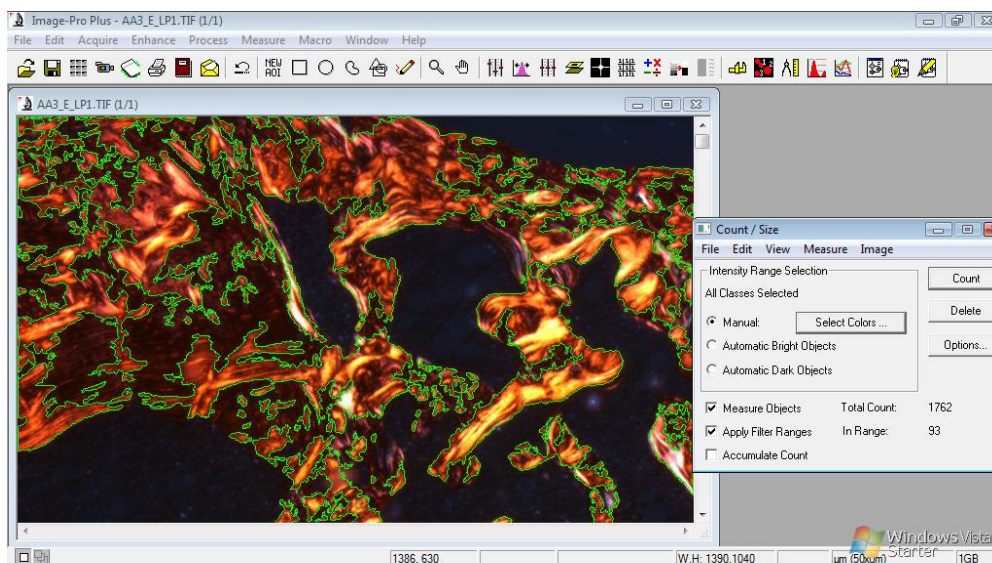


Figura 9. Programa Image ProPlus® usado para medir a área de neoformação óssea (circundada pela linha verde) no defeito através da coloração de Picosirius sob luz polarizada

6.9 Análises Estatísticas

Os dados foram expressos em média e desvio-padrão para variáveis de distribuição normal. Para a comparação 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 $\alpha=0,05$.

6.10 Aspectos Bioéticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, sob o número de protocolo 08/00055 (Anexo A).

Durante o decorrer do experimento, procurou-se respeitar os preceitos de bem-estar dos animais, com os devidos cuidados para mantê-los livres de fome, sede, ausência de dor e doenças. Tentou-se minimizar o número de animais utilizados, seguindo o princípio de redução.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os aspectos legais regidos pela Lei Federal do Brasil nº 6638 de 8 de maio de 1979, e pela Resolução nº 879 de 15 de fevereiro de 2008 do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

Os métodos de eutanásia utilizados neste estudo foram escolhidos de acordo com as normas reguladoras de procedimentos relativos à eutanásia em animais, contempladas na Resolução nº 714 de 20 de junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

7 RESULTADOS

7.1 Resultados Clínicos e Cirúrgicos

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.

7.2 Resultado da Contagem de Plaquetas

O número de plaquetas no sangue normal, antes das centrifugações para obtenção de PRP, foi de 459.000 plaquetas/ μ L e no PRP foi de 3181.000 plaquetas/ μ L. A quantidade de plaquetas confirmou que a técnica de preparação do PRP utilizada no experimento resultou em amostras com altas concentrações de plaquetas, com um número de plaquetas quase 7 vezes mais elevado quando comparado ao sangue normal (Figura 10).

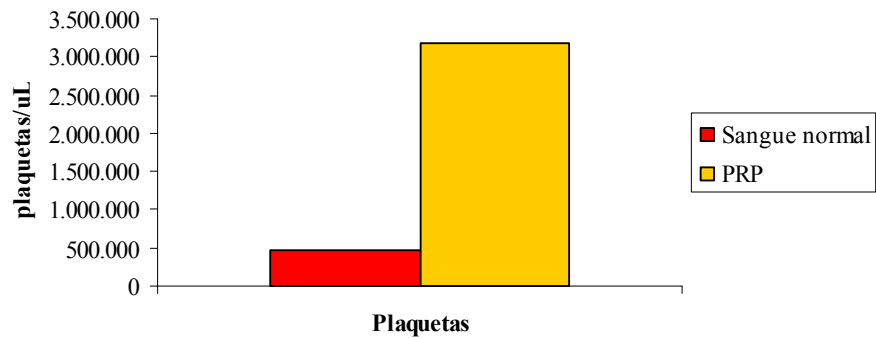


Figura 10. Gráfico comparando a concentração de plaquetas no sangue normal e no plasma rico em plaquetas (plaquetas/ μ L).

7.3 Resultados Radiográficos

Das 60 amostras obtidas inicialmente no experimento, uma foi excluída da avaliação radiográfica, pois foi observado fratura no fêmur esquerdo em um dos animais (correspondente ao grupo controle – 4 semanas). A fratura pode ser observada na região marcada na Figura 11.



Figura 11. Fêmur esquerdo fraturado, observado no período de 4 semanas.

Em alguns casos tratados com cimento de α -TCP, quando aplicado isoladamente ou com a adição de PRP, constatou-se que parte do material migrou para os tecidos adjacentes, depositando-se no músculo longitudinalmente ao osso (Figura 12).

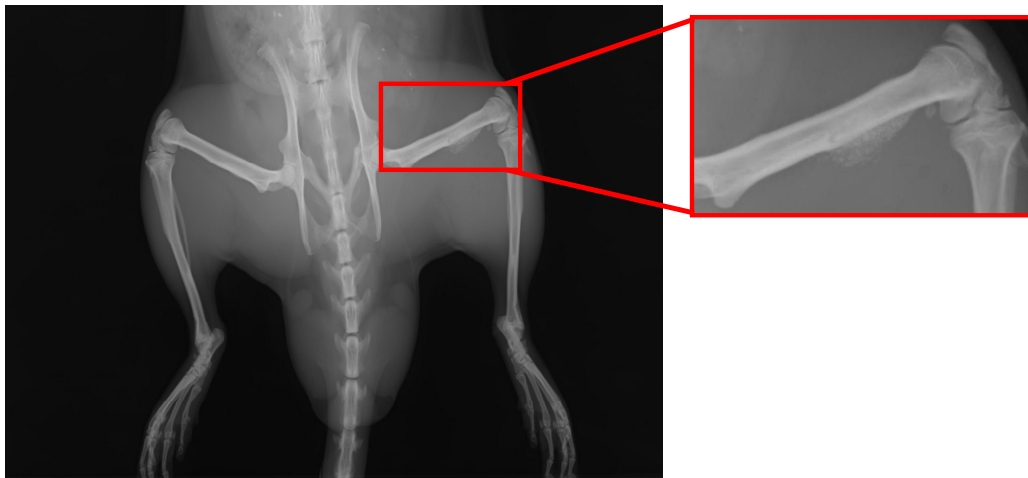


Figura 12. Tratamento com α -TCP no fêmur direito. No detalhe o material extravasado, depositando-se longitudinalmente ao osso.

Com relação à reprodutibilidade do protocolo de análise radiográfica, o coeficiente de correlação intra-classe (ICC) mostrou a influência do usuário na determinação do ponto inicial de análise da lesão, pois o grupo sem experiência (a3-a7) apresentou grande oscilação nas variáveis estimadas. Já o grupo experiente (a1 e a2) apresentou variações nas medidas de comprimento e área inferiores à dimensão de um pixel o que mostra a reprodutibilidade do processo (Tabela 3).

Tabela 3. Valores do coeficiente de correlação Intraclasse entre os dois grupos, experiente e não experiente.

Avaliadores	Correlação Intraclasse	Sig.	Classificação
a1 x a2	0,800	0,013	Muito boa
a1 x a3	0,682	0,052	NS
a1 x a4	0,169	0,394	NS
a1 x a5	0,520	0,145	NS
a1 x a6	0,342	0,666	NS
a1 x a7	0,617	0,085	NS
a2 x a3	0,403	0,227	NS
a2 x a4	0,071	0,457	NS
a2 x a5	0,287	0,311	NS
a2 x a6	0,457	0,708	NS
a2 x a7	0,608	0,090	NS

ICC <0,2: Pobre; 0,2 ≤ ICC < 0,4: Razoável; 0,4 ≤ ICC < 0,6: Moderado 0,6 ≤ ICC < 0,8: Boa; ICC ≥ 0,8: Muito Boa.⁷⁶

Os resultados mostram a dependência dos processos de análise de imagens com o examinador envolvido. Assim sendo, é de extrema relevância ressaltar a importância de que, antes de dar início ao processo de análise, o examinador seja adequadamente capacitado, discutindo e avaliando um considerável número de imagens para os casos de interesse.

As avaliações radiográficas não foram realizadas acompanhando a evolução da cicatrização da lesão no mesmo indivíduo. Entretanto, verifica-se que independentemente dos tratamentos, há diferença significativa das médias da área e do comprimento longitudinal da lesão entre os dois períodos avaliados, com $p=0,004$. Ao comparar a diferença obtida entre as médias da área e do comprimento entre os dois períodos, como pode ser observado na Tabela 4, foi encontrado valores de p significativos somente para o controle.

Tabela 4. Diferenças das médias da área e comprimento da lesão óssea obtidas entre 4 e 8 semanas.

Tratamento	Diferença entre 4 e 8 semanas			
	Área (mm ²)	<i>p</i>	Comprimento (mm)	<i>p</i>
Controle	3,44	0,007*	2,59	0,005*
Enxerto autólogo	1,80	0,174	1,46	0,095
Cimento α-TCP	0,72	0,570	0,49	0,579
PRP	2,36	0,060	0,55	0,509
Cimento α-TCP+PRP	0,74	0,542	0,26	0,756

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

Quanto ao efeito dos tratamentos sobre a lesão óssea independentemente do tempo, as evidências encontradas não forneceram dados suficientes para comprovar diferenças significativas nas duas variáveis analisadas, área e comprimento longitudinal da lesão ($p > 0,05$). Uma possível razão para não significância é o resultado das imagens brancas dos defeitos preenchidos com a adição de cimento α -TCP ou enxerto autólogo, ao serem imageadas, terem apresentado características de intensidade de sinal semelhante ao osso cortical. Dessa forma, não foi possível verificar a existência de crescimento ósseo acentuado.

Em relação à área, os valores sugerem uma significância marginal na diferença entre os tratamentos independente do tempo ($p = 0,08$). Numericamente, o tratamento PRP apresentou desempenho inferior quando comparado aos demais, inclusive em relação ao controle. Os valores das médias e respectivos desvios-padrões da área e comprimento longitudinal estão expostos nas Tabelas 5 e 6, e nas Figuras 13 e 14.

Tabela 5. Médias da área da lesão e desvios-padrões (DP) dos tratamentos e controle nos dois períodos analisados.

Tratamento	Área (mm ²) ± DP		Número de amostras
	4 semanas	8 semanas	
Controle	5,18 ± 3,75	1,74 ± 2,42	5
Enxerto autólogo	3,11 ± 1,97	1,31 ± 1,46	6
Cimento α -TCP	3,00 ± 1,07	2,28 ± 1,31	6
PRP	5,59 ± 2,69	3,23 ± 1,46	6
Cimento α -TCP+PRP	2,65 ± 2,08	1,91 ± 0,93	6

Tabela 6. Médias do comprimento longitudinal da lesão e desvios-padrões (DP) dos tratamentos e controle, nos dois períodos analisados.

Tratamento	Comprimento (mm) ± DP		Número de amostras
	4 semanas	8 semanas	
Controle	3,81 ± 2,30	1,22 ± 1,53	5
Enxerto autólogo	2,42 ± 1,31	0,96 ± 0,93	6
Cimento α -TCP	2,42 ± 1,08	1,93 ± 1,01	6
PRP	3,43 ± 1,62	2,88 ± 1,37	6
Cimento α -TCP+PRP	2,23 ± 1,47	1,97 ± 1,19	6

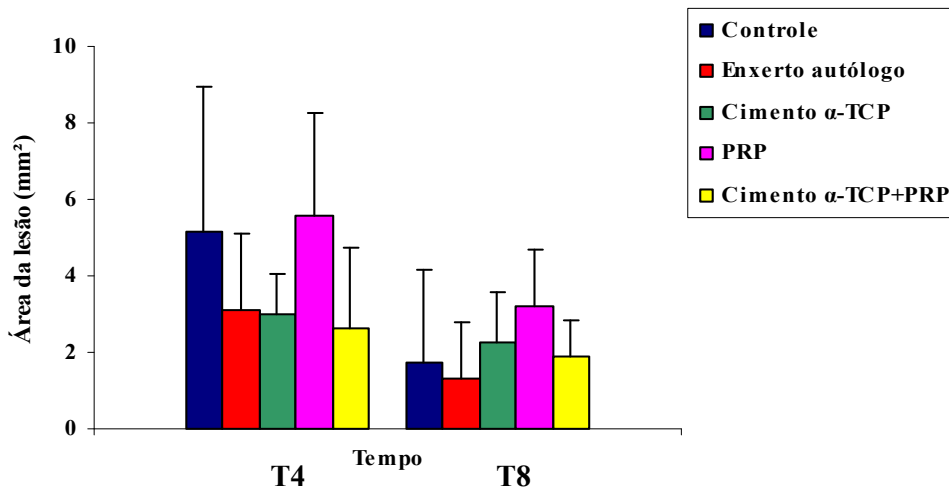


Figura 13. Gráfico representando as médias da área da lesão e respectivos desvios-padrões, em 4 e 8 semanas. É possível observar o pior desempenho do PRP em relação aos demais grupos, com a maior média da área da lesão em 4 e 8 semanas.

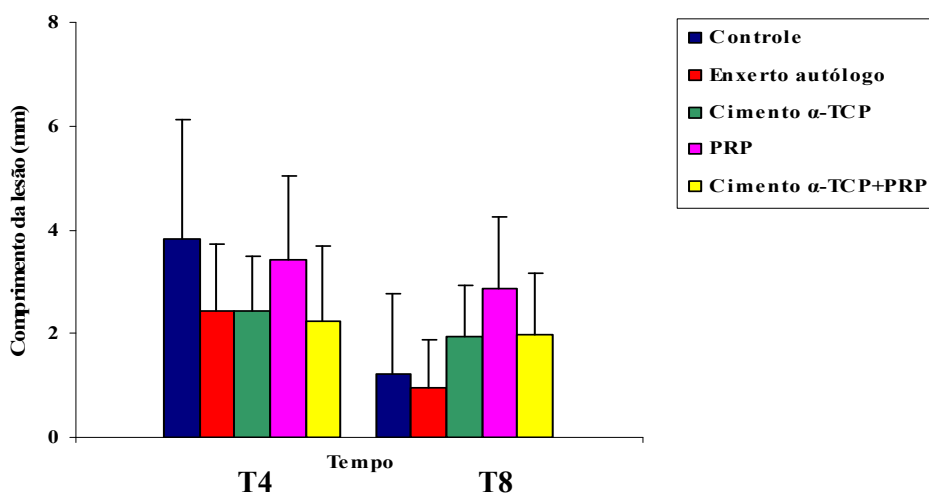


Figura 14. Gráfico representando as médias do comprimento longitudinal da lesão e respectivos desvios padrões, em 4 e 8 semanas. Em 8 semanas, a média do comprimento referente ao grupo PRP apresentou-se como a mais elevada.

7.4 Resultados Histológicos – Histomorfometria

Para avaliação histológica, além do fêmur fraturado, foram excluídas outras 4 amostras problemas na descalcificação e confecção das lâminas. Três amostras

correspondiam ao período de 8 semanas (2, controle e 1, cimento α -TCP+PRP), e a quarta pertencia ao grupo de 4 semanas (enxerto autólogo).

Na observação das lâminas através de microscopia 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 abrangendo todas as áreas do defeito cirúrgico, tanto nas margens quanto na região central. Após 4 semanas, observou-se formação de tecido conjuntivo desorganizado permeando as áreas de neoformação óssea que preencheram as cavidades cirúrgicas. Sob luz polarizada, pode-se observar a presença de fibras de colágeno, representadas por tons de amarelo a vermelho. Em 8 semanas, percebeu-se as dimensões da lesão reduzidas, com uma discreta área de tecido conjuntivo organizado permeando as áreas de neoformação óssea no sítio do defeito, sugerindo uma estrutura óssea em remodelamento. Sob luz polarizada, pode-se observar a presença de fibras de colágeno organizadas e as diferenças entre as estruturas de neoformação dos distintos grupos (Figuras 15-19).

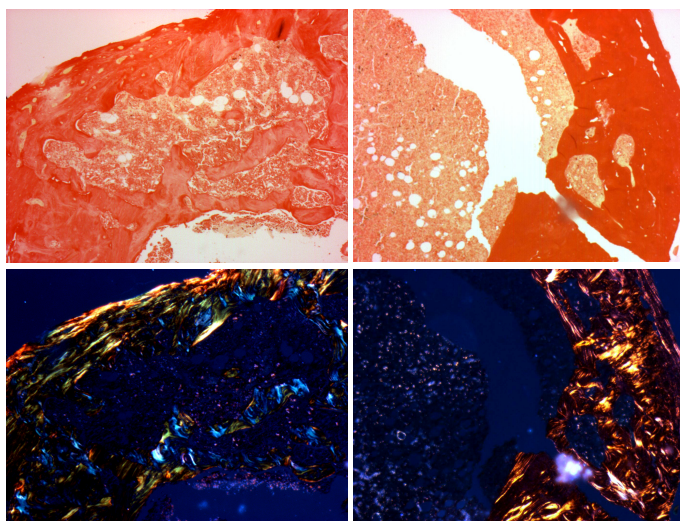


Figura 15. Imagens histológicas do grupo controle em 4 semanas (esquerda) e 8 semanas (direita), com coloração picrosirius observada com luz normal (acima) e sob luz polarizada (abaixo). Aumento 50X. Sob luz polarizada, pode-se observar a presença de fibras de colágeno, representadas por tons de amarelo a vermelho. Em 8 semanas há uma evolução no fechamento do defeito, porém com aspecto de osso ainda em remodelamento.

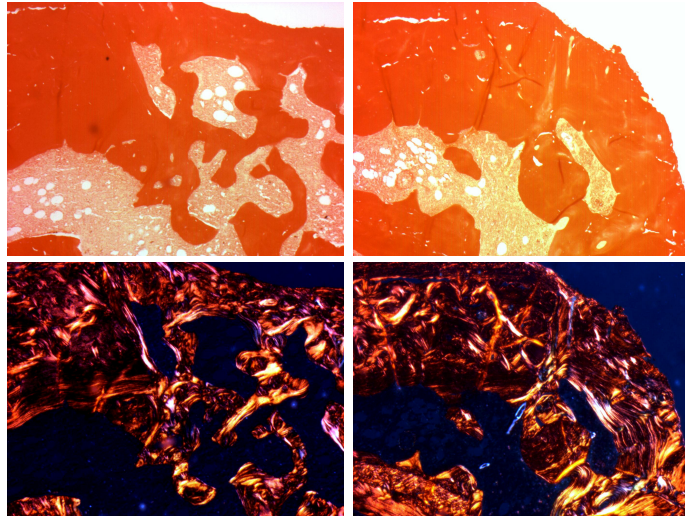


Figura 16. Imagens histológicas do grupo enxerto autólogo em 4 semanas (esquerda) e 8 semanas (direita), com coloração picrosirius observada com luz normal (acima) e sob luz polarizada (abaixo). Aumento 50X. Sob luz polarizada, observa-se uma grande quantidade de fibras de colágeno, representadas por tons de amarelo a vermelho.

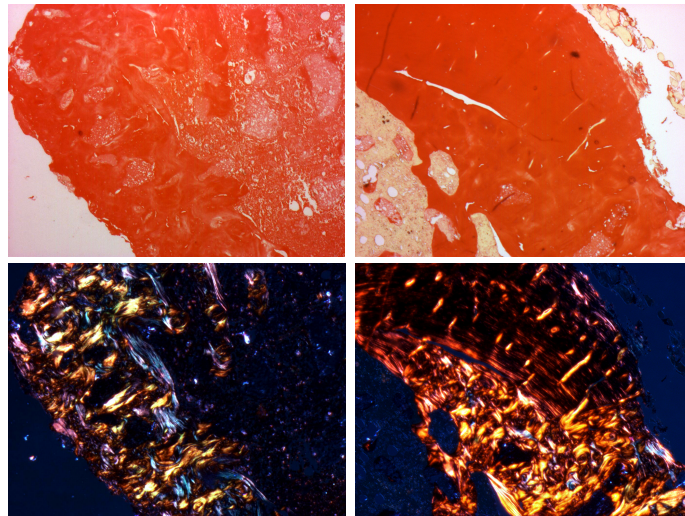


Figura 17. Imagens histológicas do grupo cimento α -TCP em 4 semanas (esquerda) e 8 semanas (direita), com coloração picrosirius observada com luz normal (acima) e sob luz polarizada (abaixo). Aumento 50X. Em 8 semanas, sob luz polarizada, percebe-se o fechamento parcial da lesão, com uma estrutura de neoformação já organizada, indicando a integração do cimento de α -TCP ao osso.

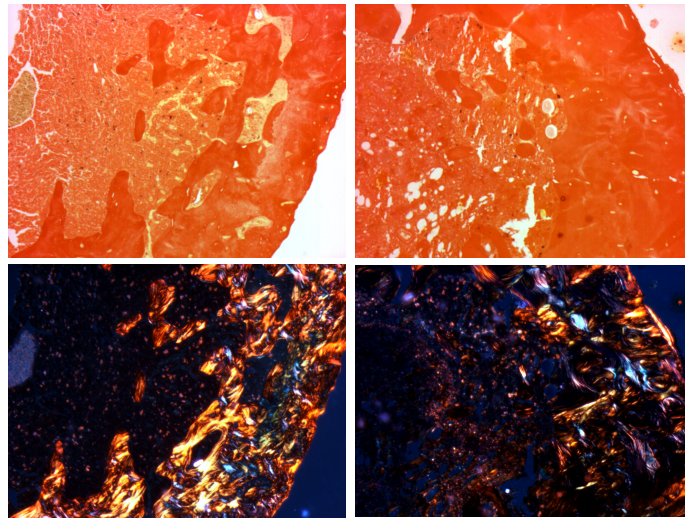


Figura 18. Imagens histológicas do grupo PRP em 4 semanas (esquerda) e 8 semanas (direita), com coloração picrosirius observada com luz normal (acima) e sob luz polarizada (abaixo). Aumento de 50X. Em 8 semanas o tecido ósseo apresenta aspecto de osso imaturo, com discreta área permeada por fibras de colágeno.

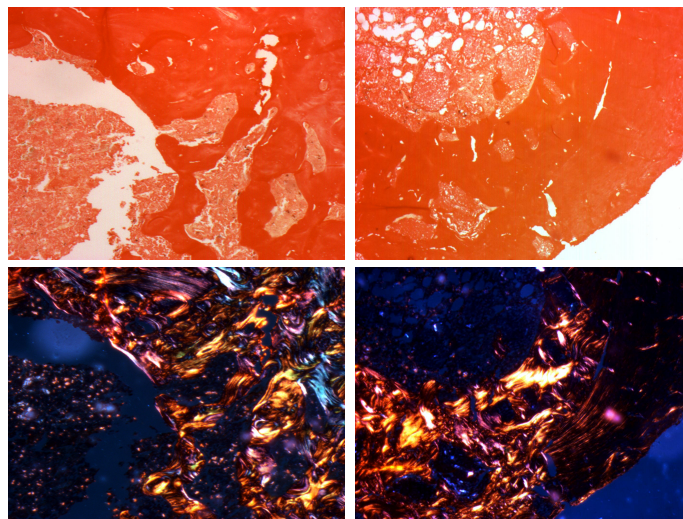


Figura 19. Imagens histológicas do grupo cimento α -TCP+PRP em 4 semanas (esquerda) e 8 semanas (direita), com coloração picrosirius observada com luz normal (acima) e sob luz polarizada (abaixo). Aumento de 50X. Em 8 semanas o osso já apresenta-se consolidado, com pequenas regiões em remodelamento.

As médias da área de neoformação óssea obtidas em 4 e 8 semanas, independentemente dos tratamentos, foram significativamente diferentes, com valor de p inferior a 0,001, indicando o fechamento parcial da lesão. Os valores das médias da área de neoformação óssea e desvios-padrões estão expostos na Tabela 7 e no gráfico da Figura 20.

Ao comparar as médias da área de neoformação óssea, independentemente do período analisado, constatou-se diferença significativa entre os tratamentos ($p=0,029$). No entanto, a comparação das médias aos pares, somente confirmou significância na diferença entre o tratamento enxerto autólogo e controle ($p=0,041$), e entre enxerto autólogo e PRP ($p=0,05$). Os demais tratamentos, α -TCP e α -TCP+PRP, não diferiram significativamente do enxerto autólogo (Tabela 7).

Tabela 7. Médias da área de neoformação óssea e desvio-padrões (DP) dos tratamentos e controle, nos dois períodos de avaliação.

Tratamento	Área de neoformação óssea (%) \pm DP			
	4 semanas	n	8 semanas	n
Controle *	62,64 \pm 6,78	5	78,04 \pm 5,65	4
Enxerto autólogo *†	77,71 \pm 14,90	5	85,81 \pm 6,43	6
Cimento α-TCP	68,32 \pm 9,61	6	85,44 \pm 5,79	6
PRP †	62,71 \pm 12,14	6	79,01 \pm 6,25	6
Cimento α-TCP+PRP	73,28 \pm 12,68	6	85,56 \pm 10,45	5

* $p = 0,041$

† $p = 0,05$

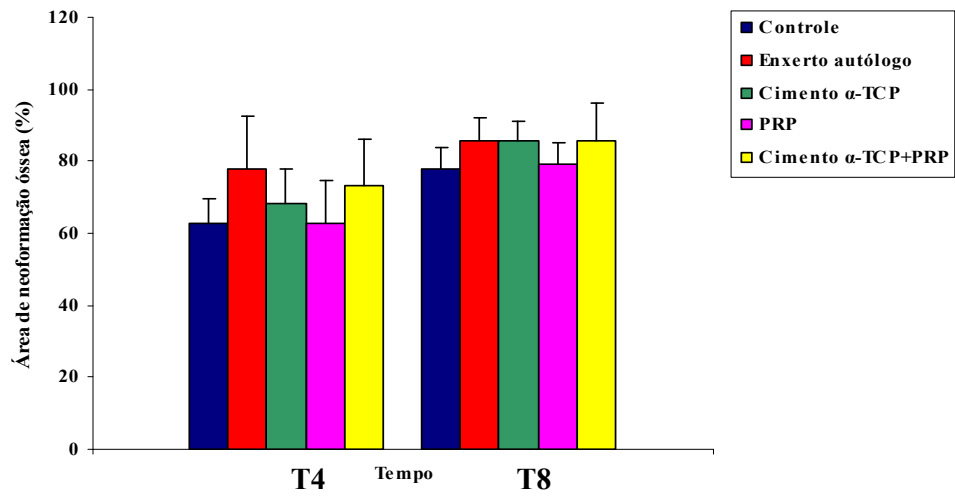


Figura 20. Gráfico com as médias da área de neoformação óssea em 4 e 8 semanas de avaliação, e respectivos desvios padrões.

8 DISCUSSÃO

O tratamento mais eficaz, considerado como padrão ouro atualmente 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 alta 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 destas limitações.^{54, 59-61}

Diversos biomateriais são constantemente pesquisados para substituir o tecido ósseo. O objetivo central destas pesquisas é encontrar uma alternativa que ofereça os mesmos benefícios do enxerto autólogo, porém livre de suas desvantagens. Atualmente, há um consenso dentro da comunidade científica que estuda os princípios da bioengenharia, de que o processo de reparo ósseo envolve uma série de elementos celulares e mediadores químicos que regulam os eventos a nível molecular. Acredita-se que a interação entre estes parâmetros promova a regeneração óssea.⁷⁷⁻⁷⁹

No âmbito conceitual da Engenharia de Tecidos, propõe-se que um complexo triangular de interações, que envolve células osteoprogenitoras, mediadores osteoindutivos e matrizes osteocondutoras, seja uma alternativa terapêutica promissora na restauração tanto de tecidos moles quanto de tecidos duros.⁷⁷

Diante destes preceitos, a aplicação combinada de cimento alfa-fosfato tricálcico e plasma rico em plaquetas parece se enquadrar dentro das propriedades ideais que caracterizam este complexo triangular. Alguns estudos afirmam que o cimento α -TCP além de biocompatível, é biocondutor e bioativo.^{54, 55, 80, 81} Da mesma forma, existem algumas evidências na literatura de que o PRP é uma ótima

alternativa para o reparo de lesões ósseas,^{31, 82, 83} em virtude de ser caracterizado como fonte autóloga de fatores de crescimento, sendo essas proteínas essenciais durante o processo de regeneração.^{27, 28}

Contudo, os estudos clínicos e experimentais realizados com PRP não são consistentes sobre seus efeitos e impactos na cicatrização óssea,⁸⁴⁻⁸⁷ e as revisões sistemáticas realizadas não comprovam sua eficácia.^{88, 89} Em outros estudos, são encontrados resultados contraditórios sobre a aplicação de PRP, possivelmente devido aos diferentes modelos experimentais utilizados (defeitos críticos ou não críticos), às diferenças na biologia e fisiologia entre as espécies estudadas, diferentes técnicas de preparação do PRP e os diferentes substitutos ósseos utilizados combinados ao PRP.⁹⁰

Na análise radiográfica do presente estudo, observou-se um pior desempenho do PRP em relação aos demais grupos, incluindo o controle, tanto para os valores das médias da área quanto do comprimento longitudinal da lesão. Em relação à área, o PRP apresentou médias e desvios-padrões de $5,59 \text{ mm}^2 \pm 2,69$ em 4 semanas e $3,23 \text{ mm}^2 \pm 1,46$ em 8 semanas, sendo verificada uma diferença significativa marginal quando comparado ao enxerto autólogo ($p=0,08$).

No presente estudo a concentração de plaquetas no PRP dos ratos foi 7 vezes maior quando comparada ao sangue normal (PRP=3181.000 plaquetas/ μL). A alta concentração pode ser a causa da falta de efeito positivo do PRP sobre o reparo do defeito ósseo. Weibrich e colaboradores,⁹¹ em um estudo *in vivo*, sugeriram que a eficácia do PRP sobre a regeneração óssea é dependente da concentração de plaquetas obtida. Em baixas concentrações, o PRP pode apresentar efeitos pouco expressivos e, paradoxalmente, em altas concentrações parece exercer um efeito inibitório. Choi et al.⁹² também verificou em um estudo *in vitro* o efeito dose dependente do PRP sobre a osteogênese, demonstrando que a viabilidade e proliferação de células ósseas aveolares são suprimidas em altas concentrações e estimuladas em baixas concentrações de PRP. As afirmações dos autores acima citados indicam que altas concentrações e altos volumes de PRP podem exercer um efeito citotóxico sobre a cicatrização óssea, podendo restringir a ação de substitutos ósseos sintéticos, bem como de enxertos autólogos ou alógenos. Tais fatos podem explicar os resultados deste estudo, que sugerem que o PRP não favorece a neoformação óssea.

A concentração terapêutica de plaquetas considerada ideal é de aproximadamente 1000.000/ μ L,²⁹ em humanos. Trowbridge et al.⁹³ 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 tróficos em animais ainda necessitam ser definidos.

Os achados de Pryor et al.^{94, 95} sobre a influência do PRP no reparo de defeitos em calvária de ratos, mesmo sendo um modelo de lesão óssea distinto, sugerem uma semelhança com os resultados do presente estudo, onde nenhum efeito do PRP sobre a regeneração óssea foi encontrado. Em contraste, Messoria et al.⁹⁶ demonstrou em seus resultados uma melhora significativa quando aplicado PRP em defeito ósseo de rato. Isso confirma as contradições encontradas na literatura sobre a eficácia do PRP na osteogênese, bem como a necessidade de padronizar as técnicas de obtenção de PRP em modelos animais, permitindo a realização de estudos consistentes sobre seus efeitos.

Segundo Marx et al.²⁷ o PRP exerce uma influência sobre as células. Portanto, ao ser utilizado em combinação com substitutos ósseos sintéticos deveria apresentar um efeito positivo maior sobre a neoformação óssea em relação ao enxerto ósseo utilizado isoladamente. 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. Sendo assim, os biomateriais podem, ocasionalmente, ofuscar os efeitos do PRP.⁹⁴ As médias do PRP em todas as variáveis estudadas no presente estudo revelaram o efeito inferior do PRP em relação ao grupo cimento α -TCP+PRP, diferente das médias do grupo α -TCP isolado, que apresentou valores semelhantes ao cimento α -TCP+PRP (Tabelas 5 e 6). Os dados sugerem que o PRP não exerceu influência sobre o desempenho do cimento no reparo do defeito ósseo.

Pode-se sugerir como possível causa para a semelhança entre os resultados dos tratamentos com cimento α -TCP e cimento α -TCP+PRP a baixa eficácia do PRP, tendo em vista que os dados histomorfométricos demonstram uma diferença

significativa entre o enxerto autólogo (padrão-ouro) e PRP, que apresentou médias de $62,71\% \pm 12,14$ em 4 semanas e $79,01\% \pm 6,25$ em 8 semanas ($p=0,05$). De maneira similar, também houve diferença significativa entre o enxerto autólogo e controle ($p=0,041$), que teve médias de neoformação bem próximas às do PRP ($62,64\% \pm 6,78$ e $78,04\% \pm 5,65$, em 4 e 8 semanas, respectivamente). Em contrapartida, os grupos cimento α -TCP e cimento α -TCP+PRP demonstraram um padrão semelhante ao enxerto autólogo, que apresentou as menores médias da área da lesão (Figura 13) e maior área de neoformação (Figura 20). Os dados histomorfométricos e radiográficos convergem ao indicar o enxerto autólogo como o melhor tratamento no reparo de defeitos cavitários em fêmur de ratos.

Na análise histomorfométrica observou-se o crescimento ósseo ao redor das partículas de cimento α -TCP, bem como a presença de colágeno. A bioatividade e a osteocondutividade dos grânulos de cimento 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.⁹⁷ Kihara et al.⁹⁸ observaram neoformação óssea sobre a superfície e no interior das partículas de cimento α -TCP quando aplicados em defeito ósseo de coelhos, semelhante ao presente estudo. Esses dados dão suporte à afirmação de que o cimento α -TCP é um material osteocondutivo, permitindo que a matriz óssea se desenvolva através dele.⁵⁶

Todas as médias verificadas nas imagens radiográficas, área e comprimento longitudinal da lesão, foram menores em 8 semanas quando comparadas à 4 semanas (Tabelas 5 e 6). Esses resultados sugerem um fechamento parcial da lesão para todos os casos estudados. Contudo, na comparação das diferenças entre as médias de cada tratamento nos dois períodos analisados, foi constatada uma diferença significativa somente no grupo controle, o que sugere um efeito precoce dos demais tratamentos (enxerto autólogo, cimento α -TCP e cimento α -TCP+PRP). O PRP não apresentou diferença significativa entre as médias de 4 e 8 semanas ($p=0,06$), entretanto não é possível sugerir um efeito antecipado sobre o reparo ósseo, pois em 8 semanas o valor da média da área foi elevado (Tabela 5).

Os grânulos do cimento α -TCP migraram para tecidos moles adjacentes em alguns casos, distribuindo-se longitudinalmente ao osso. Provavelmente o extravasamento do material foi ocasionado pela movimentação dos grânulos, não

sendo observado nenhum sinal de reação inflamatória durante todo o pós-operatório e na remoção dos fêmures. Uma das limitações do presente estudo é não ter sido adotado nenhum procedimento para conter os grânulos. O fêmur apresenta cavidade medular, sendo que uma grande quantidade de medula extravasa após a criação do defeito, podendo ser a causa da não aderência de alguns grânulos de cimento ao osso.

Também como limitação desta pesquisa, a não adoção de uma contenção para os tratamentos pode ter prejudicado a permanência do gel de PRP no sítio do defeito. Assim como os grânulos migraram para os tecidos adjacentes, o mesmo pode ter ocorrido com o PRP, sendo esta outra possível explicação para a falta de efeito positivo desse tratamento sobre o reparo ósseo.

O tamanho da lesão eleita para o atual estudo foi baseado em modelo validado na literatura⁷⁴, porém não existe consenso entre as referências pesquisadas sobre o tamanho de defeito crítico cavitário em fêmur de ratos. Para defeito segmentar (*gap*) em fêmur de ratos, o tamanho estabelecido como crítico é de 6mm⁹⁹ e para defeito cavitário em calvária, 8mm.¹⁰⁰ Portanto, o tamanho da lesão pode ser mais uma limitação desse estudo, pois um defeito crítico é caracterizado por não se regenerar espontaneamente. Possivelmente uma lesão cavitária em fêmur de rato com 5mm não possui tamanho suficiente para ser considerada crítica. O grupo controle, nesse experimento, apresentou médias que não diferiram significativamente dos demais tratamentos, exceto quando comparadas às médias de neoformação óssea do enxerto autólogo.

O número limitado de animais utilizado no experimento pode ter influenciado a não significância na comparação das médias entre os tratamentos nos diferentes períodos. Possivelmente, se o número da amostra fosse superior, diferenças com maior poder estatístico teriam sido alcançadas.

CONCLUSÕES

Considerando as limitações do presente estudo e com base nos dados apresentados, é possível concluir:

- Os resultados não ofereceram dados suficientes para comprovar diferenças significativas entre o grupo PRP e cimento α -TCP+PRP. Da mesma maneira, não foi encontrada significância entre as médias do grupo cimento α -TCP e cimento α -TCP+PRP ($p>0,05$).
 - Foi observado um melhor desempenho do tratamento enxerto autólogo, com diferenças significativas quanto à área de neoformação óssea, independente do tempo analisado, em relação aos grupos PRP ($p=0,05$) e controle ($p=0,041$). Em contrapartida, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre enxerto autólogo e os grupos cimento α -TCP+PRP e cimento α -TCP ($p>0,05$).
 - Os tratamentos PRP, cimento α -TCP e cimento α -TCP+PRP não diferiram significativamente do grupo controle, assim como não foram evidenciadas diferenças quando comparados entre si.
 - Observou-se nos dados radiográficos, um efeito inferior do tratamento PRP sobre o reparo ósseo em relação aos demais grupos, incluindo o controle.
 - Os dados do presente estudo sugerem que os tratamentos com cimento α -TCP e PRP, aplicados isoladamente ou em conjunto, não demonstram efeito positivo sobre o reparo ósseo.
-

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 Aug;67:4-5.
 3. Woolf AD, Pfleger B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ.* 2003;81(9):646-56.
 4. Lee SH, Shin H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007 May 30;59(4-5):339-59.
 5. Remedios A. Bone and bone healing. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1999 Sep;29(5):1029-44.
 6. Dahlin C. Scientific background of guided bone regeneration. In: Buser D, Dahlin C, Schenk RK, editors. *Guided bone regeneration in implant dentistry.* 1^a ed. Chigago: Quintessence; 1994. p. 31-48.
 7. Cook SD, Rueger DC. Osteogenic protein-1: biology and applications. *Clin Orthop Relat Res.* 1996 Mar(324):29-38.
 8. Chu TM, Warden SJ, Turner CH, Stewart RL. Segmental bone regeneration using a load-bearing biodegradable carrier of bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials.* 2007 Jan;28(3):459-67.
 9. Bos GD, Goldberg VM, Zika JM, Heiple KG, Powell AE. Immune responses of rats to frozen bone allografts. *J Bone Joint Surg Am.* 1983 Feb;65(2):239-46.
-
-

10. Aaron AD, Wiedel JD. Allograft use in orthopedic surgery. *Orthopedics*. 1994 Jan;17(1):41-8.
 11. Reynolds MA, Aichelmann-Reidy ME, Branch-Mays GL, Gunsolley JC. The efficacy of bone replacement grafts in the treatment of periodontal osseous defects. A systematic review. *Ann Periodontol*. 2003 Dec;8(1):227-65.
 12. Andrades JA, Han B, Becerra J, Sorgente N, Hall FL, Nimni ME. A recombinant human TGF-beta1 fusion protein with collagen-binding domain promotes migration, growth, and differentiation of bone marrow mesenchymal cells. *Exp Cell Res*. 1999 Aug 1;250(2):485-98.
 13. Marx RE, Garg AK. Bone structure, metabolism, and physiology: its impact on dental implantology. *Implant Dent*. 1998;7(4):267-76.
 14. Hollinger JO, Winn SR. Tissue engineering of bone in the craniofacial complex. *Ann N Y Acad Sci*. 1999 Jun 18;875:379-85.
 15. Kierszenbaum AL. *Histologia e Biologia Celular: Uma introdução à patologia* 1ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004.
 16. Lynch SE, Genco RJ, Marx RE. *Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics*: Quintessence 1999.
 17. Gartner LP, Hiatt JL. *Tratado de Histologia* 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan SA; 2003.
 18. Aubin JE. Regulation of osteoblast formation and function. *Rev Endocr Metab Disord*. 2001 Jan;2(1):81-94.
 19. Goldman L, Ausiello D. *Cecil - Tratado de Medicina Interna*. 22ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.
 20. Mandracchia VJ, Nelson SC, Barp EA. Current concepts of bone healing. *Clin Podiatr Med Surg*. 2001 Jan;18(1):55-77.
 21. Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol*. 1998 Mar;16(3):247-52.
 22. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*. 1998 Oct(355 Suppl):S7-21.
 23. Bolander ME. Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1992 Jun;200(2):165-70.
 24. Grundnes O, Reikeras O. The importance of the hematoma for fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand*. 1993 Jun;64(3):340-2.
-

25. Einhorn TA, Majeska RJ, Rush EB, Levine PM, Horowitz MC. The expression of cytokine activity by fracture callus. *J Bone Miner Res.* 1995 Aug;10(8):1272-81.
 26. 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 Jan;91(1):4-15.
 27. 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 Jun;85(6):638-46.
 28. 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 Jul-Aug;14(4):529-35.
 29. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.* 2001;10(4):225-8.
 30. Wu W, Chen F, Liu Y, Ma Q, Mao T. Autologous injectable tissue-engineered cartilage by using platelet-rich plasma: experimental study in a rabbit model. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007 Oct;65(10):1951-7.
 31. Nagata MJ, Melo LG, Messoria 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 Sep;36(9):775-83.
 32. Garg AK, Gargenese D, Peace I. Using platelet-rich plasma to develop an autologous membrane for growth factor delivery in dental implant therapy. *Dent Implantol Update.* 2000 Jun;11(6):41-4.
 33. Slapnicka J, Fassmann A, Strasak L, Augustin P, Vanek J. Effects of activated and nonactivated platelet-rich plasma on proliferation of human osteoblasts in vitro. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008 Feb;66(2):297-301.
 34. Frechette JP, Martineau I, Gagnon G. Platelet-rich plasmas: growth factor content and roles in wound healing. *J Dent Res.* 2005 May;84(5):434-9.
-

35. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg*. 2004 Nov;114(6):1502-8.
 36. 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 Apr;38(4):540-6.
 37. Solheim E. Growth factors in bone. *Int Orthop*. 1998;22(6):410-6.
 38. Phillips AM. Overview of the fracture healing cascade. *Injury*. 2005 Nov;36 Suppl 3:S5-7.
 39. Lynch SE, Colvin RB, Antoniades HN. Growth factors in wound healing. Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. *J Clin Invest*. 1989 Aug;84(2):640-6.
 40. Diao H, Wang J, Shen C, Xia S, Guo T, Dong L, et al. Improved cartilage regeneration utilizing mesenchymal stem cells in TGF-beta1 gene-activated scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 2009 Sep;15(9):2687-98.
 41. Zhao L, Jiang S, Hantash BM. TGF-beta1 Induces Osteogenic Differentiation of Murine Bone Marrow Stromal Cells. *Tissue Eng Part A*. 2009 Sep 21.
 42. Yeung HY, Lee KM, Fung KP, Leung KS. Sustained expression of transforming growth factor-beta1 by distraction during distraction osteogenesis. *Life Sci*. 2002 May 24;71(1):67-79.
 43. Grainger DJ, Wakefield L, Bethell HW, Farndale RW, Metcalfe JC. Release and activation of platelet latent TGF-beta in blood clots during dissolution with plasmin. *Nat Med*. 1995 Sep;1(9):932-7.
 44. Uchida S, Sakai A, Kudo H, Otomo H, Watanuki M, Tanaka M, et al. Vascular endothelial growth factor is expressed along with its receptors during the healing process of bone and bone marrow after drill-hole injury in rats. *Bone*. 2003 May;32(5):491-501.
 45. Steinbrech DS, Mehrara BJ, Saadeh PB, Greenwald JA, Spector JA, Gittes GK, et al. VEGF expression in an osteoblast-like cell line is regulated by a hypoxia response mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000 Apr;278(4):C853-60.
 46. Zisch AH, Lutolf MP, Ehrbar M, Raeber GP, Rizzi SC, Davies N, et al. Cell-demanded release of VEGF from synthetic, biointeractive cell
-

- ingrowth matrices for vascularized tissue growth. *Faseb J.* 2003 Dec;17(15):2260-2.
47. Zelzer E, McLean W, Ng YS, Fukai N, Reginato AM, Lovejoy S, et al. Skeletal defects in VEGF(120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Development.* 2002 Apr;129(8):1893-904.
 48. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med.* 1999 Jun;5(6):623-8.
 49. Ryan AM, Eppler DB, Hagler KE, Bruner RH, Thomford PJ, Hall RL, et al. Preclinical safety evaluation of rhuMAbVEGF, an antiangiogenic humanized monoclonal antibody. *Toxicol Pathol.* 1999 Jan-Feb;27(1):78-86.
 50. Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg.* 1993 Jun;165(6):728-37.
 51. Thaller SR, Salzhauer MA, Rubinstein AJ, Thion A, Tesluk H. Effect of insulin-like growth factor type I on critical size calvarial bone defects in irradiated rats. *J Craniofac Surg.* 1998 Mar;9(2):138-41.
 52. Hollinger JO, Brekke J, Gruskin E, Lee D. Role of bone substitutes. *Clin Orthop Relat Res.* 1996 Mar(324):55-65.
 53. Mirtchi AA, Lemaitre J, Terao N. Calcium phosphate cements: study of the beta-tricalcium phosphate--monocalcium phosphate system. *Biomaterials.* 1989 Sep;10(7):475-80.
 54. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury.* 2005 Nov;36 Suppl 3:S20-7.
 55. 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 Feb;16(1):119-27.
 56. dos Santos LA, Carrodeguas RG, Boschi AO, Fonseca de Arruda AC. Fiber-enriched double-setting calcium phosphate bone cement. *J Biomed Mater Res A.* 2003 May 1;65(2):244-50.
-

-
57. Hench LL, Wilson J. Introduction to biomaterials. In: Hench LL, Wilson J, editors. *An Introduction to Bioceramics* Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.; 1993. p. 1-15.
 58. Nasr HF, Aichelmann-Reidy ME, Yukna RA. Bone and bone substitutes. *Periodontol* 2000. 1999 Feb;19:74-86.
 59. Pollock R, Alcelik 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 Jun;17(6):845-52.
 60. Seiler JG, 3rd, Johnson J. Iliac crest autogenous bone grafting: donor site complications. *J South Orthop Assoc*. 2000;9(2):91-7.
 61. Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthop Relat Res*. 1996 Aug(329):300-9.
 62. Banwart JC, Asher MA, Hassanein RS. Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1995 May 1;20(9):1055-60.
 63. Summers BN, Eisenstein SM. Donor site pain from the ilium. A complication of lumbar spine fusion. *J Bone Joint Surg Br*. 1989 Aug;71(4):677-80.
 64. Kang YM, Kim KH, Seol YJ, Rhee SH. Evaluations of osteogenic and osteoconductive properties of a non-woven silica gel fabric made by the electrospinning method. *Acta Biomater*. 2009 Jan;5(1):462-9.
 65. Oi Y, Ota M, Yamamoto S, Shibukawa Y, Yamada S. Beta-tricalcium phosphate and basic fibroblast growth factor combination enhances periodontal regeneration in intrabony defects in dogs. *Dent Mater J*. 2009 Mar;28(2):162-9.
 66. Kim SS, Kim BS. Comparison of osteogenic potential between apatite-coated poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite particulates and Bio-Oss. *Dent Mater J*. 2008 May;27(3):368-75.
 67. Teng SH, Lee EJ, Park CS, Choi WY, Shin DS, Kim HE. Bioactive nanocomposite coatings of collagen/hydroxyapatite on titanium substrates. *J Mater Sci Mater Med*. 2008 Jun;19(6):2453-61.
-

-
68. Kamitakahara WA, Wada N. Neutron spectroscopy of water dynamics in NaX and NaA zeolites. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.* 2008 Apr;77(4 Pt 1):041503.
 69. Driessens FCM, Fernández E, Ginebra MP, Boltong MG, Planell JA. Calcium phosphates and ceramic bone cements vs. acrylic cements. *Anal Quim Int Ed.* 1997;93:S38-S43.
 70. Hench LL. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials.* 1998 Aug;19(16):1419-23.
 71. Jansen JA, De Ruijter JE, Schaeken HG, Van Der Waerden JPCM, Planell JA, Driessens FCM. Evaluation of tricalciumphosphate/hydroxyapatite cement for tooth replacement: an experimental animal study *Journal of Materials Science: Materials in Medicine.* 1995;6(11):653-7.
 72. Rossi Junior R, Negreiros RM, Elias FM, Jorge WA. Utilização de plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos para reparação de defeitos ósseos. *Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo.* 2008 set/dez;20(3):295-300.
 73. dos Santos L. Desenvolvimento de Cimento de Fosfato de Cálcio reforçado por fibras para uso na área Médico-Odontológica. [Doutorado] Campinas: Universidade Estadual de Campinas (SP): 2002.
 74. Moreira ASB, Pastoreli MT, Damasceno LHF, Defino HLA. Estudo experimental da influência das dimensões dos grânulos de hidroxiapatita na integração óssea. *Acta Ortopédica Brasileira.* 2003 out/dez;11(4):240-50.
 75. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis.* 1988 May;96(5):379-94.
 76. Altman, DG. *Practical Statistics for medical research.* London. 1991: Chapman and Hill.
 77. Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: a harmony of optimal biology and optimal fixation? *Injury.* 2007 Sep;38 Suppl 4:S1-2.
-

78. Laurencin CT, Einhorn TA, Lyons K. Fracture repair: challenges and opportunities. *J Bone Joint Surg Am.* 2008 Feb;90 Suppl 1:1-2.
 79. Pountos I, Georgouli T, Blokhuis TJ, Pape HC, Giannoudis PV. Pharmacological agents and impairment of fracture healing: what is the evidence? *Injury.* 2008 Apr;39(4):384-94.
 80. 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 Jul;25(15):2941-8.
 81. dos Santos LA, De Oliveria LC, Rigo EC, Carrodeguas RG, Boschi AO, De Arruda AC. Influence of polymeric additives on the mechanical properties of alpha-tricalcium phosphate cement. *Bone.* 1999 Aug;25(2 Suppl):99S-102S.
 82. Dori F, Kovacs V, Arweiler NB, Huszar 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 Oct;80(10):1599-605.
 83. 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 Jan;20(1):34-40.
 84. Raghoobar GM, Schortinghuis J, Liem RS, Ruben JL, van der Wal JE, Vissink A. Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? *Clin Oral Implants Res.* 2005 Jun;16(3):349-56.
 85. Fennis JP, Stoelinga PJ, Jansen JA. Mandibular reconstruction: a histological and histomorphometric study on the use of autogenous scaffolds, particulate cortico-cancellous bone grafts and platelet rich plasma in goats. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Jan;33(1):48-55.
 86. Hee HT, Majd ME, Holt RT, Myers L. Do autologous growth factors enhance transforaminal lumbar interbody fusion? *Eur Spine J.* 2003 Aug;12(4):400-7.
 87. Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Vasilic N, Madzarevic M, Kenney EB. Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *J Periodontal Res.* 2002 Aug;37(4):300-6.
-

-
88. Plachokova AS, Nikolidakis D, Mulder J, Jansen JA, Creugers NH. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in dentistry: a systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2008 Jun;19(6):539-45.
 89. Wallace SS, Froum SJ. Effect of maxillary sinus augmentation on the survival of endosseous dental implants. A systematic review. *Ann Periodontol.* 2003 Dec;8(1):328-43.
 90. Plachokova AS, van den Dolder J, van den Beucken JJ, Jansen JA. Bone regenerative properties of rat, goat and human platelet-rich plasma. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2009 Aug;38(8):861-9.
 91. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone.* 2004 Apr;34(4):665-71.
 92. Choi BH, Zhu SJ, Kim BY, Huh JY, Lee SH, Jung JH. Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: an in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005 Jun;34(4):420-4.
 93. 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 Aug;5(3):145-70.
 94. 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 Sep;32(9):966-72.
 95. Pryor ME, Yang J, Polimeni G, Koo KT, Hartman MJ, Gross H, et al. Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: radiographic observations. *J Periodontol.* 2005 Aug;76(8):1287-92.
 96. 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 Periodontal Res.* 2008 Apr;43(2):217-23.
 97. LeGeros RZ. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chem Rev.* 2008 Nov;108(11):4742-53.
-

-
98. 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 Nov;79(2):284-91.
 99. Einhorn TA, Lane JM, Burstein AH, Kopman CR, Vigorita VJ. The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix. A radiographic and biomechanical study. *J Bone Joint Surg Am*. 1984 Feb;66(2):274-9.
 100. Nyan M, Sato D, Oda M, Machida T, Kobayashi H, Nakamura T, et al. Bone formation with the combination of simvastatin and calcium sulfate in critical-sized rat calvarial defect. *J Pharmacol Sci*. 2007 Aug;104(4):384-6.
-

ARTIGOS

EFEITO DE ALFA-FOSFATO TRICÁLCICO E PLASMA RICO EM PLAQUETAS NA REGENERAÇÃO DE TECIDO ÓSSEO

Sebben, AD^{1*}; Hoff, G²; Klein, CP¹; Assad, CA¹; Freitas¹, TA; Santos, LA³; Braga Silva, J^{1,4}

¹ Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul- PUCRS, Brasil.

² Faculdade de Física Médica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS, Brasil.

³ Departamento de Biomateriais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Brasil.

⁴ Serviço de Cirurgia da Mão e Microcirurgia Reconstructiva, Hospital São Lucas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.

* Autor correspondência. Avenida Ipiranga, 6690 – 64. CEP: 90610000. Fone: (5551) 84179375 e (5551) 33203500 - 4816.

E-mail: adsebben@gmail.com (AD Sebben)

Resumo

Objetivo: Avaliar o efeito de cimento de alfa-fosfato tricálcico (α -TCP) e plasma rico em plaquetas (PRP) sobre a osteogênese, quando utilizados isoladamente ou em conjunto, comparando os resultados com o padrão-ouro (enxerto autólogo).

Material e Métodos: Trinta e quatro ratos Wistar-Kyoto foram utilizados no estudo. Foi criado um defeito cavitário bilateral no fêmur e cada cavidade preenchida com um dos 4 tipos de tratamentos (enxerto autólogo; cimento α -TCP; PRP; cimento α -TCP+PRP), sendo avaliados em 4 e 8 semanas. No grupo controle não foi aplicado nenhum preenchimento. As imagens radiográficas forneceram valores da área e do comprimento longitudinal da lesão, e as imagens histológicas indicaram a área de neoformação óssea.

Resultados: Quanto ao efeito dos tratamentos sobre a lesão óssea, independentemente do tempo, os resultados radiográficos encontrados não forneceram dados suficientes para comprovar diferenças significativas nas duas variáveis analisadas, área e comprimento ($p=0,08$). Na histomorfometria, foi

observado um melhor desempenho do tratamento com enxerto autólogo, apresentando diferenças significativas quanto à área de neoformação óssea, independentemente do tempo, em relação aos grupos PRP isolado ($p=0,05$) e controle ($p=0,041$). Em contrapartida, não foram verificadas diferenças com significância entre enxerto autólogo e os grupos cimento α -TCP+PRP e cimento α -TCP ($p>0,05$). Os tratamentos PRP, cimento α -TCP e cimento α -TCP+PRP não diferiram significativamente do grupo controle, assim como não foram evidenciadas diferenças quando comparados entre si.

Conclusão: Os dados do presente estudo sugerem que os tratamentos com cimento de α -TCP e PRP, aplicados isoladamente ou em conjunto, não demonstram efeito positivo sobre o reparo ósseo.

Palavras-chave: Modelo experimental. Substitutos ósseos. Plasma rico em plaquetas. Fatores de crescimento

1 Introdução

Lesões musculoesqueléticas são uma das principais causas de morbidade em todo o mundo, resultando em incapacitação física e diminuindo de maneira substancial a qualidade de vida de pessoas que por elas são acometidas [1]. As atividades esportivas e os acidentes de trânsito estão entre as origens mais comuns destes danos, gerando grande impacto sócio-econômico e elevando os custos na saúde [2].

O tecido ósseo, quando lesado, tem capacidade de retornar a sua estrutura original [3], no entanto se o defeito consistir em perda de massa óssea, a regeneração se torna limitada. Entre os substitutos ósseos mais utilizados no tratamento destas lesões está o transplante autólogo, sendo considerado o padrão ouro por sua alta capacidade osteoindutora. No entanto, apresenta desvantagens como a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica para retirada do enxerto, morbidade no local e a escassez de tecido doador [4]. Com a finalidade de fornecer auxílio ao reparo ósseo e superar as desvantagens do enxerto autólogo, os substitutos ósseos inorgânicos, como o cimento alfa-fosfato tricálcico (α -TCP), são amplamente aplicados como biomateriais na Ortopedia e Odontologia [5]. O cimento α -TCP

além de ser biocompatível, é considerado um material osteocondutivo e bioativo. Ao estabelecer ligações de natureza química com o tecido ósseo, age no estímulo da proliferação de fibroblastos, osteoblastos e outras células ósseas [6]. No âmbito conceitual da Engenharia de Tecidos, propõe-se que um complexo triangular de interações, que envolve células osteoprogenitoras, mediadores osteoindutivos e matrizes osteocondutoras, seja uma alternativa na restauração de tecidos moles e duros [7]. 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 α -TCP pode ser uma estratégia promissora para promover a osteogênese em danos ósseos de difícil reparo.

Como fonte autóloga de fatores de crescimento, o plasma rico em plaquetas (PRP), que é caracterizado como um volume de plasma com concentração plaquetária de três a oito vezes acima dos níveis fisiológicos [8-10] pode exercer um efeito positivo quando aplicado em conjunto com substitutos ósseos como o cimento α -TCP. Segundo Marx [11], o PRP libera um conjunto de fatores tróficos que possuem 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 adequado à cicatrização de tecidos, induzindo a quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular e remoção de restos teciduais [12-14].

O objetivo deste estudo foi avaliar a regeneração óssea utilizando o cimento de α -TCP granulado e o PRP, aplicados em conjunto ou isoladamente em defeitos ósseos em ratos, e comparar seus efeitos sobre a osteogênese com o padrão-ouro (enxerto autólogo).

2 Material e métodos

2.1 Animais e grupos de experimentação

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Foram

utilizados 34 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) da linhagem Kyoto, machos, adultos com 250 gramas de massa corporal, dos quais 4 foram utilizados como doadores de sangue para obtenção do PRP e de osso para o enxerto autólogo. Os 30 animais restantes foram utilizados no experimento, sendo distribuídos randomicamente em 2 grupos de acordo com o período de avaliação, 4 e 8 semanas. A adoção de um modelo de lesão bilateral resultou no dobro de unidades experimentais (lesão) em relação ao número de animais utilizados.

2.2 Obtenção do Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

Seis a oito mililitros de sangue foram puncionados da artéria carótida de cada rato doador e imediatamente transferidos para tubos contendo solução anticoagulante de ácido citrato dextrose-A (ACD-A). O sangue foi centrifugado em centrífuga hematológica CELM – LS 3 PLUS conforme protocolo adaptado [15]. Após a segunda centrifugação, a camada superior (plasma pobre em plaquetas) foi retirada do tubo e descartada, restando a porção de PRP e um pequeno botão de hemácias no fundo do tubo (Figura 1). O PRP foi ativado com cloreto de cálcio (CaCl_2) e trombina misturados (600 IU/mL de trombina em 1mL de CaCl_2 5.9mg/mL –Aventis Behring, São Paulo/BR) na proporção 1:2 de PRP. O gel de PRP foi aplicado na quantidade de 100 μ L para cada animal, isoladamente ou misturado ao cimento de α -TCP granulado conforme o tratamento requerido.

2.3 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®) do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital São Lucas da PUCRS.

2.4 Obtenção do Enxerto Autólogo

Os mesmos ratos utilizados como doadores para a aquisição do plasma rico em plaquetas foram utilizados na obtenção do enxerto autólogo. Desses animais, retirou-se fragmentos do osso ilíaco, sendo posteriormente particulados e aplicados como enxerto autólogo.

2.5 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% cimento α -TCP e 15% de sulfato de cálcio hemiidratado. O tamanho dos grânulos utilizados era entre 150 a 300 μ m e quantidade aplicada em cada defeito foi de 50 mg.

2.6 Procedimentos Cirúrgicos

A anestesia foi induzida com Cloridrato de Cetamina (50 mg.kg⁻¹) e Clorpromazina (5mg.Kg⁻¹) via intraperitoneal. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados de acordo com protocolo modificado de Galia et al. [16], sendo cuidadosamente criado um defeito com uma broca modelo Carbide nº 8 em motor de alta rotação e constante irrigação com solução fisiológica estéril. Cada cavidade foi preenchida com um dos 4 tipos de tratamentos (enxerto autólogo - padrão ouro; cimento α -TCP; PRP; cimento de α -TCP e PRP combinados). No grupo controle não foi aplicado nenhum preenchimento. Posteriormente, procedeu-se a aproximação da fáscia lata com sutura Prolene 5-0 e sutura da pele com fio mononylon 4-0 (Ethilon® Johnson & Johnson, Brasil). No pós-operatório, os ratos foram mantidos em gaiolas individuais e foi realizada analgesia com cetoprofeno subcutâneo (3,5 mg.Kg⁻¹). Após 4 e 8 semanas os animais experimentais foram anestesiados e eutanasiados com dose letal de Tiopental 100mg/Kg⁻¹.

A distribuição dos tratamentos seguiu o princípio da redução (minimizar o número de animais experimentais). Portanto, planejou-se agrupar os animais que receberam o tratamento com PRP na mesma data cirúrgica, já que a quantidade necessária de plasma para a obtenção do PRP dependia do sacrifício de outro animal isogênico, doador do volume total de sangue. Os animais nos quais o defeito foi preenchido com cimento α -TCP + PRP, receberam no outro lado o tratamento com PRP isolado. A aplicação do PRP em ambos os lados teve a intenção de evitar um possível efeito do PRP sobre o processo de osteogênese no lado contralateral. Assim a distribuição dos grupos experimentais ficou constituída segundo apresentado na Tabela 1.

2.7 Análises Radiográficas

No dia anterior à eutanásia, radiografias dorso-ventrais foram realizadas através do equipamento mamográfico Mamomat 3000 (Siemens®) e transdutores de imagens Image Plate (IP) (Fuji®), específicos para mamografia (alvo-trilha molibdênio-Molibdênio, 28 kVp e 14mAs). As avaliações das imagens radiográficas digitalizadas foram realizadas por examinador devidamente capacitado, com o auxílio do software Image J. No momento de avaliação de cada lesão foram verificadas a área (mm²) e o comprimento longitudinal da lesão (mm). O valor “0” (zero) representou a ausência de lesão observada através dos parâmetros acima descritos. Para garantir a reprodutibilidade do protocolo de análise das imagens foi desenvolvido um Procedimento Operacional Padrão (POP) e aplicado o coeficiente de correlação intraclasse (ICC) entre dois avaliadores experientes. Os valores do coeficiente adotados como referência foram: ICC < 0,2 - pobre; 0,2 ≤ ICC < 0,4 – Razoável; 0,4 ≤ ICC < 0,6 – Moderado; 0,6 ≤ ICC < 0,8 – Boa; ICC ≥ 0,8 – Muito Boa. [17].

2.8 Preparação Histológica e Histomorfometria

Após a eutanásia dos animais, os fêmures foram removidos, imediatamente fixados em formalina tamponada a 10% por 36 horas, desidratados com soluções alcoólicas em graduações crescentes e clarificados com xilol. A descalcificação foi realizada com solução de ácido fórmico 50%. Posteriormente, os fêmures foram incluídos em parafina e cortes de 5µm foram realizados. As amostras foram desbastadas até a região central da lesão, sendo confeccionada uma lâmina histológica para cada fêmur. Após permanecer em uma estufa a 60°C por 24h, as lâminas foram desparafinizadas, hidratadas em água corrente. E incubadas em solução de Picosirius a 1% por uma hora, que age através da precipitação de moléculas de Sirius Red que se depositam paralelamente às moléculas do colágeno, provocando um aumento da birrefringência das fibras quando observadas à luz polarizada. A leitura das lâminas foi realizada pelo mesmo examinador cego, supervisionado por patologista experiente, em microscópio óptico Zeiss Axioskop 40 com objetiva de 5X. Para captura das imagens utilizou-se a câmera CoolSNAP™

Pro *cf* (Media Cybernetics, Inc.) que produziu um aumento de 10x; com isso, as imagens resultantes passaram a ter um aumento de 50x. Cada imagem foi capturada sob luz normal e luz polarizada, sendo 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. As imagens foram analisadas através do software Image ProPlus® versão 4.5.1 (Media Cybernetics, Inc.) que permitiu mensurar a área em micrômetros. 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) [18].

2.9 Análise Estatística

Os dados foram expressos em média e desvio padrão para variáveis de distribuição normal. Para a comparação 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 $\alpha=0,05$.

3 Resultados

3.1 Resultados Clínicos

O protocolo anestésico empregado e as medicações administradas no pós-operatório mostraram-se efetivos para a realização dos procedimentos cirúrgicos e para manter o bem estar dos animais. Não foram 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.

3.2 Contagem de Plaquetas

O número de plaquetas no sangue normal, antes das centrifugações para obtenção de PRP, foi de 459.000 plaquetas/ μ L e no PRP foi de 3181.000 plaquetas/ μ L. A quantidade de plaquetas confirmaram que a técnica de preparação do PRP utilizada no experimento resultou em amostras com altas concentrações de plaquetas, com um número de plaquetas quase 7 vezes mais elevado quando comparado ao sangue normal.

3.3 Resultados Radiográficos

No processo de validação do protocolo de análise das imagens radiográficas, as avaliações dos dois examinadores experientes apresentaram variações nas medidas de comprimento e área inferiores à dimensão de um pixel, com ICC= 0,8, o que demonstra a reprodutibilidade do processo entre pessoas devidamente capacitadas. É importante ressaltar a relevância de que, antes de dar início ao processo de análise, o examinador seja adequadamente capacitado, discutindo e avaliando um número elevado de imagens.

Das 60 amostras obtidas inicialmente no experimento, uma foi excluída da avaliação radiográfica, devido à fratura no fêmur esquerdo em um dos animais (controle – 4 semanas). Em alguns casos tratados com cimento de α -TCP observou-se que o material migrou para os tecidos adjacentes, depositando-se no músculo longitudinalmente ao osso. A fratura e o material extravasado podem ser observados na Figura 2.

As avaliações radiográficas não foram realizadas acompanhando a evolução da cicatrização da lesão no mesmo indivíduo. Entretanto, verifica-se que independentemente dos tratamentos, há diferença significativa das médias da área e do comprimento longitudinal da lesão entre os dois períodos avaliados ($p=0,004$). Ao comparar a diferença encontrada entre as médias das duas variáveis em 4 e 8 semanas, como pode ser observado na Tabela 2, foi encontrado valores de p significativos somente para o controle.

Quanto ao efeito dos tratamentos sobre a lesão óssea, independentemente do tempo, as evidências encontradas não forneceram dados suficientes para comprovar

diferenças significativas nas duas variáveis analisadas, área e comprimento longitudinal ($p>0,05$). Uma possível razão para não significância é o resultado das imagens brancas resultantes dos defeitos preenchidos com a adição de cimento α -TCP ou enxerto autólogo, ao serem imageadas, terem apresentado características de intensidade de sinal semelhante ao osso cortical. Dessa forma, não se pode verificar a existência de crescimento ósseo acentuado.

Em relação à área, os valores sugerem uma significância marginal na diferença entre os tratamentos ($p=0,08$). Numericamente, o tratamento PRP apresentou desempenho diferente quando comparado aos demais, inclusive em relação ao controle. Os valores das médias e respectivos desvios-padrões da área e comprimento longitudinal estão expostos nas Figuras 3 e 4.

3.4 Resultados Histológicos - Histomorfometria

Para avaliação histológica, além do fêmur fraturado, foram excluídas outras 4 amostras devido a problemas na descalcificação e confecção das lâminas. Três amostras corresponderam ao período de 8 semanas (2 controle e 1 cimento α -TCP+PRP), e a quarta pertencia ao grupo de 4 semanas (enxerto autólogo).

Na observação das lâminas através de microscopia óptica, não foi constatado nenhum sinal de inflamação, necrose óssea ou de tecidos adjacentes. Em todos os casos, evidenciou-se tecido ósseo em neoformação nas áreas do defeito cirúrgico, tanto nas margens quanto na região central. Após 4 semanas, observou-se formação de tecido conjuntivo desorganizado permeando as áreas de neoformação óssea que preencheram as cavidades cirúrgicas. Em 8 semanas, percebeu-se uma redução nas dimensões da lesão, com uma discreta área de tecido conjuntivo organizado permeando as áreas de neoformação óssea que preencheram as cavidades cirúrgicas, sugerindo uma estrutura óssea em remodelamento. Sob luz polarizada, pode-se observar a presença de fibras de colágeno organizadas em tons de amarelo a vermelho (Figura 5 e 6).

As médias da área de neoformação óssea analisadas em 4 e 8 semanas, independente mente dos tratamentos, foram significativamente diferentes, com valor de p inferior a 0,001. Ao comparar as médias da área de neoformação óssea, independentemente do período analisado, constatou-se diferença significativa entre os tratamentos ($p=0,029$). Na comparação das médias par a par, confirmou-se que

essa diferença foi significativa entre o tratamento enxerto autólogo e controle ($p=0,041$), e entre enxerto autólogo e PRP ($p=0,05$). Os demais tratamentos, cimento α -TCP e cimento α -TCP+PRP, não apresentaram diferenças estatísticas significativas (Figura 7).

4 Discussão

O tratamento mais eficaz, considerado como padrão ouro atualmente no reparo de danos teciduais ósseos, é o enxerto autólogo. Apesar de suas vantagens, das quais se destacam a histocompatibilidade e a capacidade osteoindutora, o enxerto autólogo apresenta alguns inconvenientes como quantidade limitada de tecido doador, a falha gerada na região de extração do enxerto e a difícil aceitação dos pacientes [19-22].

Diversos biomateriais são constantemente pesquisados para substituir o tecido ósseo, e o objetivo destas pesquisas é encontrar uma alternativa que apresente os mesmos benefícios do enxerto autólogo, porém livre de suas desvantagens.

Atualmente, há um consenso dentro da comunidade científica que estuda os princípios da bioengenharia, de que o processo de reparo ósseo é promovido pela interação entre elementos celulares, mediadores químicos e matrizes osteocondutoras [7, 23, 24]. Diante destes preceitos, a aplicação combinada de cimento de α -TCP e PRP apresentam características que podem estimular a osteogênese. Alguns estudos afirmam que o cimento de α -TCP além de biocompatível, é biocondutor e bioativo [20,25-27]. Da mesma forma, há evidências na literatura de que o PRP é uma ótima alternativa para o reparo de lesões ósseas [28-30], em virtude de ser caracterizado como fonte autóloga de fatores de crescimento [8, 9].

Contudo, os estudos clínicos e experimentais realizados com PRP não são consistentes sobre seus efeitos e impactos na cicatrização óssea [31-34], e as revisões sistemáticas realizadas não comprovam sua eficácia [35,36]. São encontrados resultados contraditórios sobre a aplicação de PRP, possivelmente devido aos diferentes modelos experimentais utilizados (defeitos críticos ou não críticos), às diferenças na biologia e fisiologia entre as espécies estudadas, diferentes

técnicas de preparação do PRP e os diferentes substitutos ósseos utilizados combinados ao PRP [37].

Na análise radiográfica do presente estudo, observou-se um pior desempenho do PRP em relação aos demais grupos, incluindo o controle, tanto para os valores das médias da área quanto do comprimento longitudinal da lesão. Em relação à área, o PRP apresentou médias e desvios-padrões de $5,59 \pm 2,69 \text{ mm}^2$ em 4 semanas e $3,23 \pm 1,46 \text{ mm}^2$ em 8 semanas, sendo verificada uma diferença significativa marginal quando comparado ao enxerto autólogo.

No presente estudo a concentração de plaquetas no PRP dos ratos foi 7 vezes maior quando comparada ao sangue normal (PRP=3181.000 plaquetas/ μL). A alta concentração pode ser a causa da falta de efeito positivo do PRP sobre o reparo do defeito ósseo. Weibrich e colaboradores [38], em um estudo *in vivo*, sugeriram que a eficácia do PRP sobre a regeneração óssea é dependente da concentração de plaquetas obtida. Em baixas concentrações, o PRP pode apresentar efeitos pouco expressivos e, paradoxalmente, em altas concentrações parece exercer um efeito inibitório. As afirmações dos autores acima citados indicam que altas concentrações e altos volumes de PRP podem exercer um efeito citotóxico sobre a cicatrização óssea, podendo restringir a ação de substitutos ósseos sintéticos e enxertos autólogos ou alógenos. Tais fatos podem explicar os resultados deste estudo, que sugerem que o PRP não favorece a neoformação óssea.

A concentração terapêutica de plaquetas considerada ideal é de aproximadamente 1000.000/ μL [13], em humanos. Trowbridge et al. [39] 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.

Os achados de Pryor et al. [40, 41] sobre a influência do PRP no reparo de defeitos em calvária de ratos, mesmo sendo um modelo de lesão óssea distinto, sugerem uma semelhança com os resultados do presente estudo, onde nenhum efeito do PRP sobre a regeneração óssea foi encontrado. Em contraste, Messoria et al. [42] demonstrou em seus resultados uma melhora significativa quando aplicado PRP em

defeito ósseo de rato. Isso confirma as contradições encontradas na literatura sobre a eficácia do PRP na osteogênese e a necessidade de padronização das técnicas de obtenção em modelos animais.

Segundo Marx et al. [9] o PRP exerce uma influência sobre as células. Portanto, ao ser utilizado em combinação com substitutos ósseos sintéticos deveria apresentar um efeito positivo maior sobre a neoformação óssea em relação ao enxerto ósseo utilizado isoladamente. 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, e os biomateriais podem, ocasionalmente, ofuscar os efeitos do PRP [40]. As médias do PRP isolado em todas as variáveis estudadas no presente estudo foram inferiores ao grupo cimento α -TCP+PRP, diferente das médias do grupo cimento α -TCP, que apresentou valores semelhantes ao grupo cimento α -TCP+PRP (Tabelas 3 e 4). Os dados sugerem que o PRP não estimulou nem inibiu o desempenho do cimento no reparo do defeito ósseo.

Pode-se sugerir como possível causa para a semelhança entre os resultados dos tratamentos cimento α -TCP e cimento α -TCP+PRP a baixa eficácia do PRP, tendo em vista que os dados histomorfométricos demonstram uma diferença significativa entre o enxerto autólogo (padrão-ouro) e PRP isolado ($p=0,05$). De maneira similar, também houve diferença significativa entre o enxerto autólogo e controle ($p=0,041$), que teve médias de neoformação bem próximas às do PRP (Figura 7). Em contrapartida, os grupos cimento α -TCP+PRP e cimento α -TCP demonstraram um padrão semelhante ao enxerto autólogo, que apresentou as menores médias da área da lesão (Figura 3) e maior área de neoformação (Figura 7). Os dados histomorfométricos e radiográficos convergem ao indicar o enxerto autólogo como o melhor tratamento no reparo de defeitos cavitários em fêmur de ratos.

Na análise histomorfométrica observou-se o crescimento ósseo ao redor das partículas de cimento α -TCP, bem como a presença de colágeno. A bioatividade e a osteocondutividade dos grânulos de cimento 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 [43]. Kihara et al. [44] observaram neoformação óssea sobre a superfície e no interior das partículas de cimento 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 [45].

Todas as médias verificadas nas imagens radiográficas, área e comprimento longitudinal da lesão, foram menores em 8 semanas quando comparadas à 4 semanas (Figuras 3 e 4). Esses dados sugerem um fechamento parcial da lesão para todos os casos estudados. Contudo, na comparação das diferenças entre as médias de cada tratamento em 4 e 8 semanas, foi constatada diferença significativa somente no controle, o que sugere um efeito precoce dos demais tratamentos (enxerto autólogo, α -cimento e cimento α -TCP+PRP). O PRP não apresentou diferença significativa entre as médias de 4 e 8 semanas ($p=0,06$), entretanto não podemos afirmar que seu efeito foi precoce sobre o reparo ósseo, pois em 8 semanas o valor da média da área foi elevado.

Os grânulos do cimento α -TCP migraram para tecidos moles adjacentes em alguns casos, distribuindo-se longitudinalmente no músculo. Provavelmente o extravasamento do material foi ocasionado pela movimentação dos grânulos, não sendo observado nenhum sinal de reação inflamatória durante todo o pós-operatório e na remoção dos fêmures. Uma das limitações do presente estudo é não ter sido adotado nenhum procedimento para conter os grânulos. O fêmur apresenta cavidade medular, sendo que uma grande quantidade de medula extravasa após a criação do defeito, podendo ser a causa da não aderência de alguns grânulos de cimento ao osso.

O tamanho da lesão eleita para o atual estudo foi baseado em modelo validado na literatura [16], porém não existe consenso sobre qual o tamanho de defeito crítico cavitário em fêmur de ratos. Para defeito segmentar (*gap*) em fêmur de ratos, o tamanho estabelecido como crítico é de 6mm [46] e para defeito cavitário em calvária, 8mm [47]. Portanto, o tamanho da lesão pode ser mais uma limitação deste estudo, pois um defeito crítico é caracterizado por não se regenerar espontaneamente. Possivelmente uma lesão cavitária em fêmur de rato com 5mm não possua tamanho suficiente para ser considerada crítica. O grupo controle, neste experimento, apresentou médias que não diferiram significativamente dos demais tratamentos, exceto quando comparadas às médias de neoformação óssea do enxerto autólogo, independente do tempo. Tais fatos podem estimular a padronização do

tamanho de defeito crítico cavitário em fêmur de ratos, para que os estudos experimentais possam apresentar maior consistência.

O número limitado de animais utilizado no experimento pode ter influenciado a não significância na comparação das médias entre os tratamentos nos diferentes períodos. Possivelmente, se o número da amostra fosse superior, diferenças com maior poder estatístico teriam sido alcançadas.

5 Conclusão

Considerando as limitações do presente estudo e com base nos dados apresentados, é possível concluir que os resultados não ofereceram dados suficientes para comprovar diferenças significativas entre o grupo PRP e cimento α -TCP+PRP. Da mesma maneira, não foi encontrada significância entre as médias do grupo cimento α -TCP e cimento α -TCP+ PRP ($p>0,05$). Foi observado um melhor desempenho do tratamento enxerto autólogo, com diferenças significativas quanto à área de neoformação óssea, independente do tempo analisado, em relação aos grupos PRP ($p=0,05$) e controle ($p=0,041$). Em contrapartida, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre enxerto autólogo e os grupos cimento α -TCP+PRP e cimento α -TCP ($p>0,05$). Os tratamentos PRP, cimento α -TCP e cimento α -TCP+PRP não diferiram significativamente do grupo controle, assim como não foram evidenciadas diferenças quando comparados entre si. Observou-se nos dados radiográficos, um efeito inferior do tratamento PRP sobre o reparo ósseo em relação aos demais grupos, incluindo o controle. Os dados do presente estudo sugerem que os tratamentos com cimento α -TCP e PRP, aplicados isoladamente ou em conjunto, não demonstram efeito positivo sobre o reparo ósseo.

Agradecimento

Agradeço ao professor Doutor Vinícius Duval, Coordenador do Laboratório de Patologia do Hospital São Lucas da PUCRS pelo suporte durante as avaliações histológicas.

Referências

- [1] Lysaght MJ, Nguy NA, Sullivan K. An economic survey of the emerging tissue engineering industry. *Tissue Eng.* 1998 Fall;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 Aug;67:4-5.
 - [3] Remedios A. Bone and bone healing. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1999 Sep;29(5):1029-44.
 - [4] Chu TM, Warden SJ, Turner CH, Stewart RL. Segmental bone regeneration using a load-bearing biodegradable carrier of bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials.* 2007 Jan;28(3):459-67.
 - [5] Hollinger JO, Brekke J, Gruskin E, Lee D. Role of bone substitutes. *Clin Orthop Relat Res.* 1996 Mar(324):55-65.
 - [6] Hench LL. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials.* 1998 Aug;19(16):1419-23.
 - [7] Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: a harmony of optimal biology and optimal fixation? *Injury.* 2007 Sep;38 Suppl 4:S1-2.
 - [8] 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 Jul-Aug;14(4):529-35.
 - [9] 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 Jun;85(6):638-46.
 - [10] 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 Jun;74(6):849-57.
 - [11] Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.* 2001;10(4):225-8.
 - [12] 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 Jan;91(1):4-15.
 - [13] Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Apr;62(4):489-96.
 - [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 Apr;38(4):540-6.
 - [15] Rossi Junior R, Negreiros RM, Elias FM, Jorge WA. Utilização de plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos para reparação de defeitos ósseos. *Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo.* 2008 set/dez;20(3):295-300.
 - [16] Galia CR, Rosito R, Mello TM, Macedo C. Use of homologous and heterologous bone grafting in rat femoral shafts: a comparison between frozen and lyophilized bone graft. *Revista Brasileira de Ortopedia.* 2005 Março;40(3):141-6.
-

-
- [17] Altman, DG. *Practical Statistics for medical research*. London. Chapman and Hill, 1991
- [18] Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis*. 1988 May;96(5):379-94.
- [19] Pollock R, Alcelik 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 Jun;17(6):845-52.
- [20] Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005 Nov;36 Suppl 3:S20-7.
- [21] Seiler JG, 3rd, Johnson J. Iliac crest autogenous bone grafting: donor site complications. *J South Orthop Assoc*. 2000 Summer;9(2):91-7.
- [22] Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthop Relat Res*. 1996 Aug(329):300-9.
- [23] Laurencin CT, Einhorn TA, Lyons K. Fracture repair: challenges and opportunities. *J Bone Joint Surg Am*. 2008 Feb;90 Suppl 1:1-2.
- [24] Pountos I, Georgouli T, Blokhuis TJ, Pape HC, Giannoudis PV. Pharmacological agents and impairment of fracture healing: what is the evidence? *Injury*. 2008 Apr;39(4):384-94.
- [25] 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 Feb;16(1):119-27.
- [26] 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 Jul;25(15):2941-8.
- [27] dos Santos LA, De Oliveria LC, Rigo EC, Carrodeguas RG, Boschi AO, De Arruda AC. Influence of polymeric additives on the mechanical properties of alpha-tricalcium phosphate cement. *Bone*. 1999 Aug;25(2 Suppl):99S-102S.
- [28] Dori F, Kovacs V, Arweiler NB, Huszar 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 Oct;80(10):1599-605.
- [29] Nagata MJ, Melo LG, Messoria 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 Sep;36(9):775-83.
- [30] 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 Jan;20(1):34-40.
- [31] Raghoobar GM, Schortinghuis J, Liem RS, Ruben JL, van der Wal JE, Vissink A. Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? *Clin Oral Implants Res*. 2005 Jun;16(3):349-56.
- [32] Fennis JP, Stoelinga PJ, Jansen JA. Mandibular reconstruction: a histological and histomorphometric study on the use of autogenous scaffolds, particulate cortico-cancellous bone grafts and platelet rich plasma in goats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2004 Jan;33(1):48-55.
- [33] Hee HT, Majd ME, Holt RT, Myers L. Do autologous growth factors enhance transforaminal lumbar interbody fusion? *Eur Spine J*. 2003 Aug;12(4):400-7.
-

-
- [34] Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Vasilic N, Madzarevic M, Kenney EB. Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *J Periodontal Res.* 2002 Aug;37(4):300-6.
- [35] Plachokova AS, Nikolidakis D, Mulder J, Jansen JA, Creugers NH. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in dentistry: a systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2008 Jun;19(6):539-45.
- [36] Wallace SS, Froum SJ. Effect of maxillary sinus augmentation on the survival of endosseous dental implants. A systematic review. *Ann Periodontol.* 2003 Dec;8(1):328-43.
- [37] Plachokova AS, van den Dolder J, van den Beucken JJ, Jansen JA. Bone regenerative properties of rat, goat and human platelet-rich plasma. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2009 Aug;38(8):861-9.
- [38] Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone.* 2004 Apr;34(4):665-71.
- [39] 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 Aug;5(3):145-70.
- [40] 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 Sep;32(9):966-72.
- [41] Pryor ME, Yang J, Polimeni G, Koo KT, Hartman MJ, Gross H, et al. Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: radiographic observations. *J Periodontol.* 2005 Aug;76(8):1287-92.
- [42] 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 Periodontal Res.* 2008 Apr;43(2):217-23.
- [43] LeGeros RZ. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chem Rev.* 2008 Nov;108(11):4742-53.
- [44] 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 Nov;79(2):284-91.
- [45] dos Santos LA, Carrodeguas RG, Boschi AO, Fonseca de Arruda AC. Fiber-enriched double-setting calcium phosphate bone cement. *J Biomed Mater Res A.* 2003 May 1;65(2):244-50.
- [46] Einhorn TA, Lane JM, Burstein AH, Kopman CR, Vigorita VJ. The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix. A radiographic and biomechanical study. *J Bone Joint Surg Am.* 1984 Feb;66(2):274-9.
- [47] Nyan M, Sato D, Oda M, Machida T, Kobayashi H, Nakamura T, et al. Bone formation with the combination of simvastatin and calcium sulfate in critical-sized rat calvarial defect. *J Pharmacol Sci.* 2007 Aug;104(4):384-6.
-

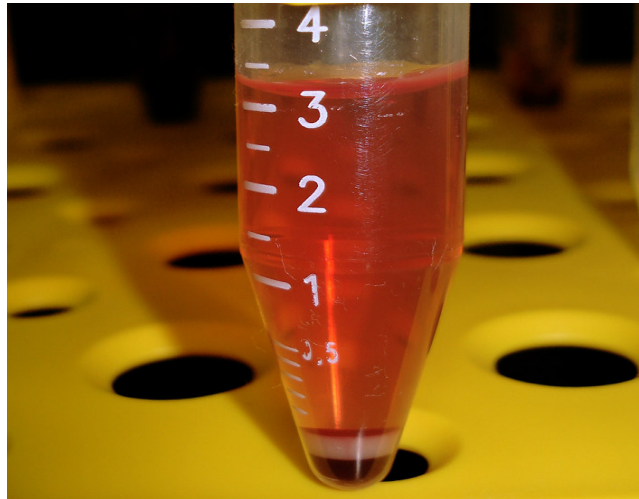


Figura 1. Sangue do rato após 2ª centrifugação. Porção superior à zona de névoa corresponde ao plasma pobre em plaquetas e porção inferior ao botão de hemácias. Na zona de névoa estão depositadas as plaquetas e os leucócitos.

Tabela 1 – Distribuição dos animais conforme aplicação dos tratamentos.

Grupo	Número de ratos	Fêmur direito	Fêmur esquerdo
4 semanas	6	Cimento α -TCP + PRP	PRP
	3	Cimento α -TCP	Enxerto autólogo
	3	Cimento α -TCP	Controle
	3	Enxerto autólogo	Controle
8 semanas	6	Cimento α -TCP + PRP	PRP
	3	Cimento α -TCP	Enxerto autólogo
	3	Cimento α -TCP	Controle
	3	Enxerto autólogo	Controle

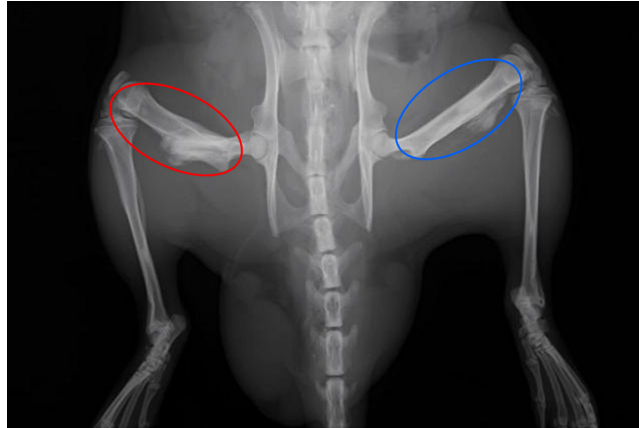


Figura 2. Fêmur esquerdo fraturado correspondente ao grupo controle – 4 semanas (circulado em vermelho). No fêmur direito, (circulado em azul), o cimento de α -TCP depositado longitudinalmente ao osso.

Tabela 2 - Diferenças das médias da área e comprimento da lesão óssea obtidas entre 4 e 8 semanas.

Tratamento	Diferença entre 4 e 8 semanas			
	Área (mm ²)	p	Comprimento (mm)	p
Controle	3,44	0,007*	2,59	0,005*
Enxerto autólogo	1,80	0,174	1,46	0,095
Cimento α-TCP	0,72	0,570	0,49	0,579
PRP	2,36	0,060	0,55	0,509
Cimento α-TCP+PRP	0,74	0,542	0,26	0,756

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

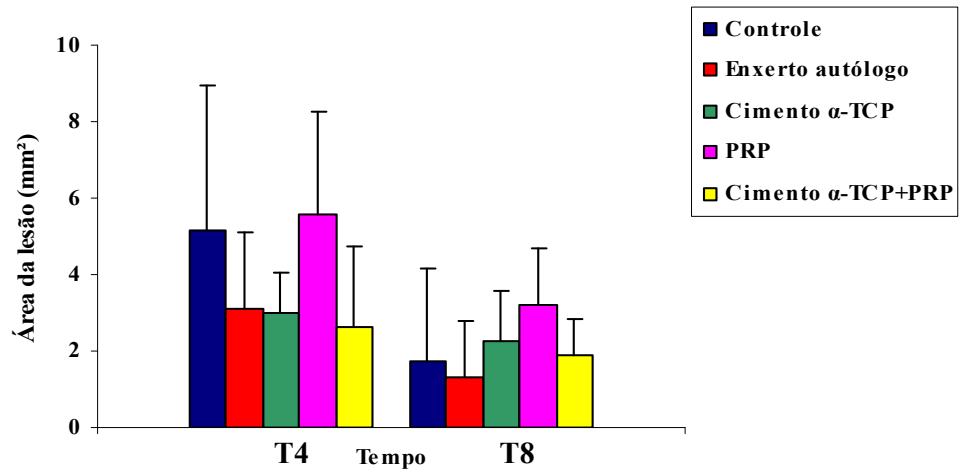


Figura 3. Gráfico representando as médias da área da lesão e respectivos desvios padrões, em 4 e 8 semanas.

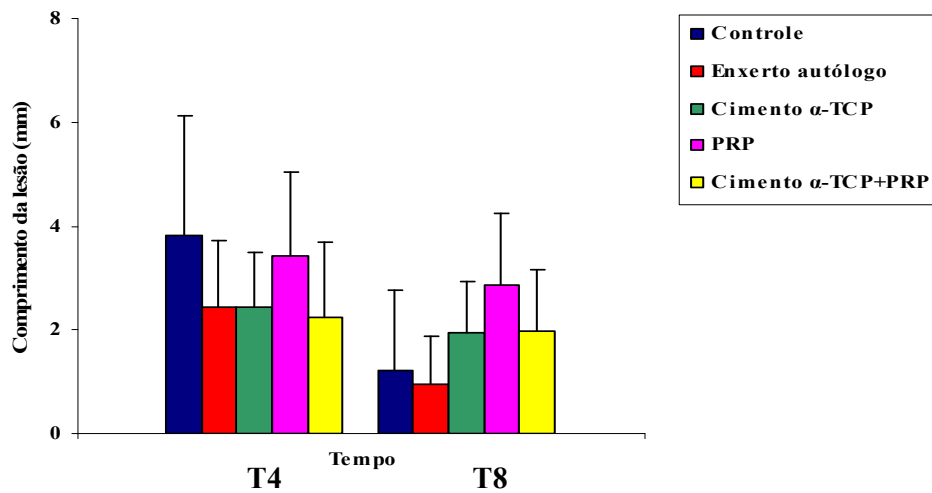


Figura 4. Gráfico representando as médias do comprimento longitudinal da lesão e respectivos desvios padrões, em 4 e 8 semanas.

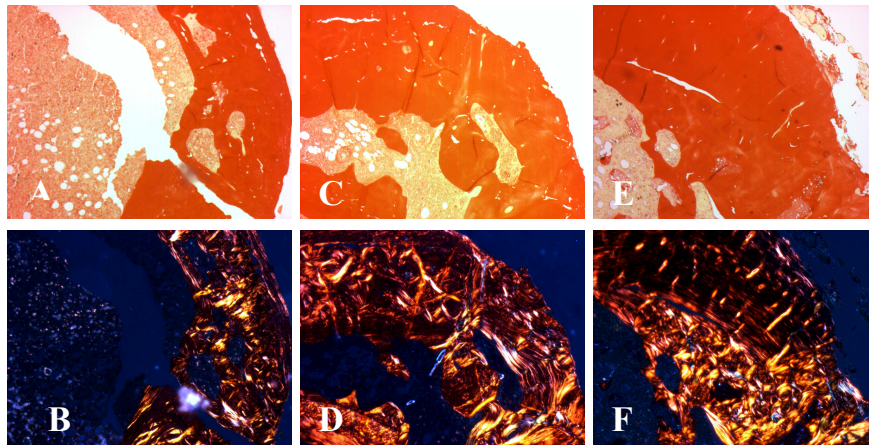


Figura 5. Grupos controle (A e B), Enxerto autólogo (C e D) e cimento de α -TCP (E e F) após 8 semanas. Coloração picrosirius sob luz normal (acima) e luz polarizada (abaixo), evidenciando áreas com colágeno em tons do amarelo ao vermelho. Aumento 50X.

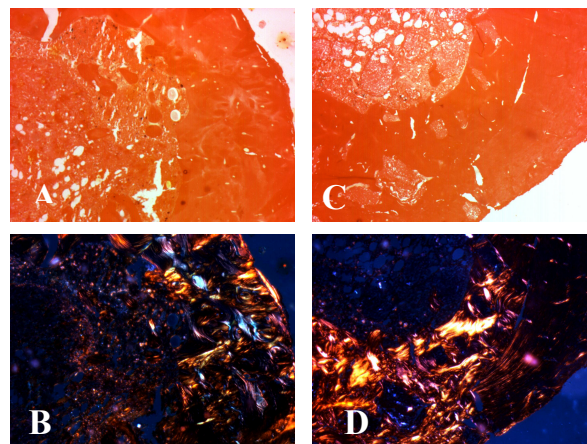


Figura 6. Grupos PRP (A e B), e cimento α -TCP + PRP (C e D) após 8 semanas. Coloração picrosirius sob luz normal (acima) e luz polarizada (abaixo), evidenciando áreas com colágeno em tons do amarelo ao vermelho. Aumento 50X.

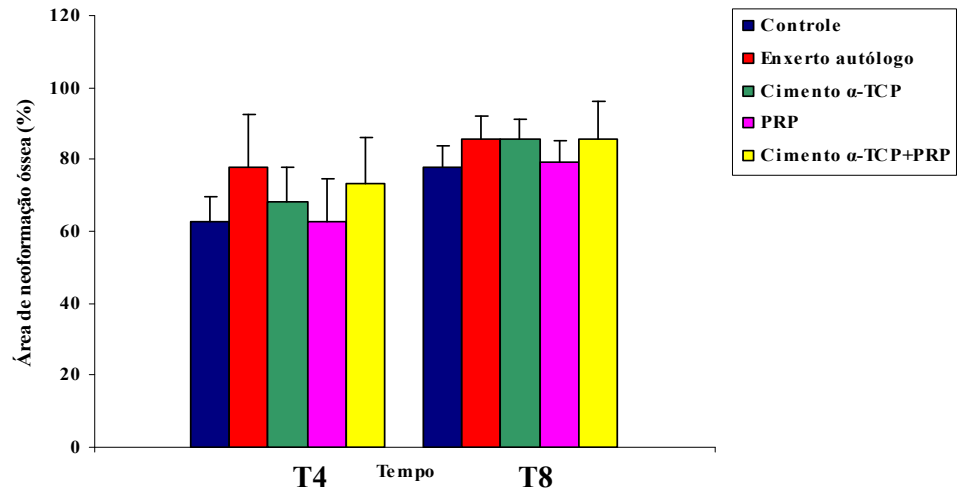


Figura 7. Gráfico com as médias da área de neoformação óssea em 4 e 8 semanas de avaliação, e respectivos desvios padrões.



Alessandra Sebben <adsebben@gmail.com>

Submission Confirmation

BONE (ELS) <bone@elsevier.com>
Para: adsebben@gmail.com

21 de janeiro de 2010 16:32

Dear adsebben,

Your submission entitled "EFFECT OF ALFA-TRICALCIUM PHOSPHATE CEMENT AND PLATELET-RICH PLASMA ON BONE HEALING" has been received by Bone

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/bone/>.

Your username is: adsebben

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/bone/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,
Joslyn Paguio
Journal Manager
Bone

EFFECT OF ALFA- TRICALCIUM PHOSPHATE CEMENT AND PLATELET-RICH PLASMA ON BONE HEALING

Sebben, AD^{1*}; Hoff, G²; Klein, CP¹; Assad, CA¹; Freitas, TA¹; Santos, LA³; Braga Silva, J^{1,4}

¹ Laboratory Skills Medical and Surgical Research of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul- PUCRS, Brazil.

² Faculty of Medical Physics of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul - PUCRS, Brazil.

³ Department of Biomaterials, Federal University of Rio Grande do Sul – UFRGS, Brazil.

⁴ Service of Hand Surgery and Reconstructive Microsurgery, Hospital São Lucas, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Brazil.

* Corresponding author. Avenue Ipiranga 6690 – 64. CEP: 90610000 Porto Alegre/RS, Brazil. Phone (5551) 84179375; (55 51) 33203500 - 4816.

E-mail address: adsebben@gmail.com (AD Sebben)

ABSTRACT

Objective: This study evaluates the effect of α -TCP cement and platelet-rich plasma on osteogenesis, when used alone or together, comparing to the gold standard (autologous graft).

Material and Methods: Thirty-four Wistar-Kyoto rats were used in this study. A bilateral defect was created, and each hole was filled with one of the four types of treatments (autologous bone graft, α -TCP cement, PRP and α -TCP cement+PRP) and evaluated in 4 and 8 weeks. In the control group no filling was applied. The X-ray images provided values of area and longitudinal length of the defect, and the histological images, indicated the new bone formation area.

Results: Regarding the effect of the treatments on the bone defect, independently of the time, the X-ray results did not provide sufficient data to confirm significant

differences in both variables analyzed – area and length ($p=0.08$). In the histomorphometry, it was observed a better performance of the treatment with autologous bone graft, and it presented significant differences regarding the new bone formation area, compared to the PRP ($p=0.05$) and control ($p=0.041$). On the other hand, there were no significant differences between autologous graft and the groups α -TCP cement+PRP and α -TCP cement ($p>0.05$). The treatments PRP, α -TCP cement and α -TCP cement +PRP did not differ significantly from the control group, as well as when they were compared to each other.

Conclusion: the data of this study suggest that the treatments with α -TCP cement and PRP, when applied alone or together, do not present positive effect on bone healing.

Keywords: Experimental Model; Osteogenesis; Bone substitutes; Platelet-rich plasma; Growth factors.

1 Introduction

Musculoskeletal injuries are considered one of the main causes of morbidity in the world. These harms decrease importantly the life quality of people suffering from them, and they cause physical disability [1]. Sports and traffic accidents are among the origins of these damages, and they generate a big socioeconomic impact and increase the healthcare expenses [2].

Bone tissue, when it is injured, has the ability to return to its original structure [3]; however, if the harm is loss of bone mass, the regeneration becomes limited. Among the most used bone substitutes are the autologous graft (considered the gold standard). The autologous graft is characterized by its high bioinductive capacity, but it presents disadvantages, such as the necessity of a second surgical intervention in order to extract the graft, morbidity in the local and the low quantity of donor tissue [4].

In order to improve the bone repair and overcome the disadvantages of the autologous graft, the inorganic bone substitutes, such as the alpha-tricalcium phosphate cement (α -TCP) are widely applied as biomaterials in Orthopedics and Dentistry [5]. The α -TCP, besides being biocompatible, is considered an osteoconductive and bioactive material. As they establish chemical connections with

the bone tissue, they stimulate the proliferation of fibroblasts, osteoblasts and other bone cells [6]. Within the Tissue Engineering, it is proposed that a complex of triangular interactions, including osteoprogenitor cells, osteoinductive mediators and osteoconductive matrixes, is an alternative in restoration of soft and hard tissues [7]. Considering that inductive proteins, such as the growth factors, regulate the cell events that stimulate the new bone formation, their application combined with α -TCP cement might be a promising strategy to promote osteogenesis in severe bone damages.

As autologous source of growth factors, the platelet-rich plasma (PRP), which is characterized as a volume of plasma with platelet concentration of 3 to 8-folds increase over the physiological levels [8-10] might have a positive effect when applied together with bone substitutes such as α -TCP.

According to Marx [11], the PRP releases a set of trophic factors whose carrier is the blood clot. Among these factors are the three isoforms of platelet-derived growth factors (PDGF), transforming growth factor alpha and beta (TGF- α and TGF- β), vascular endothelial growth factor (VEGF) and epithelial growth factor (EGF). The proteins released by the platelets create a microenvironment favorable to the healing of tissues, inducing the cell chemotaxis, proliferation and differentiation, as well as the removal of debris [12-14].

The aim of this study is evaluating bone regeneration, using α -TCP cement and PRP in bone defects in rats, comparing them to the gold standard.

2 Material and Methods

2.1 Animals and experimental groups

The current study was approved by the Animal Use Ethics Committee of Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul. Thirty-four adult male Wistar-Kyoto rats (*Rattus norvegicus*), weighting 250g, were used; four of them were blood donors in order to obtain PRP, as well as of bone to the autologous graft. All the other 30 rats were distributed randomly in two groups, accordingly to the period of evaluation – 4 and 8 weeks. The number of experimental unities was twice the number of animals used (Table 1), for it has been adopted a bilateral defect model.

2.2 PRP preparation

Six to eight milliliters of blood were extracted from the carotid artery of each rat donor and transferred immediately into tubes containing anticoagulant acid citrate dextrose solution A (ACD-A). The blood was centrifuged in a hematologic centrifuge CELM – LS 3 PLUS, according to adapted protocol [15]. After the second centrifugation, the upper layer (platelet-poor plasma) was removed from the tube and discarded. PRP and a small erythrocyte button remained at the bottom of the tube (Figure 1). PRP was activated with chloride calcium (CaCl_2) and thrombin (600 IU/mL de thrombin in 1mL de CaCl_2 5.9mg/mL – Aventis Behring, São Paulo/BR) mixed at 1:2 of PRP rate.

Platelet-rich plasma gel was applied in each animal (100 μL), alone or mixed to α -TCP cement, accordingly to requested treatment.

2.3 Platelet count

Platelet quantification in whole blood of rats and PRP samples were performed in the automated hematology analyzers (SYSMEX XT 1800 - Roche®), used in the Clinical Pathology Laboratory of São Lucas Hospital PUCRS.

2.4 Acquirement of autologous graft

The same rats used as platelet-rich plasma donors were used to obtain the autologous graft. Fragments from the iliac bone were taken from these animals, particulated and used as autologous graft preparation.

2.5 Synthesis of Alpha-Tricalcium Phosphate particulated cement

The α -TCP particulated cement employed in this research was synthesized and provided by the Biomaterials Laboratory (LABIOMAT) of Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS; it was constituted of 85% α -TCP and 15% calcium sulphate hemihidrate. The size of the particles used ranged from 150 to 300 μm , and the quantity applied in each animal was 50mg.

2.6 Surgical and anesthetic procedures

The rats were anesthetized by an intraperitoneal injection of Ketamine (50mg/kg⁻¹) and Chlorpromazine (5mg.kg⁻¹). The surgical procedures were performed accordingly to Galia et al. [45] modified protocol, and a bilateral hole defect was carefully made with a drill (Carbide 8), using a high-speed motor, under continuous sterile saline irrigation. Each hole (on the right and left femurs) was filled with one of the treatments (autologous graft, α -TCP cement, PRP, α -TCP cement+PRP). In the control group no filling was applied after the defect. Later, the fascia lata and the skin were sutured, respectively, with Prolene 5-0 and mononylon 4-0 suture. In the postoperative period, the rats were kept in individual cages, and it was administered 3.5 mg.kg⁻¹ of subcutaneous Cetoprofen for analgesia. After four and eight weeks, all the experimental rats were anesthetized and sacrificed with a Tiopental lethal dose (100mg.kg⁻¹).

The distribution of the treatments followed the principle of reduction (minimize the number of animals in the experiment). Thus, it was planned to operate all the animal that took PRP treatment in the same date, for obtaining a high quantity of plasma depended on the sacrifice of another isogenic animal, which would be the donor of the whole blood.

The animals that had the hole defect filled with α -TCP cement + PRP received only PRP on the other side. The PRP application in both sides had the purpose of avoiding a possible PRP effect on the contralateral side. Thus, the distribution of the experimental groups is as presented in Table 1.

2.7 X-ray analyses

In the day before euthanasia of the rats, the dorsal-ventral radiographs were performed through mammographic equipment Mamomat 3000 (Siemens ®) using Image Plate (IP) (Fuji ®) as image signal transducers, specific to mammography (target-track Molybdenum-Molybdenum at 28 kVp and 14 mAs). The evaluation of the digitized radiographic images were made by a professional properly qualified, using also the software Image J. The area (mm²) and the longitudinal length of the defect were evaluated, and “0” (zero) represented the absence of defect. It was developed a Standard Operating Procedure (SOP) and applied the Intraclass

Correlation Coefficient (ICC), between two experienced examiners, in order to guarantee the reproducibility of the image analysis protocol. The rates adopted as a reference were: $ICC < 0,2$ - poor; $0.2 \leq ICC < 0.4$ – Reasonable; $0.4 \leq ICC < 0.6$ – Moderate; $0.6 \leq ICC < 0.8$ – Good; $ICC \geq 0.8$ – Great [16].

2.8 Histological Preparation and Histomorphometry

After the euthanasia, the femurs were removed, fixed in 10% neutral formaline, dehydrated in gradual series of alcohol and decalcificated with 50% formic acid solution. Later on, the femurs were included in paraffin, and 5 μ m cuts were made. The most central histological section of each defect was selected, and a histological slide to each femur was made. The slides were deparaffinized, hydrated in running water and incubated in 1% Picrosirius solution for one hour. This solution works with the precipitation of Sirius Red molecules, which deposit in parallel to the collagen molecules, provoking an increase in the fibers birrefringency when observed in the polarized light. The slides were read by the same blind examiner, supervised for an experienced pathologist, on a Zeiss Axioskop 40 light microscope with 5X objective. To capture the images, it was used the camera CoolSNAP™ Pro cf (Media Cybernetics, Inc.), which magnified them 10X. Each image was captured under normal and polarized light, and two fields were selected for each slide, in order to represent all the area of defect. For each area of defect, in the same slide, it was elected an adjacent region to the defect, with similar dimensions, to represent the normal bone. The images were analyzed using Image ProPlus® 4.5.1 (Media Cybernetics, Inc.) software, which allowed to measure the area in micrometers. To differ the collagen, it was reached the rate of birrefringent tissue by unit of tissue (pixel/ μ m), using the images captured under normal and polarized light. The area in micrometers was transformed in percentage of new bone formation by comparing the area of bone tissue of the defect to the area of normal bone tissue, and it was stated as 100% of new bone formation (ideal rate) [17].

2.9 Statistical Analysis

The data was expressed in mean and standard-deviation to variables of normal distribution. To compare the values of area (mm^2), longitudinal length (mm) and area

of new bone formation (%) of the defect, it was used the analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey's *post hoc* test. The significance level adopted was $\alpha=0.05$.

3 Results

3.1 Clinical Results

The anesthetic protocol employed and the medication administered in the postoperative period showed effective in the surgical procedures and in keeping the animals welfare. No kind of moving difficulty on the limbs operated was observed. The surgical wounds healed appropriately, and no rat presented signs of infection or clinical problems during the study.

3.2 Platelet Count Results

The number of platelets in whole blood, before it was centrifuged for obtaining PRP, was 459.000 platelets/ μL , and in PRP was 3.181.000 platelets/ μL . The number of platelet confirmed that the technique for preparing PRP used in this experiment resulted in samples with platelet high concentration. The number of platelets was almost 7 times higher than the one of whole blood.

3.3 X-ray Results

From the sixty samples obtained in the experiment, one was excluded from the X-ray evaluation due to the fracture on the left femur of one of the animals (control group – 4 weeks). In some cases treated with α -TCP cement, it was noticed that the material migrated to the adjacent tissues, depositing on the muscle longitudinally to the bone. The fracture and the material that came out can be observed in Figure 2.

X-ray evaluations were not made following the evolution of the healing on the same individual. However, it is verified that independently of the treatment there is a significant difference between the mean of the area and the longitudinal length of the defect in both periods of evaluation ($p=0.004$). When comparing the difference obtained between the means of both variables in 4 and 8 weeks, significant values of

p were found only for control group (Table 2). Regarding the effect of the treatments on bone defect, independently of the time, the evidences found did not provide sufficient data to confirm significant differences in both the variables analyzed ($p>0.05$). A reason for the non-significance might be for the defects that resulted in white image, when adding α -TCP cement or autologous graft, have similar characteristics of sign intensity to the cortical bone. Thus, the existence of significant bone growth can not be verified.

Concerning the area, the values suggest a marginal significance in the difference between the treatments ($p=0.08$). Numerically, PRP treatment presented a different performance when compared to the others, even regarding control. The values of the means and respective standard deviations of area and longitudinal length are presented in Figures 3 and 4.

In the process of validation of the analysis protocol of X-ray images, the evaluations of both experienced examiners presented variations in the area and length measures, lower than one pixel, with ICC=0.8, which demonstrate the reproducibility of the process among properly qualified people. It is important to emphasize, before the beginning of the analysis process, that the examiner has to be adequately qualified, in order to discuss and evaluate a high number of images.

3.4 Histological Results – Histomorphometry

In order to perform the histological evaluation, other four samples were excluded, besides the fractured femur, due to problems in decalcification and slides preparation. Three samples corresponded to the period of eight weeks (2 control and 1 α -TCP cement+PRP), and the fourth belonged to the group of four weeks (autologous graft).

Observing the slides in optical microscopy, there was no sign of inflammation, bone necrosis or adjacent tissues. In all the cases, it was noticed new bone formation, in all the areas of the surgical defect, whether on the edges or in the center. After four weeks, it was noticed disorganized connective tissue formation surrounding the areas of new bone formation that filled the surgical holes. In eight weeks, it was seen a reduction in the dimensions of the defects and a small area of organized connective tissue surrounding the areas of new bone formation that filled the surgical hole, which suggests a bone structure in remodeling. Also, under

polarized light, it could be observed collagen fibers organized in yellow and red (Figures 5 and 6).

The means of new bone formation area analyzed in 4 and 8 weeks, independently of the treatment, were significantly different, with p value lower than 0.001. Comparing the means of new bone formation area, independently of the period analyzed, there have been a significant difference between the treatments ($p=0.029$). When they were compared in pairs, it remained clear the significant difference between autologous graft and control ($p=0.041$), and between autologous graft and PRP ($p=0.05$). All the other treatments – α -TCP cement and α -TCP cement+PRP – did not show significant statistical differences (Figure 7).

4 Discussion

The most effective treatment, currently considered gold standard in healing bone tissue injuries, is the autologous graft. Its main advantages are histocompatibility and osteoinductive capacity, however it presents some disadvantages, such as limited quantity of donor tissue, loss in the region of extraction and difficult acceptability from the patients [18-21].

Many biomaterials are constantly under research for replacing bone tissue. The aim of these researches is finding an alternative that presents the same autologous graft benefits, without its disadvantages

Currently, there is a consensus within the scientific community that studies the principles of bioengineering, stating that bone formation process is promoted by a set of cell elements, chemical mediators and osteoconductive matrixes [7, 22, 23]. Thus, the application of α -TCP cement and PRP combined seems to match the ideal properties to stimulate osteogenesis. Some studies state that α -TCP cement is bioconductive, bioactive and biocompatible [19, 24-26]. Likewise, there are evidences in literature that PRP is a great alternative in bone healing [27-29], for it is characterized as an autologous source of growth factors [8, 9].

Nevertheless, the clinic and experimental studies realized with PRP are not solid about their effects and impact on bone healing [30-33], and the systematic bibliographical reviews do not prove their effectiveness [34, 35].

Contradictory results about the use of PRP are found possibly due to the different experimental models (critical or non-critical defects), the biological and physiological differences among the species studied, the different techniques of PRP preparation and the different bone substitutes combined to the PRP [36].

In the X-ray analysis, it was seen a worst performance of PRP compared to the other groups, including control, whether to the mean values of area or to the longitudinal length of the defect. Regarding the area, the PRP presented means and standard deviations of $5.59 \pm 2.69 \text{ mm}^2$ in 4 weeks, and $3.23 \pm 1.46 \text{ mm}^2$ in 8 weeks, and a significant marginal difference when compared to the autologous graft.

The platelet concentration in the rats's PRP was 7-fold increase when compared to whole blood (PRP=3.181.000 plaquetas/ μL). The high concentration might be the cause of the lack of positive effect of PRP on defect bone healing. Weibrich and collaborators [37] in an *in vivo* study suggested that the effectiveness of PRP on bone regeneration depends on the platelet concentration obtained. In low concentration, PRP might present unimportant effects. Paradoxically, in high concentration PRP seems to have an inhibitory effect. The statements of the authors quoted indicate that PRP high concentration and high volume might have a cytotoxic effect on bone healing, and might restrict the action of synthetic bone substitutes and autologous or allogeneous bone grafts. Such facts might explain the results of this study, which suggest that PRP do not favor new bone formation.

The platelet therapeutic concentration considered ideal is of approximately 1.000.000/ μL [14], in human beings. Trowbridge et al. [38] stated that the average platelet quantity in rats is much higher than in human beings, and the average platelet volume is much lower than in human beings. Thus, there are biological differences between the species and they have to be considered. Only the protocols of human PRP preparation are standardized, as well as the platelet concentration and the ideal levels of growth factors. Therefore, the therapeutic levels of platelet concentration and the growth factor rates in animals still need to be defined.

Pryor and al. findings [39, 40] on PRP influence in repairing defects in rats's calvaria, in spite of being a different model of bone defect, have a similarity with the results of this study, where no PRP effect on bone healing was found. By contrast, Messoria et al. [41] demonstrated in their studies a significant increase when PRP was applied on bone defects in rats. This confirms the contradictions in literature about

the effectiveness of PRP on osteogenesis, and the necessity of a standard in the techniques of preparation in animal models.

Accordingly to Marx and al. [9], PRP influences the cells. Thus, when it is used combined with synthetic bone substitutes, it was supposed to present a higher positive effect on new bone formation than the bone graft used alone. However, PRP benefits depend on the number of osteoprogenitor cells existing on the graft location and on the action of the growth factors released by the platelets. The biomaterials occasionally might obscure PRP effects. [39] PRP isolated means were lower than α -TCP+PRP group in all variables studied in the current paper, while α -TCP isolated means presented values similar to α -TCP+PRP (Tables 3 and 4). The data suggest that PRP neither stimulated nor inhibited the cement performance in repairing the bone defect.

The low efficiency of PRP might be suggested as the possible cause of the similarity between α -TCP cement and α -TCP cement + PRP results, considering that the histomorphometric data demonstrate a significant difference between autologous graft (gold standard) and isolated PRP ($p=0.05$). Similarly, there was also a significative difference between autologous graft and control ($p=0.041$), which had means of new bone formation quite near to the ones of PRP (Figure 7). On the other hand, α -TCP+PRP and α -TCP showed a similar pattern to the autologous graft, which presented the lowest means of defect area (Figure 3) and the highest area of new bone formation (Figure 6). Histomorphometric and X-ray data indicate autologous graft as the best treatment to repair defects hole in femurs of rats.

In histomorphometrical analysis, bone growth surrounding α -TCP particles was seen, as well as the presence of collagen. Bioactivity and osteoconductivity of α -TCP particles might favor bone healing. It is known that partial degradation of calcium phosphate cements cause the release of calcium and phosphate ions on bone microenvironment, and they promote, in long term, mineralization and increase bone new formation. [42] Kihara et al. [43] observed bone new formation on the surface and inside α -TCP cement particles when it was applied on bone defects in rabbits, similarly to this study. These data support the statement that α -TCP cement is osteoconductive and allows the development of bone matrix [44].

All the means verified on the X-ray images, area and longitudinal length of the defect were lower in 8 weeks than in 4 weeks (Figures 3 and 4). These data suggest that the defect partially closed in all the cases studied. However, when the

differences between the means of each treatment, in 4 and 8 weeks, are compared it is seen significant difference only in the control, which suggests an earlier effect than in the other treatments (autologous graft, α -TCP and α -TCP+PRP). PRP did not present significant difference between the means of 4 and 8 weeks ($p=0.06$), but we can not state that its effect was earlier on bone repair, because in 8 weeks the mean value was high.

Alpha-Tricalcium Phosphate cement particles migrated to adjacent soft tissues in some cases, longitudinally spreading on the muscle. Possibly the overflow of the material was caused by the moves of the particle. In the postoperative period, it was not observed inflammatory reaction in the removal of the femurs. One of the limitations of the current study is that it did not adopt any procedure to contain the particles. Femur presents marrow hole, and a great portion of marrow overflows after the defect is created, which might be the reason for some cement particles not to adhere to the bone.

The size of the defect selected for the current study is based on a validated model in literature [45], however there is not a consensus about the right critical-size hole defect in femurs of rats. For segmental defect (*gap*) in femurs of rats, the established critical size is 6mm [46]; and for hole defect in calvaria, it is 8mm [47]. Thus, the defect size might be one more limitation of this study, for a critical size defect is characterized for not spontaneously regenerate. Possibly a hole defect of 5mm in femur of rats does not have enough size to be considered critical. In this experiment, control group presented means that did not differ significantly from the other treatments, except when compared to the new bone formation means of autologous graft, in any time. Such facts might stimulate the standardization of critical size hole defect in femur of rats, so the experimental studies can be more solid.

The limited number of animals used in this experiment might have contributed for the lack of significance when the means of the treatments were compared in different periods. If the number were higher, it could have been achieved statistically significant differences.

5 Conclusion

Regarding the limitations of the current study and based on the data provided, it is possible to conclude that the results did not present enough data to confirm significant differences between PRP and α -TCP cement+PRP. Likewise, no significance was found between the means of α -TCP cement and α -TCP cement+PRP ($p>0.05$). A better performance of autologous graft treatment was found, independently of the time analyzed, compared to PRP ($p=0.05$) and control ($p=0.041$) treatments. On the other hand, statistically significant differences between autologous graft and α -TCP cement+PRP and α -TCP cement alone ($p>0.05$) were not verified. PRP, α -TCP cement and α -TCP cement+PRP did not differ significantly from the control group, as well as when compared among each other. In X-ray data it was observed a lower effect of PRP on bone repair compared to all the other groups. The data of the current study suggest that the treatments with α -TCP cement and PRP, applied alone or together, do not show positive effect on bone repair. [16]

Acknowledgments

Dr. Vinicius Duval, Coordinator of the Laboratory of Pathology, Hospital São Lucas (PUCRS) for the support during the histological evaluations.

References

- [1] Lysaght MJ, Nguy NA, Sullivan K. An economic survey of the emerging tissue engineering industry. *Tissue Eng.* 1998 Fall;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 Aug;67:4-5.
- [3] Remedios A. Bone and bone healing. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1999 Sep;29(5):1029-44.
- [4] Chu TM, Warden SJ, Turner CH, Stewart RL. Segmental bone regeneration using a load-bearing biodegradable carrier of bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials.* 2007 Jan;28(3):459-67.
- [5] Hollinger JO, Brekke J, Gruskin E, Lee D. Role of bone substitutes. *Clin Orthop Relat Res.* 1996 Mar(324):55-65.
- [6] Hench LL. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials.* 1998 Aug;19(16):1419-23.

-
- [7] Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: a harmony of optimal biology and optimal fixation? *Injury*. 2007 Sep;38 Suppl 4:S1-2.
- [8] 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 Jul-Aug;14(4):529-35.
- [9] 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 Jun;85(6):638-46.
- [10] 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 Jun;74(6):849-57.
- [11] Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent*. 2001;10(4):225-8.
- [12] 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 Jan;91(1):4-15.
- [13] 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 Apr;38(4):540-6.
- [14] Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004 Apr;62(4):489-96.
- [15] Rossi Junior R, Negreiros RM, Elias FM, Jorge WA. Utilização de plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos para reparação de defeitos ósseos. *Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo*. 2008 set/dez;20(3):295-300.
- [16] Altman DG. *Practical Statistics for medical research*. London: Chapman and Hill; 1991.
- [17] Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis*. 1988 May;96(5):379-94.
- [18] Pollock R, Alcelik 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 Jun;17(6):845-52.
- [19] Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005 Nov;36 Suppl 3:S20-7.
- [20] Seiler JG, 3rd, Johnson J. Iliac crest autogenous bone grafting: donor site complications. *J South Orthop Assoc*. 2000 Summer;9(2):91-7.
- [21] Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthop Relat Res*. 1996 Aug(329):300-9.
- [22] Laurencin CT, Einhorn TA, Lyons K. Fracture repair: challenges and opportunities. *J Bone Joint Surg Am*. 2008 Feb;90 Suppl 1:1-2.
- [23] Pountos I, Georgouli T, Blokhuis TJ, Pape HC, Giannoudis PV. Pharmacological agents and impairment of fracture healing: what is the evidence? *Injury*. 2008 Apr;39(4):384-94.
- [24] 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 Feb;16(1):119-27.
-

- [25] 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 Jul;25(15):2941-8.
- [26] dos Santos LA, De Oliveria LC, Rigo EC, Carrodeguas RG, Boschi AO, De Arruda AC. Influence of polymeric additives on the mechanical properties of alpha-tricalcium phosphate cement. *Bone*. 1999 Aug;25(2 Suppl):99S-102S.
- [27] Dori F, Kovacs V, Arweiler NB, Huszar 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 Oct;80(10):1599-605.
- [28] Nagata MJ, Melo LG, Messoria 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 Sep;36(9):775-83.
- [29] 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 Jan;20(1):34-40.
- [30] Raghoobar GM, Schortinghuis J, Liem RS, Ruben JL, van der Wal JE, Vissink A. Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? *Clin Oral Implants Res*. 2005 Jun;16(3):349-56.
- [31] Fennis JP, Stoelinga PJ, Jansen JA. Mandibular reconstruction: a histological and histomorphometric study on the use of autogenous scaffolds, particulate cortico-cancellous bone grafts and platelet rich plasma in goats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2004 Jan;33(1):48-55.
- [32] Hee HT, Majd ME, Holt RT, Myers L. Do autologous growth factors enhance transforaminal lumbar interbody fusion? *Eur Spine J*. 2003 Aug;12(4):400-7.
- [33] Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Vasilic N, Madzarevic M, Kenney EB. Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *J Periodontal Res*. 2002 Aug;37(4):300-6.
- [34] Plachokova AS, Nikolidakis D, Mulder J, Jansen JA, Creugers NH. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in dentistry: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2008 Jun;19(6):539-45.
- [35] Wallace SS, Froum SJ. Effect of maxillary sinus augmentation on the survival of endosseous dental implants. A systematic review. *Ann Periodontol*. 2003 Dec;8(1):328-43.
- [36] Plachokova AS, van den Dolder J, van den Beucken JJ, Jansen JA. Bone regenerative properties of rat, goat and human platelet-rich plasma. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2009 Aug;38(8):861-9.
- [37] Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone*. 2004 Apr;34(4):665-71.
- [38] 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 Aug;5(3):145-70.
- [39] 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 Sep;32(9):966-72.
-

-
- [40] Pryor ME, Yang J, Polimeni G, Koo KT, Hartman MJ, Gross H, et al. Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: radiographic observations. *J Periodontol.* 2005 Aug;76(8):1287-92.
- [41] Messoria 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 Periodontal Res.* 2008 Apr;43(2):217-23.
- [42] LeGeros RZ. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chem Rev.* 2008 Nov;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 Nov;79(2):284-91.
- [44] dos Santos LA, Carrodeguas RG, Boschi AO, Fonseca de Arruda AC. Fiber-enriched double-setting calcium phosphate bone cement. *J Biomed Mater Res A.* 2003 May 1;65(2):244-50.
- [45] Galia CR, Rosito R, Mello TM, Macedo C. Use of homologous and heterologous bone grafting in rat femoral shafts: a comparison between frozen and lyophilized bone graft. *Revista Brasileira de Ortopedia.* 2005 Março;40(3):141-6.
- [46] Einhorn TA, Lane JM, Burstein AH, Kopman CR, Vigorita VJ. The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix. A radiographic and biomechanical study. *J Bone Joint Surg Am.* 1984 Feb;66(2):274-9.
- [47] Nyan M, Sato D, Oda M, Machida T, Kobayashi H, Nakamura T, et al. Bone formation with the combination of simvastatin and calcium sulfate in critical-sized rat calvarial defect. *J Pharmacol Sci.* 2007 Aug;104(4):384-6.
-

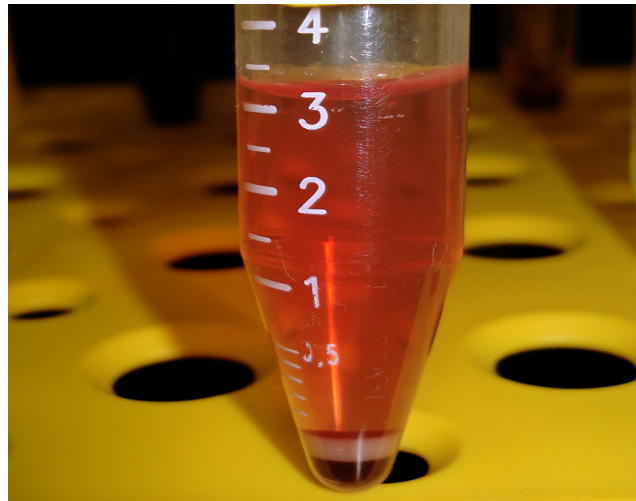


Figure 1. Blood of the rat after the second centrifugation. The upper layer to the nevoa zone correspond to poor-platelet plasma, and the lower layer, to the erythrocyte button. In the nevoa zone platelets and leukocytes are deposited.

Table 1 – Distribution of the animals to application of treatments.

Group	Rats number	Right femur	Left femur
4 weeks	6	α -TCP cement + PRP	PRP
	3	α -TCP cement	Autologous graft
	3	α -TCP cement	Control
	3	Autologou graft	Control
8 weeks	6	α -TCP cement + PRP	PRP
	3	α -TCP cement	Autologous graft
	3	α -TCP cement	Control
	3	Autologous graft	Control

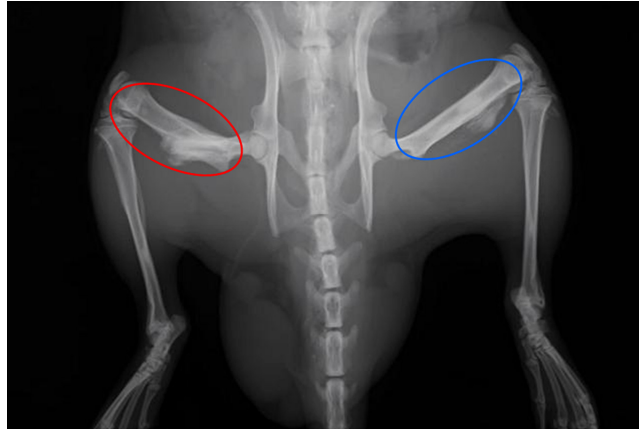


Figure 2. Fractured left femur corresponding to control group – four weeks (highlighted in red). On the right femur (highlighted in blue), α -TCP cement on the muscle longitudinally to the bone.

Table 2 - Differences in the means of area and length of bone defect obtained between 4 and 8 weeks.

Treatment	Difference between 4 and 8 weeks			
	Area (mm ²)	p	Length (mm)	p
Control	3.44	0.007*	2.59	0.005*
Autologous graft	1.80	0.174	1.46	0.095
α -TCP cement	0.72	0.570	0.49	0.579
PRP	2.36	0.060	0.55	0.509
α -TCPcement +PRP	0.74	0.542	0.26	0.756

Statistically significant difference for $p \leq 0.05$

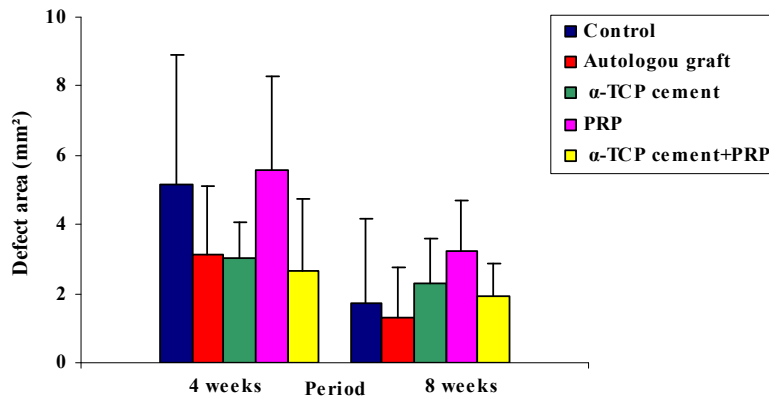


Figure 3. Graphic representing the means of defect area and respective standard deviations, in 4 and 8 weeks.

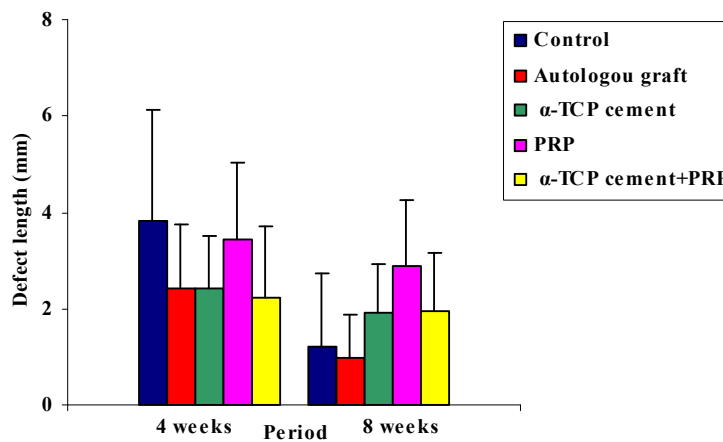


Figure 4. Graphic representing the means of defect length and respective standard deviations, in 4 and 8 weeks.

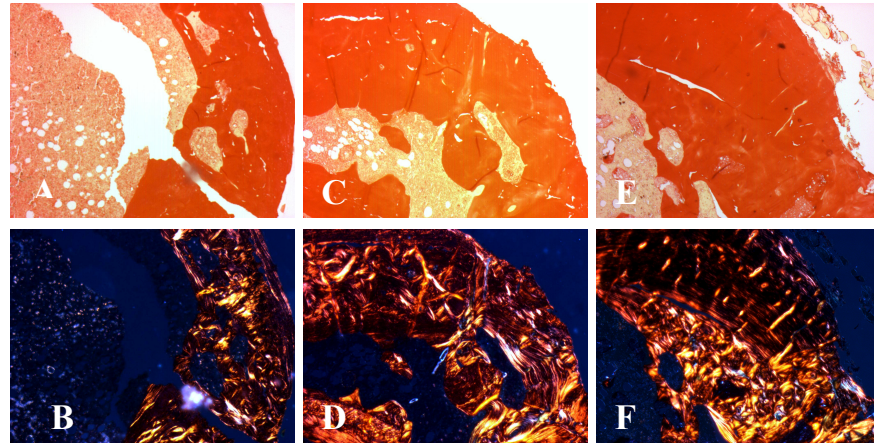


Figure 5. Control groups (A and B), autologous graft (C and D) and α -TCP cement (E e F) after 8 weeks. Picrosirius red stain under normal light (above) and polarized light (bellow), showing areas with collagen from yellow to red tones. Original magnification X 50.

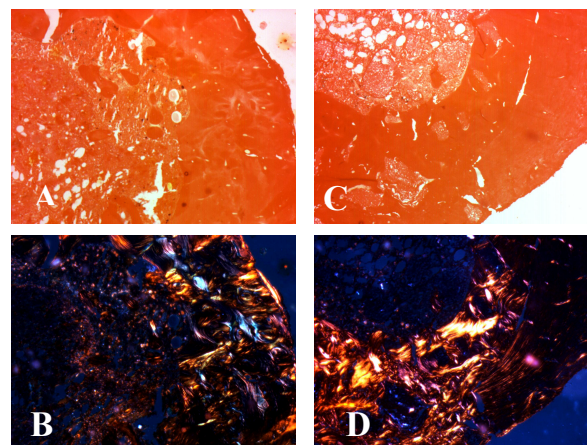


Figure 6. PRP groups (A and B) and α -TCP cement+PRP (C e D) after 8 weeks. Picrosirius red stain under normal light (above) and polarized light (bellow), showing areas with collagen from yellow to red tones. Original magnification X 50.

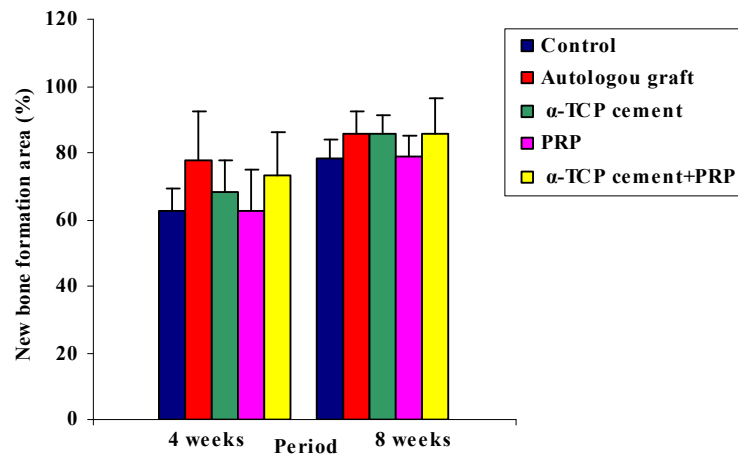


Figure 7. Graphic containing the means of bone formation area in 4 and 8 weeks of evaluation, and respective standard deviations.

ANEXOS

ANEXO A



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS

Ofício 030/09 - CEUA

Porto Alegre, 23 de março de 2009.


Senhor Pesquisador:

O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 08/00055, intitulado: **"Efeito do uso de cimento de α - fosfato tricálcico e plasma rico em plaquetas na regeneração de tecido ósseo"**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Relatórios do andamento do projeto devem ser entregues a este Comitê.

Atenciosamente,



Prof. Dr. Anamaria Feijó
Coordenadora do CEUA - PUCRS

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Jefferson Braga da Silva
N/Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 - 3º andar sala 314- CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: ceua@pucrs.br

ANEXO B**Procedimento Operacional Padrão – POP****Características das Lesões:**

Nestas análises poderão ser visualizadas imagens com e sem lesões:

Estrutura sem lesão:

A imagem se apresenta com uma coloração cinza homogênea, não havendo manchas ou estruturas com contraste significativo, como está ilustrado na Figura 1 a seguir.

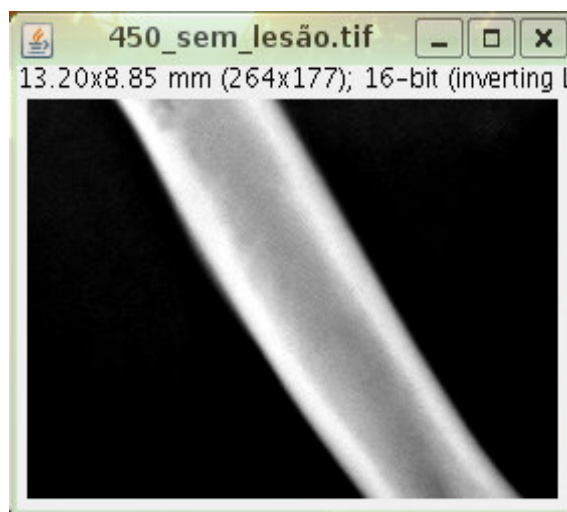


Figura 1: Imagem sem Lesão

Estruturas com lesões:**Lesões Claras:**

Estas imagens são caracterizadas por apresentarem uma coloração esbranquiçada com o formato de uma elipse alongada contrastando com a medula óssea. A Figura 2 a seguir mostra dois exemplos desse tipo de lesão. Em seguida, na Figura 3 aparecem demarcadas as respectivas lesões.

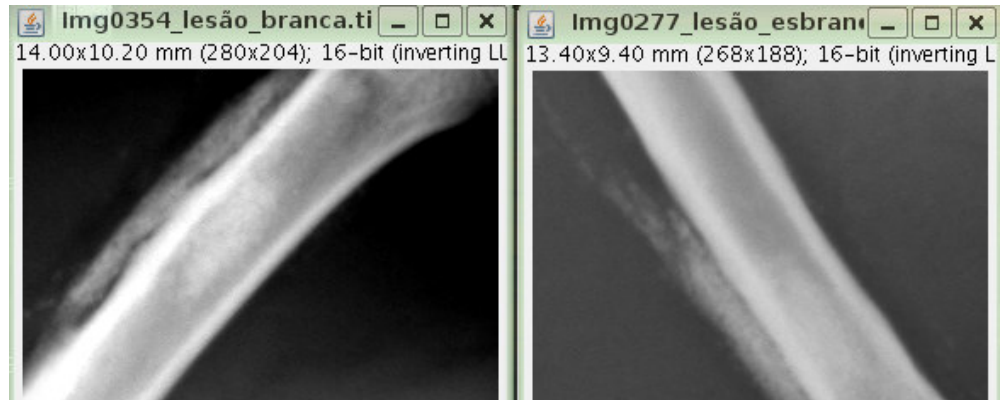


Figura 2: Imagens com Lesões Claras

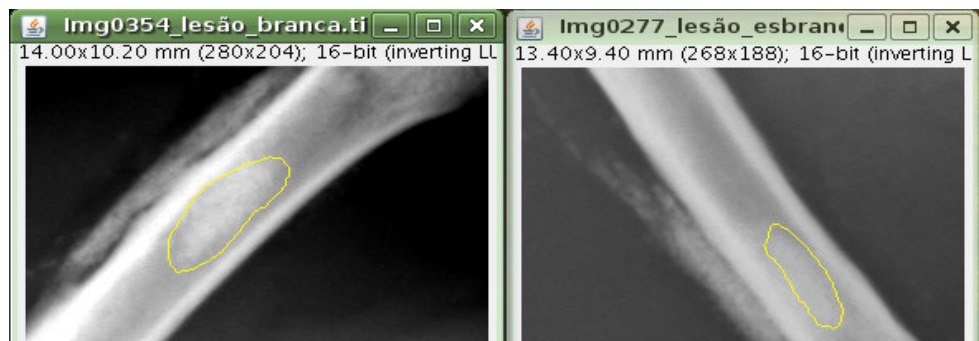


Figura 3: Imagens com as Lesões Claras Demarcadas

Lesões Escuras:

Estas lesões são caracterizadas por apresentarem-se uma coloração cinza mais escura que a medula óssea e, possuem também um formato elíptico alongado. A Figura 4 abaixo mostra duas lesões escuras e a Figura 5 ilustra as lesões escuras demarcadas.



Figura 4: Imagens com Lesões Escuras



Figura 5: Imagens com as Lesões Escuras Demarcadas

Estruturas Confusas:

As imagens que apresentam estruturas confusas, ao serem analisadas, precisam ser observadas com certo cuidado. Deve-se ter conhecimento de algumas informações adicionais sobre os tratamentos empregados nas lesões, como:

- Se há tratamento com algum tipo de cimento;
- Em qual período ocorreu o imageamento da lesão.

Portanto, estas informações devem ser usadas em caso de dúvida. A Figura 6 ilustra imagens confusas em relação a identificação das lesões.



Figura 6: Imagens com Estrutura confusas

POP para análise das imagens dos Ratos:

1. Abrir a imagem

No menu do Image J: *File* → *Open* (de acordo com a Figura 7)

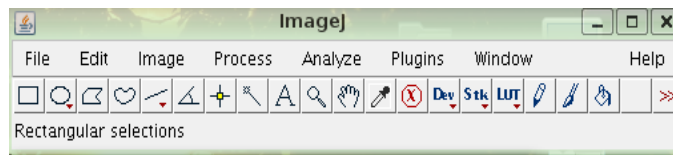


Figura 7: Abertura do Menu

Abri a janela (ilustrada na Figura 8 que segue) selecione o arquivo **.dcm** de interesse.

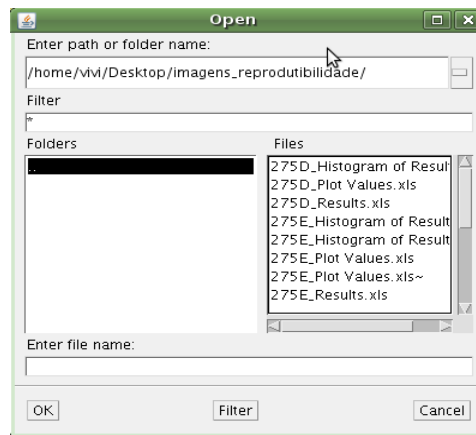


Figura 8: Abertura dos Arquivos

A imagem abrirá conforme mostra a Figura 9 que segue selecione.

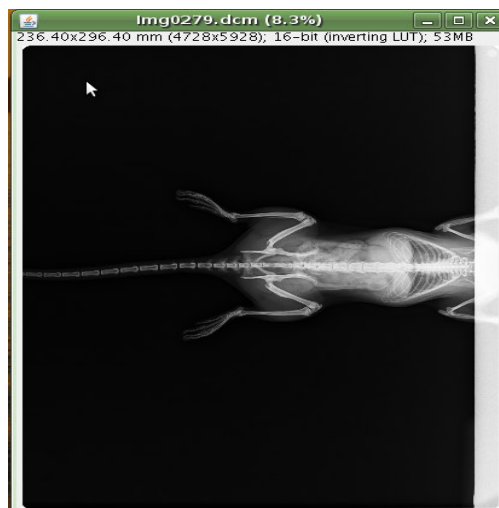


Figura 9: Imagem selecionada aberta

2. Selecionar na ferramenta *Rectangular selections* (Figura 10) a região de interesse. Selecione os dois femurs completos do rato (Figura 11)

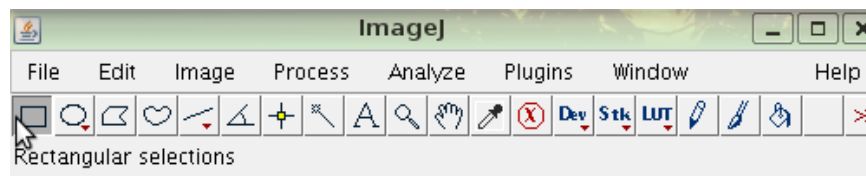


Figura 10: Ferramenta Seleção Retangular



Figura 11: Imagem com Região Seleccionada

3. Após a seleção da área retangular, na barra de ferramentas faça: *Image* → *Crop*. A a imagem será recortada para a área de interesse conforme mostra a Figura 12.



Figura 12: Corte Ampliado da Seleção Retangular

4. Usando a ferramenta *Straight line selections* (Figura 13), marque uma linha entre 19mm e 20mm a partir da cabeça do fêmur, conforme ilustra a Figura 14.

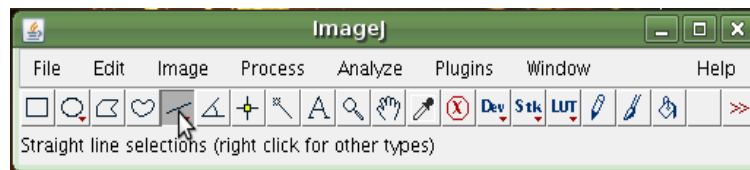


Figura 13: Seleção da Ferramenta



Figura 14: Usando a Ferramenta de Seleção *Straight Line*

5. Usando o final da linha como referência, marque com a ferramenta *Rectangular selections* (Figura 15) a nova região de interesse, que deve englobar a área referenciada anteriormente.



Figura 15: Área Referenciada Seleccionada

6. Após a seleção da área retangular, na barra de ferramentas faça: *Image* → *Crop*. A a imagem será recortada para a área de interesse, conforme mostra a Figura 16 a seguir.

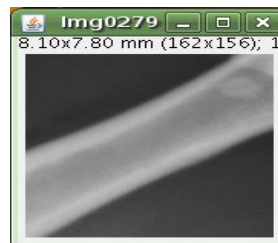


Figura 16: Imagem Recortada da Área de Interesse

7. Você pode usar a ferramenta *Magnifying glass* para aumentar a imagem. A Figura 17 mostra a localização desta ferramenta.

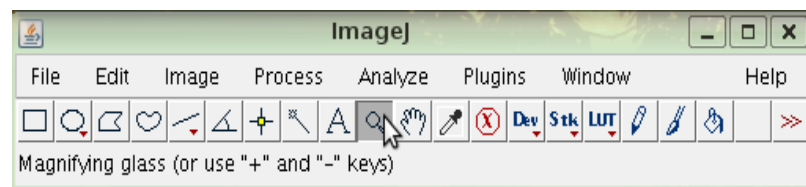


Figura 17: Ferramenta para Ampliação da Imagem

8. Você também pode usar a ferramenta *Image* → *Adjust* → *Brightness/Contrast* para adequar o brilho e o contraste da imagem para facilitar a visualização da lesão (Figura 18).

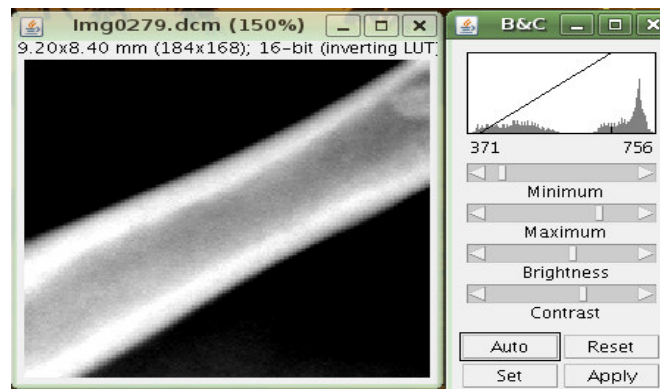


Figura 18: Imagem Ampliada com Ajuste de Brilho e Contraste

9. Com a ferramenta *Freehands selections*, marque a região da lesão o mais próximo possível do contorno visualizável (Figura 19 e 20). A lesão pode ser uma marca clara ou suavemente mais escura que a região da medula, de formato oval.

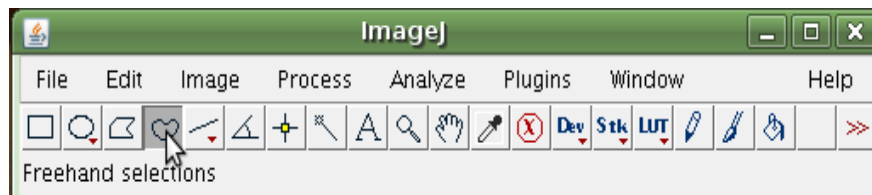


Figura 19: Ferramenta para a Marcação Manual da Lesão



Figura 20: Imagem com Região Marcada Manualmente

10. Utilize a ferramenta Snake no caminho: *Plugins* → *ABSsnake* --> *ABSsnake*. Uma tela de comunicação com o usuário irá abrir, conforme mostra a Figura 21 que segue. Parâmetros: Após o estabelecimento dos parâmetros, tem-se uma imagem *ImgXXX.dcm_ABSsnake* como na Figura 22 e uma *ImgXXX.dcm_seg* como na Figura 23.

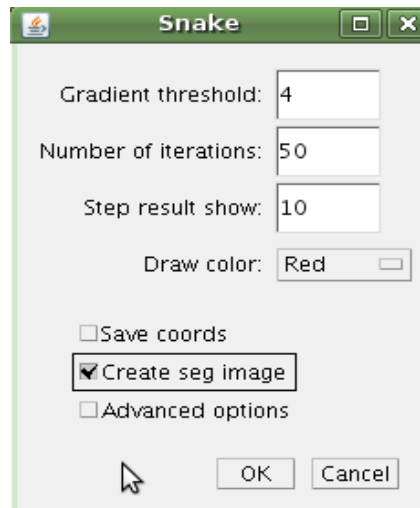


Figura 21: Parâmetros para a Formação da Máscara

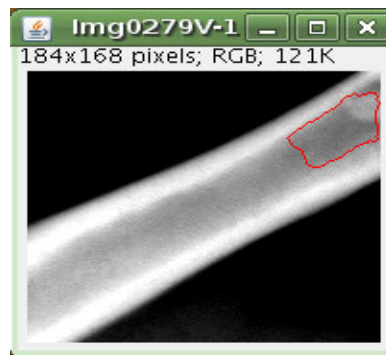


Figura 22: *ImgXXX.dcm* ABSsnake¹



Figura 23: *ImgXXX.dcm* seg¹

¹ XXX representa o número da imagem que é gerado com base na imagem original.

11. Para as máscaras ImgXXX.dcm_seg^2 e $\text{ImgXXX.dcm_ABsnake}^1$ deve ocorrer a conversão para imagem de 16-bit. Para tanto marque uma imagem de cada vez e siga o caminho: *Image* → *Type* → *16-bit*. O resultado dessa conversão é observado na Figura 24, a seguir.

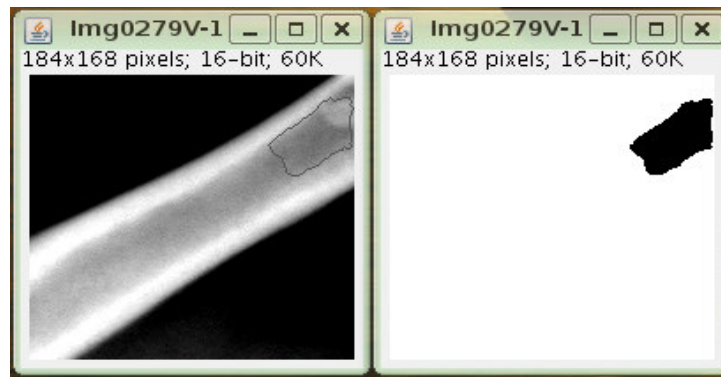


Figura 24: Imagens com 16 bits

12. Faça o processo de inversão da imagem ImgXXX.dcm_seg clicando na imagem e seguindo o caminho: *Edit* → *Invert*. Assim, a área de interesse ficará com valor de intensidade de sinal 255 e fora será registrado o valor 0 (zero), ilustrado na Figura 25 abaixo.



Figura 25: Imagem Invertida

13. Para esta mesma imagem selecione o caminho *Process* → *Math* → *Divide* e na tela que abre coloque como divisor o valor 255 (Figura 26). A imagem segmentada será composta por uma região preta a outra cinza, conforme ilustra a Figura 27.

2 XXX representa o número da imagem que é gerado com base na imagem original.

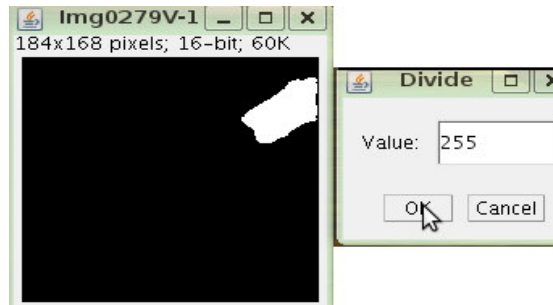


Figura 26: Imagem sendo Dividida



Figura 27: Imagem resultado da Divisão

14. Multiplique a imagem segmentada (ImgXXX.dcm_seg) pela máscara do ABSnake (ImgXXX.dcm_ABSnake) Figura 28 seguindo o processo: *Process* → *Image Calculator*. Preencha as opções conforme ilustra a Figura 29. Você terá como resultado uma imagem conforme ilustra a Figura 30. Esta imagem será utilizada para a definição da área e da dimensão do comprimento da área.



Figura 28: Imagens a serem Multiplicadas

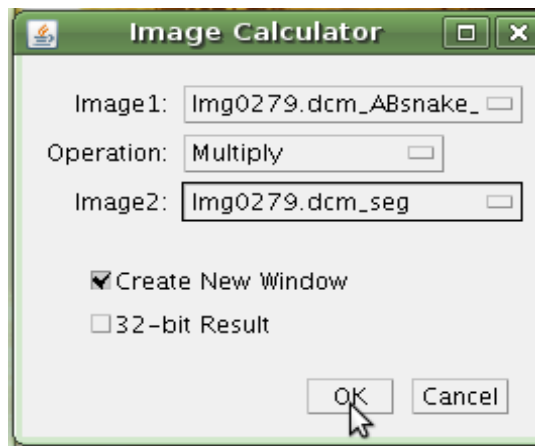


Figura 29: Opções a serem Preenchidas



Figura 30: Imagem resultante da Multiplicação

15. Salve o resultado da imagem (Figura 30) utilizando o menu do programa ImageJ *File* → *Save* e, use somente a imagem resultado deste processo para montar o histograma com o seguinte caminho: *Analyse*-->*Histogram* e teremos a Figura 31 que se segue.

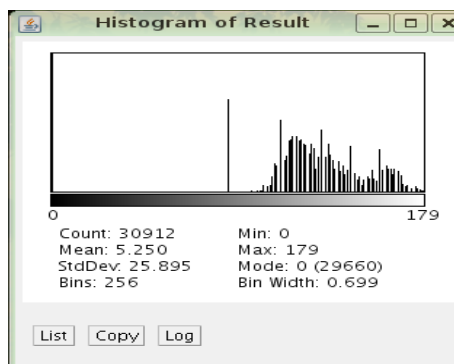
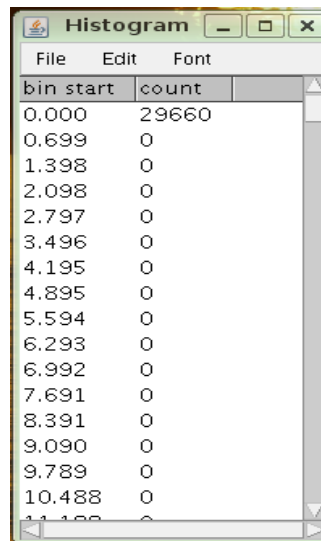


Figura 31: Histograma

16. Marcando em *List* obtemos a tabela mostrada na Figura 32, e que nos levará ao cálculo da área da região de interesse através de uma planilha de cálculo.



bin start	count
0.000	29660
0.699	0
1.398	0
2.098	0
2.797	0
3.496	0
4.195	0
4.895	0
5.594	0
6.293	0
6.992	0
7.691	0
8.391	0
9.090	0
9.789	0
10.488	0
11.188	0

Figura 32: Tabela com Valores para Cálculo da Área

17. Para salvar a tabela criada a partir do *Histogram*, Figura 32 siga o caminho: *File* → *Save as*, no menu da própria tabela e, abrirá a janela mostrada na Figura 33, complete o nome do arquivo com o número da imagem *_XXX* correspondente, ficando o arquivo *Histogram of Results _XXX* e marque em *Save*. Selecione o diretório com o seu nome para realizar o salvamento.

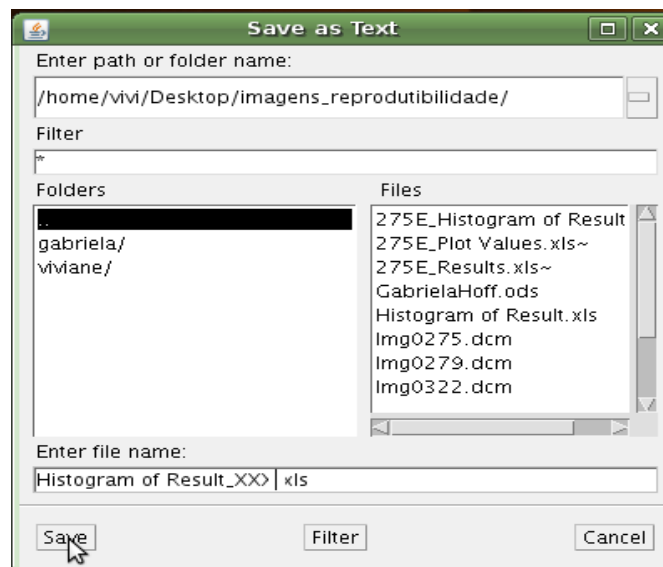


Figura 33: Arquivo Salvo

18. Ainda usando a imagem resultado (Figura 30), obtém-se o cálculo do comprimento da área de interesse seguindo o caminho: Com a ferramenta *Straight line selections* marca-se a área de interesse como ilustra a Figura 34.

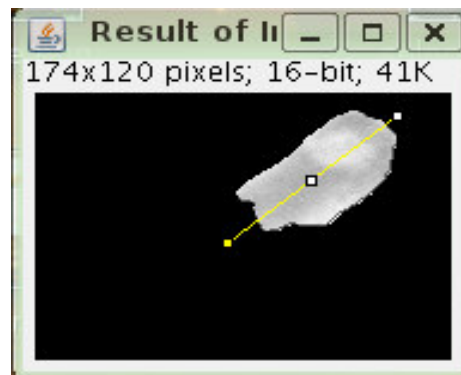


Figura 34: Imagem marcada com a ferramenta *Straight line selections*

Seguindo o caminho: *Analyse-->Plot Profile* e teremos a Figura 35 que segue.

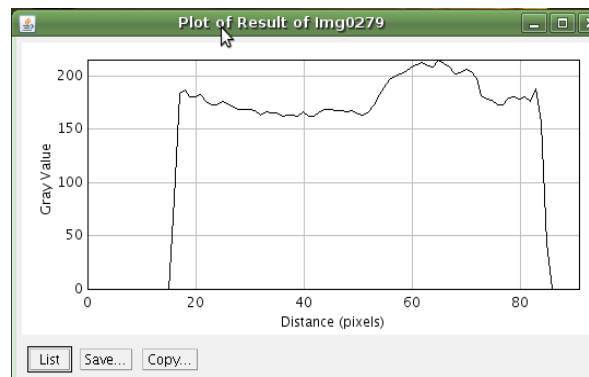


Figura 35: Gráfico Resultante

Marcando em *List* obtém-se novamente uma tabela (Figura 36 abaixo) que deve ser salva através dos procedimentos anteriormente descritos no ítem 17.

X	Y
0	0.000000000
1	0.000000000
2	66.111114502
3	122.777778625
4	138.234573364
5	136.481475830
6	127.222221375
7	115.098762512
8	119.679016113
9	110.000000000
10	108.419754028
11	110.333335876
12	111.555557251
13	111.061729431
14	115.135803223
15	114.888885498

Figura 36: Tabela com Valores para o Cálculo do Comprimento da Região

Esta tabela da Figura 36 fornece os valores necessários para o cálculo do comprimento da área de interesse.

19. Para o cálculo dos aspectos relevantes para a análise dos resultados e que são: Contraste, Sinal, Ruído e da Razão Sinal/Ruído que são obtidos através de uma tabela partindo da marcação de duas áreas na imagem original da região de interesse, uma dentro da lesão e a outra na medula óssea próxima a lesão usando programa ImageJ com a ferramenta *Elliptical*, como mostra nas Figuras 37, 38 e 39 que segue.

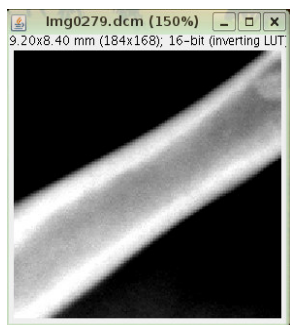


Figura 37: Imagem Original



Figura 38: Marcação de Região na Lesão



Figura 39: Marcação de Região na Medula Óssea

20. A tabela com os resultados surge a partir do momento, que usando-se o programa ImageJ e, após a marcação de cada área, faz-se o caminho: *Analyse--> Measure*, mostrado na Figura 40. Salve os resultados dessa tabela realizado todos os procedimentos anteriormente descritos no ítem 17.

File	Area	Mean	StdDev	Min	Max
1	0.815	579.285	10.171	553	604
2	0.815	535.755	13.732	494	567

Figura 40: Tabela com Valores para o Cálculo do Contraste, Sinal, Ruído e SNR

Dessa mesma forma, todas as **Listas de Dados** surgidas a partir de *Histogram*, *Plot Profile* ou *Mensure* devem ser salvas para serem trabalhadas nas planilhas de cálculos.