

EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NA APOPTOSE PÓS-TRAUMÁTICA DE CONDRÓCITOS

EFFECT OF PLATELET-RICH PLASMA ON IMPACT-INDUCED CHONDROCYTE APOPTOSIS

MÁRCIA UCHÔA DE REZENDE¹, RONALD BISPO BARRETO DA SILVA¹,
ANA CRISTINA FERREIRA BASSIT¹, NELSON HIDEKAZU TATSUI², DAVID SADIGURSKY¹, RAUL BOLLIGER NETO¹

RESUMO

Objetivo: Avaliar se a injeção intra-articular de Plasma rico em plaquetas (PRP) pode reduzir a apoptose pós-traumática de condrócitos. **Métodos:** Foi desenvolvido um estudo experimental duplo-cego com quatro joelhos de coelhos adultos. Após a anestesia, os animais foram submetidos à contusão padronizada dos joelhos. Depois foi injetado 1ml de PRP humano nos dois joelhos esquerdos e 1ml de solução fisiológica (SF) nos dois joelhos direitos. Os dois coelhos foram mantidos no mesmo ambiente sob controle de temperatura, de atividades diárias e de alimentação. A eutanásia dos animais ocorreu dez dias após a intervenção e foram realizadas biópsias da cartilagem de cada joelho. As peças foram preparadas para análise em microscopia eletrônica (ME). **Resultados:** Quatro preparados para ME foram obtidos, cada um correspondendo a um joelho. Os joelhos-PRP apresentaram as taxas de apoptose de 47,62% (50/105) e de 48,36% (59/122), respectivamente. Nos joelhos-SF as taxas de apoptose foram, respectivamente, 56,67% (17/30) e 70,40% (88/125). A diferença do índice de apoptose nos joelhos-PRP (48,02%) e nos joelhos-SF (67,74%) foi significativa ($p < 0,001$) e $OR = 0,439$ ($IC95\% = 0,287-0,673$). **Conclusão:** A injeção intra-articular de PRP imediatamente ao trauma, reduz as taxas de apoptose (pós-traumática) de condrócitos de coelhos.

Descritores: Apoptose. Cartilagem. Plasma rico em plaquetas. Traumatismos do joelho.

ABSTRACT

Objective: To evaluate if the injection of intra-articular platelet-rich plasma (PRP) can reduce impact-induced chondrocyte apoptosis. **Methods:** A double-blind experimental study was developed in four knees of two adult rabbits. Each knee was injured after anesthesia. Subsequently, 1ml PRP was injected in the right knees and 1ml of normal saline (NS) in the left knees. The animals were euthanized ten days after the intervention. All cartilage was removed from the 4 knees and prepared for analysis in electron microscopy (EM). **Results:** Four EM samples were obtained. The PRP-injected knees showed apoptosis rates of 47,62% (50/105) and 48,36% (59/122), respectively. NS-injected knees showed 56.67% (17/30) and 70.40% (88/125) of apoptosis. PRP-injected knees had statistically significant less apoptosis (48.02%) than NS-injected ones, (67.74%, $p < 0,001$) and odds ratio of 0.439 (95% CI=0.287-0.673). **Conclusion:** Immediately post-traumatic intra-articular injection of PRP reduces impact-induced chondrocyte apoptosis in rabbits.

Keywords: Apoptosis. Cartilage. Platelets-rich plasma. Knee injuries.

Citação: Rezende MU, Silva RBB, Bassit ACF, Tatsui NH, Sadigursky D, Bolliger Neto R. Efeito do plasma rico em plaquetas na apoptose pós-traumática de condrócitos. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2011;19(2):102-5. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

Citation: Rezende MU, Silva RBB, Bassit ACF, Tatsui NH, Sadigursky D, Bolliger Neto R. Effect of platelet-rich plasma on impact-induced chondrocyte apoptosis. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2011;19(2):102-5. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

INTRODUÇÃO

A cartilagem articular tem um baixo potencial de regeneração, mas este processo ainda é pouco compreendido. Apesar de vários estudos histológicos demonstrarem a ocorrência de morte celular em resposta à lesão mecânica, apenas recentemente esta sendo estabelecido se a morte celular ocorre por necrose ou apoptose.¹⁻⁴ A apoptose tem sido estudada extensivamente em outros tecidos e células. Inúmeros indutores conhecidos para apoptose têm sido

identificados, incluindo agentes químicos, citocinas, patógenos virais e bacterianos e lesões térmicas.⁵⁻⁸ A apoptose tem sido demonstrada como resultante de estresse mecânico numa variedade de células.⁹⁻¹¹ É um processo programado altamente regulado e evolutivo de morte celular que executa um papel essencial no desenvolvimento embrionário e no "turnover" celular fisiológico. A apoptose dos condrócitos foi demonstrada na osteoartrite e em resposta ao trauma mecânico em três estudos *in vitro*.¹²⁻¹⁴ Esses

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

1. Laboratório de Investigação Médica do Sistema Músculo Esquelético – LIM41 do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da FMUSP.
2. Hemocentro do Hospital das Clínicas da FMUSP.

Trabalho desenvolvido no Instituto de Ortopedia e Traumatologia da FMUSP.
Correspondência: Rua Dr. Ovidio Pires de Campos, 333, Cerqueira Cesar, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: murezende@uoi.com.br

Artigo recebido 16/10/09, aprovado em 28/10/09.

estudos concluíram que o início da apoptose nos condrócitos poderia ser um dos eventos precoces através do qual os condrócitos respondem ao estímulo mecânico. Além disso, outras investigações recentes demonstraram que bloqueio da apoptose por agentes farmacológicos diminuiu a taxa de morte de célula e aumenta a sua sobrevivência. Alguns destes agentes são representados por inibidores da caspase,¹⁵ glucosamina,¹⁶ diacereína^{17,18} e OP-1.¹⁹ Soffer *et al.*²⁰ demonstraram que fatores de crescimento liberados de plaquetas (PDGF) disparam respostas biológicas que promovem a regeneração óssea, estimulando a proliferação celular e diminuindo a diferenciação das células ósseas. Vários estudos estabelecem provas diretas ou indiretas, de que os produtos derivados de plaquetas têm um papel substancial na regeneração tecidual.^{21,22} Eles estimulam as células a produzirem trombina, que gera o fibrinógeno para formar fibrina insolúvel. Coágulos de fibrina estimulam as células a produzirem colágeno tipo I, mantendo assim um ciclo que acelera a regeneração tecidual.²³ Enquanto o PGDF pode aumentar a viabilidade das células ósseas *in vitro*, ele ainda há de ser demonstrado se isso ocorre *in vivo* e se ele pode inibir na apoptose pós-traumática na cartilagem. O objetivo deste estudo é avaliar se a injeção intra-articular (IA) de plasma rico em plaquetas (PRP) reduz a degradação da cartilagem após um trauma direto.

MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado no laboratório de investigação clínica do Instituto de ortopedia e Traumatologia da Faculdade de medicina da Universidade São Paulo (LIM-41/IOT/FMUSP). O modelo experimental seguiu os princípios éticos de COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), da *American Veterinary Medical Association* (AVMA) e do Comitê de Cuidados e Uso de Animais (IACUC), para a manutenção dos animais, protocolos de anestesia, analgesia e eutanásia.

OSTEOARTROSE EXPERIMENTAL

Foram utilizados, no presente estudo, coelhos brancos maduros da raça neozelandesa. Os dois coelhos foram anestesiados por uma injeção intramuscular do quetamina (50 mg/kg) e xilazina (100 mg/kg). Na posição supina, foi realizado o ensaio de contusão para osteoartrite de Mazières,¹⁷ reproduzido três vezes em cada joelho. Uma contusão ao nível da patela e do côndilo femoral medial foi causada pelo impacto de 1 kg de peso liberado de uma altura de 1 metro.

Imediatamente após as contusões, cada coelho recebeu a injeção de 1 ml de derivados humanos PRP nos joelhos direitos (denominados 1 e 3) e injeção de 1 ml de solução salina normal (NaCl 0,9 %) nos joelhos esquerdos (denominados 2 e 4).

Após as injeções, os animais foram autorizados a permanecer em atividade, em gaiolas (60 cm X 60 cm x 40 cm), sem qualquer imobilização. Os animais foram rigorosamente monitorados quanto a complicações.

HISTOLOGIA

Dez dias após a contusão nos joelho, os animais sofreram eutanásia. Este tempo exato foi selecionado para avaliar a fase precoce da apoptose pós-traumática.¹ Fragmentos de cartilagem frescos

foram colhidos da patela e de ambos os côndilos femorais. Os espécimes foram fixados em glutaraldeído 3% e em cacodilato 0,1 M em PH de 7.3 a 7.35 por 2 a 3 horas. Depois da lavagem em cacodilato de sódio de 0,1 M em pH de 7.3, os espécimes foram fixados em tetróxido de ósmio de 1 % e em cacodilato de sódio a 0,1 M (pH 7.3) por 1 hora. Os espécimes foram lavados novamente, desidratados com etanol e em seguida postos em uma mistura de etanol/*spurn* 50:50 antes da incorporação definitiva em *spurn*. Em seguida foram cortados e corados com acetato de uranilo e citrato, após seções de ultratina (60 nm) e analisados por TEM (microscópio de transmissão de elétrons (JEOL JEM-1010, Japão)) com ampliação de 1500x.

A investigação por TEM foi usada para confirmar a presença de células apoptóticas e para permitir a documentação detalhada de suas alterações morfológicas. Ambos, o técnico responsável por preparar os espécimes de cartilagem e o patologista responsável pela contagem das células foram cegos com relação aos grupos do estudo (metodologia de duplo-cego). Para o estudo histológico, cada espécime de cartilagem foi dividido em campos aleatórios do TEM. Nestes campos, condrócitos normais e apoptóticos foram contados. (Figura 1)

EXTRAÇÃO DE PRP

A Aférese (*Haemonetics*, *Braintree*, MA, EUA) do sangue periférico de um voluntário humano foi realizada para obter PRP através do separador celular automático *Haemonetics* MCS 9000 kit específico para *plateletpheresis* 995-E (*Haemonetics* Corp.). O sangue foi drenado para um dispositivo de separação contínua de centrifugação. Depois da sedimentação do sangue, foi utilizado um analisador de fibra óptica de refração com o objetivo de

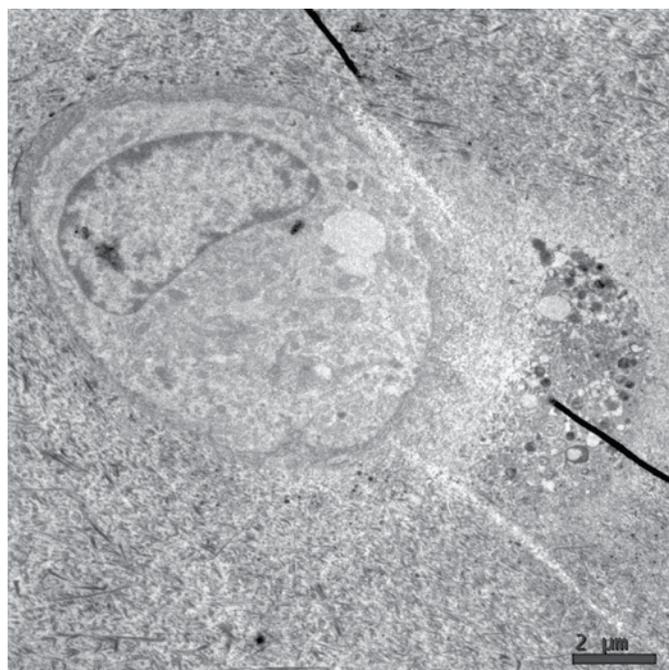


Figura 1. Microscopia de transmissão de elétrons (TEM) de espécime de cartilagem do joelho. Seta branca, condrócito normal com citoplasma abundante e morfologia normal celular e nuclear. Seta preta, condrócito demonstrando alterações apoptóticas incluindo fragmentação nuclear, redução do tamanho celular e enrugamento da membrana citoplasmática.

isolar a camada das plaquetas, que foi armazenada em um saco específico. O sangue total restante foi reintroduzido no animal, determinando o fim de um ciclo. O citrato de sódio foi usado como anticoagulante numa proporção de um para cada 9 ml de sangue total processado. Geralmente, dois ciclos são transportados e 70 ml de concentrado de plaquetas é coletado.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise para comparação das proporções da apoptose entre os grupos foi feita pelo teste do qui-quadrado. A estimativa do tamanho de amostra resultou em 142 células para cada grupo.

RESULTADOS

Foram preparadas quatro grades de TEM, uma para cada joelho. Em média, foram fotografadas 8,75 (7 – 10) malhas para cada grade. Totais de 247 e 158 condrócitos foi contados no grupo com introdução de PRP e no grupo de controle, respectivamente. Este número de células foi suficiente para obter poder estatístico, como mencionado acima.

Os joelhos tratados com PRP (joelhos 1 e 3) revelaram a existência de 47,62% (50/105) e 48,36% (59/122) de apoptose, respectivamente. Em contrapartida, no grupo controle (joelhos 2 e 4), as taxas de apoptose foram 56,67% (17/30) e 70,40% (88/125), respectivamente. (Tabela 1)

A injeção intra-articular de PRP foi associada com um número significativamente menor de morte de condrócitos, 48,02%, em relação aos 67,74% no grupo controle ($p < 0.001$). Um fator de proteção de 56,1 % foi demonstrado, de acordo com a razão de probabilidades (OR = 0,439; CI95% = 0,287-0,673), para os joelhos tratados com PRP. (Figura 2)

DISCUSSÃO

D'Lima *et al.*^{1,24,25} demonstraram o aumento gradual dos níveis de células apoptóticas após um evento traumático, oferecendo uma janela potencialmente terapêutica. Eles também demonstraram que na apoptose pode ser inibida, sugerindo um potencial para a modulação farmacológica dos efeitos das lesões de cartilagem, que já foi demonstrado por Mazières *et al.*^{17,18} em seu modelo de contusão em coelhos. A administração profilática (ou seja, tratamento imediato após a contusão) de diacereína, impediu a

Tabela 1. Número de condrócitos observados em cada joelho do estudo.

Joelho	Apoptose	Normal	Total de Células	% apoptose
1	50	55	105	47,62
2	17	13	30	56,67
3	59	63	122	48,36
4	88	37	125	70,40

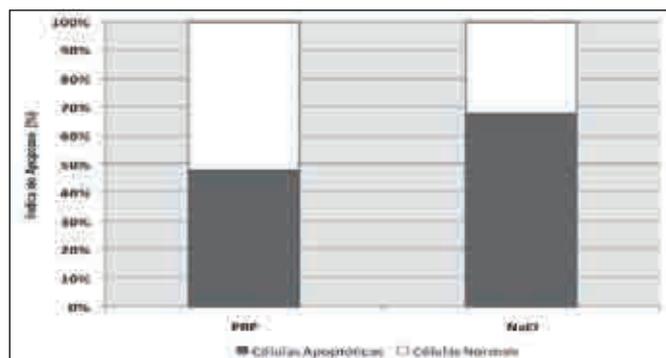


Figura 2. Efeito da infusão intrarticular do plasma rico em plaquetas sobre apoptoses de condrócitos induzidas por impacto. PRP representa o grupo de intervenção e NaCl, representa o grupo controle. Diferença significativa entre os dois grupos ($p < 0.001$).

destruição da cartilagem induzida pelo impacto e apresentou um efeito de condroprotetor.

Mais recentemente, Chubinskaya *et al.*¹⁹ revelaram que a injeção intra-articular de OP-1 pode impedir que a apoptose pós-traumática. Shikhman *et al.*¹⁶ revelaram que glucosamina intra-articular possui uma atividade condroprotetora e antiinflamatória na osteoartrose experimental. Em alguns trabalhos, plaquetas foram utilizadas diretamente ao invés de plasma rico em plaquetas. Em outros, foram utilizados géis de plaquetas e realsatos. Os principais fatores de crescimento armazenados em α -granulados de plaquetas (fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF)) são os fatores de crescimento-beta transformados (TGF- β), o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), o fator de crescimento epidérmico (EGF), o fator de crescimento fibroblástico (β -FGF) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).²²

Estudos *in vitro* revelaram que PDGF são dependentes do número de plaquetas por ml.²⁶ O'Neill *et al.*²⁷ revelou que o método pelo qual o PRP é recolhido afeta o volume do PRP e a concentração de plaquetas alcançada. Devido a esta eficácia relacionada, usamos um ml de PRP obtido por aférese. Este método (MCS+) tem uma contagem média de plaquetas de 14×10^8 /ml.

Os resultados deste estudo demonstraram que o menor número necessário para mostrar as diferenças entre as amostras era 142 células em cada grupo. No grupo no qual realizada a injeção de PRP teve 247 células disponíveis para contar e o grupo controle teve 155 células. (Tabela 1) A apoptose estava presente em 48,02 % das células após o tratamento com PRP e 67,74 % das células após tratamento com solução salina normal (Figura 2), mostrando uma diferença estatística significativa ($p < 0.001$) e a uma proporção de probabilidades de 0,439 (CI95 % 0,287-0,673).

D'Lima demonstrou um aumento progressivo das células apoptóticas após uma lesão traumática.²⁴ Se uma única injeção de PRP pode reduzir significativamente o número de células de apoptóticas, maior dose e frequência devem ser estudadas para verificar uma ação condroprotetora mais expressiva do PDGF pós-trauma.

CONCLUSÃO

Este estudo não permite explicar o porquê e como ocorreu a redução da apoptose induzida pelo trauma, mas mostra a possibilidade de utilizar o PRP como agente protetor desse tipo de lesão de cartilagem.

REFERÊNCIAS

1. D'Lima DD, Hashimoto S, Chen PC, Lotz MK, Colwell CW, Jr. Cartilage injury induces chondrocyte apoptosis. *J Bone Joint Surg Am.* 2001;83(Suppl 2 Pt 1):19-21.
2. Loening AM, James IE, Levenston ME, Badger AM, Frank EH, Kurz B et al. Injurious mechanical compression of bovine articular cartilage induces chondrocyte apoptosis. *Arch Biochem Biophys.* 2000;381:205-12.
3. Repo RU, Finlay JB. Survival of articular cartilage after controlled impact. *J Bone Joint Surg Am.* 1977;59:1068-76.
4. Tew SR, Kwan AP, Hann A, Thomson BM, Archer CW. The reactions of articular cartilage to experimental wounding: role of apoptosis. *Arthritis Rheum.* 2000;43:215-25.
5. Lim JT, Piazza GA, Han EK, Delohery TM, Li H, Finn TS et al. Sulindac derivatives inhibit growth and induce apoptosis in human prostate cancer cell lines. *Biochem Pharmacol.* 1999;58:1097-107.
6. Rudel T. Caspase inhibitors in prevention of apoptosis. *Herz.* 1999;24:236-41.
7. Weinrauch Y, Zychlinsky A. The induction of apoptosis by bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol.* 1999;53:155-87.
8. Wong BC, Zhu GH, Lam SK. Aspirin induced apoptosis in gastric cancer cells. *Biomed Pharmacother.* 1999;53:315-8.
9. Hashimoto S, Takahashi K, Amiel D, Coutts RD, Lotz M. Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1998;41:1266-74.
10. Cheng W, Li B, Kajstura J, Li P, Wolin MS, Sonnenblick EH et al. Stretch-induced programmed myocyte cell death. *J Clin Invest.* 1995;96:2247-59.
11. DeMeester SL, Cobb JP, Hotchkiss RS, Osborne DF, Karl IE, Tinsley KW et al. Stress-induced fractal rearrangement of the endothelial cell cytoskeleton causes apoptosis. *Surgery.* 1998;124:362-71.
12. Blanco FJ, Guitian R, Vazquez-Martul E, de Toro FJ, Galdo F. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum.* 1998;41:284-9.
13. Chen CT, Burton-Wurster N, Borden C, Hueffer K, Bloom SE, Lust G. Chondrocyte necrosis and apoptosis in impact damaged articular cartilage. *J Orthop Res.* 2001;19:703-11.
14. Kim HA, Lee YJ, Seong SC, Choe KW, Song YW. Apoptotic chondrocyte death in human osteoarthritis. *J Rheumatol.* 2000;27:455-62.
15. D'Lima D, Hermida J, Hashimoto S, Colwell C, Lotz M. Caspase inhibitors reduce severity of cartilage lesions in experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54:1814-21.
16. Shikhman AR, Amiel D, D'Lima D, Hwang SB, Hu C, Xu A et al. Chondroprotective activity of N-acetylglucosamine in rabbits with experimental osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2005;64:89-94.
17. Mazieres B, Berdah L, Thiechart M, Viguier G. [Diacetylrhein on a postcontusion model of experimental osteoarthritis in the rabbit]. *Rev Rhum Ed Fr.* 1993; 60(6 Pt 2):77S-81S.
18. Mazieres B, Blanckaert A, Thiechart M, Viguier G. [Diacetylrhein administrated "curatively" in an experimental model of post-contusion osteoarthritis in rabbits]. *Rev Prat.* 1996; 46(19 Spec No):S42-5.
19. Chubinskaya S, Hurtig M, Rueger DC. OP-1/BMP-7 in cartilage repair. *Int Orthop.* 2007;31:773-81.
20. Soffer E, Ouhayoun JP, Dosquet C, Meunier A, Anagnostou F. Effects of platelet lysates on select bone cell functions. *Clin Oral Implants Res.* 2004;15:581-8.
21. Borzini P, Mazzucco L. Tissue regeneration and in loco administration of platelet derivatives: clinical outcome, heterogeneous products, and heterogeneity of the effector mechanisms. *Transfusion.* 2005;45:1759-67.
22. Borzini P, Mazzucco L. Platelet gels and releasates. *Curr Opin Hematol.* 2005;12:473-9.
23. Kawase T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H. Platelet-rich plasma-derived fibrin clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro. *J Periodontol.* 2003;74:858-64.
24. D'Lima DD, Hashimoto S, Chen PC, Colwell CW Jr., Lotz MK. Human chondrocyte apoptosis in response to mechanical injury. *Osteoarthritis Cartilage.* 2001;9:712-9.
25. D'Lima DD, Hashimoto S, Chen PC, Lotz MK, Colwell CW Jr. Prevention of chondrocyte apoptosis. *J Bone Joint Surg Am* 2001; Suppl 2(Pt 1):25-6.
26. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone.* 2004;34:665-71.
27. 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;81:172-5.