

ESTUDO SOBRE A ASSOCIAÇÃO DE CERÂMICA A PLASMA RICO EM PLAQUETAS NA COLUNA VERTEBRAL DE RATOS

STUDY ABOUT FUSION USING CERAMIC WITH PLATELET-RICH PLASMA IN THE SPINE OF RATS

RITA DELGADO, ANTONIO DE PÁDUA FURQUIM BONATELLI, MARIA TERESA DE SEIXAS ALVES

RESUMO

Objetivo: Analisar o efeito osteoindutor dos fatores de crescimento contidos no plasma rico em plaquetas (PRP) quando associados a cerâmicas no processo de fusão na coluna vertebral de ratos. Material e Método: Laminectomia lombar foi realizada em 16 ratos Lewis isogênicos para implantar cerâmica. O PRP foi preparado no ato operatório a partir do sangue de outras duas cobaias. Os grupos estudo e controle foram estabelecidos por randomização, recebendo o grupo estudo cerâmica associada a PRP e o controle apenas cerâmica. Os animais foram sacrificados após 10 semanas e as colunas enviadas para análise histopatológica. Resultados: Intensa atividade osteoblástica e osteoclástica e completa reabsorção da cerâmica foram achados no grupo estudo. No grupo controle havia ilhotas de osso em meio a tecido fibroso e cerâmica não reabsorvida. Discussão: Os fatores de crescimento liberados pelas plaquetas agem ligando-se à superfície de osteoblastos e fibroblastos, estimulando a síntese de colágeno para formação de matriz óssea. Macrófagos ativados continuam secretando os fatores de crescimento e estimulando a osteogênese. Conclusão: O uso de PRP associado a cerâmica mostrou maior atividade osteoblástica e osteoclástica e completa reabsorção da cerâmica em relação à enxertia da mesma isoladamente na coluna vertebral de ratos.

Descritores: Plasma rico em plaquetas. Cerâmica. Ossificação.

ABSTRACT

Objective: To assess the osteoinductive action of platelet-rich plasma when associated to ceramics in the spine of rats. Material and method: Laminectomy was performed in 16 isogenic Lewis rats for posterior ceramic grafting. PRP was prepared intraoperatively using blood collected from two other rats. Study and control groups were set by randomization, with the study group receiving ceramics associated to PRP, and the control group receiving only ceramics. The animals were sacrificed for histopathological analysis after 10 weeks. Results: Strong osteoblastic and osteoclastic activity and full re-absorption of ceramics were found on study group. In control group, small bone islands across fibrous tissue and non-reabsorbed were seen. Discussion: growth factors released by platelets bind to osteoblasts and fibroblasts surfaces, stimulating collagen synthesis to form bone matrix. Activated macrophages keep releasing growth factors and stimulating osteogenesis. Conclusion: The use of PRP associated to ceramics showed stronger osteoblastic and osteoclastic activity and full ceramics re-absorption compared to stand-alone grafting on the spine of rats.

Keywords: Platelet-rich plasma. Ceramic. Ossification.

Citação: Delgado R, Bonatelli APF, Alves MTS. Estudo sobre a associação de cerâmica a plasma rico em plaquetas na coluna vertebral de ratos. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2009; 17(5):282-5. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

Citation: Delgado R, Bonatelli APF, Alves MTS. Study about fusion using ceramic with platelet-rich plasma in the spine of rats. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2009; 17(5):282-5. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

INTRODUÇÃO

As intervenções cirúrgicas de artrodese vêm se popularizando na prática de cirurgiões envolvidos com o tratamento das afecções da coluna vertebral, notadamente nos últimos vinte anos. A compreensão da biomecânica da coluna e o desenvolvimento de técnicas operatórias e de materiais de instrumentação rígida levaram à racionalização destes procedimentos, tornando-os mais fáceis de executar, menos mórbidos e mais eficientes, com consequente

diminuição do tempo de hospitalização e melhor recuperação pós-operatória dos pacientes.

O processo de fusão óssea é de fundamental importância na estabilização pós-operatória das artrodeses espinhais. Para tanto é necessário o uso de material de enxertia que favoreça a neoformação óssea entre os segmentos vertebrais osteotomizados no ato cirúrgico. A formação de pontes ósseas que levam à fusão e, por conseguinte, à estabilização da coluna envolve uma série de eventos fisiopatológicos em que células mesenquimais osteopro-

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

Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

Trabalho realizado na Disciplina de Neurocirurgia da Escola Paulista de Medicina-UNIFESP, São Paulo, SP, Brasil.
Endereço para correspondência: Rua Borges Lagoa, 1080 CJ 307, CEP 04038-002 São Paulo, SP, Brasil. email: ritadelg@yahoo.com.br

Trabalho recebido em 27/05/08 aprovado em 30/08/08

genitoras são ativadas por fatores de crescimento indutores e se diferenciam em osteoblastos, responsáveis pela osteogênese e posterior remodelação ao longo de uma superfície estruturalmente condutora.

O enxerto de osso autólogo presta-se como material ideal para enxertia por apresentar três propriedades principais: presença de células osteogênicas, estrutura osteocondutiva e matriz osteoindutora. Nenhum outro material reúne as vantagens citadas. A enxertia autóloga implica em maior morbidade operatória para obter-se uma pequena quantidade de enxerto. Daí a necessidade de buscar alternativas em biomateriais que favoreçam a fusão óssea nas artrodeses. Os mais utilizados atualmente são as cerâmicas, os enxertos ósseos homólogos e a matriz óssea desmineralizada. São geralmente utilizados em combinação com o enxerto autólogo ou acrescidos a outros materiais que lhes confirmam propriedades osteoindutoras: os fatores de crescimento.²

Vários são os fatores que interferem no processo de fusão óssea e que vão além das propriedades do material de enxertia. Alterações biomecânicas locais que resultam em instabilidade prejudicam o processo de neoformação óssea. O estado de mineralização do leito hospedeiro, a presença de alterações patológicas locais como isquemia, infecções e neoplasias, bem como desequilíbrios hormonais, uso de medicamentos e substâncias tóxicas (notadamente o fumo) são agravantes que interferem negativamente no processo de fusão óssea.³⁻⁶ Desta feita, é compreensível que as taxas de não-fusão nas artrodeses lombares intertransversárias, para citar uma abordagem das mais rotineiras no tratamento das lesões da coluna lombar, variem entre 5 a 35%.⁵

Diversas linhas de pesquisa e estudos clínicos estão atualmente voltados para esta questão, à procura do enxerto ideal: um material com propriedades osteoindutoras, osteogênicas e osteocondutoras, de fácil obtenção e disponibilidade ilimitada, biocompatível e reabsorvível, imunologicamente inerte, economicamente acessível e que favoreça a neoformação de tecido ósseo a despeito da presença de alterações teciduais locais e de doenças sistêmicas. Evidentemente, há um longo caminho a percorrer.

O presente trabalho tem por objetivo avaliar o efeito osteoindutor dos fatores de crescimento presentes no plasma rico em plaquetas (PRP) quando associado a cerâmica no processo de neoformação óssea na coluna vertebral de ratos.

MATERIAL E MÉTODO

O modelo experimental foi executado em ratos da espécie Lewis, machos, adultos, com peso médio de 300 g e isogênicos. A utilização de animais isogênicos homogeneiza a amostra e permite reduzi-la, o que simplifica a execução do trabalho. Desta forma, foram constituídos grupos de estudo e controle com sete animais cada. Dois ratos foram utilizados a parte para a obtenção do PRP. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no mesmo dia pela pesquisadora. Os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de xilazina a 2% e quetamina a 5% na proporção de 1:0,2 ml/ 100 g. Incisão cutânea mediana à altura das cristas ilíacas foi realizada na região lombar, com posterior dissecação das fâscias, exposição da aponeurose muscular, dissecação subperiosteal da musculatura paravertebral e laminectomia de dois níveis contínuos da coluna vertebral. Os ferimentos foram temporariamente cobertos e o PRP foi preparado a parte a partir da centrifugação do sangue de duas outras cobaias, obtido por exanguinação pelo cateterismo direto da artéria aorta, exposta por tóraco-laparotomia.

O sistema utilizado foi o Smart Prep (Harvest Technologies Inc., Plymouth, MA). Os grupos estudo e controle foram definidos por randomização. O PRP foi ativado adicionando-se gluconato de

cálcio na proporção de 1:10 e o coágulo resultante foi imediatamente misturado à cerâmica (Osteosynt, Einco Biomaterial Ltda., Belo Horizonte, MG). Os animais do grupo estudo receberam enxertia de cerâmica com PRP e os do controle apenas cerâmica. As feridas foram fechadas em dois planos e os animais mantidos em biotério no pós-operatório durante 10 semanas, em condições uniformes de luz e temperatura com água e ração *ad libitum*. Após este período os animais foram sacrificados por injeção letal e as colunas retiradas em bloco nos segmentos operados para estudo anátomo-patológico. As colorações utilizadas para análise foram a Hematoxilina-eosina e o Tricrômio de Masson. A análise anátomo-patológica do material compreendeu duas etapas:

1) Estudo qualitativo, em que se verificaram aspectos histopatológicos do processo de neoformação óssea: presença de tecido conjuntivo frouxo, cartilaginoso e ósseo, e em que proporção; atividade osteogênica e osteoclástica; presença e tipo de processo inflamatório associado e grau de reabsorção da cerâmica.

2) Estudo quantitativo. Este foi feito com a ajuda de um sistema digital de análise que consiste em um microscópio da marca Olympus BX40, com objetivas plan-acromáticas, acoplado a uma videocâmara marca Oly e a um microcomputador marca Intel Celeron, com 768 Mhz e 1,00 GB de RAM, contendo placa digitalizadora de imagem, trabalhando com o software Image Tool versão 3.0 da UTHSCA (The University of Texas Health Science Center in San Antonio). As imagens foram obtidas no aumento de 200 vezes, avaliando-se todo o leito operatório. Após a captura, as imagens digitalizadas foram trabalhadas no programa Adobe Photoshop 7.0, com o auxílio da ferramenta "borracha", apagando-se da imagem todas as estruturas não-ósseas. Desta imagem trabalhada foi mensurada a área óssea através do software Image Tool, sendo o valor expresso em micrômetros quadrados e exportado para o Excel.

RESULTADOS

A análise histopatológica mostrou diferenças entre os grupos. No grupo estudo havia neoformação de tecido ósseo tópico e heterotópico e por vezes em continuidade com tecido cartilaginoso (ossificação endocondral), intensa atividade osteoblástica e osteoclástica com sinais de remodelação óssea com várias linhas de cimento ósseo, *restitutio ad integrum* da medular óssea e completa reabsorção da cerâmica implantada (Figura 1A,1B). No grupo controle havia ilhotas de osso maduro em meio a tecido conjuntivo frouxo, com atividade osteoblástica mais discreta, sem atividade osteoclástica e com grande quantidade de cerâmica não reabsorvida (Figura 2A,2B). Processo inflamatório específico e inespecífico foi encontrado nos dois grupos, aleatoriamente. A média simples das áreas obtidas pela histometria foi maior no grupo estudo do que no controle.

Os valores histométricos obtidos nos dois grupos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Histometrias (em micrômetros quadrados)

	Grupo Estudo	Grupo Controle
Animal 1	4587291	1974169
Animal 2	11161126	6293622
Animal 3	4586735	5242105
Animal 4	10101187	5251582
Animal 5	4291024	1767348
Animal 6	2756362	3704697
Animal 7	26564948	3114449

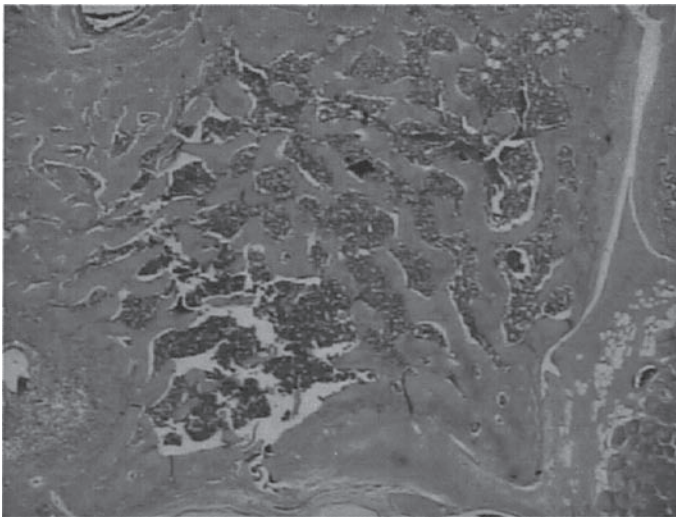


Figura 1 (a) – Corte histológico em Hematoxilina-eosina, em aumento de 200 vezes, mostrando área de neoformação óssea adjacente ao canal vertebral em animal do grupo estudo.



Figura 1 (b) – Imagem trabalhada no programa de processamento e análise de imagens para Windows Image Tool, da UTHSCSA (The University of Texas Health Science Center in San Antonio) a partir da anterior (a), em que se excluíram os elementos histológicos distintos ao osso para posterior cálculo histométrico da área obtida.

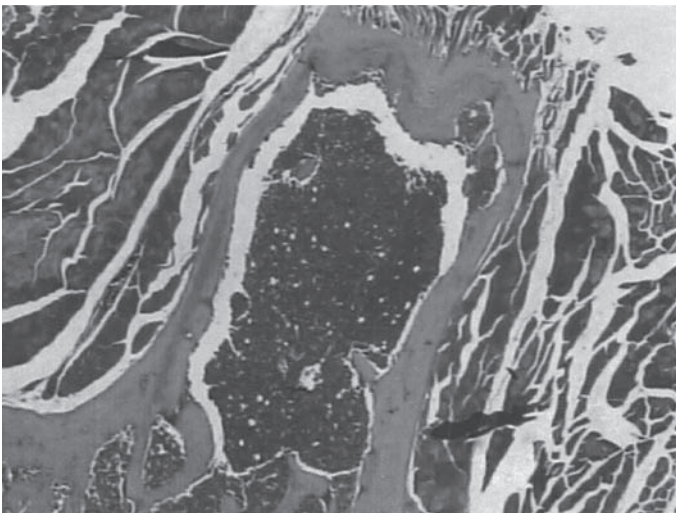


Figura 2 (a) – Corte histológico em Hematoxilina-eosina, em aumento de 200 vezes, mostrando área de neoformação óssea adjacente ao canal vertebral em animal do grupo controle.



Figura 2 (b) – Imagem trabalhada no programa de processamento e análise de imagens para Windows Image Tool, da UTHSCSA (The University of Texas Health Science Center in San Antonio) a partir da anterior (a), em que se excluíram os elementos histológicos distintos ao osso para posterior cálculo histométrico da área obtida.

DISCUSSÃO

As plaquetas sanguíneas contêm proteínas fundamentais que são secretadas pelas mesmas para iniciar a cicatrização de qualquer ferida no organismo humano: o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF, secretado em três formas isômeras: PDGF $\alpha\alpha$, PDGF $\beta\beta$ e PDGF $\alpha\beta$), os fatores de crescimento transformantes (TGF, variantes TGF β 1 e TGF β 2), o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e o fator de crescimento epitelial (EGF).

O PDGF é o primeiro fator de crescimento secretado diante de qualquer lesão tecidual. Sua ação inicia o processo de indução e diferenciação do tecido conectivo que culmina com o reparo da lesão. As atividades específicas do PDGF incluem o aumento da mitogênese, da angiogênese e a ativação de macrófagos, responsáveis pelo desbridamento inicial da ferida através da fagocitose dos resíduos de degradação celular. Posteriormente estas células

também passam a secretar PDGF, dando continuidade ao estímulo osteoindutor e à diferenciação local de células mesenquimais. As plaquetas sanguíneas são ricas em PDGF, estimando-se que em torno de 1200 moléculas deste fator de crescimento estejam pré-sintetizadas nos grânulos de uma única plaqueta.

O TGF β 1 e TGF β 2 pertencem à mesma família das proteínas morfogenéticas do osso (BMP). São igualmente sintetizados por macrófagos e outras células e quando secretados têm ação parácrina sobre fibroblastos, células mesenquimais da medula óssea e pré-osteoblastos. Suas ações específicas incluem a estimulação da mitogênese, quimiotaxia de células osteoprogenitoras, estimulação de osteoblastos a depositar matriz colágena para formação de osteóide e inibição da atividade osteoclástica.

Considerando as propriedades dos fatores de crescimento encontrados nas plaquetas e sabendo que pelo menos dois deles (PDGF e

TGF) estimulam a atividade osteoblástica⁷ e considerando ainda que o TGF engloba em sua superfamília todas as variáveis conhecidas de BMP⁸, é razoável supor que estes fatores de crescimento tenham capacidade osteoindutora semelhante àquela atribuída às BMP. Desta forma, poder-se-ia obter a amplificação da capacidade osteoindutora destes fatores pela obtenção de um concentrado de plaquetas sanguíneas quando depositado numa solução de continuidade óssea. O PRP consiste em um concentrado autólogo de plaquetas em um pequeno volume de plasma, obtido a partir de um processo de centrifugação que separa as plaquetas dos outros elementos do sangue, sem danificá-las. Os níveis de PDGF e TGF foram identificados e quantificados por radioimunoensaio (ELISA) por Landsberg.⁹ Haynesworth et al.¹⁰ verificaram que há uma relação entre a capacidade osteoindutora e a concentração local de plaquetas, estabelecendo a concentração plaquetária osteoindutora em 1.000.000/ml de PRP.

Os fatores de crescimento são liberados pela degranulação das plaquetas e agem ligando-se à superfície de osteoblastos, fibroblastos, células endoteliais e epiteliais através de receptores de membrana, cuja ativação resulta na indução de proteínas no citoplasma celular o que, por sua vez, estimula a expressão de uma sequência gênica própria da célula. A síntese proteica resultante implica em proliferação celular e síntese de colágeno para formação da matriz óssea ou osteóide. Desta forma, os fatores de crescimento não penetram na célula nem são mutagênicos: agem simplesmente como estimuladores de processos de crescimento fisiológicos. As plaquetas mantêm o estímulo osteoindutor durante sete dias e sofrem degradação a seguir. A osteoindução é assumida a partir daí pelos macrófagos anteriormente ativados.

A obtenção do PRP e o reconhecimento de suas propriedades osteoindutoras é objeto de estudo recente. Há poucos estudos experimentais e sua aplicação clínica começa a ser avaliada em algumas situações. Marx et al.⁸ e Kassolis et al.¹¹ relatam o uso clínico de PRP na preparação de enxertos de mandíbula em situações diversas e na ossificação de implantes dentários, bem como Garg¹² e Anitua¹³ com bons resultados. Man et al.¹⁴ e Abuzeni et al.¹⁵ apontam sua utilização em Cirurgia Plástica, relatando cicatrização melhor e mais precoce, com evolução clínica e resultado cosmético superior em incisões em que o PRP foi utilizado como selante. Fennis et al.¹⁶ obtiveram resultados significativos em estudo experimental reali-

zado em cabras, em que a osteotomia da mandíbula dos animais mantida por fixação rígida teve reparo ósseo superior quando o enxerto era acrescido de PRP. Aghaloo et al.¹⁷ observaram maior neoformação óssea em calvária de coelhos neozelandeses utilizando PRP em relação ao reparo autólogo.

Até a data deste relato não encontramos na literatura nenhuma publicação envolvendo o uso experimental de PRP associado a cerâmica no reparo de osteotomias na coluna vertebral de nenhum modelo animal. O presente estudo é inédito neste sentido.

Os achados histopatológicos encontrados em nosso estudo no grupo estudo são similares àqueles descritos na literatura em estudos em que a cerâmica é associada a algum tipo de BMP, geralmente rhBMP-2. A partir da oitava semana de evolução o animal se encontra na fase de reabsorção e remodelagem no processo de reparo ósseo, com formação de osso maduro disposto em trabéculas e lamelas apostas e reestruturação da medular óssea *ad integrum*. Há presença de osteoclastos e osteoblastos, sinais de remodelação óssea com várias linhas de cemento ósseo e com completa reabsorção da cerâmica. No grupo controle foi encontrado tecido frouxo ou fibroso de permeio a ilhotas de tamanhos variados de tecido ósseo e grânulos de cerâmica não reabsorvida em grande quantidade. A histometria comparada pela média simples das áreas ósseas obtidas foi três vezes maior no grupo estudo do que no controle. Desta forma, é possível que o PRP tenha acelerado o processo de neoformação óssea no grupo estudo, justificando-se a completa reabsorção da cerâmica enxertada e o aspecto tecidual mais organizado, com remodelação mais evidente. A formação de osso maduro mais precocemente poderia significar um processo de fusão acelerado e mais eficiente, o que encoraja a realização de estudos em modelos animais mais evoluídos visando extrapolar a associação sinérgica de cerâmicas e PRP para estudos clínicos no futuro.

CONCLUSÃO

O uso de PRP associado a cerâmica como enxertia sinérgica em osteotomias na coluna vertebral de ratos isogênicos mostrou marcadas diferenças histopatológicas quando comparada à enxertia de cerâmica isoladamente. Maior atividade osteoblástica e osteoclástica, melhor estruturação tecidual do osso neoformado e completa reabsorção da cerâmica foram verificadas com o uso de PRP.

REFERÊNCIAS

1. Trummee E, Herkowitz HN. Alternatives to autologous bone harvest in spinal surgery. *UPOJ* 1999;12:77-88.
2. Gazdag AR, Lane JM, Glaser D, Forster RA. Alternatives to autogenous bone graft: efficacy and indications. *J Am Acad Orthop Surg*. 1995;3:1-8.
3. Boden SD, Schimandle JH, Hutton WC, Chen MI. The use of an osteoinductive growth factor for spinal fusion. Part I: The biology of spinal fusion. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1995;20:2626-32.
4. Boden SD, Schimandle JH, Hutton WC. The use of an osteoinductive growth factor for lumbar spinal fusion. Part II: Study of dose, carrier and species. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1995;20:2633-44.
5. Boden SD, Schimandle JH, Hutton WC. An experimental lumbar intertransverse process spinal fusion model. Radiographic, histologic and biomechanical healing characteristics. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1995;20:412-20.
6. An HS, Simpson JM, Glover JM, Stephany J. Comparison between allograft plus DBM versus autograft in anterior cervical fusion. A prospective multicenter study. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1995;20:2211-6.
7. Vaccaro AR, Rosenfeld JF. Bone biology. In: *Textbook of Neurological Surgery-Principles and Practice*. Philadelphia: Lipincott Williams and Wilkins; 2003. p. 1568-76.
8. 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*. 1998;85:638-46.
9. Landesberg R, Roy M, Glickman PS. Quantification of growth factors levels using a simplified method of platelet rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg* 2000;58:297-300.
10. Haynesworth SE, Kadiyale S, Liang LN. Mitogenic stimulation of human mesenchymal stem cells by platelet release suggest a mechanism for enhancement of bone repair by platelet concentrates. In: 48th Meeting of the Orthopedic Research Society. Boston, MA, 2002.
11. Kassolis JD, Rosen PS, Reynolds MA. Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: case series. *J Periodontol*. 2000;71(10):1654-61.
12. Garg AK. The use of platelet rich plasma to enhance the success of bone grafts around dental implants. *Dental Implant Update* 2000;11:17-21.
13. Anitua E. The use of plasma rich growth factors (PRGF) in Oral Surgery. *Pract Proced Aesthet Dent* 2001;13:487-93.
14. Man D, Plosker H, Winland-Brown JE. The use of autologous platelet rich plasma (fibrin gel) in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg*. 2001;107(1):229-371.
15. Abuzeni P, Alexander RW. Enhancement of autologous fat transplantation with platelet rich plasma. *Am J Cosmetic Surg* 2001;18:59.
16. Fennis JP, Stoelinga PJ, Jansen JA. Mandibular reconstruction: a clinical and radiographic animal study on the use of autogenous scaffolds and platelet-rich plasma. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2001;31:281-6.
17. Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Investigation of platelet rich plasma in rabbit cranial defects: a pilot study. *J Oral Maxillofac Surg*. 2002;60:1176-81.