
MARCO ANTONIO BATISTA

Estudo experimental comparativo entre o plasma rico em plaquetas e o centrifugado de medula óssea na consolidação de falha em tíbia de coelho: avaliação radiográfica, tomográfica e histomorfométrica

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Programa de Ortopedia e Traumatologia

Orientador: Prof. Dr. Roberto Guarniero

**São Paulo
2010**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Batista, Marco Antonio

Estudo experimental comparativo entre o plasma rico em plaquetas e o centrifugado de medula óssea na consolidação de falha em tibia de coelho : avaliação radiográfica, tomográfica e histomorfométrica / Marco Antonio Batista.

-- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de: Ortopedia e Traumatologia.

Orientador: Roberto Guarniero.

Descritores: 1.Plasma rico em plaquetas 2.Medula óssea 3.Consolidação da fratura
4.Radiologia 5.Tomografia 6.Histologia

USP/FM/DBD-466/10

Dedicatória

Aos meus pais
Irene e José

A minha família

Ana Margarete,
Felipe e Vitória

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Olavo Pires de Camargo, Professor Titular e Chefe do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Ao Prof. Dr. Tarcisio Eloy Pessoa de Barros Filho, Vice-Diretor da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Professor Titular e Presidente do Conselho Diretor do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Ao Prof. Dr. Gilberto Luiz Camanho, Professor Titular do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Chefe do Corpo Clínico do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Ao Prof. Dr. Roberto Guarniero, Professor Associado do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Aos Professores Mânlio Mario Marco Napoli e Osny Salomão, meus mestres na cirurgia do pé.

Aos Drs. Carlos Eduardo Sanchez Vaz e Paulo José de Santana, colegas do Hospital Universitário (HU) de Londrina.

Ao Dr. Décio Sabbatini Barbosa, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina.

Aos Drs. Marcelo Garcia Marini, Gustavo Andrade de Margalho, médicos radiologistas responsáveis pelas avaliações dos exames de imagens.

Ao Dr. Mauro Takeda, Diretor da Clínica Ultramed de Londrina.

Ao Sr. Marcos Bicalho Figueiredo da Clínica Ultramed de Londrina.

Ao Sr. Izatino Farias do Biotério do Hospital Universitário (HU) de Londrina.

Ao Eng. Tomaz Puga Leivas, Géssica Cantadori Funes Arenas e Donizeti Rodrigues Belitardo pelo auxílio neste trabalho experimental.

Às Sras. Andressa da Costa Santos e Julietti de Andrade, bibliotecárias do IOT-HCFMUSP e Diva da Silva Godoy, bibliotecária da SBOT

À Sra. Lucia Maria Evangelista Ferraz, Chefe da Secretaria do Serviço de Graduação da FMUSP.

Aos demais colegas do Setor de Ortopedia e Traumatologia do Departamento de Clínica Cirúrgica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese de doutorado está de acordo com as seguintes normas e documentos:

Terminologia anatômica em português conforme *Sociedade Brasileira de Anatomia. Terminologia anatômica: terminologia anatômica internacional. São Paulo (Brasil): Editora Manole Ltda; 2001.* (Terminologia anatômica internacional da Comissão Federativa da Terminologia Anatômica – CFTA aprovada em 1998 e traduzida e publicada pela Comissão de Terminologia Anatômica da Sociedade Brasileira de Anatomia – CTA-SBA em 2001).

Terminologia e definições estatísticas conforme Associação Brasileira de Normas Técnicas, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, Sociedade Brasileira de Metrologia, Programa RH-Metrologia. Guia para expressão da incerteza de medição: segunda edição brasileira do “Guide to the expression of uncertainty in measurements”. 2ª ed. Rio de Janeiro (Brasil): ABNT, INMETRO, SBM; 1998. (Edição revisada em agosto de 1998 da primeira edição em português de 1997 da versão em inglês de 1993, corrigida e republicada em 1995 do ISO/IEC Guide 98: 1995. Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM)).

Apresentação de tabelas e gráficos estatísticos conforme *Lang TA, Secic M. How to report statistics in medicine: annotated guideline for authors, editors, and reviewers. 2nd ed. Philadelphia: American College of Physicians, 2006.* *Governo do Estado do Paraná. Normas para apresentação gráfica de dados: tabelas. Curitiba (Brasil): Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social; 1995.*

As abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of journals indexed in Index Medicus (1992)* e *LILACS - Literatura Latino-americana e do Caribe em Ciências da Saúde (1995)*.

Referências segundo o *International Committee of Medical Journal Editors [http://www.icmje.org/faq.pdf]. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication [acessado em 19 de dezembro de 2008] Obtido de: <http://www.ICMJE.org>. (“Vancouver” - versão atualizada em novembro de 2008).*

SUMÁRIO

Resumo

Summary

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	OBJETIVOS.....	5
3.	REVISÃO DA LITERATURA.....	7
3.1	Consolidação Óssea.....	8
3.1.1	Fatores de Crescimento.....	9
3.1.2	Medula Óssea e Células-Tronco.....	12
3.2	Enxertos e Substitutos Ósseos.....	14
4.	MÉTODOS.....	17
4.1	Modelo Experimental de Consolidação Óssea em Tíbia de Coelho.....	18
4.2	Método de Avaliação da Consolidação Óssea.....	27
4.2.1	Avaliação radiográfica digital.....	28
4.2.2	Avaliação tomográfica computadorizada.....	29
4.2.3	Avaliação Histológica (Histomorfometria óssea).....	31
4.3	Análise Estatística.....	34
5.	RESULTADOS.....	37
6.	DISCUSSÃO.....	44
7.	CONCLUSÕES.....	53
8.	REFERÊNCIAS.....	55

Resumo

Batista MA. *Estudo experimental comparativo entre o plasma rico em plaquetas e o centrifugado de medula óssea na consolidação de falha em tíbia de coelho: avaliação radiográfica, tomográfica e histomorfométrica* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 65p.

Procurou-se valiar comparativamente o efeito do plasma rico em plaquetas (PRP) e do centrifugado do aspirado de medula óssea (CMO) na indução da consolidação óssea no coelho. Utilizaram-se vinte coelhos adultos, machos, da raça Nova Zelândia. Foram separados aleatoriamente em dois grupos iguais e operados para a realização de uma falha óssea (orifício cortical de 3,3mm de diâmetro) na metáfise proximal da tíbia direita. No primeiro grupo implantou-se o PRP associado ao β fosfato tricálcico (grupo PRP) e no segundo, o CMO associado ao β fosfato tricálcico (grupo CMO). Após um período de quatro semanas, os animais foram submetidos à eutanásia e as tíbias avaliadas através de radiografia digital, tomografia computadorizada e histomorfometria. Ao final, avaliaram-se os resultados de sete amostras de cada grupo. A avaliação radiográfica confirmou a ausência de fraturas no membro no pós-operatório e a ocorrência, ou não, de consolidação. A avaliação tomográfica mostrou uma consolidação superior e a formação de maior espessura da cortical óssea no grupo PRP. A histomorfometria determinou uma maior ossificação no grupo PRP em relação ao CMO. Após quatro semanas, o plasma rico em plaquetas proporcionou uma melhor consolidação do que o centrifugado de aspirado de medula óssea.

Descritores: plasma rico em plaquetas, medula óssea, consolidação de fratura, radiologia, tomografia, histologia.

SUMMARY

Batista MA. *Experimental comparative study of platelet-rich plasma and centrifuged bone marrow on the induction of bone healing in tibia of rabbits: radiographic, tomographic and histomorphometric evaluation*. [tese]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2010. 65p.

To perform a comparative analysis of the effect of platelet-rich plasma (PRP) and centrifuged bone marrow aspirate (CBM) on the induction of bone healing in rabbits. Twenty adult, male, New Zealand rabbits were randomly separated into two equal groups, and surgery was performed to create a bone fracture (cortical orifice of 3.3mm in diameter) in the proximal metaphysis of the right tibia. In the first group, PRP was implanted, associated with β -tricalcium phosphate (PRP group) and in the second, CBM associated with β -tricalcium phosphate (CBM group). After a period of four weeks, the animals were submitted to euthanasia and the tibias evaluated through digital radiography, computed tomography and histomorphometry. At the end, the results of seven samples from each group were evaluated. The radiographic evaluation confirmed the absence of fractures in the postoperative limb, and the occurrence, or not, of bone healing. The tomographic evaluation showed better healing, and the formation of greater cortical bone thickness in the PRP group. The histomorphometry determined greater ossification in the PRP group, compared with the CBM group. After four weeks, the platelet-rich plasma provided better bone healing than the centrifuged bone marrow aspirate.

Descriptors: platelet-rich plasma, bone marrow, fracture healing, radiology, tomography, histology.

1 INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Existe uma necessidade do desenvolvimento de procedimentos terapêuticos mais seguros, eficientes e eficazes para a consolidação das fraturas (**Alonso, Burgess e Browner, 1996**), assim como para a reconstrução óssea (perdas ósseas) ou substituição de segmentos ósseos. Há uma demanda elevada decorrente do crescente número de pacientes vítimas de acidentes e traumatismos (quedas, acidentes de trânsito, acidentes de trabalho, agressões e demais causas externas de morbidade) (**OMS, 2004; IPEA, 2003**) e de pacientes acometidos por patologias ortopédicas (idiopáticas, degenerativas, metabólicas, infecciosas, autoimunes, congênitas e neoplásicas). A previsão do crescimento acelerado da parcela da população adulta e do aumento da expectativa de vida no país (rápido processo de envelhecimento relativo e conseqüente aumento proporcional da população idosa) (**IBGE, 2008**) e o agravamento das condições urbanas decorrentes da concentração contínua (aumento da ocorrência de acidentes de trânsito (**OMS, 2004; IPEA, 2003**) e de agressões) tornam urgente a procura por procedimentos inovadores, porém práticos e possíveis de serem executados na maioria dos hospitais públicos do sistema único de saúde (equidade).

Pesquisadores buscam a melhora da compreensão da fisiologia da consolidação óssea (**Einhorn, 1998**), da evolução nas técnicas cirúrgicas de fixação interna e externa das fraturas (**Alonso, Burgess e Browner, 1996**) e as melhores soluções para as possíveis seqüelas e complicações, como a

consolidação viciosa, o atraso e a ausência de consolidação (pseudo-artrose) (**Croci, 1997**).

Novos recursos e tecnologias são continuamente incorporados ao arsenal terapêutico do ortopedista. Atualmente, avaliam-se drogas administradas por via sistêmica, principalmente os medicamentos utilizados no tratamento e prevenção da osteoporose como os bisfosfonatos (**Guarniero et al., 2007; Santana, 1999**), os agentes osteocondutores, substitutos ósseos sintéticos (**De Long et al., 2007**) ou compósitos (biológico-sintético), e os agentes osteoindutores, plasma rico em plaquetas (PRP) (**Anitua, 1999; Whitman e Barry, 1998; Andrew et al., 1995; Lind et al., 1993**), concentrado do aspirado de medula óssea (CMO) (**Connoly, 1995; Connoly, 1998; Paley, 1988; Sharma et al., 1992**), proteínas morfogenéticas ósseas (BPMs) (**Urist, 1965; Lieberman, Daluiski e Einhorn, 2002**) e terapia genética (**Hannallah et al., 2002**). Os aparelhos para osteoestimulação através de campo eletromagnético pulsátil (**Donley e Ward, 2002**), de microcorrentes elétricas (**Esquisatto et al., 2006**) e de ondas de choque extra-corpóreas (**Valchanov e Michailov, 1991**), também, são avaliados.

Os resultados clínicos dos materiais osteocondutores e osteoindutores sintéticos ainda são controversos. Quando necessário, o enxerto ósseo autólogo (autoenxerto) retirado do íliaco ainda é o mais utilizado e considerado o “padrão-ouro” como agente osteocondutor, osteogênico e osteoindutor (**Sen e Miclau, 2007**).

Nem sempre, é possível ou indicado, a utilização do autoenxerto ósseo retirado do ílaco, ou de outra região doadora do paciente, devido à necessidade da realização de uma segunda operação, à limitação do estoque ósseo e às possíveis complicações (cicatriz antiestética, risco de dor, risco de alteração da sensibilidade local e infecção) (D'Elia, 2009). Nesses casos, os biomateriais osteocondutores sintéticos (hidroxiapatita, β fosfato tricálcico, outros fosfatos e carbonatos, colágeno, compósitos e demais arcabouços ou materiais carreadores) são opções viáveis, principalmente, quando utilizados em associação com fatores biológicos autólogos osteoindutores: plasma rico em plaquetas (Delgado, Bonatelli e Alves, 2009), concentrado do aspirado de medula óssea (Vaz, 2006), fatores de crescimento tecidual (Lieberman, Daluiski, e Einhorn, 2002). Dentre estes, destacam-se o plasma rico em plaquetas (PRP) e o centrifugado do aspirado de medula óssea (CMO), utilizados em associação com osteocondutores sintéticos, devido à praticidade, à facilidade técnica de obtenção, ao processamento no intra-operatório, à não imunogenicidade, à não transmissibilidade de doenças e ao baixo custo.

Procurou-se avaliar a eficácia de dois agentes osteoindutores, o plasma rico em plaquetas e o centrifugado do aspirado de medula óssea, associados ao β fosfato tricálcico, um agente osteocondutor sintético comercial, através de um estudo prospectivo controlado em modelo experimental em coelhos, e comparar a qualidade do tecido ósseo formado nas falhas das tíbias preenchidas com os dois compostos. Essa informação, possibilita a escolha do agente osteoindutor mais eficaz.

2 OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Avaliar e comparar o efeito osteoindutor do plasma rico em plaquetas (PRP) e do centrifugado do aspirado de medula óssea (CMO) na consolidação de falhas ósseas na tíbia de coelhos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Consolidação Óssea

Diferentemente de outros tecidos, o osso consolida formando um regenerado com basicamente todas as propriedades do tecido antigo, principalmente em crianças e indivíduos jovens, o que lhe confere uma característica especial (**Einhorn, 1998**). Apesar do avanço na tecnologia médica e no manejo das lesões músculo-esqueléticas nos últimos trinta anos, algumas fraturas apresentam uma baixa taxa de consolidação e outras demoram longo tempo para consolidar o que estimula a pesquisa clínica de fatores que possam influenciar nesse processo.

A consolidação das fraturas, das osteotomias, dos alongamentos ósseos e das artrodeses, continua sendo um desafio para a traumatologia e ortopedia, devido à vários fatores, que podem ser divididos em dois tipos: a) fatores locais: grau de energia causadora do trauma, vascularização sangüínea da região acometida, tipo de osso fraturado (esponjoso ou cortical), presença de infecção, falta de imobilização rígida do segmento ósseo; b) fatores sistêmicos: diabetes melitus, tabagismo, uso de corticosteróides, imunodepressão e idade.

Nessas situações podemos ter duas complicações freqüentes do tratamento: o retardo de consolidação e a pseudoartrose (**Croci, 1997**). A consolidação das fraturas segue uma seqüência bem determinada de fases

contínuas e que se superpõem, podendo resumidamente, dividi-las e quantificá-las em termos do tempo total de consolidação em fase inflamatória (10%), fase de reparação (40%) e fase de remodelação (70%) (**Frost, 1989**).

O tempo de consolidação das fraturas varia muito conforme o osso envolvido, e no mesmo osso conforme a localização (epifisária, metafisária ou diafisária). O retardo de consolidação é definido como o aumento do período de tempo para a consolidação de determinada fratura, ou seja, o processo de consolidação não avança no ritmo usualmente esperado para aquela fratura (**Croci, 1997**).

A pseudoartrose ocorre quando o processo de consolidação de uma fratura ou osteotomia cessa, aparecendo os sinais clínicos e radiológicos de que a consolidação óssea parou, com alta probabilidade de não consolidação (**Croci 1997**).

3.1.1 Fatores de Crescimento

Fatores de crescimento são proteínas secretadas pelas células que agirão em determinadas células alvo, levando a uma ação específica (**Lieberman, 2002**). Existem três tipos de ação dos fatores de crescimento: a) autócrina, na qual os fatores de crescimento agem nas células originais ou em outras células com o mesmo fenótipo, b) parácrina, na qual os fatores de crescimento agem em

células vizinhas, porém com fenótipo diferente; e c) endócrina, na qual os fatores de crescimento agem em células com outro fenótipo e localizadas à distância. O fator de crescimento pode ter efeitos em múltiplas células e induzir várias funções em vários tecidos (**Trippel et al., 1996; Lieberman, Daluiski e Einhorn, 2002**).

Os prooncogenes que são homólogos aos retrovírus e estão presentes em vários tecidos e devem regular a expressão genética para que os fatores de crescimento e os receptores possam desempenhar suas funções. A alteração na expressão dos prooncogenes tipo c, presentes principalmente no tecido ósseo, pode levar a doenças como à fibrodisplasia ou à osteopetrose (**Einhorn, 1998**).

Os fatores de crescimento que agem na consolidação óssea são as proteínas morfogenéticas ósseas (BPMs), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), o fator de crescimento transformador tipo beta (TGF- β), o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), o fator de crescimento insulínico (IGF), as prostaglandinas (PGE-1 e PGE-2), as somatomedinas, o fator de crescimento epidermal, os fatores angiogênicos, a fibronectina, as interleucinas 1 e 2 (IL-1 e IL-2), o fator ativador de osteoclastos, as bradicininas e o fator de necrose tumoral (**Croci, 1997; Lieberman, Daluiski e Einhorn, 2002**).

As proteínas morfogenéticas: BPM-2 e BPM-7, possuem papel fundamental na consolidação óssea. Elas fazem parte da superfamília dos fatores de crescimento transformador β (TGF- β). Vários trabalhos científicos associam a proteína morfogenética-2 recombinante (rhBPM-2) ou a proteína morfogenética-7

recombinante (também chamada de “osteogenic protein-1” ou OP-1) aos agentes osteocondutores como o enxerto ósseo autógeno, os substitutos ósseos sintéticos e materiais inertes como a esponja de colágeno (Gelfoam[®]), mostrando resultados positivos, com melhor e mais rápida taxa de consolidação óssea (**Trippel et al., 1996; Bostrom e Camacho, 1998; Bames et al., 1999; Vaz, 2006; Bibbo, Patel e Haskell, 2009**).

As plaquetas sangüíneas contêm fatores de crescimento que são liberados de seus grânulos logo após a formação do coágulo (**Marx, 2001**). Os níveis de PDGF e TGF- β foram identificados e quantificados por radioimunensaio e verifica-se que há uma relação entre a capacidade osteoindutora e a concentração local de plaquetas (1.000.000/ml de PRP) (**Landesberg, Roy e Glickman, 2000; Haynesworth, Kadiyale e Liang, 2002**).

Na administração local de fatores de crescimento, o plasma rico em plaquetas (PRP) é um produto autógeno e rico em quatro fatores de crescimento (PDGF, TGF- β , VEGF, EGF) que são liberados dos grânulos alfa após a ativação plaquetária (**Andrew, 1995; Anitua, 1999**).

A ativação plaquetária ocorre após uma fratura ou uma intervenção cirúrgica pela liberação da trombina e do colágeno subendotelial. O fator de crescimento derivado da plaqueta (PDGF) guia a revascularização, a síntese de colágeno e promove a formação óssea, iniciando o processo de consolidação das fraturas (**Slater et al., 1995; Marx et al., 1998**).

No plasma rico em plaquetas existem dois tipos de fatores transformadores de crescimento β , o TGF- β 1 e o TGF- β 2, que são fatores ligados à cicatrização do tecido conjuntivo e do tecido ósseo (**Nielsen et al., 1994; Summer et al., 1995**).

Alguns estudos com o uso do plasma rico em plaquetas (PRP) apresentam controvérsias, parecendo que o mesmo também atua como um carreador fisiológico de outros agentes osteoindutores e outros relatam ainda não haver evidência clínica do seu benefício na consolidação das fraturas (**Griffin, Smith e Costa, 2009**).

3.1.2 Medula Óssea e Células-Tronco

A medula óssea é um órgão composto por dois sistemas principais que originam linhagens celulares distintas, o sistema hematopoiético e o seu estroma de suporte (**Bianco, 2001; Vaz, 2006**). Existem dois grupos de células-tronco na medula óssea: as células-tronco hematopoiéticas, que dão origem às células sanguíneas e às células do sistema imune, e as células-tronco do estroma ou mesenquimais, que são capazes de se diferenciar em diversos tipos de tecidos, como osso, cartilagem, tendão e músculo (**Beresford, 1989, Lin, 1998**).

A cultura de células-tronco mesenquimais obtidas da medula óssea é um processo complexo e caro. Desta forma, é mais viável administrar diretamente o aspirado da medula óssea no local desejado. O centrifugado do aspirado de medula óssea é a fonte mais acessível de células-tronco mesenquimais pluripotentes adultas (**Vaz, 2006**).

O tecido ósseo também apresenta a capacidade de induzir a osteogênese (**Urist, 1965; Büring e Urist, 1967**). A matriz orgânica do osso e a dentina, mesmo na ausência de células vivas, contém proteínas ósseas morfogenéticas (“Bone Morphogenetic Proteins”), responsáveis pelo princípio da indução óssea (**Urist, 1965; Urist et al., 1967; Urist e Strates, 1971; Urist e Iwata, 1973**).

A osteoindução depende da integração substrato-célula: os macrófagos reabsorvem primeiramente a antiga matriz morta e, em seguida, as células-tronco mesenquimais são induzidas pelos fatores de crescimento a se transformarem em células osteoprogenitoras e, finalmente, em osteoblastos (**Katthagen e Mittelmeier, 1984**).

A célula-tronco é uma célula indiferenciada, proveniente do embrião, feto ou adulto, que após receber um estímulo (fator de crescimento) tem a capacidade de se auto-renovar e dar origem a células especializadas (**Beresford, 1989; Muschler e Midura, 2002**).

Quando uma célula-tronco se divide, dá origem a duas células: a célula progenitora que se prolifera simetricamente e, quando se diferencia e multiplica, forma os tecidos maduros e a célula filha que possui o mesmo fenótipo e todas as propriedades da célula-tronco mãe original (auto-renovação) (**Muschler e Midura, 2002**).

Yoo e Johnstone (1998) relatam que os osteoblastos locais participam de uma extensão limitada na consolidação das fraturas e que a presença de células-tronco osteoprogenitoras de novos osteoblastos é fundamental para o sucesso da consolidação óssea. Uma falha neste processo pode levar ao retardo na consolidação óssea ou à pseudoartrose.

3.2 Enxertos e Substitutos Ósseos

Burkus (2002) e **De Long (2007)** afirmam que os enxertos ósseos autógenos apresentam três propriedades distintas: osteogenicidade, osteocondutividade e osteoindução.

O enxerto ósseo autógeno retirado da crista ilíaca está consagrado e é considerado como “padrão-ouro”. Apresenta, porém, algumas desvantagens como o defeito gerado na área doadora, a dor no pós-operatório, a dificuldade de aceitação pelo paciente e a limitação na quantidade de enxerto (**Sem e Miclau, 2007; D`Elia, 2009**).

As estratégias terapêuticas empregadas que visam complementar ou substituir a necessidade de enxerto ósseo autógeno compreendem a implantação de suportes teciduais (**Delgado, Bonatelli e Alves, 2009**) (enxertos semi-sintéticos ou sintéticos), a administração local de fatores de crescimento (**Nielsen et al., 1994**) e o transplante de células-tronco mesenquimais (**Vaz, 2006**).

Kadiyala et al. (1997) relatam que ocorre a consolidação óssea completa em um defeito ósseo segmentar no fêmur de ratos com a implantação de cilindros porosos de fosfato tricálcico juntamente com células-tronco mesenquimais.

Assim como o enxerto ósseo autógeno, os substitutos ósseos sintéticos ou semi-sintéticos (agentes osteocondutores) agem como um arcabouço para o crescimento ósseo e são absorvidos gradativamente, parcial ou completamente, pelo organismo, conforme a sua composição.

As biocerâmicas apresentam a propriedade osteocondutora basicamente. A hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) é a mais utilizada.

Dentre as biocerâmicas sintéticas, o β fosfato tricálcico apresenta uma absorção gradual pelo organismo, mantendo a resistência mecânica do material até que a consolidação óssea fisiológica se concretize (**Delécrin et al., 2000**).

A associação entre as biocerâmicas e os agentes osteoindutores (rhBMP-2, rhBMP-7, centrifugado de medula óssea e o plasma rico em plaquetas) (**Lieberman, Daluiski e Einhorn, 2002; Marx et al., 1998**) é uma opção de tratamento, alternativo ao uso de enxertia óssea autógena.

4 MÉTODOS

4. MÉTODOS

O protocolo de pesquisa foi elaborado de acordo com a Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008 que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais, aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo de pesquisa nº 1052/06 aprovado pela CAPPesq-HCFMUSP em 14 de março de 2007) e seguiu os procedimentos de manutenção, manejo, sedação, analgesia, anestesia e eutanásia para pequenos animais estabelecidos na versão em espanhol do Manual do Canadian Council on Animal Care (**CCAC, 1998**).

4.1 Modelo Experimental de Consolidação Óssea em Tíbia de Coelho

Para avaliar a eficácia de dois agentes osteoindutores, o plasma rico em plaquetas e o centrifugado do aspirado de medula óssea e comparar a qualidade do tecido ósseo formado, decidiu-se realizar um estudo prospectivo controlado em modelo experimental de consolidação óssea de falhas produzidas por perfurações monocorticais na face ântero-medial da metáfise proximal das tíbias de coelhos.

Utilizaram-se vinte coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia, albinos, adultos, machos, com peso médio de 2700g, clinicamente saudáveis, de origem comercial e mantidos no Biotério do Hospital Universitário (HU) de Londrina.

Para a avaliação dos agentes osteoindutores autólogos, formaram-se dois grupos experimentais com dez coelhos cada, distribuídos de forma aleatória. O primeiro grupo recebeu plasma rico em plaquetas (grupo PRP) e o segundo, centrifugado do aspirado de medula óssea (grupo CMO). Os dois tipos de agentes osteoindutores foram associados a um agente osteocondutor absorvível comercial, o β fosfato tricálcico (Cerasorb[®] M - Curasan AG International - Kleinostheim, Alemanha), com tamanho de grão de 500 a 1.000 μ m, 65% porosidade e poros de 5 a 500 μ m.

Os animais foram trazidos unitariamente do Biotério do Hospital Universitário (HU) de Londrina para o Laboratório de Técnica Cirúrgica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina - UEL, sendo anestesiados, após pesagem, conforme o protocolo de anestesia para pequenos animais do Canadian Council of Animal Care (**CCAC, 1998**) com aplicação intramuscular na região proximal do membro pélvico esquerdo de uma solução contendo 40mg/kg de peso de hidrocloreto de dextrocetamina a 10% associada a 5mg/kg de peso de cloridrato de xilazina a 2%. Cada coelho, sob anestesia, foi tatuado na orelha direita com números de 1 a 20.

Para a preparação do plasma rico em plaquetas (**Arenas, 2010**), colheu-se uma amostra sangüínea de 9ml por punção cardíaca dos coelhos do grupo PRP (Figura 1). A amostra de sangue de cada animal, distribuídos em 3 tubos de ensaios estéreis de 5ml contendo 0,3ml de anticoagulante ACD-A-citrato dextrose, foi encaminhada ao Laboratório de Pós-graduação Medicina Interna do Centro de Ciências da Saúde da UEL e centrifugada durante dez minutos a uma

rotação de 1200rpm (centrífuga FANEM 4 - modelo 280R), na temperatura ambiente.

A fração separada (fração intermediária, região da nuvem de leucócitos ou “buffy coat”) (Figura 2), relativa ao plasma rico em plaquetas foi transferida para outro tubo estéril e armazenada. Na seqüência, acrescentou-se 0,2ml de gluconato de cálcio a 10% ao tubo com PRP e, após alguns minutos, obteve-se a formação de um coágulo (ativação do PRP). Após esse processamento, o tubo com PRP ativado retornou ao Laboratório de Técnica Cirúrgica, pronto para o uso no procedimento operatório.

Realizaram-se as tricotomias, com máquina de corte elétrica, na região da tuberosidade tibial anterior até a metade da perna, nos coelhos dos dois grupos, e na região da crista ilíaca direita nos animais do grupo CMO e fez-se a anti-sepsia e assepsia, respectivamente, com degermante digluconato de clorexidina a 2% e solução alcoólica de digluconato de clorexidina a 0,5%.



Figura 1 Detalhe da punção cardíaca do animal para coleta de sangue e preparação do plasma rico em plaquetas (PRP)

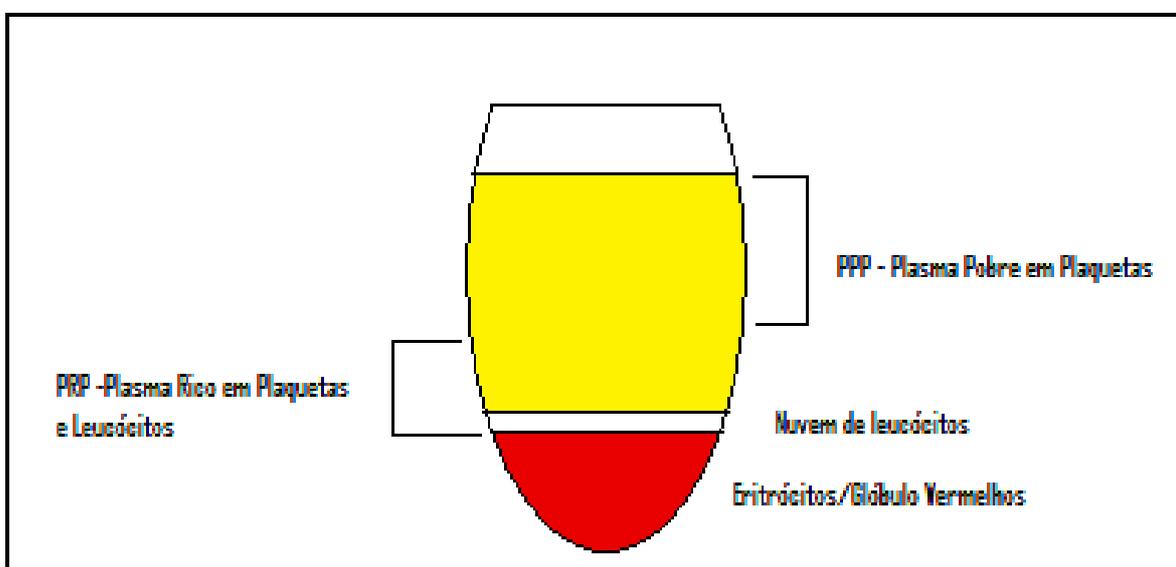


Figura 2 Região da fração separada intermediária relativa ao plasma rico em plaquetas (PRP) no tubo após centrifugação durante dez minutos a uma rotação de 1200rpm (reprodução autorizada da ilustração original de **Arenas, 2010**)

Para a preparação do centrifugado do aspirado de medula óssea, colheu-se uma amostra de 5ml, através de punção medular no osso ilíaco direito dos coelhos do grupo CMO e aspirou-se 5ml da medula óssea através de forte sucção com uma seringa embebida internamente com uma solução de heparina a 1:1000 (Figura 3).

Este material foi imediatamente enviado, em recipiente resfriado, ao Laboratório de Pós-graduação Medicina Interna para processamento. No laboratório, a amostra de medula óssea foi transferida para um tubo estéril e centrifugada a 400rpm durante dez minutos. Na fração intermediária formada após a centrifugação (“buffy-coat”), encontram-se as células do estroma da medula óssea, com as células-tronco mesenquimais e os precursores hematopoiéticos. A fração assim obtida, foi homogeneizada no agitador tipo vortex. Em seguida, aplicou-se o corante azul de Trypan numa amostra de 50µl, separada em tubo Eppendorf, para avaliar a viabilidade celular.

As células viáveis, com membrana citoplasmática íntegra, não apresentavam coloração. Considerou-se a amostra viável, quando a contagem por microscopia ótica de células coradas, não foi significativa (**Vaz, 2006**): Após teste de viabilidade celular, um volume de cerca de 0,5ml do centrifugado do aspirado de medula óssea (CMO) restante foi encaminhado ao Laboratório de Técnica Cirúrgica para o uso na operação.



Figura 3 Aspiração de 5ml da medula óssea do coelho através de forte sucção com uma seringa embebida internamente com uma solução de heparina a 1:1000

Previamente aos procedimentos operatórios nas tíbias, realizou-se uma infiltração de anestésico local, cloridrato de bupivacaína a 0,5%, sem vasoconstritor, para melhora da analgesia no pós-operatório. Para o procedimento operatório, posicionou-se o animal em decúbito dorsal horizontal, ainda sob anestesia geral. Executou-se uma via de acesso cutânea de 1,5cm na face ântero-medial da perna direita, sobre a região região metafisária proximal da tibia, afastamento das partes moles e abertura do periósteo. Em seguida, perfurou-se a região da transição metafisária-diafisária medial da tibia exposta com uma trefina odontológica de 3,3mm de diâmetro. Utilizou-se uma perfuratriz odontológica (NSK, Surgical XT) com rotação controlada (800rpm) para não causar lesão térmica local no tecido ósseo (Figura 4, A-C).

No grupo PRP, depositou-se o coágulo de plasma rico em plaquetas (PRP) sobre o β fosfato tricálcico numa placa de Petri, formando um cilindro que foi introduzido na falha óssea (Figura 4, D-F).

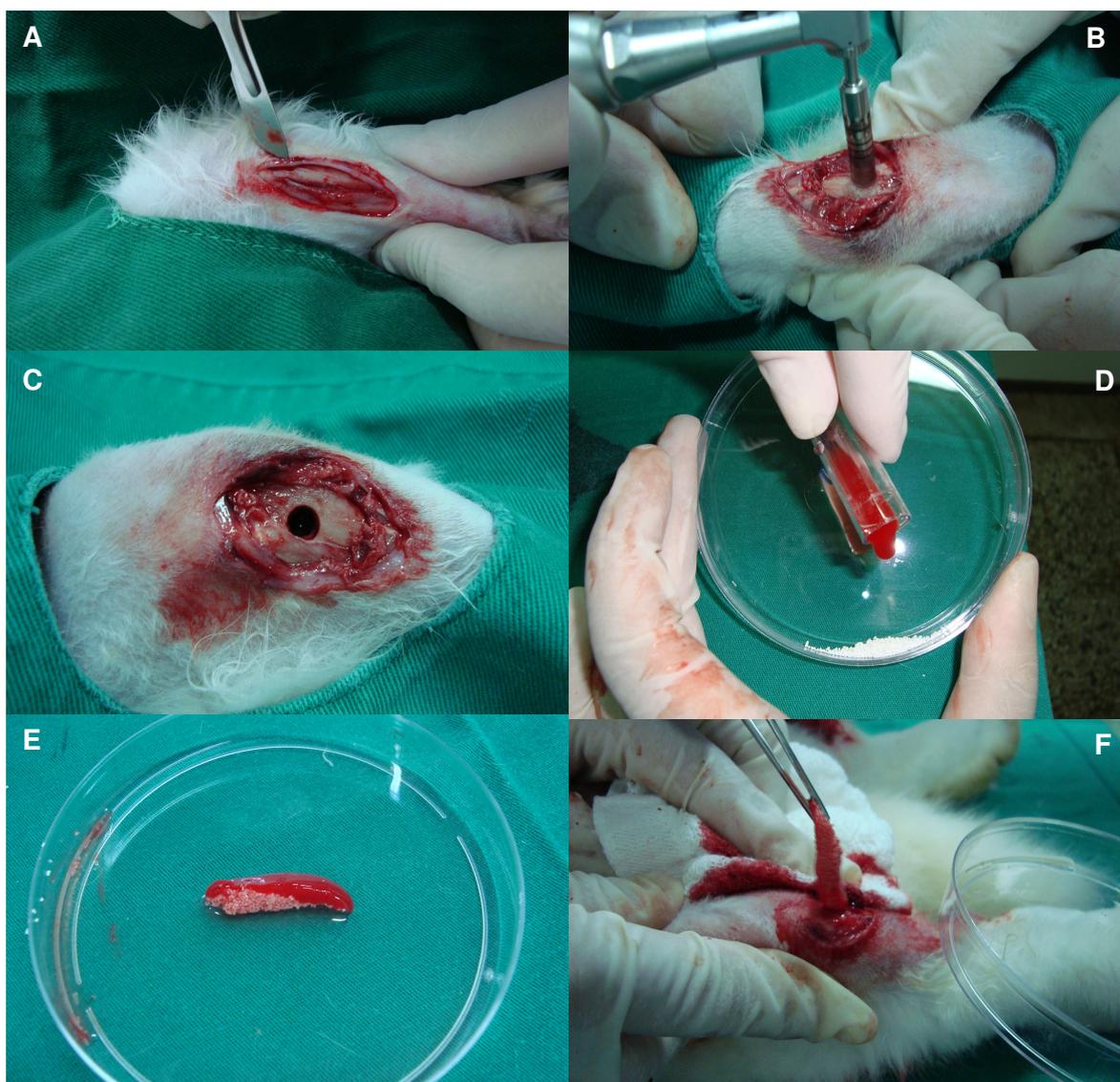


Figura 4 Procedimentos do modelo experimental de consolidação óssea em tíbia de coelho: (A) via de acesso; (B) perfuração óssea com trefina de 3,3mm de diâmetro e perfuratriz odontológica com rotação controlada (800rpm); (C) falha óssea na face ântero-medial da metáfise proximal da tíbia direita; (D) preparação do cilindro de plasma rico em plaquetas e de β fosfato tricálcico e (F) implantação do cilindro de PRP e β TCP

No grupo CMO, homogeneizou-se o centrifugado do aspirado de medula óssea e o β fosfato tricálcico. O material pastoso resultante foi introduzido na falha óssea da tibia.

Terminados os procedimentos de preenchimento das falhas ósseas, suturou-se a pele dos animais com fio cirúrgico de poliamida (“mononylon”) espessura 3-0. Não foi realizado curativo oclusivo ou imobilização do membro operado.

Após o término das cirurgias, os animais receberam uma dose de 20.000 UI/kg de medicação antibiótica a base de penicilina G benzatina e procaína (Pencivet[®] Plus PPU) e uma dose de 10mg/kg de anti-inflamatório piroxicam por via intramuscular.

Aguardou-se a recuperação anestésica completa. A seguir, cada coelho foi levado em gaiola individual de transporte ao biotério de manutenção. Permitiu-se carga normal nos membros no pós-operatório imediato.

Os animais foram mantidos vivos por um período de seguimento de quatro semanas após a operação, tempo suficiente para a consolidação óssea em coelhos (**Guarniero et al., 2007; Vaz, 2006**).

A eutanásia foi realizada com uma injeção letal intracardíaca de cloreto de potássio a 20% (**CCAC, 1998**), com os animais sob anestesia geral, através de

injeção intramuscular com solução de hidrocloreto de dextrocetamina e cloridrato de xilazina (**CCAC, 1998**), como nas operações, respeitando-se a resolução nº 714 de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária e a Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008.

Para a retirada das tíbias, realizou-se a desarticulação do joelho do membro pélvico direito e, a seguir, a osteotomia da tíbia logo acima do tornozelo. As tíbias retiradas, foram devidamente dissecadas das partes moles, com cuidado especial na região proximal das tíbias, imediatamente, acondicionadas em frascos apropriados com solução tamponada de formol a 10% e identificadas com o número do respectivo animal.

As tíbias contra-laterais (esquerdas) foram retiradas da mesma forma e submetidas a exame de densitometria óssea (densitômetro ósseo Lunar DPX) para comprovar a equivalência da qualidade óssea dos coelhos dos dois grupos avaliados.

As carcaças dos coelhos foram descartadas conforme o Plano de Gestão de Resíduos em Serviços de Saúde (PGRSS-UEL) e as normas de biossegurança da Resolução nº 5 de agosto de 1993, do Conselho Nacional do Meio Ambiente.

4.2 Método de Avaliação da Consolidação Óssea

Compararam-se os resultados de consolidação da falha óssea das tíbias dos coelhos preenchidas com o plasma rico em plaquetas associado com β fosfato tricálcico (Cerasorb[®] M) (grupo PRP) e das falhas preenchidas com o centrifugado do aspirado de medula óssea associado com β fosfato tricálcico (grupo CMO) obtidos pela radiografia digital, pela tomografia computadorizada e pela histologia, através da histomorfometria.

As avaliações dos exames de imagem foram realizadas por radiologistas experientes e independentes (Clínica Ultramed, Londrina, PR).

Após os exames de imagens, as tíbias direitas foram submetidas à rotina histológica e as regiões referentes às falhas ósseas (tecido formado na região consolidada) à histomorfometria óssea para determinação da formação relativa de tecido ósseo por área (%) em cada amostra, ou seja, determinar o percentual de ossificação observado no tecido neoformado na região consolidada.

4.2.1 Avaliação radiográfica digital

As tíbias retiradas após a eutanásia dos animais foram radiografadas nas posições de frente e de perfil a uma distância de 50cm da ampola de raios X, identificadas pelo número do animal. Utilizou-se um equipamento de radiografia digital Kodak[®] Directview CR 850. Após a digitalização, as imagens foram adquiridas pelo aparelho GE[®] Silhoutte 500, sendo processadas e compactadas para a análise em formato "jpg". A radiografia digital avaliou a ocorrência, ou não,

de consolidação. Verificou, também, a ocorrência de fraturas na tíbia (critério de exclusão).

A análise radiográfica foi realizada conjuntamente por dois radiologistas (consenso).

4.2.2 Avaliação tomográfica computadorizada

A avaliação tomográfica foi utilizada para confirmar a consolidação (maior eficácia do que a radiologia digital) e para a mensuração da cortical óssea formada na região da falha consolidada. As medidas foram realizadas em tomógrafo computadorizado de 8 canais (GE LightSpeed UltraTM CT - 8 Slice).

Para medir a espessura da parede cortical óssea neoformada ao nível da região de consolidação da falha, realizou-se a aquisição axial volumétrica das amostras em aparelho tomográfico de múltiplas fileiras de detectores, com posterior reconstrução nos planos das falhas ósseas corticais das tíbias. O programa permite a marcação das corticais e a mensuração das distâncias entre pontos determinados pelo radiologista (Figura 5).

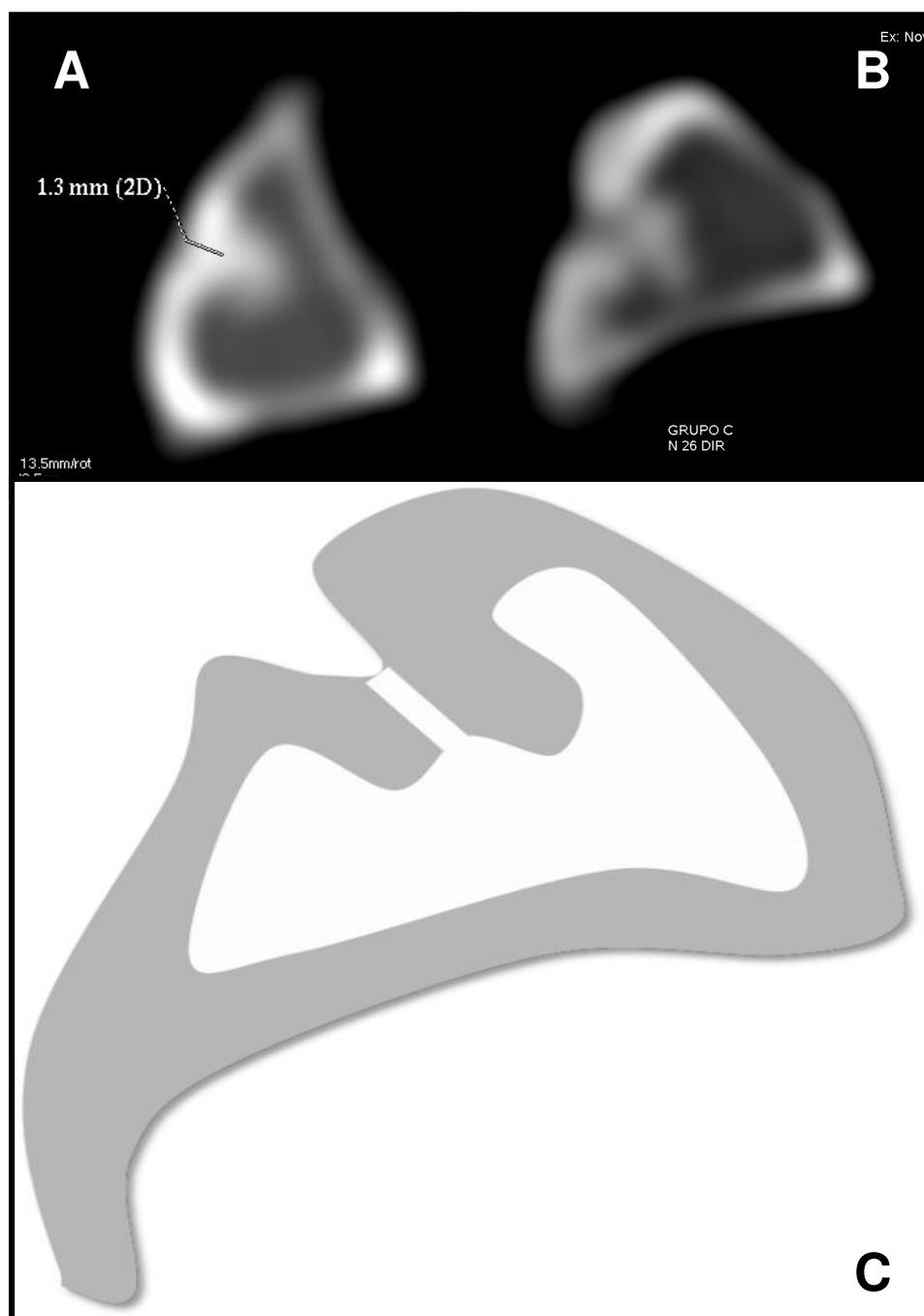


Figura 5 Imagem tomográfica axial (A) da tíbia de coelho do grupo PRP mostrando a consolidação da falha óssea e a neoformação de uma cortical de 1,3mm de espessura, (B) do grupo CMO mostrando a não consolidação da falha óssea na cortical e (C) reconstrução da área de secção da tíbia pelo programa de computador do tomógrafo determinada a partir da imagem do mesmo animal do grupo CMO com a falha não consolidada

4.2.3 Avaliação Histológica (Histomorfometria óssea)

A preparação das amostras para exame histológico consistiu de fixação em formalina a 10% e descalcificação posterior em solução de ácido nítrico a 7% até que o tecido ósseo apresentasse consistência macia. As amostras foram, então, lavadas em água corrente e submetidas a cortes transversais em toda a extensão. Os fragmentos que apresentaram alterações macroscópicas na cortical óssea (local da falha óssea) foram submetidos à rotina histológica: desidratados em série crescente de etanol, desengordurados em xilol e embebidos em parafina. Estes fragmentos ósseos, incluídos em blocos de parafina e submetidos a cortes histológicos de 4µm de espessura, foram recolhidos em lâminas de vidro. As lâminas foram coradas pelo método de hematoxilina-eosina (HE) e encaminhadas para análise histométrica por microscopia ótica com auxílio de analisador de imagens.

A estação de trabalho para a análise histomorfométrica consistiu de um microscópio Zeiss® trinocular, com lente objetiva com 4 vezes de aumento e ocular, de 10 vezes, uma vídeo-câmara colorida (Sony CCD - Iris®), com uma placa digitalizadora de imagens, um microcomputador com processador Pentium® 133 MHz, IBM-PC® compatível, operando em ambiente Windows 95® 32 bits. As imagens obtidas em 10 campos microscópicos foram digitalizadas com o auxílio do software Kontron Eletronic 300 (Zeiss®), proporcionando o compartilhamento dos dados com o processador de textos (Microsoft Word®) e planilha eletrônica (Microsoft Excel®). As micrografias representativas das alterações foram fotografadas (Figura 6).

A utilização deste programa proporcionou a análise, o tratamento, a interpretação e a obtenção de valores de mensuração das estruturas com todas as variáveis e a distribuição automática dos dados. A transmissão óptica foi quantificada a fim de se processar e analisar a imagem e, para que esta seja quantificada em suas medidas originais, transformou-se a medida da imagem digitalizada, o pixel, em medida micrometrada, utilizando-se para tal a calibração de pixel em micrômetros. A calibração das imagens foi realizada para imagens obtidas em aumentos de 10, 20 e 40 vezes de aumento. O fator de calibração foi calculado automaticamente, em pixels, e foi utilizado pelo software para os cálculos correspondentes em micrômetros. As imagens foram analisadas pelo software Kontron Eletronic 300 (Zeiss®) para a determinação de área, comprimento e contagem de partículas, contendo a ferramenta que permitia identificar determinada estrutura, colocá-la em evidência, e automatizar a sua marcação.

A área do tecido analisado foi obtida pela delimitação da lesão através de ferramenta de traço livre do programa analisador de imagem Kontron Eletronic 300 (Zeiss®). Esta rotina semi-automatizada foi realizada em cada campo com aumento de 40 vezes. Os resultados obtidos em cada campo, correspondente à área de estruturas ósseas em micrômetros quadrados (μm^2), foram arquivados em planilha Excel® para posterior análise estatística.

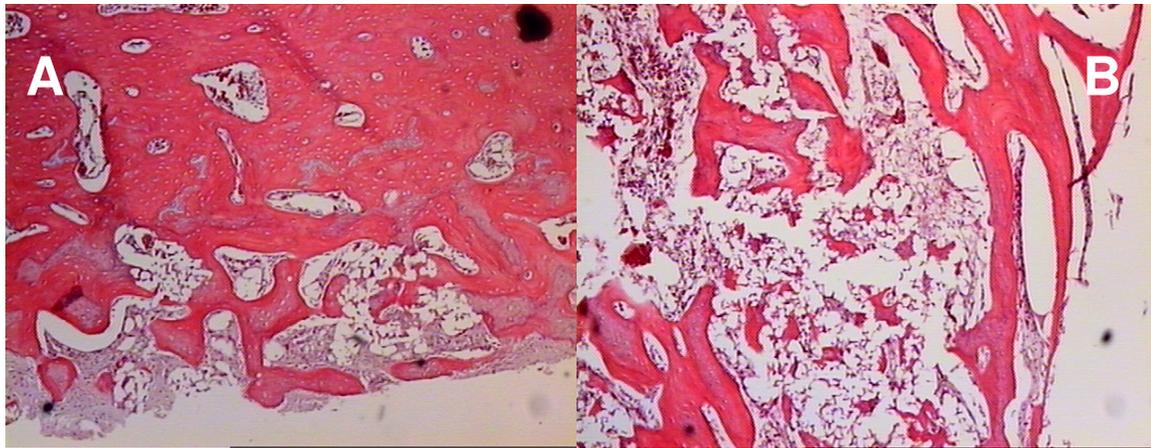


Figura 6 Fotomicrografia da consolidação da falha óssea de animal (A) do grupo PRP e (B) do grupo CMO.

4.3 Análise Estatística

Na composição dos grupos, os coelhos foram escolhidos e distribuídos de forma independente e aleatória garantindo a imparcialidade dos resultados. Tomou-se o cuidado de reduzir as interferências (“ruídos” ou “bias”) causadas por variáveis incontroláveis através da adoção de critérios de inclusão específicos para a homogeneização dos grupos experimentais (raça, idade, peso e condição clínica).

Realizou-se a distribuição de frequência, absoluta (n) e relativa (%), para a descrição e análise da ocorrência de consolidação, uma variável nominal ou categórica, nos grupos PRP e CMO. Para a comparação das frequências das classes entre os grupos PRP e CMO (amostras), para a inferência sobre a diferença das frequências de ocorrências, utilizou-se o teste exato de Fisher.

As frequências (interclasses) da ocorrência de cada atributo (qualidade) foi apresentada em tabela de contingência (Tabela 3) e as proporções (%) intraclasses representadas em gráficos de setores (Figura 8).

Para a descrição das amostras e análise dos dados quantitativos da densidade mineral óssea das tíbias contra-laterais (g/cm^2) (Tabela 1), do volume da fração relativa ao plasma rico em plaquetas (ml) e da viabilidade celular (%) (Tabela 2), da espessura cortical (mm) (Tabela 4) e do percentual de ossificação por área (%) (Tabela 5), grandezas específicas ou variáveis contínuas, realizou-se a estatística descritiva: média (M), e mediana (MN), no caso de amostras não

paramétricas, desvio padrão (DP), erro padrão da média (EPM), valores máximo (MAX) e mínimo (MIN) e número de casos (N).

A normalidade das distribuições foi testada pelo coeficiente de variação de Pearson (CVP) e pela prova de Kolmogorov-Smirnov para variáveis contínuas. Admitiu-se a distribuição paramétrica nos casos em que o coeficiente de variação de Pearson (CVP) apresentou-se inferior a 30% e que a prova de Kolmogorov-Smirnov (KS) não apresentou resultado significativo. Em todas as comparações das variáveis contínuas entre as amostras dos grupos PRP e CMO, as duas distribuições foram consideradas normais (curvas de Gauss) e, portanto, adotaram-se testes paramétricos. Utilizou-se o teste t de student para a inferência da diferença das médias das variáveis para amostras paramétricas independentes.

A estatística descritiva, o coeficiente de variação de Pearson (CVP) e o resultado da prova de Kolmogorov-Smirnov (KS) de cada variável foram apresentados em tabelas estatísticas de acordo com os grupos (amostras) PRP e CMO (Tabelas 1, 2, 4 e 5). A estatística descritiva de cada variável comparada foi representada na forma de gráficos de coluna (média \pm erro padrão de média) (Figuras 7, 9 e 10).

Adotou-se o nível de confiança de 5% ($\alpha=0,05$).

Admitiu-se, previamente, que as amostras (grupos) seriam equivalentes.

Utilizaram-se testes bidimensionais ou bilaterais:

$$(H_0 = \mu_1 - \mu_2 = 0)$$

Os resultados que demonstraram diferenças estatisticamente comprovadas foram evidenciadas por asteriscos (*) nas tabelas estatísticas (Tabelas 4 e 5).

Utilizou-se o arredondamento científico e os resultados foram apresentados com até três casas após a vírgula nas tabelas estatísticas e com até duas casas, ou até o primeiro número significativo, nos resultados dos testes estatísticos.

Utilizaram-se os programas estatísticos GraphPad Prism[®], versão 2.01 (1996) da GraphPad Software Incorporated[®], StatSoft[®] Statistica 6.0[®] da Software Incorporated[®] e o suplemento de ferramentas de análise de dados (estatística) do Microsoft[®] Excel 2007[®] da Microsoft Corporation[®].

5 RESULTADOS

5. RESULTADOS

Os resultados foram apresentados nas tabelas e gráficos a seguir.

Na Tabela 1 e Figura 7 apresentaram-se os resultados da densidade mineral óssea (g/cm^2), avaliada por densitometria convencional (raios x), para avaliação da qualidade óssea das tíbias contra-laterais dos coelhos dos grupos PRP e CMO e comprovação da equivalência entre os grupos previamente ao experimento.

Na Tabela 2 apresentaram-se os resultados das avaliações do volume de “buffy coat” e da contagem de células viáveis (coloração por azul de Trypan) realizados durante o processamento do centrifugado de aspirado de medula óssea para confirmação da viabilidade celular previamente a sua aplicação cirúrgica.

Para determinar a eficácia da consolidação óssea, apresentaram-se os resultados comparativos da ocorrência da consolidação da falhas preenchidas pelo PRP+ β TCP e pelo CMO+ β TCP constatadas pela radiografia digital (Tabela 3 e Figura 8), da espessura da parede cortical neoformada (mm) avaliada pela tomografia axial computadorizada (Tabela 4 e Figura 9) e do percentual de ossificação por área (%) medido pela histomorfometria (Tabela 5 e Figura 10).

TABELA 1 ESTATÍSTICA DESCRITIVA DA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA - BMD (g/cm^2) DAS TÍBIAS CONTRA-LATERAIS DOS COELHOS PREVIAMENTE AO EXPERIMENTO COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP+ β TCP) E COM CENTRIFUGADO DE MEDULA ÓSSEA (CMO+ β TCP). AVALIAÇÃO DA NORMALIDADE PELO COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DE PEARSON E PELA PROVA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV. COMPARAÇÃO PELO TESTE T DE STUDENT ($\alpha=0,05$ BILATERAL)

DENSIDADE MINERAL ÓSSEA (g/cm^2)	MATERIAL DE ENXERTO	
	PRP + β TCP	CMO + β TCP
M	0,264	0,249
DP	0,027	0,060
EPM	0,010	0,021
MAX	0,297	0,292
MIN	0,211	0,107
N	8	8
CVP (%)	10,13	24,01
KS (p)	>0,10	>0,10
t de student	t=0,66	p=0,51

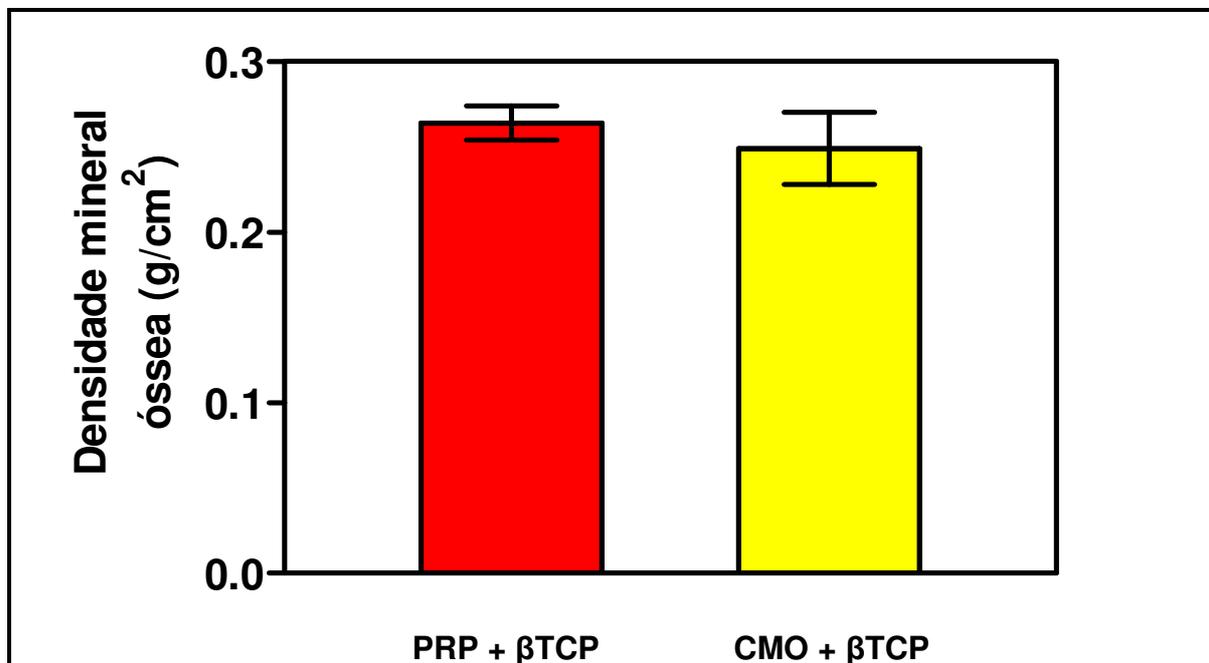


FIGURA 7 DENSIDADE MINERAL ÓSSEA (g/cm^2) DAS TÍBIAS DOS COELHOS PREVIAMENTE AO EXPERIMENTO COM PRP+ β TCP E COM CMO+ β TCP. REPRESENTAÇÃO PELO GRÁFICO DE COLUNAS (M \pm EPM)

TABELA 2 ESTATÍSTICA DESCRITIVA DO VOLUME DE “BUFFY COAT” (ml) E DO PERCENTUAL DE CÉLULAS VIÁVEIS NO CENTRIFUGADO DE MEDULA ÓSSEA (CMO). AVALIAÇÃO DA NORMALIDADE PELO COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DE PEARSON E PELA PROVA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV. ($\alpha=0,05$ BILATERAL)

CÉLULAS VIÁVEIS	MATERIAL DE ENXERTO	
	Volume de “buffy coat” (ml)	Viabilidade celular (%)
M	0,62	96,36
MN	0,50	-
DP	0,23	3,15
EPM	0,08	1,12
MAX	1,00	99,0
MIN	0,50	89,0
N	8	8
CVP (%)	37,03	3,27
KS (p)	0,07	>0,10

TABELA 3 DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA, ABSOLUTA (N) E RELATIVA (%), DA OCORRÊNCIA DE CONSOLIDAÇÃO DAS FALHAS DAS TÍBIAS DOS COELHOS PREENCHIDAS COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP+ β TCP) E COM CENTRIFUGADO DE MEDULA ÓSSEA (CMO+ β TCP) AVALIADA PELA RADIOGRAFIA DIGITAL. COMPARAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE OCORRÊNCIA DE CONSOLIDAÇÃO PELO TESTE EXATO DE FISHER ($\alpha=0,05$ BILATERAL)

CONSOLIDAÇÃO - AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA	MATERIAL DE ENXERTO					
	PRP + β TCP		CMO + β TCP		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%
Com consolidação	7	50,0	7	43,8	15	93,8
Sem consolidação	0	0,0	1	0,0	0	0,0
Fratura ¹	1	0,0	0	6,2	1	6,2
TOTAL	8	50,0	8	50,0	16	100,0

Fisher

p=1,00

¹ Fratura com calo, caso não considerado para análise estatística.

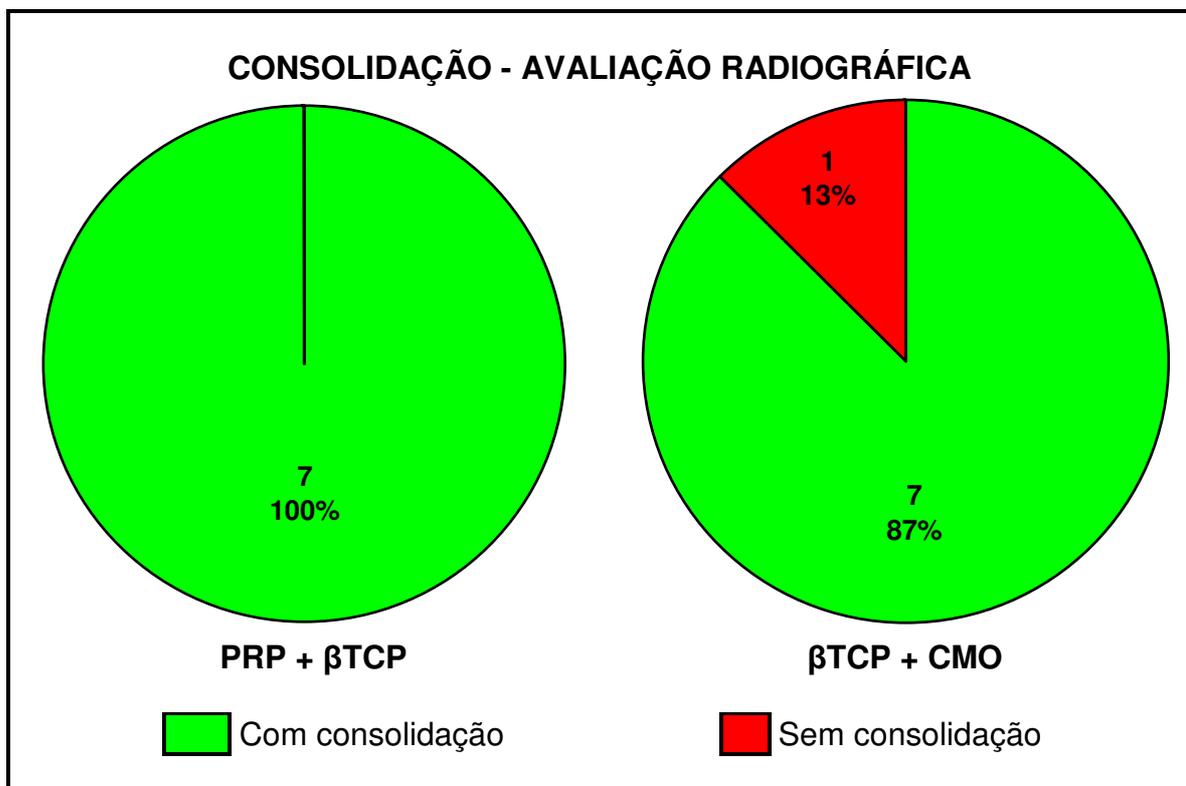


FIGURA 8 FREQUÊNCIAS RELATIVAS INTRACLASSES (%) DA OCORRÊNCIA DE CONSOLIDAÇÃO DAS FALHAS PREENCHIDAS COM PRP+ β TCP E COM CMO+ β TCP AVALIADA PELA RADIOGRAFIA DIGITAL

TABELA 4 ESTATÍSTICA DESCRITIVA DA ESPESSURA (mm) DA CORTICAL FORMADA APÓS A CONSOLIDAÇÃO DAS FALHAS DAS TÍBIAS DOS COELHOS PREENCHIDAS COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP+ β TCP) E COM CENTRIFUGADO DE MEDULA ÓSSEA (CMO+ β TCP) AVALIADA PELA TOMOGRAFIA AXIAL COMPUTADORIZADA. AVALIAÇÃO DA NORMALIDADE PELO COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DE PEARSON E PELA PROVA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV. COMPARAÇÃO PELO TESTE T DE STUDENT ($\alpha=0,05$ BILATERAL)

ESPESSURA CORTICAL (mm)	MATERIAL DE ENXERTO	
	PRP + β TCP	CMO + β TCP
M	1,96	1,00
DP	0,36	0,26
EPM	0,13	0,15
MAX	2,3	1,2
MIN	1,3	0,7
N	7	3
CVP (%)	18,39	26,46
KS (p)	>0,10	-
t de student	t=4,10	p=0,004*

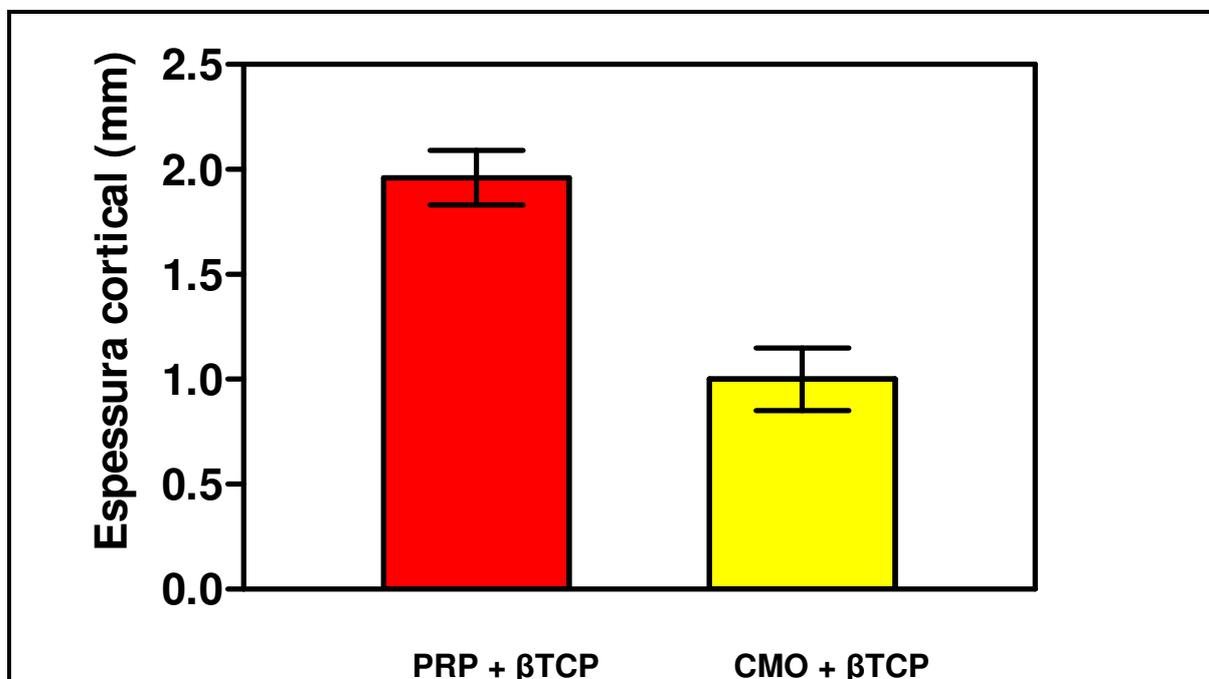


FIGURA 9 ESPESSURA DA CORTICAL FORMADA (mm) APÓS A CONSOLIDAÇÃO DAS FALHAS PREENCHIDAS PRP+ β TCP E COM CMO+ β TCP. REPRESENTAÇÃO PELO GRÁFICO DE COLUNAS (M \pm EPM)

TABELA 5 ESTATÍSTICA DESCRITIVA DO PERCENTUAL DE OSSIFICAÇÃO POR ÁREA (%) NO TECIDO FORMADO APÓS A CONSOLIDAÇÃO DAS FALHAS DAS TÍBIAS DOS COELHOS PREENCHIDAS COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP+ β TCP) E COM CENTRIFUGADO DE MEDULA ÓSSEA (CMO+ β TCP). AVALIAÇÃO DA NORMALIDADE PELO COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DE PEARSON E PELA PROVA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV. COMPARAÇÃO PELO TESTE T DE STUDENT ($\alpha=0,05$ BILATERAL)

PERCENTUAL DE OSSIFICAÇÃO (%)	MATERIAL DE ENXERTO	
	PRP + β TCP	CMO + β TCP
M	65,02	36,88
DP	5,71	9,05
EPM	2,16	3,42
MAX	72,13	48,17
MIN	59,07	26,39
N	7	7
CVP (%)	8,78	24,55
KS (p)	>0,10	>0,10
t de student	t=6,96	p \leq 0,00*

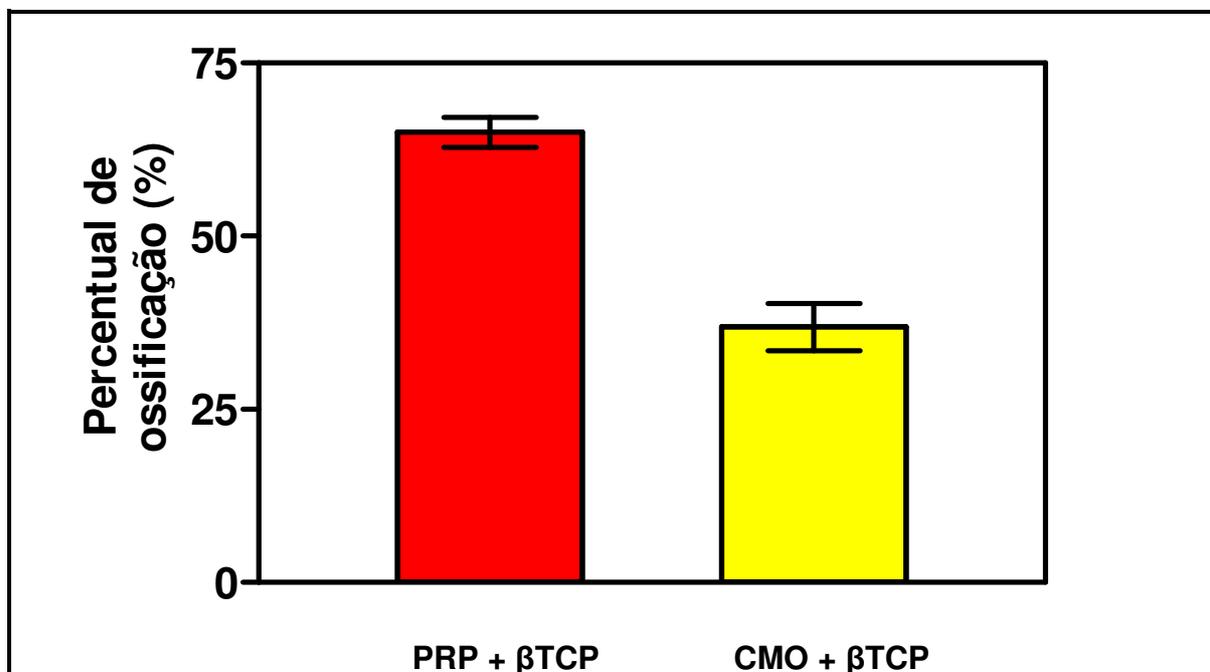


FIGURA 10 PERCENTUAL DE OSSIFICAÇÃO POR ÁREA (%) NO TECIDO FORMADO APÓS A CONSOLIDAÇÃO DAS FALHAS PREENCHIDAS COM PRP+ β TCP E COM CMO+ β TCP. REPRESENTAÇÃO PELO GRÁFICO DE COLUNAS (M \pm EPM)

6 DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O plasma rico em plaquetas (Lind et al., 1993; Andrew et al., 1995; Marx et al., 1998; Whitman e Berry, 1998; Anitua, 1999; Lieberman, Daluiski e Einhorn, 2002; Delgado, Bonatelli e Alves, 2009) e o centrifugado do aspirado de medula óssea (Paley, 1998; Sharma et al., 1992; Connoly, 1995; Connoly, 1998; Vaz, 2006) são agentes com ação osteoindutora comprovada. Associados a materiais sintéticos osteocondutores, estes compósitos sintético-biológicos poderiam ser utilizados como materiais de preenchimento e de remodelamento, alternativos ao enxerto ósseo autógeno, nas cirurgias ortopédicas de reconstrução óssea.

O enxerto ósseo autógeno (porção de osso córtico-esponjoso triturado) é o material de preenchimento mais utilizado nas cirurgias de reconstrução ósseas e, atualmente, é considerado o “padrão-ouro”. Possui propriedades osteoindutoras e osteocondutoras comprovadas (Sen e Miclau, 2007; D’Elia, 2009).

Neste experimento, procurou-se avaliar e comparar o efeito do plasma rico em plaquetas e do centrifugado do aspirado de medula óssea na consolidação de falhas ósseas, associados a um mesmo material osteocondutor sintético comercial, o β fosfato tricálcico. A utilização de um material sintético comercial homogêneo facilitaria a identificação de eventuais diferenças.

A decisão de não combinar esses agentes osteoindutores ao enxerto ósseo autógeno deve-se ao fato de que o enxerto, também, apresenta propriedades osteoindutoras. Estes efeitos se superporiam às dos agentes estudados e dificultaria a comprovação das diferenças entre o PRP e o CMO, objetivo deste estudo.

Existem poucos estudos publicados sobre a associação de osteoindutores biológicos, como o PRP (**Delgado et al., 2009**), o CMO e outros, e osteocondutores sintéticos, como as biocerâmicas, os materiais a base de colágeno e fibrina e outros.

O animal de experimentação escolhido foi o coelho por vários aspectos como a disponibilidade, a infra-estrutura do biotério do Hospital Universitário (HU) de Londrina estar adequada a coelhos, a facilidade de manuseio destes animais, a maior facilidade na técnica operatória em relação aos ratos (dimensões) e, principalmente, devido ao tecido ósseo dos coelhos ser mais semelhante ao dos humanos, apresentando, inclusive, o sistema de Havers (**Masoud et al., 1986**).

O estudo de **Katthagen e Mittelmeier (1984)** mostra que a cicatrização do tecido ósseo nos coelhos começa na 2ª semana, atinge a máxima atividade na 3ª semana e está completa na 4ª semana após a operação realizada para obter uma falha óssea de 6,0mm (orifício) no fêmur de coelhos, falha significativamente maior do que a utilizada neste experimento (área da falha quatro vezes maior). Adotou-se o mesmo período tempo de seguimento pós-operatório de quatro semanas, suficiente para garantir uma completa consolidação.

Na técnica operatória optou-se por realizar uma falha óssea (orifício), semelhante ao referido no estudo de **Stein, Silva e Silva (2009)**. A realização de uma osteotomia da fíbula, conforme descrito por **Matos, Gonçalves e Araujo (2001)**, apresenta diversos inconvenientes como a maior variabilidade da posição e do traço de fratura produzida pelo osteotomia, pela falta de homogeneidade das superfícies da fratura, pela instabilidade no foco de fratura, pelo extravasamento ou extrusão do material implantado, pelo aumento de intercorrências e de problemas associados e de outros fatores não controláveis (morbidade, alteração da vascularização local e outros). A produção de uma falha óssea por perfuração facilitou, inclusive, o preenchimento das falhas com os substitutos ósseos utilizados, os compósitos sintético-biológicos a base de PRP+ β TCP e CMO+ β TCP na forma de massa.

Park et al. (1999) afirmam que ocorrência de uma lesão térmica no local da falha óssea, devido à realização de perfuração com broca em alta rotação, interfere e compromete o estudo do processo de consolidação óssea. Para evitar esse problema, utilizou-se uma perfuratriz e trefina (serra-copo) odontológicas e realizou-se a perfuração em baixa rotação (800rpm) para não gerar calor e evitar, assim, a ocorrência de tais problemas.

Ao contrário do procedimento adotado por **Stein, Silva e Silva (2009)**, preferiu-se não utilizar a tíbia contra-lateral (esquerda) como controle devido à dificuldade de obter-se um enxerto ósseo autógeno ideal (córtico-esponjoso). O material disponível no interior da trefina era basicamente osso cortical. **Katthagen**

e **Mittelmeier (1984)** afirmam que o osso cortical tem menor vascularização e menor poder osteogênico e não proporcionam um enxerto autógeno adequado. Decidiu-se, também, não retirar enxerto da crista ilíaca (osso córtico–esponjoso) ou de outra possível região doadora, para não aumentar a morbidade e a dificuldade operatória, o que poderia elevar as perdas de animais por mortes ou por outros critérios de exclusão.

Da mesma forma que **Santos (2007)**, excluíram-se do experimento os casos nos quais ocorreram fratura da tíbia. A fratura na região da falha óssea alteraria as condições locais do experimento, introduziria fatores não controláveis e distorções e interferiria de forma não previsível ou controlável nos resultados.

Com relação aos métodos de avaliação e quantificação, as radiografias não trouxeram dados quantitativos em relação à consolidação óssea, porém auxiliaram na avaliação da não ocorrência de fraturas no pós-operatório e também na confirmação do local da falha óssea realizada na operação.

Assim como **Stein, Silva e Silva (2009)**, decidiu-se utilizar a radiografia e a histomorfometria óssea como métodos de controle da consolidação. A realização da avaliação da consolidação pela tomografia computadorizada foi introduzida por ser um método mais preciso e eficaz do que a radiografia na análise da ocorrência, ou não, da consolidação e por permitir uma medição da espessura da cortical formada (avaliação quantitativa, objetiva e repetível).

No grupo PRP, dois coelhos foram excluídos deste estudo. Um morreu por complicação intra-operatória e um outro foi excluído devido à intercorrência da coagulação da amostra sangüínea antes da preparação do PRP. Dos oito animais restantes, um apresentou uma fratura na região da falha da tíbia (Tabela 3 e Figura 8). As avaliações da espessura da cortical pela tomografia e do percentual de ossificação por área do tecido consolidado (histomorfometria óssea) foram realizadas em sete animais do grupo PRP (Tabelas 4 e 5, Figuras 9 e 10).

No grupo CMO, perderam-se quatro animais. Dois por problemas técnicos na execução do teste da viabilidade celular da amostra do centrifugado do aspirado de medula óssea e outro, excluído devido à complicação pós-operatória de automutilação do membro operado. Um quarto coelho foi excluído devido aos problemas técnicos durante o processamento histológico da amostra. Dos seis animais restantes, um não apresentou consolidação da falha óssea (Tabela 3 e Figura 8). Dois animais foram repostos neste grupo, para manter a avaliação tomográfica e histomorfométrica de, no mínimo, sete animais por grupo (Tabelas 4 e 5, Figuras 9 e 10).

As tíbias contralaterais integras dos coelhos dos grupos PRP e CMO foram submetidas a exame de densitometria óssea para comprovação da equivalência da qualidade óssea dos coelhos de ambos os grupos. Não se comprovou diferença na densidade mineral óssea entre os coelhos dos dois grupos. As amostras foram consideradas equivalentes e os grupos comparáveis (Tabela 1 e Figura 7).

As radiografias não permitiram obter dados quantitativos em relação à consolidação óssea, apenas, a avaliação qualitativa da ocorrência, ou não, da consolidação. Permitiram, também, confirmar a ocorrência de fraturas no pós-operatório (critério de exclusão). No grupo PRP todos os casos consolidaram. Um foi excluído da análise por apresentar uma fratura da tíbia na região da falha. No grupo CMO, um caso não consolidou. Não se comprovou, no entanto, diferença estatística entre os grupos (Tabela 3 e Figura 8).

Após as verificações de ocorrência de fratura ou de consolidação, ou não, na região da falha óssea na tíbia, apenas as tíbias de sete coelhos de cada grupo foram encaminhadas para a avaliação pela tomografia computadorizada e pela histomorfometria.

A tomografia computadorizada mostrou-se mais confiável para a confirmação da consolidação das falhas nas corticais das tíbias e permitiu, também, uma avaliação quantitativa do tecido ósseo neoformado. Constatou-se que a espessura da cortical formada na região da falha do grupo PRP foi superior ($p=0,004^*$) à do grupo CMO (Tabela 4 e Figura 9).

A histomorfometria das amostras do grupo PRP comprovou uma maior formação relativa de tecido ósseo por área ($p=0,00^*$) do que as das amostras do grupo CMO (Tabela 5 e Figura 10). Nas imagens fotográficas obtidas das lâminas do grupo CMO, constatou-se uma menor densidade de tecido ósseo e traves ósseas regeneradas pouco adensadas (Figura 6).

As plaquetas sangüíneas contém proteínas fundamentais que são secretadas pelas mesmas para iniciar a cicatrização de qualquer tecido em nosso organismo, o fator de crescimento das plaquetas (PDGF), os fatores de crescimento transformadores (TGF- β 1 e TGF- β 2), o fator de crescimento endotélio vascular (VEGF), o fator de crescimento epitelial (EGF) (**Delgado, Bonatelli e Alves, 2009**).

O PDGF é o primeiro e principal fator de crescimento secretado diante de qualquer lesão tecidual, ou seja, sua ação inicia o processo de indução e diferenciação do tecido conectivo, que culmina com a cicatrização da lesão (**Lieberman, 2002; Delgado, Bonatelli e Alves, 2009**).

A melhor consolidação observada no grupo PRP em relação ao grupo CMO, no período de 4 semanas, poderia ser explicada pela diferença relativa dos fatores sangüíneos encontrados em suas composições. Por ser um concentrado de plasma sangüíneo rico em plaquetas, o PRP apresenta quantidades significativamente maiores de plaquetas sangüíneas e das proteínas fundamentais, principalmente de PDGF, do que as encontradas no CMO.

As células-tronco mesenquimais do centrifugado do aspirado de medula óssea, poderiam necessitar de um intervalo de tempo maior para uma consolidação semelhante à obtida pelo plasma rico em plaquetas (espessura da parede). No entanto, pelos resultados da histomorfometria, seria difícil acreditar que o CMO produza a mesma qualidade óssea do PRP, uma vez que ocorreu formação significativamente maior de tecido cicatricial (fibro-cartilagem) nos

interstícios do tecido ósseo neoformado na região de consolidação da falha preenchida com CMO, tecidos que dificilmente seriam substituídos posteriormente.

Assim sendo, pôde-se inferir que as plaquetas agem decisivamente no início da consolidação óssea e explicaria a melhor consolidação observada no grupo PRP em relação ao grupo CMO, no tempo de 4 semanas.

Constatou-se a ocorrência de uma melhor consolidação, com maior quantidade de tecido ósseo nas amostras do grupo plasma rico em plaquetas e β fosfato tricálcico (grupo PRP), em relação às amostras do grupo centrifugado do aspirado de medula óssea e β fosfato tricálcico (grupo CMO); fato demonstrado pela tomografia computadorizada e pela análise histomorfométrica das amostras.

Constatou-se, também, uma melhor consolidação, com formação de paredes corticais mais espessas e com maior quantidade relativa de tecido ósseo por área nas amostras do grupo plasma rico em plaquetas e β fosfato tricálcico em relação às amostras do grupo centrifugado do aspirado de medula óssea e β fosfato tricálcico.



7 CONCLUSÃO



7. CONCLUSÃO

O plasma rico em plaquetas promoveu uma consolidação mais eficaz do que o centrifugado do aspirado de medula óssea.

8 REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

Alonso JE, Lee J, Burgess AR, Browner BD. The management of complex orthopedic injuries. *Surg Clin North Am.* 1996;76:879-903.

Andrew JG, Hoyland JA, Fremont AJ, Marsh DR. Platelet-derived growth factor expression in normally healing human fractures. *Bone.* 1995;16: 455-60.

Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999;14:529-35.

Arenas GCF, inventor. Protocolo Cantadori. *Obtenção do Plasma Rico em Plaquetas para infiltrações e procedimentos cirúrgicos.* São Paulo; 2010. (Registrado na Biblioteca Nacional do RJ, N° Registro: 508.102, Livro:962, Folha: 379).

Bames GL, Kostenuk PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res.* 1999; 14: 1805-15.

Beresford JN. Osteogenic stem cells and stromal system of bone marrow. *Clin Orthop Relat Res.* 1989 Mar; (240): 270-80.

Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stem cells: nature, biology and potential applications. *Stem Cells.* 2001; 19 (3): 180-92.

Bibbo C, Patel VD, Haskell MD. Recombinant bone morphogenetic protein-2 (rhBPM-2) in high-risk ankle and hindfoot fusions. *Foot & Ankle Int.* 2009; 30(7): 597-603.

Bostrom MP, Camacho NP. Potential role of morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1998a Oct; (355 suppl): S274-82.

Bostrom MP, Seigerman DA. The clinical use of allografts, desmineralized bone matrices, synthetic bone grafts substitutes and osteoinductive growth factors: a survey study. *HSS J.* 2005b; 1(1): 9-18.

Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem.* 1994; 56(3): 283-94.

Büring K, Urist MR. Transfilter bone induction. *Clin Orthop Relat Res.* 1967 Sep-Oct; 54: 235-39.

Burkus JK. New bone graft techniques and applications in the spine. [Internet].,2002. Medscape Orthopaedics. Available from <http://www.medscape.com/viewprogram/2073>

Canadian Council on Animal Care CCAC. Guide to the care and use of experimental animals. [Internet]. 1998. Available from:

http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/GUIDES/SPANISH/toc_v1.htm

Chapman MW, Bucholz R, Cornell C. Treatment of acute fractures with a collagen-calcium phosphate graft material. A randomized clinical trial. *J Bone Joint Surg Am.* 1997; 79(4): 495-502.

Connolly J. Clinical use of marrow osteoprogenitor cells to stimulate osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res.* 1998 Oct; (355 Suppl): S257-66.

Connolly JF. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1995 Apr; 313: 8-18.

Croci AT. Retarde de consolidação e pseudoartrose. *Acta Ortop Bras.* 1997; 5:26-34.

D'Elia CA, Comparação entre o uso do plasma rico em plaquetas associado com aspirado de medular óssea ao enxerto autólogo de íliaco na consolidação das osteotomias da tíbia proximal: estudo prospectivo randomizado [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2009.

Davis WH, Cohen BE. Adjuvant use of the implantable bone growth stimulator for the high-risk ankle arthrodesis. *Tech Foot Ankle Surg.* 2002; 1 (1): 69-73.

De Long WG Jr, Einhorn TA, Koval K, Mckee M, Smith W, Sanders et al. Bone grafts and bone grafts substitutes in orthopaedic trauma surgery. *J Bone Joint Surg Am.* 2007;89 (3): 649-58.

Delécrin J, Takahashi S, Gouin F, Passuti N. A synthetic porous ceramic as a bone graft substitute in the surgical management of scoliosis: a prospective, randomized study. *Spine.* 2000; 25(5): 563-9.

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.* 2009; 17 (5): 282-5.

Donley BG, Ward DM. Implantable electrical stimulation in high-risk hindfoot fusion. *Foot Ankle Int.* 2002; 23 (1):13-8.

Einhorn T. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1998 Oct; (355 Suppl): S7-21.

Esquisatto MAM, Levada VMO, Mendonça JS, Dalge G, Santos GT, Mendonça FS. Efeitos de diferentes intensidades de microcorrente no reparo ósseo em ratos Wistar. *Rev Bras Ortop.* 2006; 41 (8): 331-5.

Frost HM. The biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1989 Nov; (248): 283-93.

Griffin XL, Smith CM, Costa ML. The clinical use of platelet-rich plasma in the promotion of bone healing: A systematic review. *Injury*. 2009; 40 (2): 158-62.

Guarniero R, Vaz CES, Santana PJ, Molin ED, Braun J, Harada MS. Avaliação do efeito do ibandronato na consolidação de fratura: Estudo experimental em coelhos. *Rev Bras Ortop*. 2007;42 (8): 254-60.

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 Orthopaedic Reserch Society. Boston, MA, 2002.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE(BR). Projeção da População do Brasil por Sexo e Idade – 1980-2050. Revisão 2008. Informação Demográfica e Socioeconômica número 24. Rio de Janeiro: IBGE; 2008.

Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada – IPEA – Impactos sociais de trânsito nas aglomerações urbanas: síntese da pesquisa. Brasília, 2003, 21 p.

Kadiyala S, Jaiswal N, Bruder SP. Culture-expanded, bone marrow-derived mesenchymal stem cells can regenerate a critical-sized segmental bone defect. *Tissue Eng*. 1997; 3 (2): 173-85.

Katthagen BD, Mittelmeier H. Experimental animal investigation of bone regeneration with collagen-apatite. *Arch Orthop Trauma Surg.* 1984; 103 (5): 291-302.

Kossmann T, Giebel G, Glombitza A. Rat model for limb lengthening by callus distraction. *Res Exp Med (Berl).* 1993; 193 (1): 13-20.

Landesberg R, Roy M, Glickman PS. Quantification of growth factors level using a simplified method of platelet rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000; 58 (3): 297-300.

Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. *J Bone Joint Surg Am.* 2002; 84 (6): 1032-44.

Lin H. The self-renewing mechanism of stem cells in the germline. *Curr Opin Cell Bioll.* 1998; 10 (6): 687-93.

Lind M, Schumaker B, Soballe K, Keller J, Melsen F, Bünger C. Transforming growth factor-beta enhances fracture healing in rabbit tibiae. *Acta Orthop Scand.* 1993; 64 (3):553-6.

Marx RE, Carlson ER, Eichtaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeoff KR. Platelet rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85 (6): 638-46.

Marx RE. Platelet rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.* 2001; 10 (4): 225-8.

Masoud I, Shapiro F, Kent R, Moses A. A longitudinal study of the growth of the New Zealand white rabbit: cumulative and biweekly incremental growth rates for body length, femoral length and tibial length. *J Orthop Res.* 1986; 4(2): 221-31.

Matos MA, Gonçalves RR, Araújo FP. Modelo experimental de osteotomia em coelhos imaturos. *Acta Ortop Bras.* 2001; 9(4): 21-6.

Mckee MD, Schemitsch EH, et al. The effect of human recombinant bone morphogenic protein (rhBPM-7) on the healing of open tibial shaft fractures: results of a multi-center, prospective, randomized clinical trial in: Proceedings of the 16th Annual Meeting of the Orthopaedic Trauma Association; 2002: Toronto. Ontario. Canada; p. 157-8.

Muschler GF, Midura RJ. Connective tissue progenitors: Practical concepts for clinical applications. *Clin Orthop Relat Res.* 2002; (395): 66-80.

Nielsen HM, Andreassen TT, Ledet T, Oxlund H. Local injection of TGF β increases the strength of tibial fractures in the rat. *Acta Orthop Scand.* 1994; 65 (1): 37-41.

Organización Mundial de la Salud – OMS. Informe mundial sobre prevención de los traumatismos causados por el tránsito: resumen. Ginebra, 2004. 176p.

Paley D, Young MC, Wiley AM, Fornasier VL, Jackson RW. Percutaneous bone marrow grafting of fractures and bone defects .An experimental study in rabbits. *Clin Orthop Relat Res.* 1986; (208): 300-12.

Park SH, O Connor K, Sung R, McKellop H, sarmiento A. Comparison of healing process in open osteotomy model and closed fracture model. *J Orthop Trauma.* 1999; 13 (2): 114-20.

Santana PJ. Estudo da consolidação de fraturas na desnutrição protéica: trabalho experimental com o uso de alendronato em ratos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1999.

Santos LAU. Efeito da utilização de plasma rico em plaquetas na osteointegração dos enxertos ósseos homólogos criopreservados: estudo histomorfométrico em coelhos. Dissertação [dissertação] apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 2007.

Sen MK, Miclau T, Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions? *Injury.* 2007; 38 Suppl 1: S75-80.

Sharma S, Garg NK, Veliath AJ, Subramanian S, Srivastava KK. Percutaneous bone marrow grafting of osteotomies and bony defects in rabbits. *Acta Orthop Scand.* 1992; 63(2):166-9.

Slater M, Patava J, Kingham K, Mason RS. Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity. *J Orthop Res.* 1995; 13 (5): 655-63.

Soost F, Koch S, Stoll C, Amthauer H, grosse-Siestrup C, Zorn P. Validation of bone conversion in osteoconductive and osteoinductive bone substitutes. *Cell Tissue Bank.* 2001; 2(2): 77-86.

Stein RS, Silva JB, Silva VD. Estudo comparativo da neoformação óssea utilizando-se o enxerto autógeno e três substitutos: defeitos ósseos em ratos. *Rev Bras Ortop.* 2009; 44 (4): 330-5.

Summer DR, Turner TM, Purchio AF, Gombotz WR, Urban RM, Galante JO. Enhancement of bone ingrowth by transforming growth factor beta. *J Bone Joint Surg Am.* 1995; 77 (8): 1135-47.

Urist MR, Iwata H. Preservation and biodegradation of the morphogenetic property of bone matrix. *J Theor Biol.* 1973; 38(1): 155-62.

Urist MR, Silverman BF, Büring K, Dubuc FL, Rosemberg JM. The bone induction principle. *Clin Orthop Relat Res.* 1967 Jul-Aug; 53: 243-83.

Urist MR, Strates BS. Bone morphogenetic protein. *J Dent Res.* 1971; 50(6): 1392-401.

Urist MR. The classic Bone formation by autoinduction. *Clin Orthop Relat Res.* 2002 Feb; (395): 4-10.

Urist MR. Bone formation by autoinduction. *Science (New York)*. 1965;150 (698): 893-9.

Valchanov VD, Michailov P. High energy shock waves in the treatment of delayed and non-union of fractures. *Int Orthop*. 1991;15 (3):181-4.

Vaz, CES. Avaliação do efeito de centrifugado osteogênico de medula óssea na consolidação de fratura: estudo experimental em coelhos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2006.

Whitman DH, Berry RL. A technique for improving the handling of particulate cancellous bone and marrow grafts using platelet gel. *J Oral Maxillofac Surg*. 1998;56 (10): 1217-8.

Yoo JU, Johnstone B. The role of osteochondral progenitor cells in fracture repair. *Clin Orthop Relat Res*. 1998 Oct; (355 Suppl): 73-81.