

Caio Oliveira D'Elia

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 apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Ortopedia e Traumatologia
Orientador: Gilberto Luis Camanho

São Paulo

2009

Caio Oliveira D'Elia

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 tibia proximal: estudo prospectivo randomizado

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Ortopedia e Traumatologia
Orientador: Gilberto Luis Camanho

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

D'Elia, Caio Oliveira

Comparação entre o uso do plasma rico em plaquetas associado com aspirado de medular óssea ao enxerto autólogo de ilíaco na consolidação das osteotomias da tibia proximal : estudo prospectivo randomizado / Caio Oliveira D'Elia. -- São Paulo, 2009.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Ortopedia e Traumatologia.

Área de concentração: Ortopedia e Traumatologia.

Orientador: Gilberto Luis Camanho.

Descritores: 1.Substitutos ósseos 2.Peptídeos e proteínas de sinalização intercelular
3.Plasma rico em plaquetas 4.Osteotomia 5.Tibia

USP/FM/SBD-198/09

Dedicatória

Dedico a conclusão deste ciclo em minha vida às pessoas que tornaram isto possível:

À minha **amada esposa Carolina**, por todo seu amor, apoio e paciência nestes 14 maravilhosos anos que estamos juntos.

À minha **filha Manuela**, que em apenas 10 meses deu um novo e melhor propósito à minha vida.

Aos meus amados pais **Ricardo e Regina**, por terem doado suas vidas à nossa família. Devo **tudo** a vocês.

Aos meus irmãos **Luciano e Leonardo**, por serem meus verdadeiros, inseparáveis e incondicionais amigos.

Às minhas queridas avós **Antonieta e Cléa**, pela contribuição e apoio em minha criação e formação.

Ao meu falecido avô **José Alfano**, de quem tenho muita saudade e que com certeza está radiante com mais esta conquista.

Aos meus sobrinhos, **Ricardo, Pietra e Guilherme**, por terem dado nova vida a nossa família.

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Gilberto Luís Camanho pelas orientações, ensinamentos, apoio e confiança durante todos estes anos de minha formação profissional.

À Dra. Márcia pela fundamental ajuda e participação em todas as etapas deste trabalho.

Ao Dr. Pécora pela confiança e apoio durante todos estes anos.

Ao amigo Bitar pelo auxílio na realização deste e de tantos outros trabalhos.

Ao Dr. Nelson Tatsui pela ajuda e contribuição com os procedimentos técnicos.

Ao amigo Alexandre Godoy pelo companheirismo desde os tempos de faculdade.

À Dra. Ana Lúcia por todas as oportunidades e pela confiança ao longo destes anos.

Ao Dr. Arnaldo Hernandez pelas sugestões na banca de qualificação.

Aos amigos do IOT-HC pela contribuição à minha formação como ortopedista.

Aos amigos do Instituto Vita por todo apoio em minha vida profissional e pessoal.

Aos pacientes que foram voluntários deste estudo, pela paciência, seriedade e boa vontade. Sem vocês esta dissertação não teria sido possível.

Normalização adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: Adaptado do *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena, 2^a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus* (1992) e na LILACS – Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde.

Terminologia Anatômica em Português conforme a terminologia anatômica internacional da “Federative Committee on Anatomical Terminology – FCAT” (Comissão Federativa de Terminologia Anatômica – CFTA) aprovada em 1998 e traduzida pela Comissão de Terminologia Anatômica da Sociedade Brasileira de Anatomia – CTA-SBA. 1. Ed (Brasileira) São Paulo, Editora Manole Ltda 2001. 248p.

A terminologia e as definições estatísticas foram utilizadas conforme o “Guia para Expressão da Incerteza da Medição”, segunda edição brasileira do “Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement” (BIPM, IEC, IFCC, ISSO, IUPAC, IUPAP, OIML, 1983). Edição Revisada (Agosto de 1998) – Rio de Janeiro: ABNT, INMETRO, SBM, 1998.

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Summary

1 Introdução.....	1
2 Objetivos.....	3
3 Revisão da literatura.....	4
3.1 Substituto ósseo.....	4
3.2 Enxerto ósseo autólogo.....	5
3.3 Aspirado de medular óssea.....	7
3.4 Fatores de crescimento.....	8
3.5 Osteotomia valgizante de tibia.....	10
3.6 Fatores de crescimento e aspirado de medular óssea.....	12
4 Métodos.....	14
4.1 Comitê de ética.....	14
4.2 Critérios de inclusão.....	14
4.3 Critérios de exclusão.....	15
4.4 Casuística.....	15
4.5 Procedimento cirúrgico.....	18
4.6. Obtenção do enxerto autólogo do íliaco (GI).....	20
4.7 Obtenção do enxerto biológico (GPRP).....	21

4.8 Avaliação radiográfica.....	24
4.9 Análise estatística.....	25
5 Resultados.....	26
6 Discussão.....	30
7 Conclusão.....	36
8 Anexos.....	37
8.1 Anexo 1.....	37
8.2 Anexo 2.....	38
8.3 Anexo 3.....	41
9 Referências.....	42

Lista de abreviaturas

BMPs: proteínas morfogenéticas ósseas

CTM: célula-tronco mesenquimal

et al: e outros

LCA: ligamento cruzado anterior

PRP: plasma rico em plaquetas

OA: osteoartrose

OTP: Osteotomia tibial proximal

Lista de símbolos

cm: centímetro

kV: quilovolt

mA: miliampère

Lista de tabelas

Tabela 1. Distribuição dos pacientes dos grupos ilíaco e PRP segundo diagnóstico.....	16
Tabela 2. Distribuição dos pacientes dos grupos ilíaco e PRP segundo sexo.....	16
Tabela 3. Distribuição dos pacientes dos grupos ilíaco e PRP segundo tabagismo.....	17
Tabela 4. Distribuição dos pacientes dos grupos ilíaco e PRP segundo tamanho da cunha utilizada.	17
Tabela 5. Distribuição dos pacientes dos grupos ilíaco e PRP segundo tamanho da cunha utilizada.....	17
Tabela 6. Medidas descritivas para idade dos pacientes, segundo grupos de estudo.....	18
Tabela 7. Distribuição dos pacientes dos grupos Ilíaco e PRP segundo consolidação após 12 semanas.....	26
Tabela 8. Distribuição dos pacientes dos grupos Ilíaco e PRP segundo consolidação após 24 semanas.....	26
Tabela 9. Estimativas de Kaplan-Meier para os grupos ilíaco e PRP.....	28
Tabela 10. Medidas descritivas para o tempo até a consolidação (em semanas)	28
Tabela 11. Resultados dos testes utilizados para comparar as curvas de sobrevida dos grupos Ilíaco e PRP.	28

Lista de figuras

Figura 1: Fio guia para orientação da osteotomia.....	19
Figura 2: Instrumental para abertura da cunha.	20
Figura 3: Desenho ilustrativo da placa utilizada.	20
Figura 4: Separador celular automático Haemonetics MCS+ 9000.	22
Figura 5: Bolsa descartável para coleta de PRP.	22
Figura 6: Obtenção do aspirado de medular óssea.	23
Figura 7: Colocação do enxerto biológico no sítio da osteotomia.	23
Figura 8: C.A.N., Grupo Ilíaco, masculino, 53 anos, lesão crônica do LCA, cunha de 15mm, consolidação com 14 semanas (RX final com 14 semanas).....	24
Figura 9: F.P.C., Grupo PRP, feminino, 34 anos, lesão crônica do LCA, cunha de 12,5mm, consolidação com 8 semanas.(RX final com 8 semanas)	24
Figura 10: Estimativas de Kaplan-Meier para os grupos PRP e Ilíaco.....	27
Figura 11: Gráfico de dispersão entre o tempo até a consolidação versus a idade do paciente, segundo grupos de estudo e ocorrência de censura.	29

Resumo

D'Elia CO. Comparação entre o uso de 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, Universidade de São Paulo; 2009.

Introdução: A busca por um substituto ósseo que faça prescindível a obtenção de enxerto autólogo é uma necessidade do cirurgião ortopédico. O aspirado de medular óssea possui células tronco do sistema mesenquimal capazes de se diferenciarem em osteoblastos, sendo assim considerado um material osteogênico. O plasma rico em plaquetas possui os chamados fatores plaquetários de crescimento, que possuem a capacidade de promover e estimular a diferenciação de células tronco do sistema mesenquimal em osteoblastos, acelerando o processo de consolidação óssea.

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de consolidação e o tempo para tal nas osteotomias de cunha de abertura na tíbia, comparando o enxerto autólogo de íliaco, ao plasma rico em plaquetas associado a medular óssea. **Métodos:** Foram estudados 25 pacientes submetidos a osteotomia tibial de cunha de abertura medial. Os pacientes foram divididos em dois grupos, de forma randomizada. O grupo controle formado por 14 pacientes submetidos à osteotomia com a utilização de enxerto autólogo do íliaco, e o grupo de estudo formado por 11 pacientes submetidos à osteotomia com utilização de um composto de plasma rico em plaquetas e medular óssea. **Resultados:** Quanto à ocorrência de consolidação da osteotomia, as

porcentagens de consolidação foram de 100% no grupo Ilíaco e 91% no grupo PRP ($p=0,440$). Em relação ao tempo para consolidação não se observou diferença entre os grupos ($p=0,129$). **Conclusão:** Nas osteotomias proximais por cunha de adição medial a utilização do plasma rico em plaquetas associado ao aspirado de medular óssea foi efetiva no que se refere à ocorrência de consolidação e no tempo necessário para a ocorrência de tal evento, quando estudamos e comparamos este enxerto ao enxerto autólogo do ilíaco.

Descritores: 1.Substitutos ósseos 2.Peptídeos e proteínas de sinalização intercelular 3.Plasma rico em plaquetas 4.Osteotomia 5.Tibia.

Summary

D'Elia CO. Comparison between platelet rich plasma associated with bone marrow aspirate to autologous iliac graft regarding bone healing in proximal tibial osteotomies: A prospective randomized study [Dissertation]. São Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo, SP (Brazil); 2009.

Introduction: The search for a bone substitute that makes unnecessary the harvest of autologous bone graft is a necessity of the orthopaedic surgeon. Bone marrow aspirate is rich in mesenchymal stem cells. The bone marrow aspirate contain mesenchymal stem cells that can differentiate in osteoblasts, being considered an osteogenic material. Platelet rich plasma contain several growth factors that have the capacity to promote and stimulate the differentiation of mesenchymal stem cells in osteoblasts improving the bone healing process, in other words platelet rich plasma has osteoinductive property. **Objective:** The aim of this study was to compare the occurrence of consolidation and the time taken to achieve this in cases of opening wedge osteotomy of the tibia, between autologous iliac grafts and platelet rich plasma with bone marrow aspirate. **Methods:** Twenty-five patients who underwent opening wedge osteotomy were studied. They were randomly divided into two groups: a control group of 14 patients which received autologous iliac grafts and a study group of 11 patients which received a compound of platelet rich plasma and bone marrow aspirate. **Results:** The consolidation rates achieved were 100% in the iliac group and 91% in the platelet-rich plasma group ($p = 0.440$). There was no difference in the time taken to achieve consolidation between the groups ($p = 0.129$). **Conclusion:** The use

of platelet rich plasma with bone marrow aspirate as a bone substitute was shown to be effective in achieving consolidation in tibial osteotomies and in the time necessary to achieve this when compared to autologous iliac graft.

Descriptos: 1. Bone substitutes 2. Interceular signaling proteins 3. Platelet rich plasma 4. Osteotomy 5.Tibia.

1. Introdução:

Atualmente existem diversos estudos sendo realizados com o intuito de desenvolver técnicas e materiais que permitam a substituição óssea, prescindindo assim a necessidade de obtenção do enxerto autólogo. A necessidade de um eficiente substituto ósseo é uma realidade para o cirurgião ortopédico(1-11).

A enxertia óssea é um procedimento estudado e realizado há muito tempo dentro da Ortopedia e Traumatologia(12-15). Como qualquer procedimento cirúrgico não é livre de complicações. Entre os enxertos, o autólogo é o mais frequentemente utilizado(16, 17).

As pesquisas envolvendo fatores de crescimento, como os fatores de crescimento derivados da plaqueta, têm demonstrado sua capacidade em acelerar o processo de reparação tecidual em diversos níveis. O estudo de sua aplicação na reparação do tecido ósseo é o principal foco de interesse(6, 18-27).

A medular óssea é rica em células tronco do sistema mesenquimal capazes de se diferenciarem em osteoblastos. A sua utilização isolada ou associada a outros substitutos ósseos também tem sido objeto de pesquisas(7, 28-31).

A osteotomia da tibia é um procedimento frequentemente utilizado no tratamento de diversas patologias ortopédicas. A osteotomia valgizante da tibia proximal com abertura de cunha medial (OTCAM) é uma das técnicas mais utilizadas nos dias de hoje. A indicação para a realização deste procedimento, a técnica usada para sua execução, o instrumental utilizado durante a cirurgia, assim como o material de síntese para sua fixação são muito bem padronizados.

Quando na OTCAM a correção necessária faz obrigatória a abertura de cunhas maiores que 7,5mm, frequentemente têm-se interposto algum tipo de enxerto e/ou substituto ósseo no local da osteotomia, com a intenção de minimizar a ocorrência de

não união e acelerar o processo de consolidação óssea(32). O enxerto mais utilizado com esta finalidade é o enxerto autólogo obtido do osso ilíaco. A morbidade associada à obtenção de enxerto autólogo do osso ilíaco é considerada pelos cirurgiões uma grande desvantagem da OTCAM (33).

No presente estudo procuramos avaliar a associação do plasma rico em plaquetas ao aspirado de medular óssea como forma de substituto ósseo. A combinação do plasma rico em plaquetas ao aspirado de medular óssea como forma de substituto ósseo ainda não foi estudada em humanos. Escolhemos como procedimento cirúrgico para avaliar seu resultado a OTCAM, por ser um procedimento de execução padronizada e reprodutível.

2. Objetivos:

O objetivo do presente estudo foi avaliar a ocorrência de consolidação e o tempo para tal evento nas osteotomias proximais por cunha de adição medial (OTCAM) comparando os seguintes enxertos:

1. Enxerto autólogo de íliaco.
2. Plasma rico em plaquetas associado ao aspirado de medular óssea.

3. Revisão da literatura:

3.1. Substituto ósseo:

A definição de substituto ósseo e/ou enxerto ósseo é muito debatida(34). Considera-se substituto ósseo qualquer material implantado, isolado ou em combinação, que promova uma resposta no sentido da consolidação óssea, seja por oferecer propriedade osteocondutora, osteogênica ou osteoindutora, ao local onde é implantado(35, 36).

Tentativas do transplante de tecidos para humanos são realizadas desde os tempos de Hipócrates. Evidências sugerem que hindus e egípcios também fizeram experimentos envolvendo transplantes. Entretanto, o primeiro relato documentado sobre um xenoenxerto é atribuído a Job van Mee`kren (1632) apud Meeder (37), que em torno de 1600 realizou a tentativa de corrigir um defeito da calota craniana de um soldado com um pedaço de crânio de um cão.

A ciência da utilização de enxerto e/ou substitutos ósseos evoluiu muito nas últimas décadas, principalmente com a compreensão dos fundamentos do processo de cicatrização do tecido ósseo, incorporando princípios da biologia molecular e celular. Os enxertos ósseos são utilizados em muitos procedimentos ortopédicos nos dias de hoje. Os substitutos ósseos possuem função mecânica e/ou biológica, em maior ou menor grau dependendo de sua finalidade clínica(38).

Um material dito osteogênico pode ser definido como aquele que possui células vivas capazes de se diferenciarem e iniciarem o processo de formação do tecido ósseo. Um material osteocondutor fornece a estrutura tridimensional necessária para a invasão vascular, aposição de células mesenquimais e proliferação celular, promovendo a aposição óssea em sua superfície, funcionando como uma

matriz facilitadora da formação óssea(38). Os osteoindutores possuem a capacidade de oferecer um estímulo biológico, que promove a diferenciação de células-tronco mesenquimais locais, vizinhas ou transplantadas em condroblastos e osteoblastos(34).

3.2. Enxerto ósseo autólogo:

O enxerto ósseo autólogo é o único material utilizado atualmente que possui propriedades osteocondutoras (colágeno e matriz mineral), osteogênicas (células osteoblásticas derivadas da medular e pré-osteoblastos) e osteoindutoras (fatores de crescimento), fazendo-o assim um material ideal para tal aplicação, sendo considerado nos dias de hoje o “padrão ouro” entre os materiais utilizados como enxerto(9, 16, 34, 39).

O enxerto ósseo autólogo continua sendo o padrão ao qual outros tipos de substitutos ósseos devem ser comparados. A área doadora mais frequentemente utilizada para obtenção de enxerto autólogo é a crista do íliaco, sendo utilizada em aproximadamente um terço dos casos(16, 17).

Existem algumas limitações na utilização do enxerto autólogo, que tornam o seu uso de certa forma restrito: sua fonte é esgotável, limitando o seu uso principalmente em crianças e em cirurgias de revisão. O procedimento cirúrgico para sua obtenção com frequência apresenta morbidade na área doadora e a queixa de dor e/ou alteração de sensibilidade no local podem ser verificadas em 10% a 30% dos pacientes(16, 17).

As complicações associadas à obtenção de enxerto autólogo do íliaco variam em relação ao tipo, frequência e severidade. Complicações mais graves podem causar incapacidade funcional, e necessitar de tratamento cirúrgico, medicamentoso

e/ou fisioterápico. As maiores estimativas de complicações são verificadas em pacientes submetidos a tratamento cirúrgico para dor lombar crônica. Complicações menos graves, e que não interferem com a função e se resolvem espontaneamente ou após breve período de tratamento medicamentoso são vistas em 10% a 40% dos pacientes(16, 17, 40).

A proximidade de estruturas neurológicas na obtenção de enxerto autólogo do ilíaco justifica a ocorrência de grande parte destas complicações. Os nervos cutâneo femoral lateral e o nervo cluneal superior estão particularmente em risco. Sintomas neurológicos persistentes que necessitam de tratamento mais agressivo ocorrem em até 10% dos pacientes(41).

Os custos diretos e indiretos envolvidos na realização de um procedimento cirúrgico adicional para a obtenção de enxerto autólogo são suficientemente altos, de forma a garantir um exame crítico desta prática(17).

O processo de formação do osso a partir da enxertia caracteriza-se por uma sequência de eventos onde a presença de elementos osteoindutores gera a quimiotaxia de células pluripotentes. As células pluripotentes diferenciam-se em condroblastos e osteoblastos, formando osso através de um processo de ossificação intramembranosa e/ou endocondral(42).

Os eventos biológicos que ocorrem no local da enxertia envolvem a formação de um hematoma com liberação de citocinas e fatores de crescimento, migração e proliferação de células-tronco mesenquimais com desenvolvimento de um tecido fibrovascular, invasão vascular, reabsorção óssea focal e formação de tecido ósseo(34).

3.3. Aspirado de medular óssea:

A medular óssea é um tecido complexo formado por precursores hematopoéticos e um tecido conectivo denominado estroma. O estroma possui células capazes de se diferenciarem em diversos tecidos do sistema mesenquimal como osso, cartilagem e gordura, estas células são denominadas de células-tronco mesenquimais (CTMs) (43). Caplan et al(43, 44) individualizaram uma célula-tronco do sistema mesenquimal da medular óssea capaz de se diferenciar em osteoblasto.

O aspirado de medular óssea constitui uma importante fonte para obtenção de CTMs(45). Estudos experimentais demonstraram a capacidade destas células em induzir a formação de tecido ósseo(28, 46, 47).

A obtenção de células com potencial osteogênico através da aspiração, teoricamente é possível em qualquer paciente. A fim de obter-se uma concentração ideal de células-tronco mesenquimais e com isso potencializar a aplicação clínica do aspirado de medula óssea como substituto ósseo, o volume da cada punção não deve exceder 2ml(45), visto que acima deste volume por punção ocorre uma maior contaminação por células do sangue periférico.

Alguns estudos clínicos utilizaram a propriedade osteogênica do aspirado de medular óssea no tratamento de pseudoartroses, com bons resultados(29, 48). A utilização do aspirado de medular óssea nestes casos demonstrou índices de consolidação de 62,5% a 90%(29, 48, 49). Burwell(30) e Salama(50) também utilizaram a medular óssea, isolada ou em associação com matrizes inorgânicas, para aplicação clínica.

3.4. Fatores de crescimento:

Em 1938, Levander demonstrou que a injeção intramuscular em coelhos de um extrato contendo osso e calo ósseo era capaz de induzir a formação óssea heterotópica, e concluiu que a regeneração óssea acontece através do estímulo de CTMs não específicas por substâncias indutoras de formação óssea(15). Urist et al(51), em trabalho pioneiro sobre osteoindução, obtiveram a formação óssea ectópica de osso endocondral, utilizando a matriz óssea desmineralizada e acelular, implantada em animais. Este estudo desencadeou diversas pesquisas na área de osteoindução.

Graças ao desenvolvimento de modernas técnicas laboratoriais, nos últimos anos foram identificadas diversas substâncias com propriedade osteoindutora, entre elas: proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), fatores de crescimento tipo insulina I e II (IGF-I e IGF-II), fator de crescimento transformador tipo beta (TGF- β) e fator de crescimento derivado da plaqueta (PDGF)(52), entre outras. A literatura mostra que esses fatores agem na proliferação e na diferenciação da célula-tronco mesenquimal em célula progenitora óssea(53).

As pesquisas para o desenvolvimento e aplicação de substâncias e materiais com propriedades osteoindutoras têm avançado muito nos últimos anos(26, 52, 54-57).

Fatores de crescimento são polipeptídios, geralmente sintetizados por tecidos específicos, e que atuam como reguladores locais da função celular. A maioria dos fatores de crescimento são liberados como precursores de alto peso molecular, estes precursores são ativados após sua proteólise com a consequente formação de fatores que em geral possuem baixo peso molecular. Estes fatores de crescimento ligam-se a

receptores de membrana na célula alvo, ativando um processo intracelular que produzirá proteínas a serem utilizadas dentro da célula ou exportadas(58).

Dentre os materiais com propriedade osteoindutora o plasma rico em plaquetas (PRP) é um dos mais utilizados e pesquisados atualmente. Diversas pesquisas que avaliam o envolvimento de fatores bioquímicos na aceleração da regeneração óssea, apontam para a importância de vários compostos que são naturalmente encontrados no interior das plaquetas, dentre os mais importantes: fator de crescimento derivado da plaqueta (PDGF)(59), fator de crescimento transformador tipo beta (TGF- β) e fator endotelial de crescimento vascular (VEGF)(53).

O PDGF é um dímero composto por dois polipeptídios A e B, que tem ação sobre a maioria das células mesodérmicas e é sintetizado pelas plaquetas, monócitos, macrófagos e células endoteliais. Ele é capaz de aumentar a síntese de DNA, replicação celular e a produção de colágeno. O PDGF é liberado pelas plaquetas no sítio de lesões durante a agregação plaquetária, sendo importante para o processo cicatricial das fraturas(60).

O fator de crescimento transformador tipo beta (TGF- β) é membro da superfamília dos TGF- β s. O TGF- β também estimula células de origem mesenquimal e está estando envolvido no processo de reparação tecidual(61, 62).

A concentração normal de plaquetas no sangue periférico é em média de 150,000/ μ l a 350,000/ μ l. Para que o PRP tenha eficácia como osteoindutor, a concentração de plaquetas deve ser em torno de 1,000,000/ μ l(22, 27, 63).

O PRP é obtido a partir do sangue autólogo, portanto não existe o risco de transmissão de doenças infecciosas como HIV e hepatite. O PRP libera no local de sua aplicação diversos fatores de crescimento encontrados naturalmente em nosso organismo, o que o diferencia dos fatores de crescimento recombinantes como as

proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs). O PRP é a combinação destes fatores de crescimento, associados a células formadoras de coágulo. Este coágulo serve como carreador destes fatores de crescimento(63).

Marx et al demonstraram resultados promissores em relação à formação óssea, tratando defeitos ósseos mandibulares quando combinaram o plasma rico em plaquetas ao enxerto autólogo. A maturação radiográfica foi de 1,62 a 2,16 vezes mais rápida quando utilizou-se o PRP. A análise histomorfométrica demonstrou também uma maior densidade trabecular em comparação ao grupo controle sem PRP(5, 19, 64).

Em uma série de 32 casos, o PRP foi utilizado com sucesso no tratamento de retardos de união e pseudoartroses, sendo utilizado através da administração percutânea(65).

A utilização das plaquetas coletadas do próprio paciente, imediatamente antes do procedimento cirúrgico, em concentração adequada, é capaz de acelerar a regeneração óssea. O plasma rico em plaquetas através de sua ação osteoindutora possui capacidade de acelerar o processo de consolidação óssea(64, 66).

3.5. Osteotomia valgizante da tibia:

A articulação do joelho possui um alinhamento normal de 5 a 7 graus de valgo quando medido a partir dos eixo anatômicos do fêmur e tibia, e de zero a 1,2 graus de varo quando medido a partir dos eixos mecânicos do fêmur e tibia(67).

Lesões ligamentares crônicas, osteoartrose do joelho, e algumas deformidades que afetam a articulação (pós-traumáticas), podem causar alterações no alinhamento do membro inferior, afetando muitas vezes a articulação do joelho(68). Não é rara a alteração do eixo, do valgo ou neutro para o varo (geno varo).

O alinhamento em varo gera uma alteração da distribuição normal de carga na articulação do joelho, sobrecarregando o compartimento medial e afrouxando as estruturas ligamentares laterais, o que pode causar dor, deformidade e impotência funcional(68-73).

A osteotomia valgizante da tíbia proximal é um procedimento cirúrgico padronizado e reproduzível, e tem se mostrado efetivo em pacientes bem selecionados com genu varo associado a osteoartrose unicompartimental, deficiências ligamentares crônicas e deformidades dos membros inferiores(69, 71, 74).

Os primeiros relatos de osteotomias podem ser encontrados na literatura alemã, remontando ao início do século 19. Mais tarde na moderna literatura inglesa, Jackson(70), descreveu técnicas de osteotomias valgizantes com cunha de fechamento lateral. Somente em 1965, este método foi popularizado por Coventry(73). Ele alterou o procedimento, realizando uma osteotomia proximal à tuberosidade anterior da tíbia. Isto possui diversas vantagens, pois a osteotomia passou a ser realizada mais próxima à articulação e à deformidade, e o osso esponjoso presente nesta região possui melhor potencial de consolidação.

A técnica de osteotomia em cunha de abertura medial surgiu anos após. Hernigou(75), apresentou seus resultados com a 10 a 13 anos de seguimento de 93 pacientes tratados com esta técnica no tratamento da OA medial. Puddu(76-78) e Fowler(79, 80) descreveram modificações e popularizaram a técnica de osteotomia em cunha de abertura medial.

Tradicionalmente, a osteotomia da tíbia com inclusão de cunha medial tem sido realizada com a interposição de enxerto autólogo do íliaco no local da osteotomia, quando se utilizam cunhas maiores que 7,5mm(32, 71, 72, 78).

A união óssea na osteotomia com inclusão de cunha medial, provavelmente ocorre por um mecanismo similar à consolidação óssea de fraturas que apresentam movimento ou um intervalo no foco de fratura, ou seja, uma consolidação dita secundária. Este processo compreende a progressão das CTMs para condroblastos, condrocitos, fibroblastos e osteoblastos, que promovem a formação e aparecimento do calo ósseo(81).

3.6. Fatores de crescimento e aspirado de medular óssea

Kawasumi et al em estudo experimental concluíram que a maior concentração de plaquetas presente no PRP estimula a proliferação das células presentes na medular óssea, indicando que a maior concentração de plaquetas tem um efeito favorável na osteogênese em um modelo experimental de alongamento ósseo(82).

Lucarelli et al em outro estudo demonstraram que a associação do PRP às CTMs é capaz de melhorar a integração de um aloenxerto, melhorando a vascularização, regeneração óssea e resistência mecânica deste aloenxerto(66).

A combinação do plasma rico em plaquetas com enxerto ósseo e/ou células osteoprogenitoras com o objetivo de aumentar a taxa de consolidação têm sido objeto de diversos estudos(2, 5-7, 19, 57, 66, 82-85). Estes estudos experimentais demonstram que a adição de células derivadas da medular óssea a materiais com propriedade osteoindutora melhoram significativamente os resultados.

Dallari et al. em um estudo experimental, verificaram que a associação do PRP a células derivadas da medular óssea potencializam a taxa de reparo tecidual em um defeito ósseo criado no côndilo femoral(86).

Apesar do teórico potencial osteogênico das células da medula óssea e do potencial osteoindutor dos fatores de crescimento derivados das plaqueta, existem

poucos trabalhos clínicos que utilizaram esses dois componentes, associados ou não como forma de promover a consolidação(2, 6, 10, 21, 29, 57, 59, 66, 87, 88).

Dallari et al em recente estudo, demonstraram a capacidade do plasma rico em plaquetas associado a células da medular óssea, em promover a osteointegração na osteotomia da tíbia com inclusão de cunha medial, porém neste estudo a comparação não foi feita em relação ao enxerto autólogo, considerado ainda hoje como o “padrão ouro” dos enxertos(10).

4. Métodos:

4.1. Comitê de Ética

Antes de iniciar qualquer procedimento, o presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo (anexo 1). Todos pacientes assinaram o termo de informação e consentimento (anexo 2).

4.2. Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão dos pacientes no estudo foram:

- Pacientes com deformidade em varo do joelho avaliada a partir de uma radiografia panorâmica com carga dos membros inferiores.
- Pacientes entre 25 e 60 anos de idade.
- Ambos os gêneros.
- Ausência de doenças inflamatórias sistêmicas (artrite reumatóide, lúpus, etc).
- Índice de massa corpórea (IMC) menor que 30kg/m^2 (89).
- Ausência de contratura em flexão do joelho.
- Flexão do joelho maior que 90 graus.
- Necessidade de correção com a utilização de cunhas entre 10 mm e 15 mm.

Foram respeitadas as indicações para osteotomia valgizante recomendadas na literatura(69, 71, 72, 74).

4.3. Critérios de exclusão:

- Perda de seguimento.
- Solicitação do paciente para ser excluído do estudo.
- Infecção profunda.
- Síndrome compartimental.

4.4. Casuística:

Foram estudados 25 pacientes do Grupo de Joelho, do Instituto de Ortopedia e Traumatologia, do Hospital das Clínicas, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, submetidos a osteotomia de adição medial da tíbia proximal, no período de agosto de 2005 a julho de 2007.

Todos os procedimentos cirúrgicos neste estudo tiveram a participação do autor deste trabalho. Os 25 pacientes foram distribuídos em dois grupos, de forma randomizada, através de sorteio aleatório com reposição realizado no dia do agendamento do procedimento cirúrgico. O sorteio foi realizado por um co-autor do trabalho que não estaria presente no dia da realização da cirurgia.

Os pacientes foram então separados em dois grupos: o grupo ilíaco (GI) formado por 14 pacientes submetidos à osteotomia com a utilização de enxerto autólogo do ilíaco no sítio da osteotomia e o grupo PRP (GPRP) formado por 11 pacientes submetidos à osteotomia com utilização de um substituto ósseo composto por plasma rico em plaquetas (PRP) e aspirado de medular óssea. Denominamos este substituto ósseo de enxerto ósseo biológico.

Em relação ao diagnóstico, os dois grupos apresentaram como diagnóstico varo do joelho. O diagnóstico associado mais frequente foi a lesão crônica do ligamento cruzado anterior (LCA). Avaliamos os diagnósticos agrupados em três categorias:

lesões ligamentares crônicas, osteoartrose do compartimento medial e deformidade do membro inferior (Tabela 1). A análise não indicou associação entre estas categorias e os grupos de estudo ($p=0,168$).

Tabela 1 - Distribuição dos pacientes dos grupos ilíaco e PRP segundo diagnóstico

		GRUPOS		
		Ilíaco*	PRP*	TOTAL
DIAGNÓSTICO	Lesão crônica do LCA ¹	6	9	15
		42,9%	81,2%	60,0%
	OA medial ²	5	1	6
		35,7%	9,1%	24,0%
	Deformidades ³	3	1	4
		21,4%	9,1%	16,0%
TOTAL		14	11	25
		100%	100%	100%

Valor de p referente ao teste Exato de Fisher ($*p=0,168$).

¹Duplo varo ou triplo varo.

²Inclui também osteonecrose.

³Geno varo ou sequela de fratura.

A distribuição dos pacientes quanto ao gênero foi homogênea entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição dos pacientes dos grupos ilíaco e PRP segundo gênero

		GRUPOS		
		Ilíaco*	PRP*	TOTAL
Gênero	Feminino	2	2	4
		14,3%	18,2%	16,0%
	Masculino	12	9	21
		85,7%	81,8%	84,0%
TOTAL		14	11	25
		100%	100%	100%

Valor de p referente ao teste Exato de Fisher ($*p=0,183$).

Em relação à presença ou ausência de tabagismo, ambos os grupos foram homogêneos em relação a esta variável (Tabela 3).

Tabela 3 - Distribuição dos pacientes dos grupos ilíaco e PRP segundo tabagismo

		GRUPOS		
		Ilíaco*	PRP*	TOTAL
TABAGISMO	Não	14	9	23
		100%	81,8%	92,0%
	Sim	0	2	2
		-	18,2%	8,0%
TOTAL		14	11	25
		100%	100%	100%

Valor de p referente ao teste Exato de Fisher(*p>0,99).

A análise dos tamanhos das cunhas utilizadas em cada grupo não foi diferente entre os mesmos, conforme demonstram as Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - Distribuição dos pacientes dos grupos ilíaco e PRP segundo tamanho da cunha utilizada

		GRUPOS		
		Ilíaco*	PRP*	TOTAL
TAMANHO DA CUNHA	10,0 mm	5	3	8
		35,7%	27,3%	32,0%
	12,5 mm	5	5	10
		35,7%	45,5%	40,0%
	15,0 mm	4	3	7
		28,6%	27,3%	28,0%
TOTAL		14	11	25
		100%	100%	100%

Valor de p referente ao teste Exato de Fisher (*p=0,885).

Tabela 5 - Distribuição dos pacientes dos grupos ilíaco e PRP segundo tamanho da cunha utilizada

		GRUPOS		
		Ilíaco*	PRP*	TOTAL
		(n=14)	(n=11)	
TAMANHO DA CUNHA (mm)	Média	12,3	12,5	12,4
	D.P.	2,1	1,9	2,0
	Mediana	12,5	12,5	12,5
	Mínimo	10,0	10,0	10,0
	Máximo	15,0	15,0	15,0

Valor de p referente ao teste t de Student (p=0,828).

A Tabela 6 mostra as medidas descritivas para a idade dos pacientes, segundo os grupos de estudo. Os resultados dos testes de comparação entre as médias dos grupos também são apresentados.

Tabela 6 - Medidas descritivas para idade dos pacientes, segundo grupos de estudo

		GRUPOS		
		Íliaco* (n=14)	PRP* (n=11)	TOTAL
IDADE DOS PACIENTES (ANOS)	Média	45,9	37,8	42,4
	D.P.	8,1	6,9	8,5
	Mediana	48,0	37,0	43,0
	Mínimo	30,0	28,0	28,0
	Máximo	57,0	49,0	57,0

Valor de p referente ao teste t de Student (*p=0,014).

A idade média dos pacientes do grupo íliaco (46 anos) apresentou-se significativamente maior do que a dos pacientes do grupo PRP (38 anos), com p=0,014.

4.5. Procedimento Cirúrgico:

A técnica empregada para a realização da osteotomia foi, como já referida anteriormente, a adição de cunha medial, à semelhança do planejamento e técnica cirúrgica descrita por Puddu(72, 90). A via de acesso utilizada iniciava-se com uma incisão longitudinal com extensão de 6 a 8 cm distal à linha articular, centrada entre a borda medial da tuberosidade anterior da tibia e a região mais anterior do ligamento colateral medial. Os tendões da “pata de ganso” eram então elevados do osso subperiostealmente. Após a obtenção de exposição adequada, inseria-se um pino de “Steinmann” (fio guia) de medial para lateral, de maneira oblíqua, iniciando-se 4 cm distal à linha articular e progredindo-o para lateral até um ponto 1 cm abaixo da linha articular.

Após o posicionamento do fio guia realizava-se a osteotomia, com o auxílio de uma serra oscilante para romper a cortical medial. O restante da osteotomia era realizada com a utilização de osteótomos, mantendo-os abaixo e paralelos ao fio guia. O osteótomo era avançado até 0,5 cm da cortical lateral, nunca rompendo-a. A osteotomia era realizada com o auxílio de radioscopia (Figura 1).

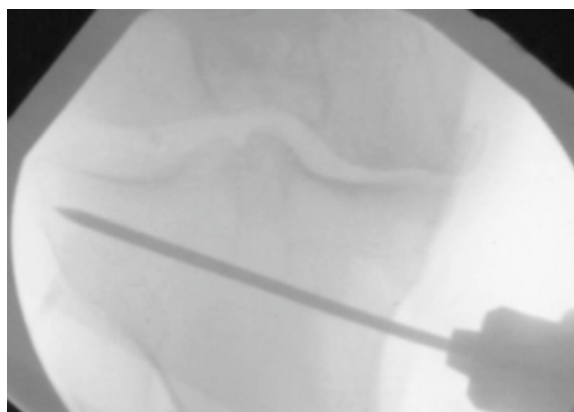


Figura 1. Fio guia para orientação da osteotomia

Efetivada a realização da osteotomia, utilizava-se um instrumento para abertura da cunha até o tamanho necessário de acordo com a correção planejada (Figura 2). A fixação da osteotomia era obtida com a utilização de uma placa em titânio com desenho especial, constituída em seu centro por um “dente” utilizado como espaçador no local da osteotomia, contando ainda com dois orifícios acima e dois abaixo para a fixação com parafusos (Figura 3). Após o posicionamento da placa com cunha no local da osteotomia, a mesma era fixada ao osso com dois parafusos esponjosos (6,5 mm) proximalmente e dois parafusos corticais (4,5 mm) distalmente(78).

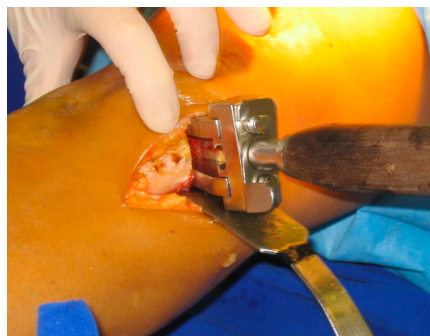


Figura 2. Instrumental para abertura da cunha

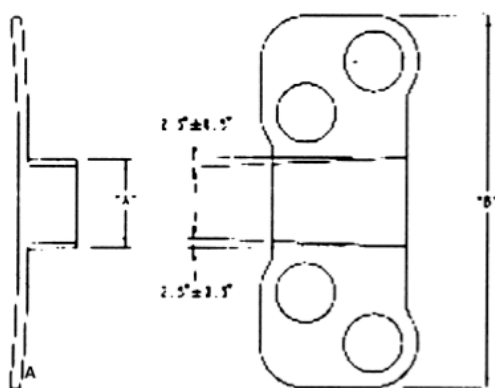


Figura 3. Desenho ilustrativo da placa utilizada

Após a realização da osteotomia e fixação da placa, o espaço criado na região metafisária da tibia era preenchido por um dos enxertos avaliados (ilíaco ou biológico).

4.6. Obtenção do enxerto autólogo do ilíaco:

O defeito criado pela osteotomia era preenchido com enxerto autólogo do ilíaco obtido em quantidade suficiente para preencher o defeito criado pela osteotomia. A área doadora foi a crista ilíaca, e a técnica cirúrgica foi padronizada(91).

Com o paciente na posição supina, utilizamos o terço anterior do osso ilíaco como fonte doadora. Realizamos um incisão de 4 cm paralela à crista ilíaca e

centrada no tubérculo do íliaco. Após a dissecação superficial, com o auxílio do eletrocautério desinseríamos a musculatura da parede externa do ílio, e com a utilização de um levantador de Cobb o restante da musculatura era elevada subperiostealmente.

Com a exposição adequada do osso, utilizando osteótomo procedíamos a retirada de um enxerto cortico-esponjoso tricortical de formato triangular, e base equivalente à medida da cunha de abertura realizada na tibia. Adicionalmente removíamos enxerto esponjoso do íliaco.

4.7. Obtenção do enxerto biológico:

Para coleta das plaquetas utilizamos o separador celular automático Haemonetics MCS+ 9000 e o kit específico para plaquetaférese 995-E (Haemonetics Corp.). Nesse sistema, por meio de uma punção venosa na fossa antecubital, o sangue do próprio paciente era drenado para um dispositivo de separação sob centrifugação contínua (Figura 4). Após o fracionamento do sangue, um analisador de refração ótica individualizava a camada plaquetária e determinava a sua coleta em bolsa descartável específica (Figura 5). O sangue remanescente era totalmente reinfundido no paciente, determinando o fim de um ciclo. Citrato de Sódio foi usado como anticoagulante na proporção de um para cada 9 ml de sangue total processado. Habitualmente, realizávamos dois ciclos, coletando aproximadamente 70 ml de concentrado de plaquetas. Avaliamos em todos os pacientes os índices hematimétricos, antes e após o procedimento, assim como do concentrado de plaquetas(22, 88, 92).

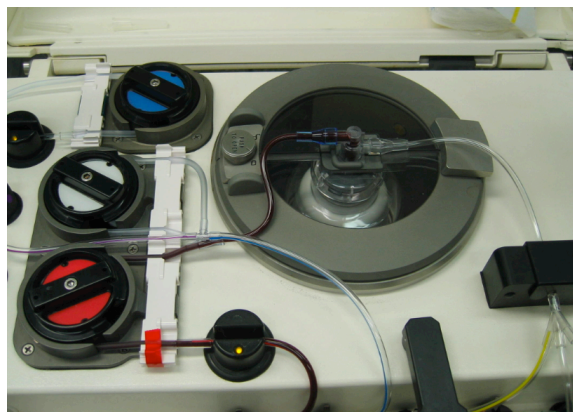


Figura 4. Separador celular automático Haemonetics MCS+ 9000



Figura 5. Bolsa descartável para coleta de PRP

Para a obtenção dos fatores de crescimento plaquetário, ainda no centro cirúrgico, o manuseio do concentrado de plaquetas era feito em campo cirúrgico estéril com princípios de biossegurança. No preparo do PRP acrescentamos 400 μ l de cloreto de cálcio para cada 10 ml de concentrado de plaquetas. Aceleramos o processo de formação do coágulo usando o soro remanescente de um coágulo anterior. Após a utilização cirúrgica, enviávamos uma amostra do concentrado de plaquetas para pesquisa de bactérias, aeróbias e anaeróbias, e agentes fúngicos (Bact-Alert).

O aspirado de medular óssea foi obtido da crista ilíaca por punção percutânea, por meio de técnica padronizada (Figura 6). Utilizando-se de um dispositivo agulhado com mandril número 14 (agulha tipo “Thomas”), esta agulha era inserida manualmente na crista ilíaca. Realizavam-se seis punções para obter cerca de 12 ml de medula óssea, de forma a não exceder o volume de 2 ml por punção, sendo que após cada punção a agulha era reposicionada(45). Este material era anticoagulado com citrato de sódio numa proporção citrato: medular-óssea de 1:5.



Figura 6. Obtenção do aspirado de medular óssea

O enxerto ósseo biológico era formado pela adição de aspirado de medular óssea do osso ilíaco ao PRP. Uma vez formado o gel, o cirurgião procedia à colocação do material no sítio cirúrgico (Figura 7).

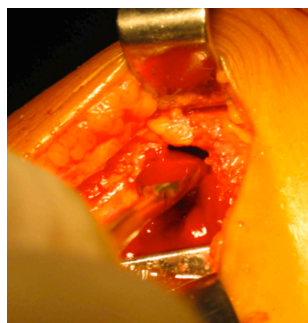


Figura 7. Colocação do enxerto biológico no sítio da osteotomia

4.8. Avaliação Radiográfica(10, 93):

Os pacientes foram avaliados a cada duas semanas para verificação de sinais de consolidação no local da osteotomia por um avaliador cego em relação a qual grupo pertencia o paciente.

O exame de imagem utilizado foi a radiografia simples em incidências frente (AP) e perfil (P), com técnica padronizada (65kV, 20mA, distância âmpola-filme de 100cm e dose efetiva equivalente de $<0,01\text{mSv} \pm 2\%$). Considerou-se como tempo total para consolidação aquele verificado através deste exame.

Os critérios para consolidação foram: na incidência AP o aumento da densidade no local da enxertia e a presença de pontes ósseas demonstrando o preenchimento ósseo de pelo menos 60 % da osteotomia no sentido latero-medial e na incidência de perfil a consolidação da cortical anterior ou posterior (Figuras 8 e 9).

Figura 8. C.A.N., Grupo Ilíaco, masculino, 53 anos, lesão crônica do LCA, cunha de 15mm, consolidação com 14 semanas (RX final com 14 semanas)

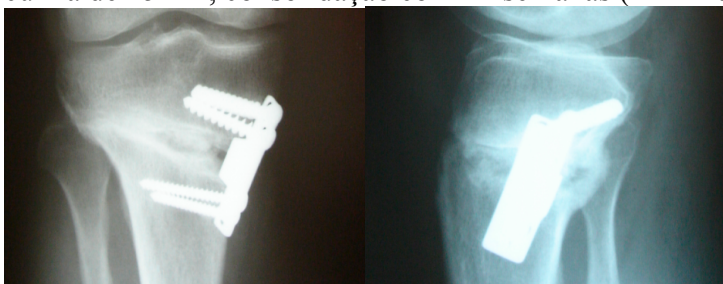
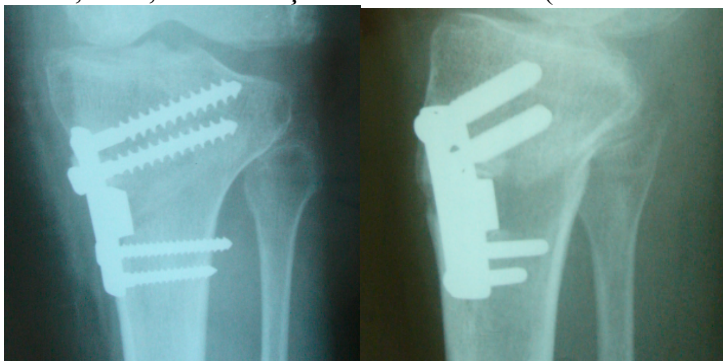


Figura 9. F.P.C., Grupo PRP, feminino, 34 anos, lesão crônica do LCA, cunha de 12,5mm, consolidação com 8 semanas.(RX final com 8 semanas)



Caso após um período de 6 meses do procedimento, não ocorresse a consolidação da osteotomia, a mesma era considerada em não união(33).

4.9. Análise estatística:

Neste trabalho foram estudados os tempos até a consolidação e a ocorrência do evento consolidação das osteotomias proximais por cunha de adição medial, comparando os seguintes enxertos: enxerto autólogo de íliaco (GI) e enxerto biológico (GPRP).

O tempo até a consolidação foi definido como sendo o intervalo, em semanas, entre a data da cirurgia e a data até a consolidação. A avaliação dos tempos até a consolidação (tempos de sobrevivência) foi feita por meio da construção de Curvas de Kaplan-Meier. Estas curvas foram comparadas por meio do teste Log-rank e do teste de Breslow.

A comparação da ocorrência do evento consolidação (sim ou não) entre os grupos foi realizada utilizando-se o teste Exato de Fisher. Os grupos foram comparados em dois momentos, com 12 e 24 semanas após a realização do procedimento cirúrgico.

O teste Exato de Fisher foi utilizado para avaliar a associação entre os grupos e cada uma das seguintes variáveis categóricas: gênero, presença de tabagismo, tamanho da cunha (com três categorias) e diagnóstico (com três categorias).

Os grupos também foram comparados em relação à idade dos pacientes e ao tamanho da cunha utilizado. A comparação entre as médias destas quantidades em cada grupo foi feita por meio do teste t de Student.

A influência da idade dos pacientes na consolidação da osteotomia foi realizada com a construção de um gráfico de dispersão.

5. Resultados:

As Tabelas 7 e 8 apresentam a distribuição dos pacientes dos grupos GI e GPRP segundo consolidação após 12 e 24 semanas da cirurgia.

Pode-se observar que as porcentagens de consolidação após 12 e 24 semanas da cirurgia não são significativamente diferentes, com $p=0,238$ com 12 semanas e $p=0,440$ com 24 semanas.

Tabela 7 - Distribuição dos pacientes dos grupos Ilíaco e PRP segundo consolidação após 12 semanas.

		GRUPOS		
		Ilíaco*	PRP*	TOTAL
Consolidação após 12 semanas	Sim	9 64,3%	4 36,4%	13 52%
	Não	5 35,7%	7 36,4%	12 48%
TOTAL		14 100%	11 100%	

Valor de p referente ao teste Exato de Fisher (* $p=0,238$).

Tabela 8 - Distribuição dos pacientes dos grupos Ilíaco e PRP segundo consolidação após 24 semanas.

		GRUPOS		
		Ilíaco*	PRP*	TOTAL
Consolidação após 24 semanas	Sim	14 100%	10 90,9%	24 96,0%
	Não	0 -	1 9,1%	1 4,0%
TOTAL		14 100%	11 100%	25 100%

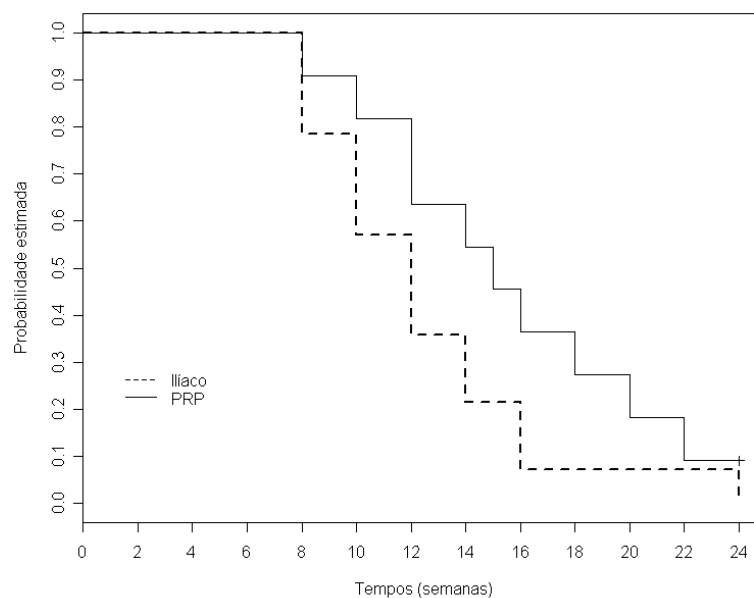
Valor de p referente ao teste Exato de Fisher (* $p=0,440$).

A Figura 10 ilustra as curvas de Kaplan-Meier obtidas para cada grupo. Estas curvas informam a probabilidade estimada de sobrevivência para um determinado tempo. Os valores estimados e respectivos intervalos de confiança de 95% são mostrados na Tabela 9. Nota-se que, a partir da oitava semana, o tempo até a consolidação é superior para pacientes do grupo PRP. Além disso, para este grupo,

cerca de 36% dos pacientes ainda não haviam apresentado consolidação após 16 semanas da cirurgia, enquanto que, para o grupo Ilíaco, esta porcentagem cai para 7%. Observa-se ainda que, após 24 semanas, a probabilidade de consolidação estimada é igual a 100% para o grupo ilíaco e 90,9% para o grupo PRP.

O tempo mediano, isto é, tempo para o qual cerca de 50% dos pacientes apresentam consolidação, pode ser obtido diretamente da Figura 10. A estimativa deste valor é de 15 semanas para o grupo PRP e de 12 semanas para o grupo Ilíaco. O tempo mediano também pode ser obtido por interpolação linear a partir dos resultados apresentados na Tabela 9. Desta forma, o tempo mediano de consolidação é de 14,5 semanas para o grupo PRP, enquanto que, para os pacientes do grupo Ilíaco, este tempo é menor (10,7 semanas), conforme mostra a Tabela 10.

Figura 10. Estimativas de Kaplan-Meier para os grupos PRP e Ilíaco



Nota: Probabilidade(t) representa a função de sobrevivência estimada e mostra a probabilidade de um paciente não ter consolidado até um certo tempo t. O tempo representado pelo símbolo + indica a ocorrência de censura

Tabela 9 - Estimativas de Kaplan-Meier para os grupos íliaco e PRP

GRUPOS	Tempo	Estimativa	Erro		
			padrão	I.C. 95%	
ILIACO	8	78,6%	11,0%	47,2%	92,5%
	10	57,1%	13,2%	28,4%	78,0%
	12	35,7%	12,8%	13,0%	59,4%
	14	21,4%	11,0%	5,2%	44,8%
	16	7,1%	6,9%	0,5%	27,5%
	24	0,0%	-	-	-
PRP	8	90,9%	8,7%	50,8%	98,7%
	10	81,8%	11,6%	44,7%	95,1%
	12	63,6%	14,5%	29,7%	84,5%
	14	54,5%	15,0%	22,9%	78,0%
	15	45,5%	15,0%	16,7%	70,7%
	16	36,4%	14,5%	11,2%	62,7%
	18	27,3%	13,4%	6,5%	53,9%
	20	18,2%	11,6%	2,9%	44,2%
	22	9,1%	8,7%	0,5%	33,3%

I.C. 95%: Intervalo de confiança aproximado de 95%.

Tabela 10 - Medidas descritivas para o tempo até a consolidação (em semanas)

GRUPOS	Mediana	I.C. 95%		TOTAL	Eventos Ocorridos	Censuras	
ILIACO	10,7	7,2	13,0	14	14	0	0,0%
PRP	14,5	9,6	17,8	11	10	1	9,1%

Valores medianos obtidos por interpolação linear.

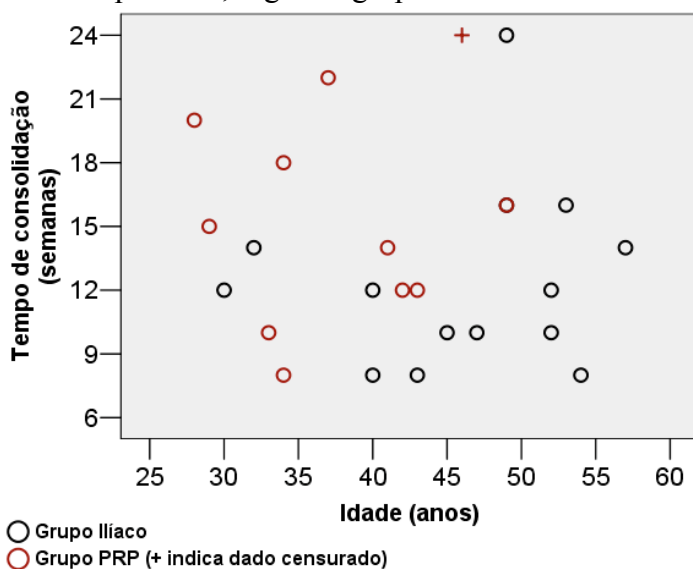
De acordo com os resultados apresentados na Tabela 11, não existem fortes evidências de diferença entre as curvas de sobrevivência dos grupos íliaco e PRP.

Tabela 11 - Resultados dos testes utilizados para comparar as curvas de sobrevivência dos grupos íliaco e PRP

Teste de igualdade das curvas	Valor de p
LOG-RANK	0,129
BRESLOW	0,100

Conforme apresentado na Tabela 6 a idade dos pacientes entre os grupos foi significativamente diferente ($p=0,014$). De uma forma geral, a Figura 11 indica baixa correlação entre a idade e o tempo de consolidação, tanto para total de casos ($N=25$) quanto para cada grupo separadamente.

Figura 11. Gráfico de dispersão entre o tempo até a consolidação versus a idade do paciente, segundo grupos de estudo e ocorrência de censura



6. Discussão:

A busca pelo desenvolvimento de técnicas e materiais que permitam a substituição óssea é uma necessidade do cirurgião ortopédico(2-4, 6-9, 94). Há uma carência de estudos clínicos com maior nível de evidência, em especial estudos prospectivos e randomizados que comparem a aplicação do substituto ósseo ao elemento hoje considerado padrão de enxertia, o osso autólogo do ilíaco(9, 16, 93). O presente estudo apresentou este desenho, quando avaliamos e comparamos o desempenho de dois tipos de enxerto (ilíaco x biológico) quanto à ocorrência da consolidação e o intervalo de tempo para tal evento.

Uma grande dificuldade ao se avaliar a eficácia de um enxerto ou substituto ósseo em promover a consolidação é o grande número de variáveis presentes nos procedimentos nos quais este enxerto ou substituto ósseo é aplicado. Grande parte dos estudos clínicos avalia o desempenho do enxerto ou substituto ósseo no tratamento de fraturas, pseudoartroses ou artrodeses de coluna (9, 11, 48, 55, 65, 95-97). Pensando nisto escolhemos a osteotomia tibial valgizante de adição de cunha medial.

A osteotomia valgizante de tibia, utilizando-se da técnica de adição de cunha medial é um procedimento frequentemente utilizado no tratamento de diversas patologias ortopédicas(71, 74, 75, 78, 80, 98), sendo sua realização bem padronizada nos dias de hoje(68, 77, 90). Trata-se de uma “fratura” planejada, em uma mesma região do osso, realizada sempre da mesma forma, sempre com semelhante grau de lesão de partes moles e mecanicamente estabilizada da mesma forma.

Alguns fatores sabidamente influenciam o processo de consolidação óssea: tabagismo, tamanho do defeito a ser preenchido e idade do paciente. A presença do

tabagismo é um fator que retarda a consolidação óssea em fraturas(99-103). Em nosso estudo a presença do tabagismo foi semelhante entre os grupos ($p>0,99$).

O tamanho do defeito a ser preenchido por osso possui uma relação inversa quanto à consolidação, ou seja, quanto maior o defeito pior o processo de consolidação(3, 104). Em nosso estudo não tivemos este possível viés ao avaliar consolidação, visto que o tamanho da cunha utilizada nos grupos (consequentemente do defeito) foi semelhante entre os grupos($p=0,828$).

Existem indícios de que quanto mais avançada a idade de um paciente mais lento e ineficaz é o seu processo de consolidação. A idade média dos pacientes do grupo ilíaco (46 anos) apresentou-se significativamente maior do que a dos pacientes do grupo PRP (38 anos), com $p=0,014$. Este resultado sugere que a idade do paciente poderia ser considerada como uma covariável na análise do tempo até a consolidação. A construção do gráfico de dispersão entre o tempo de consolidação e a idade do paciente, conforme mostrou a Figura 11 indica baixa correlação entre a idade e o tempo de consolidação, tanto para total de casos ($N=25$) quanto para cada grupo separadamente.

A presença de grupos semelhantes em relação ao tabagismo, tamanho do defeito e a baixa correlação entre a idade e o tempo de consolidação demonstram que os grupos avaliados foram homogêneos em relação a estas variáveis. Soma-se a isto a realização de um procedimento bem padronizado como a osteotomia valgizante da tibia. Acreditamos com isto termos estudado um excelente modelo para estudo e avaliação de consolidação óssea.

A osteotomia valgizante da tibia proximal foi inicialmente utilizada no tratamento do geno varo associado à osteoartrose unicompartimental(70, 71, 73-75), mais recentemente sua indicação se expandiu e passou a ser utilizada no tratamento

de deficiências ligamentares crônicas(69, 80, 105). Em nosso estudo o diagnóstico mais frequente foi o de deficiências ligamentares crônicas (60%)(98), seguido pela artrose unicompartmental (24%).

A união óssea na osteotomia com inclusão de cunha medial, provavelmente ocorre por um mecanismo similar à consolidação óssea de fraturas que apresentam movimento ou um intervalo no foco de fratura, ou seja, uma consolidação dita secundária. Apesar da ocorrência de não união ser baixa neste tipo de procedimento, (0,7% a 4,4%)(106) recomenda-se a colocação de algum tipo de enxerto no sítio da osteotomia, quando esta cunha de abertura é maior que 7,5mm, a fim de se evitar esta complicação(32, 71, 72, 78, 106, 107). Pensando nisto, em nosso estudo somente foram incluídos pacientes que necessitaram correções nas quais utilizaram-se cunhas iguais ou maiores que 10mm(10).

O enxerto mais frequentemente utilizado pelos cirurgiões neste tipo de procedimento é o enxerto autólogo do ilíaco, sendo o aloenxerto e as biocerâmicas osteocondutoras também utilizados(33).

O enxerto autólogo do ilíaco é considerado por muitos o padrão ouro em termos de enxerto e/ou substituto ósseo e a ele são comparados os diversos substitutos ósseos disponíveis(9, 16, 33, 39). A obtenção do enxerto autólogo de ilíaco apresenta morbidade ao sítio doador e complicações na sua obtenção não são infrequentes (16, 17). Portanto a busca por um substituto ósseo que possibilite a não utilização do enxerto autólogo de ilíaco é muito interessante, e foi isto que buscamos avaliar com o presente estudo.

O plasma rico em plaquetas (PRP) possui importante ação osteoindutora, como demonstrado por diversos estudos experimentais (8, 21, 27, 88, 108). O PRP tem larga aplicação clínica na área de cirurgia buco-maxilo facial, sendo utilizado como

agente osteopromotor em diversas situações(8, 19, 109). A sua utilização clínica em ortopedia vem crescendo, a despeito da ausência de estudos prospectivos e randomizados que avaliem os resultados de sua aplicação(18, 52, 88, 110).

Ao se avaliar um estudo que se propõe verificar a eficácia do PRP isolado ou em associação a outros materiais é importante lembrar que diversos são os métodos utilizados na obtenção do PRP(63, 88, 111), e que a capacidade em obter-se altas concentrações de plaquetas é variável entre os métodos disponíveis.

Para que o PRP tenha eficácia como osteoindutor, a concentração de plaquetas deve ser em torno de 1,000,000/ μ l(22, 27, 63). A maioria dos sistemas utilizados na prática clínica são baseados na centrifugação, porém as centrífugas utilizadas para este fim foram desenvolvidas para diagnóstico e não para a obtenção de PRP, o que gera frequentemente a obtenção de um PRP com níveis de plaquetas inferiores ao ideal. O método de obtenção de PRP utilizado em nosso estudo (92) é capaz de oferecer uma concentração de plaquetas superior a 1,000,000/ μ l.

Estudos experimentais e clínicos já demonstraram que o PRP associado ao enxerto autógeno possui a capacidade de acelerar a osteogênese e melhorar a formação óssea(2, 5-7, 27, 57, 82, 84), porém o efeito do PRP sobre as células mesenquimais presentes na medular óssea é mais controverso. Enquanto alguns estudos demonstram que o PRP promove a proliferação de células mesenquimais, porém inibindo sua diferenciação(112), outros demonstram que o PRP quando associado a células mesenquimais derivadas da medular óssea melhora e acelera a osteogênese(86). Corroborando com esta informação, Yamada et al demonstraram a capacidade osteogênica do PRP associado a células tronco mesenquimais em estudo com cães(2).

As células tronco mesenquimais, presentes nos aspirados de medular óssea, quando associadas a substâncias com propriedades osteoindutoras ou osteocondutoras, já demonstram ser uma alternativa ao enxerto autólogo(2, 29, 47). O aspirado de medular óssea têm excelente ação osteogênica e discreta propriedade osteocondutora e já foi utilizado no tratamento de pseudoartroses, com bons resultados(29, 48). A utilização das células tronco mesenquimais presentes nos aspirados de medular óssea, pode ser feita a partir da expansão destas células *in vitro* (43, 47, 86). Alternativamente realizando-se punções que não excedam o volume de 2ml/punção consegue-se potencializar a concentração de células tronco mesenquimais e diminuir a contaminação por células do sangue periférico (29, 45, 48).

Não é de nosso conhecimento nenhum trabalho na literatura sobre a utilização clínica do PRP associado ao aspirado de medular óssea isolados, como substituto ósseo, comparando sua eficácia ao enxerto autólogo do íliaco nas osteotomias tibiais.

Dallari et al(10), demonstraram que o PRP associado a células tronco mesenquimais derivadas do aspirado de medular óssea e enxerto ósseo alógeno, é capaz de auxiliar o processo de consolidação no local da osteotomia de cunha de adição medial. A adição do PRP e células tronco mesenquimais derivadas de aspirado de medular óssea ao aloenxerto demonstraram um melhor índice de osteointegração e revascularização local. Porém o grupo controle utilizado neste estudo foi constituído por pacientes que receberam enxerto ósseo alógeno isoladamente, não incluindo nenhum grupo no qual se utilizasse enxerto autólogo.

Apesar dos ótimos resultados clínicos obtidos com a osteotomia de cunha de adição medial(69, 72, 78), um dos grandes inconvenientes deste procedimento é o período que o paciente deve permanecer sem carga até a consolidação local(32, 77).

Qualquer substituto ósseo a ser utilizado neste tipo de procedimento deve ser comparado ao enxerto autólogo em relação à ocorrência da consolidação assim como ao tempo necessário para tal evento, justamente o que avaliamos no presente estudo.

O enxerto biológico constituído por PRP e medular óssea quando comparado ao enxerto autólogo do íliaco foi efetivo em obter a consolidação no sítio da osteotomia ($p=0,440$). Porém observamos uma tendência para que o tempo de consolidação seja mais prolongado no GPRP. Neste grupo, cerca de 36% dos pacientes ainda não haviam apresentado consolidação após 16 semanas da cirurgia, enquanto que no GI esta porcentagem era de 7%. Este fato pode ser considerado uma desvantagem, visto o maior período em que o paciente deverá permanecer com restrição de carga no membro operado.

Consideramos que o presente estudo possui algumas limitações como o número restrito de pacientes e a ausência de um grupo no qual o enxerto fosse constituído somente por PRP. Porém o número de pacientes avaliados e o desenho do estudo é compatível com outras pesquisas já publicadas na área(6, 10, 48, 59, 84, 86).

7. Conclusão:

Nas osteotomias proximais por cunha de adição medial a utilização do plasma rico em plaquetas associado ao aspirado de medular óssea foi efetiva no que se refere à ocorrência de consolidação e no tempo necessário para a ocorrência de tal evento, quando estudamos e comparamos este enxerto ao enxerto autólogo do íliaco.

8. Anexos

8.1. Anexo 1



CIÊNCIA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 30/01/2008, **TOMOU CIÊNCIA** do(s) documento(s) abaixo mencionado(s) do Protocolo de Pesquisa nº **207/06**, intitulado: **"ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O USO EXTERNO AUTÓLOGO DE ILÍACO E OS FATORES DE CRESCIMENTO PLAQUETÁRIO ASSOCIADO A CÉLULAS-TRONCO MESEQUIMAIS NAS OSTEOTOMIAS DA TÍBIA PROXIMAL"** apresentado pelo Departamento de **ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA**.

- **Mudança de pesquisador executante pelo Dr. Caio Oliveira D'Elia**
- **Relatório parcial do estudo**

Pesquisador(a) Responsável: **Prof. Dr. Arnaldo José Hernandez**

CAPPesq, 30 de Janeiro de 2008

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Eduardo Massad'.

Prof. Dr. Eduardo Massad
**Presidente da Comissão de
Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa**

8.2 Anexo 2



HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Anexo I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M F

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

PESQUISADOR: Márcia Uchoa Rezende

CARGO/FUNÇÃO: médica assistente INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 62181

UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto de Ortopedia e Traumatologia

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : dois anos.

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa ; 2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais; 3. desconfortos e riscos esperados; 4. benefícios que poderão ser obtidos; 5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.

O objetivo desta pesquisa é avaliar a eficácia de uma alternativa ao enxerto ósseo retirado do próprio paciente, esta alternativa é um concentrado de células chamadas plaquetas, que possuem proteínas chamadas de fatores de crescimento que ajudam e aceleram a consolidação óssea.

Você será submetido a um procedimento cirúrgico chamado osteotomia, que é realizado para corrigir deformidades. Para que ocorra a consolidação adequada desta osteotomia, é necessário a utilização de enxerto ósseo, tradicionalmente retirado do osso ilíaco (osso da bacia). A medicina vem desenvolvendo tecnologias que procuram substituir o enxerto ósseo retirado da bacia com o mesmo sucesso e menos complicações, como a dor crônica no local da retirada do enxerto, lesão de nervos da pele, infecção e cosmese inadequada, que são complicações em potencial da retirada do enxerto.

Uma destas tecnologias, a qual estamos estudando é a utilização do concentrado de plaquetas associado a um aspirado do ilíaco, que é retirado através de uma punção com uma agulha durante a cirurgia de osteotomia, como substituto do enxerto de ilíaco. No procedimento padrão de retirada enxerto ósseo da bacia é realizada uma incisão na região antero lateral do ilíaco, com um tamanho aproximado de 7 cm, através da qual se obtém acesso a osso ilíaco que é então cortado com um osteotomo para possibilitar a retirada do enxerto.

No procedimento em estudo é retirado sangue periférico através de um acesso venoso (veia do braço), este sangue é então filtrado em um aparelho retirando-se somente as plaquetas, o restante do sangue é devolvido ao paciente. Junta-se a essas plaquetas o aspirado do osso ilíaco que é obtido através de uma punção realizada através da pele com uma agulha como já explicado.

Ao concordar a participar deste estudo você será sorteado e em função deste sorteio será incluído no grupo que utiliza as plaquetas ou no grupo que utiliza o enxerto da bacia.

As complicações das osteotomias são: dor, infecção, sangramento, não consolidação, trombose venosa profunda, síndrome compartimental, trombo embolismo pulmonar, perda da correção, supra correção, lesão vascular, lesão nervosa, rigidez articular, e amputação. As complicações da retirada de enxerto do ilíaco são: dor crônica no quadril, claudicação, defeito ósseo no local da retirada de enxerto, cosmética inadequada, infecção local, lesão de nervos cutâneos. Tanto a punção do ilíaco quanto a obtenção do concentrado de plaquetas são praticamente livres de complicações no paciente que não apresenta problemas de coagulação do sangue.

A utilização do enxerto do ilíaco apesar de suas complicações não garante com certeza a consolidação, pois a isso estão associados outros fatores como: fatores individuais do próprio paciente (idade, tabagismo, condição imunológica), fatores locais e a técnica cirúrgica.

A complicação da utilização do concentrado de plaquetas é o retardo ou a não consolidação da osteotomia, e a eventual necessidade de se submeter a nova cirurgia para colocação de enxerto do ilíaco.

O procedimento de osteotomia tem como objetivos a melhora da dor, e a correção da deformidade, e para isso quanto mais rápida a consolidação do local da osteotomia mais rápida será a reabilitação e melhor será o resultado final. Os procedimentos alternativos às osteotomias são as artroplastias total e parcial do joelho, que têm sua indicação no paciente com idade mais avançada.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

1. Caio Oliveira D' Ella, Rua Dr. Ovídio Pires de Campos n°333, 3°andar, cep 05403-010, São Paulo, SP, Brasil. Tel/fax: (11) 30696000.

2. Márcia Uchoa Rezende, Rua Dr. Ovídio Pires de Campos n°333, 3°andar, cep 05403-010, São Paulo, SP, Brasil. Tel/fax: (11) 30696000.

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 200....

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

8.3 Anexo 3

De: "Francesca Georgiou" <F.Georgiou@jbjs.org.uk>
Assunto: **JBJS [BR] Log No. 22246 - New submission**
Data: 30 de dezembro de 2008 7h5min0s GMT-02:00
Para: <caiodelia@terra.com.br>, <caio@vita.org.br>

Dear Dr D'Elia,

The Editor acknowledges receipt of the paper entitled 'Comparison between platelet rich plasma and autologous iliac grafts for tibial osteotomy', recently submitted to the Journal of Bone and Joint Surgery. It has been given the Log number 22246.

Please ensure that you quote the Log No. in any future correspondence regarding this paper.

This paper will be circulated to reviewers. The Editor will write to you in due course giving the decision regarding publication.

Please note that now your paper has been logged on to our database you can track (using corresponding author's details) what is happening at the different stages by logging on to our website (<http://journals.jbjs.org.uk/tools/subsTracker.dtl>) and pick the author section. I hope you find this useful. If you have any problems let us know.

If you have any queries please email me.

(The jpegs of the figures were fine)

Best Wishes,

Francesca Georgiou
Editorial Secretary

Journal of Bone and Joint Surgery
22 Buckingham Street
London WC2N 6ET
UK
T: +44 (0)20 7782 0010
F: +44 (0)20 7839 9777
E: f.georgiou@jbjs.org.uk
W. www.jbjs.org.uk

For details of how to subscribe go to www.jbjs.org.uk/subscriptions. Please pass these details to colleagues who might be interested in Journal of Bone and Joint Surgery.

Sign up for the electronic Table of Contents alerting at www.jbjs.org.uk/cgi/alerts/etoc

9. Referências:

1. Zabeu JLA, Mercadante MT. Bone graft substitutes compared to autologous bone graft in orthopedic surgery – Systematic literature review. *Rev Bras Ortop.* 2008 2008;43(3):10.
2. Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Takahashi M, Hata K, Nagasaka T. Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue-engineered bone regeneration. *Tissue Eng.* 2004 May-Jun;10(5-6):955-64.
3. Viateau V, Guillemin G, Bousson V, Oudina K, Hannouche D, Sedel L, et al. Long-bone critical-size defects treated with tissue-engineered grafts: a study on sheep. *J Orthop Res.* 2007 Jun;25(6):741-9.
4. Parikh SN. Bone graft substitutes: past, present, future. *J Postgrad Med.* 2002 Apr-Jun;48(2):142-8.
5. Marx RE. Commentary on: Bone regeneration in standardized bone defects with autografts or bone substitutes in combination with platelet concentrate: a histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2006 Mar-Apr;21(2):190-1; discussion 1-2.
6. Lowery GL, Kulkarni S, Pennisi AE. Use of autologous growth factors in lumbar spinal fusion. *Bone.* 1999 Aug;25(2 Suppl):47S-50S.
7. Ito K, Yamada Y, Nagasaka T, Baba S, Ueda M. Osteogenic potential of injectable tissue-engineered bone: a comparison among autogenous bone, bone substitute (Bio-oss), platelet-rich plasma, and tissue-engineered bone with respect to their mechanical properties and histological findings. *J Biomed Mater Res A.* 2005 Apr 1;73(1):63-72.
8. Grageda E. Platelet-rich plasma and bone graft materials: a review and a standardized research protocol. *Implant Dent.* 2004 Dec;13(4):301-9.
9. De Long WG, Jr., Einhorn TA, Koval K, McKee M, Smith W, Sanders R, et al. Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis. *J Bone Joint Surg Am.* 2007 Mar;89(3):649-58.
10. Dallari D, Savarino L, Stagni C, Cenni E, Cenacchi A, Fornasari PM, et al. Enhanced tibial osteotomy healing with use of bone grafts supplemented with platelet gel or platelet gel and bone marrow stromal cells. *J Bone Joint Surg Am.* 2007 Nov;89(11):2413-20.
11. Burkus JK. Re: Kim DH, Jahng TA, Fu T-S, et al. Evaluation of HealosMP52 osteoinductive bone graft for instrumented lumbar intertransverse process fusion in sheep. *Spine* 2004;29;2800-8. *Spine.* 2005 Jun 1;30(11):1342-3; author reply 3-4.
12. Macewen W. I. The Osteogenic Factors in the Development and Repair of Bone. *Ann Surg.* 1887 Oct;6(4):289-306.
13. E. G. Recherches experimentales sur les propriétés du tissu osseux. *J L Anat.* 1869;6:399-412.
14. Meek'ren J. *Observations Medico-Chirurgicae.* Amsterdam: H & T Boon; 1632.
15. Willestaedt H, Levander G, Hult L. Studies in osteogenesis. *Acta Orthop Scand.* 1950;19(4):419-32.
16. Sen MK, Miclau T. Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions? *Injury.* 2007 Mar;38 Suppl 1:S75-80.

17. Russell JL, Block JE. Surgical harvesting of bone graft from the ilium: point of view. *Med Hypotheses*. 2000 Dec;55(6):474-9.
18. Roldan JC, Jepsen S, Miller J, Freitag S, Rueger DC, Acil Y, et al. Bone formation in the presence of platelet-rich plasma vs. bone morphogenetic protein-7. *Bone*. 2004 Jan;34(1):80-90.
19. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998 Jun;85(6):638-46.
20. Kovacevic D, Rodeo SA. Biological augmentation of rotator cuff tendon repair. *Clin Orthop Relat Res*. 2008 Mar;466(3):622-33.
21. Gandhi A, Doumas C, O'Connor JP, Parsons JR, Lin SS. The effects of local platelet rich plasma delivery on diabetic fracture healing. *Bone*. 2006 Apr;38(4):540-6.
22. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg*. 2004 Nov;114(6):1502-8.
23. Canalis E. Clinical review 35: Growth factors and their potential clinical value. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992 Jul;75(1):1-4.
24. Borzini P, Mazzucco L. Platelet gels and releasates. *Curr Opin Hematol*. 2005 Nov;12(6):473-9.
25. Anitua E, Sanchez M, Orive G, Andia I. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials*. 2007 Nov;28(31):4551-60.
26. Anitua E, Andia I, Sanchez M, Azofra J, del Mar Zaldueño M, de la Fuente M, et al. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J Orthop Res*. 2005 Mar;23(2):281-6.
27. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost*. 2004 Jan;91(1):4-15.
28. Lane JM, Yasko AW, Tomin E, Cole BJ, Waller S, Browne M, et al. Bone marrow and recombinant human bone morphogenetic protein-2 in osseous repair. *Clin Orthop Relat Res*. 1999 Apr(361):216-27.
29. Connolly JF. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clin Orthop Relat Res*. 1995 Apr(313):8-18.
30. Burwell RG. The function of bone marrow in the incorporation of a bone graft. *Clin Orthop Relat Res*. 1985 Nov(200):125-41.
31. Filho Cerruti H, Kerkis I, Kerkis A, Tatsui NH, da Costa Neves A, Bueno DF, et al. Allogeneous bone grafts improved by bone marrow stem cells and platelet growth factors: clinical case reports. *Artif Organs*. 2007 Apr;31(4):268-73.
32. Franco V, Cerullo G, Cipolla M, Gianni E, Puddu G. Open wedge high tibial osteotomy. *Tech Knee Surg*. 2002;1(1):43-53.
33. Warden SJ, Morris HG, Crossley KM, Brukner PD, Bennell KL. Delayed- and non-union following opening wedge high tibial osteotomy: surgeons' results from 182 completed cases. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2005 Jan;13(1):34-7.
34. Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res*. 2000 Feb(371):10-27.

35. Zabeu JLA MM. Substitutos ósseos comparados ao enxerto autólogo em cirurgia ortopédica: revisão sistemática da literatura (Bone graft substitutes compared to autologous bone graft in orthopedic surgery – Systematic literature review). *Rev Bras Ortop.* 2007;43(3):59-68.
36. Muschler GF, Huber B, Ullman T, Barth R, Easley K, Otis JO, et al. Evaluation of bone-grafting materials in a new canine segmental spinal fusion model. *J Orthop Res.* 1993 Jul;11(4):514-24.
37. Meeder PJ, Eggers C. The history of autogenous bone grafting. *Injury.* 1994;25 Suppl 1:A2-3.
38. Khan SN, Cammisa FP, Jr., Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg.* 2005 Jan-Feb;13(1):77-86.
39. Friedlaender GE. Bone grafts. The basic science rationale for clinical applications. *J Bone Joint Surg Am.* 1987 Jun;69(5):786-90.
40. Goulet JA, Senunas LE, DeSilva GL, Greenfield ML. Autogenous iliac crest bone graft. Complications and functional assessment. *Clin Orthop Relat Res.* 1997 Jun(339):76-81.
41. Kurz LT, Garfin SR, Booth RE, Jr. Harvesting autogenous iliac bone grafts. A review of complications and techniques. *Spine.* 1989 Dec;14(12):1324-31.
42. Wozney JM, Rosen V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1998 Jan(346):26-37.
43. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem.* 1997 Feb;64(2):295-312.
44. Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem.* 1994 Nov;56(3):283-94.
45. Muschler GF, Boehm C, Easley K. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. *J Bone Joint Surg Am.* 1997 Nov;79(11):1699-709.
46. Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A, Owen M. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop Relat Res.* 1980 Sep(151):294-307.
47. Kraus KH, Kirker-Head C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet Surg.* 2006 Apr;35(3):232-42.
48. Connolly JF, Guse R, Tiedeman J, Dehne R. Autologous marrow injection for delayed unions of the tibia: a preliminary report. *J Orthop Trauma.* 1989;3(4):276-82.
49. Connolly JF. Clinical use of marrow osteoprogenitor cells to stimulate osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res.* 1998 Oct(355 Suppl):S257-66.
50. Salama R, Weissman SL. The clinical use of combined xenografts of bone and autologous red marrow. A preliminary report. *J Bone Joint Surg Br.* 1978 Feb;60(1):111-5.
51. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science.* 1965 Nov 12;150(698):893-9.
52. Solheim E. Growth factors in bone. *Int Orthop.* 1998;22(6):410-6.
53. Slater M, Patava J, Kingham K, Mason RS. Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity. *J Orthop Res.* 1995 Sep;13(5):655-63.

54. Johnson EE, Urist MR, Finerman GA. Repair of segmental defects of the tibia with cancellous bone grafts augmented with human bone morphogenetic protein. A preliminary report. *Clin Orthop Relat Res.* 1988 Nov(236):249-57.
55. Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, Cierny G, Muschler GF, et al. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg Am.* 2001;83-A Suppl 1(Pt 2):S151-8.
56. Everts PA, Knape JT, Weibrich G, Schonberger JP, Hoffmann J, Overdevest EP, et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J Extra Corpor Technol.* 2006 Jun;38(2):174-87.
57. Choi BH, Im CJ, Huh JY, Suh JJ, Lee SH. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Jan;33(1):56-9.
58. Mundy GR. Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling. *J Bone Miner Res.* 1993 Dec;8 Suppl 2:S505-10.
59. Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H, Mitsuyama H, Nakamura H, Katoh M, et al. Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis--a preliminary result of three cases. *Bone.* 2004 Oct;35(4):892-8.
60. Canalis E, Varghese S, McCarthy TL, Centrella M. Role of platelet derived growth factor in bone cell function. *Growth Regul.* 1992 Dec;2(4):151-5.
61. Carrington JL, Roberts AB, Flanders KC, Roche NS, Reddi AH. Accumulation, localization, and compartmentation of transforming growth factor beta during endochondral bone development. *J Cell Biol.* 1988 Nov;107(5):1969-75.
62. Centrella M, Massague J, Canalis E. Human platelet-derived transforming growth factor-beta stimulates parameters of bone growth in fetal rat calvariae. *Endocrinology.* 1986 Nov;119(5):2306-12.
63. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.* 2001;10(4):225-8.
64. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Apr;62(4):489-96.
65. Bielecki T, Gazdzik TS, Szczepanski T. Benefit of percutaneous injection of autologous platelet-leukocyte-rich gel in patients with delayed union and nonunion. *Eur Surg Res.* 2008;40(3):289-96.
66. Lucarelli E, Fini M, Beccheroni A, Giavaresi G, Di Bella C, Aldini NN, et al. Stromal stem cells and platelet-rich plasma improve bone allograft integration. *Clin Orthop Relat Res.* 2005 Jun(435):62-8.
67. Moreland JR, Bassett LW, Hanker GJ. Radiographic analysis of the axial alignment of the lower extremity. *J Bone Joint Surg Am.* 1987 Jun;69(5):745-9.
68. Noyes FR, Barber SD, Simon R. High tibial osteotomy and ligament reconstruction in varus angulated, anterior cruciate ligament-deficient knees. A two-to seven-year follow-up study. *Am J Sports Med.* 1993 Jan-Feb;21(1):2-12.
69. Noyes FR, Barber-Westin SD, Hewett TE. High tibial osteotomy and ligament reconstruction for varus angulated anterior cruciate ligament-deficient knees. *Am J Sports Med.* 2000 May-Jun;28(3):282-96.
70. Jackson JP, Waugh W. Tibial osteotomy for osteoarthritis of the knee. *J Bone Joint Surg Br.* 1961 Nov;43-B:746-51.
71. Bauer GC, Insall J, Koshino T. Tibial osteotomy in gonarthrosis (osteoarthritis of the knee). *J Bone Joint Surg Am.* 1969 Dec;51(8):1545-63.

72. Amendola A, Panarella L. High tibial osteotomy for the treatment of unicompartmental arthritis of the knee. *Orthop Clin North Am.* 2005 Oct;36(4):497-504.
73. Coventry MB. Osteotomy of the Upper Portion of the Tibia for Degenerative Arthritis of the Knee. A Preliminary Report. *J Bone Joint Surg Am.* 1965 Jul;47:984-90.
74. Coventry MB, Ilstrup DM, Wallrichs SL. Proximal tibial osteotomy. A critical long-term study of eighty-seven cases. *J Bone Joint Surg Am.* 1993 Feb;75(2):196-201.
75. Hernigou P, Medevielle D, Debeyre J, Goutallier D. Proximal tibial osteotomy for osteoarthritis with varus deformity. A ten to thirteen-year follow-up study. *J Bone Joint Surg Am.* 1987 Mar;69(3):332-54.
76. Franco V, Cipolla M, Gerullo G, Gianni E, Puddu G. [Open wedge osteotomy of the distal femur in the valgus knee]. *Orthopade.* 2004 Feb;33(2):185-92.
77. Puddu G, Cipolla M, Cerullo G, Franco V, Gianni E. Osteotomies: the surgical treatment of the valgus knee. *Sports Med Arthrosc.* 2007 Mar;15(1):15-22.
78. Asik M, Sen C, Kilic B, Goksan SB, Ciftci F, Taser OF. High tibial osteotomy with Puddu plate for the treatment of varus gonarthrosis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2006 Oct;14(10):948-54.
79. Amendola A, Fowler PJ, Litchfield R, Kirkley S, Clatworthy M. Opening wedge high tibial osteotomy using a novel technique: early results and complications. *J Knee Surg.* 2004 Jul;17(3):164-9.
80. Naudie DD, Amendola A, Fowler PJ. Opening wedge high tibial osteotomy for symptomatic hyperextension-varus thrust. *Am J Sports Med.* 2004 Jan-Feb;32(1):60-70.
81. Yoo JU, Johnstone B. The role of osteochondral progenitor cells in fracture repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1998 Oct(355 Suppl):S73-81.
82. Kawasumi M, Kitoh H, Siwicka KA, Ishiguro N. The effect of the platelet concentration in platelet-rich plasma gel on the regeneration of bone. *J Bone Joint Surg Br.* 2008 Jul;90(7):966-72.
83. Tischler M. Platelet rich plasma. The use of autologous growth factors to enhance bone and soft tissue grafts. *N Y State Dent J.* 2002 Mar;68(3):22-4.
84. Savarino L, Cenni E, Tarabusi C, Dallari D, Stagni C, Cenacchi A, et al. Evaluation of bone healing enhancement by lyophilized bone grafts supplemented with platelet gel: a standardized methodology in patients with tibial osteotomy for genu varus. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2006 Feb;76(2):364-72.
85. Sarkar MR, Augat P, Shefelbine SJ, Schorlemmer S, Huber-Lang M, Claes L, et al. Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold. *Biomaterials.* 2006 Mar;27(9):1817-23.
86. Dallari D, Fini M, Stagni C, Torricelli P, Nicoli Aldini N, Giavaresi G, et al. In vivo study on the healing of bone defects treated with bone marrow stromal cells, platelet-rich plasma, and freeze-dried bone allografts, alone and in combination. *J Orthop Res.* 2006 May;24(5):877-88.
87. Everts PA, Jakimowicz JJ, van Beek M, Schonberger JP, Devilee RJ, Overvest EP, et al. Reviewing the structural features of autologous platelet-leukocyte gel and suggestions for use in surgery. *Eur Surg Res.* 2007;39(4):199-207.

88. Floryan KM, Berghoff WJ. Intraoperative use of autologous platelet-rich and platelet-poor plasma for orthopedic surgery patients. *AORN J.* 2004 Oct;80(4):668-74, quiz 75-8.
89. Romero-Corral A, Somers VK, Sierra-Johnson J, Thomas RJ, Collazo-Clavell ML, Korinek J, et al. Accuracy of body mass index in diagnosing obesity in the adult general population. *Int J Obes (Lond).* 2008 Jun;32(6):959-66.
90. Puddu G. High tibial osteotomy (the arthritic knee in the young athlete). 11th ESSKA 2000 Congress and 4th World Congress on Sports Trauma; 2000 and 2004; Athens, Greece. 2000 and 2004. p. 446-7.
91. Crenshaw AH. Surgical Techniques and Approaches. In: ST C, editor. *Campbell's Operative Orthopaedics.* Tenth ed. Philadelphia: Mosby; 2006. p. 14-7.
92. O'Neill EM, Zalewski WM, Eaton LJ, Popovsky MA, Pivacek LE, Ragno G, et al. Autologous platelet-rich plasma isolated using the Haemonetics Cell Saver 5 and Haemonetics MCS+ for the preparation of platelet gel. *Vox Sang.* 2001 Oct;81(3):172-5.
93. Yacobucci GN, Cocking MR. Union of medial opening-wedge high tibial osteotomy using a corticocancellous proximal tibial wedge allograft. *Am J Sports Med.* 2008 Apr;36(4):713-9.
94. Zabeu J. Bone substitutes compared to bone autograft in orthopaedic surgery: a systematic review of the literature. 2007.
95. Friedlaender GE. OP-1 clinical studies. *J Bone Joint Surg Am.* 2001;83-A Suppl 1(Pt 2):S160-1.
96. Einhorn TA. Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am.* 1995 Jun;77(6):940-56.
97. Bielecki T, Gazdzik TS, Szczepanski T. Re: "The effects of local platelet rich plasma delivery on diabetic fracture healing". What do we use: Platelet-rich plasma or platelet-rich gel? *Bone.* 2006 Dec;39(6):1388; author reply 9.
98. Koshino T, Murase T, Saito T. Medial opening-wedge high tibial osteotomy with use of porous hydroxyapatite to treat medial compartment osteoarthritis of the knee. *J Bone Joint Surg Am.* 2003 Jan;85-A(1):78-85.
99. Castillo RC, Bosse MJ, MacKenzie EJ, Patterson BM. Impact of smoking on fracture healing and risk of complications in limb-threatening open tibia fractures. *J Orthop Trauma.* 2005 Mar;19(3):151-7.
100. Kyro A, Usenius JP, Aarnio M, Kunnamo I, Avikainen V. Are smokers a risk group for delayed healing of tibial shaft fractures? *Ann Chir Gynaecol.* 1993;82(4):254-62.
101. Harvey EJ, Agel J, Selznick HS, Chapman JR, Henley MB. Deleterious effect of smoking on healing of open tibia-shaft fractures. *Am J Orthop.* 2002 Sep;31(9):518-21.
102. Schmitz MA, Finnegan M, Natarajan R, Champine J. Effect of smoking on tibial shaft fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1999 Aug(365):184-200.
103. El-Zawawy HB, Gill CS, Wright RW, Sandell LJ. Smoking delays chondrogenesis in a mouse model of closed tibial fracture healing. *J Orthop Res.* 2006 Dec;24(12):2150-8.
104. Viateau V, Guillemain G, Yang YC, Bensaid W, Reviron T, Oudina K, et al. A technique for creating critical-size defects in the metatarsus of sheep for use in investigation of healing of long-bone defects. *Am J Vet Res.* 2004 Dec;65(12):1653-7.

105. Noyes FR, Dunworth LA, Andriacchi TP, Andrews M, Hewett TE. Knee hyperextension gait abnormalities in unstable knees. Recognition and preoperative gait retraining. *Am J Sports Med.* 1996 Jan-Feb;24(1):35-45.
106. Spahn G. Complications in high tibial (medial opening wedge) osteotomy. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2004 Dec;124(10):649-53.
107. Andrew JG, Hoyland JA, Freemont AJ, Marsh DR. Platelet-derived growth factor expression in normally healing human fractures. *Bone.* 1995 Apr;16(4):455-60.
108. Nash TJ, Howlett CR, Martin C, Steele J, Johnson KA, Hicklin DJ. Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. *Bone.* 1994 Mar-Apr;15(2):203-8.
109. Sanchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003 Jan-Feb;18(1):93-103.
110. Mariconda M, Cozzolino F, Cozzolino A, D'Agostino E, Bove A, Milano C. Platelet Gel Supplementation in Long Bone Nonunions Treated by External Fixation. *J Orthop Trauma.* 2008 May/June;22(5):342-5.
111. Everts PA, Brown Mahoney C, Hoffmann JJ, Schonberger JP, Box HA, van Zundert A, et al. Platelet-rich plasma preparation using three devices: implications for platelet activation and platelet growth factor release. *Growth Factors.* 2006 Sep;24(3):165-71.
112. Ogino Y, Ayukawa Y, Tsukiyama Y, Koyano K. The effect of platelet-rich plasma on the cellular response of rat bone marrow cells in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005 Sep;100(3):302-7.