

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**UTILIZAÇÃO DE PLASMA RICO OU POBRE EM
PLAQUETAS, ASSOCIADO OU NÃO À ENXERTO ÓSSEO
CORTICAL ALÓGENO, NA REPARAÇÃO CIRÚRGICA DE
FALHA ULNAR EM OVINOS.**

Patrícia Rodrigues da Silveira

Médica Veterinária

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**UTILIZAÇÃO DE PLASMA RICO OU POBRE EM
PLAQUETAS, ASSOCIADO OU NÃO À ENXERTO ÓSSEO
CORTICAL ALÓGENO, NA REPARAÇÃO CIRÚRGICA DE
FALHA ULNAR EM OVINOS.**

Patrícia Rodrigues da Silveira

Orientador: Prof. Dr. João Guilherme Padilha Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Julio Carlos Canola

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Cirurgia Veterinária (Cirurgia Veterinária).

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Novembro - 2009

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

PATRICIA RODRIGUES DA SILVEIRA – nascida em 06 de março de 1978, em São Paulo, SP, é médica veterinária formada pela Universidade de Marília – UNIMAR, Marília - SP, em 29 de dezembro de 2000. Em 31 de janeiro de 2001, iniciou o Programa de aprimoramento Profissional em Medicina Veterinária, na área de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Claudia Sampaio Fonseca Repetti, junto ao Hospital Veterinário “Dr. Vicente Borelli” da Universidade de Marília – UNIMAR, o que concluiu em 31 de janeiro de 2003. Em agosto de 2003, após aprovação em curso de seleção, iniciou o Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária, área de concentração em CIRURGIA VETERINÁRIA, curso de MESTRADO, junto à FCAV, UNESP, Câmpus de Jaboticabal, sob a orientação do Prof. Dr. Carlos Roberto Daleck, o que concluiu em julho de 2005. Em agosto de 2005, após aprovação em curso de seleção, iniciou o Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária, área de concentração em CIRURGIA VETERINÁRIA, curso de DOUTORADO, junto à FCAV, UNESP, Câmpus de Jaboticabal, sob a orientação do Prof. Dr. João Guilherme Padilha Filho.

Ao meu querido noivo,

Fabio

DEDICO

Carinhosamente,

Aos meus pais,

Osmildo e Marilene

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Guilherme Padilha Filho, de quem colhi os fundamentos em Ortopedia, pela amizade e confiança, pelas críticas sábias e construtivas e pela orientação carinhosa e eficaz.

Ao Prof. Dr. Julio Carlos Canola, pela contribuição e auxílio e pela convivência e amizade.

Aos Profs. Drs. Celso Sanches Brachialli e José Luis Laus e a Prof^a. Dr^a. Paola Castro Moraes pelas valiosas contribuições por ocasião do Exame Geral de Defesa deste trabalho e pelas prestimosas cooperações

À Prof^a. Dr^a. Claudia Sampaio Fonseca Repetti, pela contribuição e auxílio e pela convivência e amizade.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Daleck, pela contribuição por ocasião do Exame Geral de Qualificação deste trabalho e pela valiosa amizade.

Ao Prof. Dr. Luis Gustavo Gosuen Gonçalves Dias, pela contribuição e auxílio e pela convivência e amizade.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Garça – FAMED, pela valiosa contribuição e auxílio neste trabalho.

Aos alunos da graduação da Universidade de Marília – UNIMAR e Faculdade de Medicina Veterinária de Garça – FAMED, não podendo referir todos os nomes que foram companheiros em nossa caminhada.

Aos animais utilizados neste trabalho.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram conosco neste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
1. BIOMATERIAIS.....	3
2. PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP).....	7
2.1. Fatores de crescimento.....	7
2.2. Plasma pobre em plaquetas (PPP).....	9
2.3. Processos de obtenção dos plasmas rico e pobre em plaquetas.....	10
3. UTILIZAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM FALHAS ÓSSEAS	13
4. UTILIZAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS ASSOCIADO A	
ENXERTOS ÓSSEOS E BIOMATERIAIS.....	14
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
1. ANIMAIS.....	20
1.1. Grupos experimentais.....	20
1.2. Doadores de ossos.....	21
1.3. Avaliação geral do paciente e cuidados pré-operatórios.....	22
2. PROCEDIMENTOS PRÉ-OPERATÓRIOS.....	23
2.1. Coletas de sangue.....	23
2.2. Protocolo de obtenção do plasma rico em plaquetas e plasma pobre	
em plaquetas.....	23
2.3. Procedimentos anestésicos.....	27
3. PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS.....	28
3.1. Ostectomia de ulna.....	28
3.2. Enxertia de plasma rico e plasma pobre em plaquetas no grupo GP....	30

3.3. Enxertia de osso cortical no grupo GO.....	32
3.4. Enxertia de osso cortical, PRP e PPP no grupo GPO.....	34
4. CUIDADOS NO PÓS - OPERATÓRIO.....	36
5. AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL.....	37
6. AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA.....	37
IV. RESULTADOS.....	39
1. OBTENÇÃO DO PLASMA RICO E DO PLASMA POBRE EM PLAQUETAS	39
2. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	40
3. AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL PÓS-OPERATÓRIA.....	40
4. AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA PÓS-OPERATÓRIA.....	41
V. DISCUSSÃO.....	54
VI. CONCLUSÕES.....	60
VII.REFERÊNCIAS.....	61

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Imagem fotográfica ilustrando obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP). A) sangue coletado do animal no período pré-operatório; B) colocação dos tubos em centrífuga; C) centrifugação do sangue por três minutos a 3.500rpm; D) pipetagem do PRP (seta).....	24
Figura 2 Localização das colunas de plasma riquíssimo em plaquetas, plasma rico em plaquetas (PRP) e de plasma pobre em plaquetas (PPP), após primeira centrifugação.....	25
Figura 3 Imagem fotográfica ilustrando a obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). A) plasma sobrenadante da primeira centrifugação (seta vermelha) e células vermelhas (seta amarela); B) centrifugação; C) pipetagem do plasma PPP (seta); D) tubos com 2 ml de PRP (seta vermelha) e 2 ml de PPP (seta amarela).....	26
Figura 4 Localização do plasma pobre em plaquetas (PPP), após a segunda centrifugação.....	27
Figura 5 Imagem fotográfica ilustrando o acesso cirúrgico a ulna em ovino. A) face caudal do membro torácico para abordagem da porção proximal da ulna (seta); B) incisão de pele, subcutâneo e fáscia (seta) e C) músculos afastados para exposição da ulna (seta).....	29

Figura 6	Imagem fotográfica ilustrando trans-operatório de ostectomia da ulna direita em ovino. A) Nota-se fragmento osteoperiosteal em todo o seu diâmetro (seta) e B) falha óssea de 1,5 cm de comprimento (seta).....	30
Figura 7	Imagem fotográfica ilustrando sequencia de gelificação do plasma rico em plaquetas (PRP). A) 2 ml de PRP (seta); B) Início de agregação plaquetária após adição de soluplastin® (setas); C) coagulação plaquetária (seta); e D) gel de plaquetas (seta).....	31
Figura 8	Imagem fotográfica ilustrando processo de gelificação do plasma pobre em plaquetas (PPP). Observar coagulação após adição de soluplastin® (seta).....	31
Figura 9	Imagem fotográfica ilustrando trans-operatório de enxertia da ulna direita em ovino. Notar falha óssea preenchida por plasmas rico e plasma pobre em plaquetas (seta).....	32
Figura 10	Imagem fotográfica ilustrando a sequencia para a obtenção de osso cortical alógeno triturado. A) acondicionamento do fragmento ósseo no triturador; B) movimentos manuais em socos; C) osso cortical triturado (seta).....	33
Figura 11	Imagem fotográfica ilustrando trans-operatório de enxertia da ulna direita em ovino. Notar falha óssea totalmente preenchida por osso cortical alógeno triturado (seta).....	34
Figura 12	Imagem fotográfica ilustrando gelificação do plasma rico em plaquetas (PRP) associado ao osso cortical alógeno triturado (seta).....	35

- Figura 13 Imagem fotográfica ilustrando trans-operatório de enxertia da ulna direita em ovino. A) Notar falha óssea preenchida por osso cortical triturado associado ao plasma rico em plaquetas (PRP) (seta); B) membrana de plasma pobre em plaquetas (PPP) (seta); C) falha óssea preenchida por osso cortical alógeno triturado associado ao PRP e PPP (seta)..... 36
- Figura 14 Imagem radiográfica da ulna esquerda do ovino nº 8 (GO). A) pós-operatório imediato (seta); B) ausência de formação de calo ósseo (seta) aos 90 dias do pós-operatório..... 43
- Figura 15 Imagem radiográfica, em projeção mediolateral, da ulna direita do ovino nº 3 (GP). A) pré-operatória; B) pós-operatório imediato. Notar falha óssea osteoperiosteal de 1,5 de comprimento (seta).. 46
- Figura 16 Imagem radiográfica, em projeção mediolateral, da ulna direita do ovino nº 3 (GP), obtida nos diferentes momentos de observação pós-operatória. A) 15 dias - início de formação de ponte óssea (12,5%) (seta); B) 30 dias – formação de ponte óssea de 25% (seta); C) 45 dias ponte óssea (75%) e formação de calo ósseo (25%) (setas); D) 60 dias - formação de calo ósseo mais intenso (50%) (seta); E e F) aos 75 e 90 dias - notar 100% de ponte óssea e formação de calo ósseo mais intenso (75%) (setas)..... 47
- Figura 17 Imagem radiográfica, em projeção mediolateral, da ulna direita do ovino nº 8 (GO). A) pré-operatória; B) aspecto no pós-operatório imediato. Notar falha óssea osteoperiosteal de 1,5cm de comprimento preenchida por enxerto cortical alógeno triturado (seta)..... 48

- Figura 18 Imagem radiográfica, em projeção mediolateral, da ulna direita do ovino nº 8 (GO), obtida nos diferentes momentos de observação pós-operatória. A) aos 15 dias - início de reabsorção do enxerto de 25% (seta); B) aos 30 dias - notar reabsorção do enxerto de 75% (seta); C) aos 45 dias - 100% de reabsorção do enxerto e união da ulna distal com o rádio (seta); D, E e F) aos 60, 75 e 90 dias - observar união do segmento distal da falha da ulna com o rádio (setas)..... 49
- Figura 19 Imagem radiográfica, em projeção mediolateral, da ulna direita do ovino nº 6 (GO). A) pré-operatória; B) aspecto no pós-operatório imediato. Notar falha óssea osteoperiosteal de 1,5cm de comprimento preenchida por enxerto cortical alógeno triturado (seta)..... 50
- Figura 20 Imagem radiográfica, em projeção mediolateral, da ulna direita do ovino nº 6 (GO), obtida nos diferentes momentos de observação pós-operatória. A) aos 15 dias - início de reabsorção do enxerto (seta); B) aos 30 dias - início de formação calo ósseo (12,5%) e reabsorção do enxerto de 50% (seta); C) aos 45 dias - 100% de reabsorção do enxerto (seta); D) aos 60 dias - formação de calo ósseo mais intenso (100%) e remissão da linha de falha óssea (seta); E e F) aos 75 dias e 90 dias - formação completa de calo ósseo (setas)..... 51
- Figura 21 Imagem radiográfica, em projeção mediolateral, da ulna direita do ovino nº 11 (GPO). A) pré-operatória; B) aspecto no pós-operatório imediato. Notar falha óssea osteoperiosteal de ulna de 1,5cm de comprimento preenchida totalmente por enxerto ósseo cortical triturado associado ao PRP e PPP (seta)..... 52

Figura 22 Imagem radiográfica, em projeção mediolateral, da ulna direita do ovino nº 11 (GPO), obtida nos diferentes momentos de observação pós-operatória. A) aos 15 dias - sem absorção do enxerto (seta); B) aos 30 dias - observar início de formação de ponte óssea (25%) e 25% de reabsorção do enxerto (seta); C) aos 45 dias - notar ponte óssea (87,5%) e reabsorção do enxerto de 87,5% (seta); D) aos 60 dias - observar formação de calo ósseo mais intenso (87,5%) e absorção de 100% do enxerto (seta); D e F) aos 75 dias e 90 dias de pós-operatório, com formação completa de calo ósseo (setas)..... 53

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1	Protocolo experimental, por grupo de ovelhas, relacionado à enxertia com plasma rico em plaquetas (PRP) e plasma pobre em plaquetas (PPP), implante de osso cortical alógeno (OCA), associação de OCA ao PRP+PPP (OCA/PRP/PPP) e sem enxertia na falha óssea da ulna do membro torácico esquerdo (S/TTO).....
	21
Tabela 2	Contagem plaquetária em 1 µL do sangue total, plasma rico em plaquetas (PRP) e plasma pobre em plaquetas (PPP) em 12 ovinos.....
	39
Tabela 3	Avaliação radiográfica percentual comparativa para as falhas ósseas ulnar do membro torácico esquerdo (controle), em função dos grupos de tratamento e em relação à ponte óssea, linha de falha óssea e formação de calo ósseo aos 90 dias de pós-operatório.....
	42
Tabela 4	Avaliação radiográfica percentual comparativa dos animais dos grupos GP, GO e GPO, em relação à formação de ponte óssea, em função dos dias de observação de pós-operatório.....
	43
Tabela 5	Avaliação radiográfica percentual comparativa dos animais dos grupos GP, GO e GPO, em relação à linha de falha óssea, em função dos dias de observação de pós-operatório.....
	44
Tabela 6	Avaliação radiográfica percentual comparativa dos animais dos grupos GP, GO e GPO, em relação à formação de calo ósseo, em função dos dias de observação de pós-operatório.....
	44

Tabela 7	Avaliação radiográfica percentual comparativa dos animais dos grupos GO e GPO, em relação à reabsorção óssea, em função dos dias de observação de pós-operatório.....	45
----------	---	----

UTILIZAÇÃO DE PLASMA RICO OU POBRE EM PLAQUETAS, ASSOCIADO OU NÃO À ENXERTO ÓSSEO CORTICAL ALÓGENO, NA REPARAÇÃO CIRÚRGICA DE FALHA ULNAR EM OVINOS.

RESUMO - A enxertia óssea alógena na ortopedia veterinária é meio seguro e de eleição na reposição de perdas e falhas ósseas em fraturas ou ressecções amplas. A glicerina a 98% é excelente meio de conservação de tecido ósseo, possui efeito bactericida, baixo custo e simplicidade operacional. O plasma rico em plaquetas (PRP) é produto orgânico, derivado do sangue autógeno, utilizado como fonte autógena de fatores de crescimento combinado aos diferentes enxertos e substitutos ósseos. O plasma pobre em plaquetas (PPP) associado ao protocolo de PRP promove melhor cicatrização dos tecidos moles incisados durante o procedimento cirúrgico. Com este estudo objetivou-se, avaliar os efeitos do uso de PRP e PPP associados ou não ao enxerto alógeno de osso cortical conservado em glicerina à 98%, em falhas ósseas ulnares. Foram utilizados 12 ovinos, fêmeas, entre um e dois anos de idade, mestiços da raça Santa Inês, entre 30 a 35 Kg. Os animais foram separados em três grupos de quatro animais cada. Induziu-se, em ambas as ulnas, defeito ósseo de 1,5 cm de comprimento em todo seu diâmetro. A ulna esquerda não recebeu enxertia (controle). No grupo GP implantou-se na ulna direita PRP e PPP. No grupo GO, implantou-se osso cortical alógeno triturado e no grupo GPO implantou-se osso cortical alógeno associado ao PRP e PPP. Comparam-se entre os grupos, a evolução clínica e formação de calo ósseo por exames radiográficos aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório. Os grupos GO e o GPO, durante os períodos de observação, apresentaram melhores resultados na formação de ponte óssea, diminuição da linha de falha óssea e formação de calo ósseo, quando comparados ao grupo GP e a falha sem enxertia (controle), além disso, todos os grupos que receberam enxertia na falha ulnar apresentaram melhores resultados quando comparados à falha controle.

Palavras chave: ortopedia, ovinos, enxertia ulnar, fatores de crescimento e glicerina à 98%

USE OF PLASMA RICH OR POOR IN PLATELETS, WITH OR WITHOUT CORTICAL BONE GRAFTDONOR, SURGICAL REPAIR OF THE ULNAR FAILURE IN SHEEP.

ABSTRACT - The allogeneic bone graft in veterinary orthopedics is secure and choice in the replacement of losses and failures in bone fractures or wide resections. A 98% glycerin is an excellent means of preservation of bone tissue, has a bactericidal effect, low cost and operational simplicity. The platelet-rich plasma (PRP) is an organic product derived from the blood was used as a source of autologous growth factors combined with the different grafts and bone substitutes. The platelet-poor plasma (PPP) protocol associated with the PRP promotes better healing of tissues incised during surgery. This study aimed to evaluate the effects of the use of PRP and PPP associated or not with allograft cortical bone preserved in glycerin to 98% in ulnar bone defects. We used 12 sheep, females, between one and two years old, crossbred Santa Inês, between 30 and 35 kg. The animals were divided into three groups of four animals each. Was induced in both ulnar, bone defect of 1.5 cm in length across its diameter. The left ulna received no graft (control). In the GP group was implanted in the right ulna PRP and PPP. In the OG, it was implanted cortical bone allografts ground and the group GPO was implanted cortical bone allografts associated with the PRP and PPP. Are compared between the groups, the clinical and callus formation by X-ray examinations at 15, 30, 45, 60, 75 and 90 days postoperatively. The GO group and the GPO during the observation periods, showed better results in the formation of bone bridge, reduction of the fault line and bone callus formation, when compared to the GP and graft failure without (control), in addition, all the groups that received the graft failure ulnar showed better results when compared to control failure.

Keywords: Orthopedics, sheep, ulnar nerve grafting, growth factors and glycerine to 98%

I. INTRODUÇÃO

A possibilidade de recuperação de perdas ósseas tem sido um desafio para os profissionais e pesquisadores em medicina veterinária já há algum tempo (COSTA, 1996; PINTO Jr. et al., 1996; DEL CARLO et al., 1999; GIOSO et al., 2002; ZILIOTTO et al., 2003; PAGLIOSA & ALVES, 2007; BARBOSA et al., 2008; SILVA et al., 2009).

O reparo de defeitos ósseos requer grande conhecimento a respeito de materiais que possam preencher estas falhas. Esses materiais podem ser derivados biológicos, sintéticos ou metálicos. Dentre eles, destacam-se os enxertos ósseos e os implantes de biomateriais (GIOSO et al., 2002; MARIA et al., 2003; ANDRADE et al., 2007).

A enxertia óssea de ossos alógenos na ortopedia veterinária é o meio seguro e de eleição na reposição de perdas e de falhas ósseas em fraturas ou ressecções amplas (GIOSO et al., 2002).

Diferentes meios de conservação para aloenxertos corticais são citados na literatura (MELO et al., 1998), porém a glicerina à 98% é a mais utilizada (COSTA, 1996; PINTO Jr. et al., 1996; DEL CARLO et al., 1999; GIOSO et al., 2002; ZILIOTTO et al., 2003).

Dentre os biomateriais, o plasma rico em plaquetas (PRP) tem sido amplamente estudado por melhorar a integração de enxertos, sejam cutâneos, cartilagosos ou de gordura, bem como por estimular a cicatrização de feridas. O PRP, na medicina, é utilizado em cardiologia e em neurocirurgia e, recentemente, tornou-se comum em procedimentos de enxertos ósseos (MARX et al., 1998; LANDSBERG & GLICKMAN, 2000; KIM et al., 2002; WEIBRICH et al., 2004; VIEGAS et al., 2006).

O fundamento da utilização do PRP no processo de regeneração óssea tem respaldo no princípio de que os fatores de crescimento plaquetário, presentes no PRP, atuam diretamente, aumentando a proliferação de pré-osteoblastos, e indiretamente, por promover maior angiogênese (ANDRADE et al., 2007).

Desta forma, nos defeitos ósseos maiores onde células remanescentes não são suficientes para induzir ao reparo, os fatores de crescimento desempenham papel fundamental, capazes de auxiliar as células no processo de reparação óssea (LYNCH et al., 1989).

No entanto, a utilização do PRP deve ser realizada com critério, baseando-se na adequada metodologia de isolamento e de utilização. A aplicação inadequada pode ser um fator determinante na eficácia em enxertos, justificando alguns resultados controversos da utilização do PRP em enxertos ósseos (ANDRADE et al., 2007; PAGLIOSA & ALVES, 2007).

Apesar do grande número de publicações, relacionadas à associação de PRP e enxertia óssea, a literatura científica relativa à aplicação do PRP na reconstrução do tecido ósseo cortical do esqueleto apendicular, em modelos animais, é muito escassa.

Objetivou-se, com o presente estudo, avaliar por meio de exames clínicos e físicos, radiográficos e laboratoriais, a influência do plasma rico em plaquetas e do plasma pobre em plaquetas, associados ou não ao enxerto cortical alógeno triturado conservado em glicerina à 98%, na reparação de grande falha óssea induzida experimentalmente na ulna de ovinos.

II. REVISÃO DA LITERATURA

1. BIOMATERIAIS

Os enxertos ósseos são utilizados desde o século XVI quando Van Meeken transplantou, com sucesso, osso de crânio de cão para um defeito ósseo no homem. A partir de 1800, observa-se emprego de compostos sintéticos para substituição óssea, quando se implantou sulfato de cálcio em defeitos ósseos (NUNES FILHO et al., 2007).

A procura por substâncias naturais ou sintéticas capazes de substituir tecidos ósseos tem sido alvo de muitas pesquisas contemporâneas (WILSON et al., 2006; ANDRADE et al., 2007; DUSSE et al., 2008).

Por ser uma estrutura innervada e irrigada, os ossos apresentam grande sensibilidade e alto potencial de regeneração, porém esta capacidade pode não se manifestar nos defeitos ósseos de grandes dimensões. Nestes casos, o tecido ósseo não exibe capacidade de regeneração espontânea, exigindo procedimentos operatórios reconstrutivos, que tem na enxertia óssea sua principal técnica de tratamento (LYNCH et al., 1989; MARX et al., 1998).

Atualmente, existe grande variedade de opções para enxertos que podem ser derivados biológicos, sintéticos ou metálicos. Dentre eles, destacam-se o osso autógeno (SANTOS & RAHAL, 2004), osso alógeno (ALIEVI et al., 2007), enxertos xenógenos, cerâmicas biocompatíveis, hidroxiapatita sintética, vidros bioativos e polímeros (COSTA, 1996; CAMARINI et al., 2006; ANDRADE et al., 2007; SILVA et al., 2007).

Biomaterial é definido como todo material utilizado para substituir, no todo ou em parte, sistemas biológicos. As próteses produzidas com materiais biológicos de origem animal constituem-se, hoje, opção para os cirurgiões médicos e veterinários, sendo de fácil obtenção, baixo custo e simples conservação. Na literatura, há muitos relatos da utilização de próteses biológicas, com sucesso, na reparação de diversas injúrias, inclusive ósseas, funcionando como arcabouço para formação de tecidos do próprio receptor, sendo incorporados sem provocar rejeição ou induzir processos inflamatórios significativos (COSTA, 1996; PINTO Jr. et al., 1996; DEL CARLO et al., 1999; GIOSO et al., 2002; BARBOSA et al., 2008).

Um material para enxertia óssea é considerado ideal quando apresenta as seguintes características como biocompatibilidade, não ser carcinogênico, apresentar baixo custo, ser gradualmente substituído por tecido da área receptora, com propriedades osteocondutoras e osteoindutoras (CAMARINI et al., 2006).

Os biomateriais devem promover a regeneração óssea e, para isso, necessitam de pré-requisitos tais como fonte de células formadoras de osso, ou células com capacidade de se diferenciar em células formadoras de osso; estímulo indutor para iniciar a diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos; presença de meio osteocondutor formando uma matriz sobre a qual o tecido invasor possa diferenciar-se em osteoblastos e formar osso (GARG, 1999).

Durante as fases iniciais da cicatrização, os biomateriais têm as funções de manter o volume tecidual e a estabilidade mecânica para, posteriormente, serem reabsorvidos e substituídos por novo osso, através da atividade osteoclástica e

osteoblástica, formando a matriz osteóide e mineralização subsequente (DALAPICULA et al., 2006).

Há muitas discussões e controvérsias quanto à utilização de biomateriais para enxerto e reconstrução óssea, sendo do conhecimento de todos que o melhor material é o osso autógeno, devido às propriedades biológicas osteoindutoras e osteocondutoras e à ausência de rejeição (ANDRADE et al., 2007; NUNES FILHO et al., 2007; BARBOSA et al., 2008). No entanto, as fontes de enxertos autógenos são escassas, de modo que o ortopedista necessite utilizar outros materiais ou técnicas para casos complicados que requeiram múltiplos procedimentos de enxertia. Nesses, a fonte principal são os ossos obtidos a partir de animais da mesma espécie, ou seja, aloenxertos (COSTA, 1996; MORELLO et al. 2001; WILSON et al., 2006).

O aloenxerto ou enxerto alógeno envolve dois indivíduos da mesma espécie, porém, sem parentesco. O enxerto ósseo cortical é o mais usado para promover estabilidade ao foco da fratura, com a finalidade de reconstrução e estabilidade mecânica. O osso cortical pode ser colhido e imediatamente transplantado a fresco ou colhido e armazenado em bancos de ossos, portanto, um único doador pode fornecer vários segmentos ósseos (MELO et al., 1998; ZILIOTTO et al., 2003).

Com relação aos meios de conservação de implantes corticais, vários métodos são citados na literatura. Entre eles destacam-se glicerol (MELO et al., 1998), mel (ALIEVI et al., 2007), congelamento (MORELLO et al., 2001), óxido de etileno e glicerina 98% (COSTA, 1996; PINTO Jr. et al., 1996; DEL CARLO et al., 1999; GIOSO et al., 2002; ZILIOTTO et al., 2003), visam a preservar a integridade física do implante e

da proteína osteoindutora, a reduzir a sua imunogenicidade e a preservar a sua esterilidade.

Na medicina veterinária, a glicerina a 98% é o método de conservação mais utilizado atuando com eficiência para fragmentos ósseos, mantendo-os livres de contaminação bacteriana durante o período de estocagem, mesmo por períodos longos de tempo (GIOSO et al., 2002). Além disso, a glicerina possui ação redutora da antigenicidade, preservando as funções de osteoindução e a osteocondução, sendo bom substituto ao método de congelamento, além de apresentar baixo custo (COSTA, 1996; PINTO Jr. et al., 1996; DEL CARLO et al., 1999; GIOSO et al., 2002; ZILIOTTO et al., 2003).

A osteoindução é uma das principais propriedades atribuídas aos enxertos ósseos. O termo refere-se ao processo pelo qual ocorre diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas, presentes no tecido circunjacente ao local do enxerto, em células de linhagem osteogênica. Esse mecanismo está relacionado à atividade da proteína morfogenética do osso (BMP) contida na matriz óssea (BESSHO & IZUKA, 1994).

CAVASSANI et al. (2001) relataram a preservação da atividade osteoindutora em fragmentos ósseos conservados em glicerina a 98%, durante 30 dias, em temperatura ambiente. Como a glicerina desidrata o tecido ósseo e preserva a concentração iônica das células, mantendo a integridade celular, provavelmente, a mesma preserva a função osteoindutora do material implantado, por conferir algum tipo de proteção à BMP.

O conhecimento crescente dos eventos moleculares e celulares envolvidos na reparação óssea em fraturas permitiu ampliar as possibilidades terapêuticas em enxertos ósseos (PAGLIOSA & ALVES, 2007).

Além do desenvolvimento dos biomateriais, a partir da década de 90, vem se desenvolvendo terapia baseada na associação de fatores de crescimento aos enxertos, buscando acelerar e melhorar o reparo ósseo (MARX et al., 1998).

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um adjuvante recentemente introduzido neste contexto. Gel de plaquetas, fonte autógena de fator de crescimento, coquetel natural de fatores de crescimento, tecido rico em plaquetas e concentrado plaquetário são os sinônimos do PRP. Independentemente da denominação recebida, desde o início da sua aplicação, tem aumentado a esperança de que intensifique a neoformação óssea (ANDRADE et al., 2007).

2. PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)

2.1. Fatores de crescimento

As plaquetas atuam na hemostasia, na cicatrização de feridas e na neovascularização. Elas liberam diversos fatores de crescimento que estimulam a angiogênese, promovendo crescimento vascular e proliferação de fibroblastos, que, por sua vez, proporcionam aumento na síntese de colágeno. Fatores de crescimento (FCs) são polipeptídios específicos, presentes no plasma e em tecidos, que regulam a

diferenciação e a proliferação celulares e, portanto, a regeneração de tecidos (MARX, 2004).

Vários FCs têm sido relacionados à reparação do osso. Alguns desses FCs, como os fatores de crescimento derivados das plaquetas (PDGF), fatores de crescimento transformadores α e β (TGF- α e TGF- β), fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fatores de crescimento epitelial (EGF) e fatores de crescimento semelhantes à insulina I e II (IGF-I e IGF-II) estão contidos em grânulos das plaquetas (MARX et al., 1998). A ação conjunta desses fatores resulta na sinalização para que células mesenquimais e epiteliais migrem para o local lesado, sofram divisão mitótica, estimulem a síntese de matriz e colágeno, resultando em cicatrização mais rápida e eficiente. Além disso, outras proteínas das plaquetas como fibrina, fibronectina e vitronectina, atuam como moléculas de adesão celular, osteocondução e osteoindução (MARX et al., 1998; TÖNZÜM & DEMIRALP, 2003; ANDRADE et al., 2007).

Os fatores de crescimento locais e sistêmicos atuam nas fases de inflamação, reparo e remodelação durante a cicatrização óssea, exercendo funções importantes em cada uma dessas fases (MARX, 2004).

O PRP é uma fonte autógena, atóxica e não imunogênica de fatores de crescimento que apresenta, em sua constituição plasma, leucócitos e plaquetas. No plasma estão contidos diversos fatores de coagulação, leucócitos que conferem resistência natural aos agentes infecciosos e imunogênicos, e plaquetas que sofrem degranulação nos sítios de lesão liberando fatores de crescimento (MARX et al., 1998).

Os FCs do PRP agem nas células osteoprogenitoras, diferenciando-as e auxiliando o trabalho das células presentes no osso pré-existente, diminuindo, assim, sua reabsorção. Como os fatores de crescimento derivados das plaquetas são altamente instáveis e não duram muito em estado livre na corrente sanguínea, o PRP é veículo adequado para aumentar sua concentração nos tecidos lesados (WILSON et al., 2006).

O PRP possui, também, proteínas osteocondutoras, que servem de matriz para a migração epitelial e a formação óssea e do tecido conectivo (KIM et al., 2002). Estas propriedades tornam o PRP produto com grande potencial para melhorar a integração de enxertos (MARX, 2004).

2.2 Plasma pobre em plaquetas

Estudos recentes demonstram os benefícios do uso de plasma pobre em plaquetas (PPP) em cirurgias com descolamento de retalhos. O PPP ou cola de fibrina autógena é utilizado, na enxertia óssea, como membrana para auxiliar a cicatrização de tecidos moles presentes no sítio da enxertia (MAN et al., 2001; ALMEIDA et al., 2008; ROMEIRO et al., 2008).

Os autores evidenciaram que o uso do PPP acelera a cicatrização, diminui o sangramento capilar local, reduz o tempo cirúrgico, elimina a necessidade de dreno, reduz o uso de curativos de pressão e diminui a dor pós-operatória (MAN et al., 2001; BROWN et al., 2006; ALMEIDA et al., 2008).

2.3 Processos de obtenção dos plasmas rico e pobre em plaquetas

As primeiras formas de extração do plasma rico em plaquetas e do pobre em plaquetas para utilização em cirurgias empregavam máquinas de autotransfusão, para fazer a separação celular do sangue que circulava por ela proveniente de cateter venoso profundo colocado no paciente durante a cirurgia. A técnica inicialmente descrita foi proposta por meio do método de separação celular descontínua, onde, normalmente, eram necessários de 400 a 450 mL de sangue e de pessoal especializado para operar o equipamento (MARX et al., 1998). Esse método, porém, é limitado pela técnica empregada e pelo volume de sangue necessário, ficando restrito a institutos de transfusão de sangue ou a ambientes hospitalares (TÖNZUM & DEMIRALP, 2003).

Recentemente, com alguns protocolos simplificados têm-se conseguido a obtenção do PRP com custos menores e utilizando-se de centrífugas convencionais. Embora mais trabalhosos, os protocolos simplificados permitem a preparação do PRP com custo dez vezes menor e em ambientes mais simples (ANUITA, 1999; LANDENBERG & GLICKMAN, 2000; VENDRAMIN et al., 2006).

A preparação do PRP, em si, é simples e está ao alcance de qualquer cirurgião que disponha de centrífuga com regulação de velocidade (MARX et al., 1998; LANDENBERG & GLICKMAN, 2000; BARBOSA et al., 2008; ROMEIRO et al., 2008). Como o PRP é uma preparação autógena, não há risco de rejeição para o paciente, inclusive de infecções no local operatório (WILSON et al., 2006; ANDRADE et al., 2007).

O PRP é obtido pela centrifugação do sangue recém colhido, utilizando-se citrato de sódio como anticoagulante, em velocidade baixa, de modo a sedimentarem-se as hemácias e manterem-se os leucócitos e as plaquetas em suspensão no plasma. O processo permite a concentração de grande número de plaquetas em condição de liberar os fatores de crescimento, em pequeno volume de plasma. O citrato de sódio é o anticoagulante de escolha, pois não altera os receptores de membrana das plaquetas. Para o preparo do PRP em laboratórios clínicos, é fundamental observarem-se as condições assépticas de manipulação do sangue, de modo a evitar sua contaminação (DUSSE et al., 2008). Sua preparação demora, em média, 45 minutos, após a coleta do sangue (VENDRAMIN et al., 2006).

Os protocolos e as técnicas cirúrgicas utilizadas no preparo e na administração do PRP e do PPP diferem-se amplamente (ANUITA, 1999; LANDESBURG & GLICKMAN, 2000; WEIBRICH et al., 2004; PAGLIOSA & ALVES, 2007), causando variações em propriedade fundamental, ou seja, a concentração de plaquetas, o que pode influenciar marcadamente o efeito biológico dos plasmas.

MARX et al. (1998) afirmam que um protocolo de dupla centrifugação é essencial para que possa, verdadeiramente, concentrar as plaquetas durante o preparo de PRP. Segundo os autores, não só o número de centrifugações é importante no preparo do PRP, mas a força de rotação selecionada. O aumento desta pode garantir maior concentração de plaquetas.

Para ser considerado PRP, a concentração mínima deve ser de 500.000 a 1.000.000 plaquetas por μL (ANUITA, 1999; OBARRIO et al., 2000; MARX, 2004; SILVA et al., 2009) ou, ainda, possuir aumento de 300 a 400% de plaquetas em relação

à quantidade presente no sangue periférico para que se possa acelerar a reparação do osso (KIM et al., 2002; WEIBRICH et al., 2004). Quanto maior o número de plaquetas no sangue total, mais rico em plaquetas será o PRP (SILVA et al., 2007; BARBOSA et al., 2008; MESSORA et al., 2009).

MESSORA et al. (2009) avaliaram um protocolo de única centrifugação, para o preparo do PRP. Os autores concluíram que o protocolo foi capaz de concentrar plaquetas em níveis menores que o dobro da quantidade presente no sangue periférico.

Segundo MARX (2001), os protocolos de única centrifugação não produzem PRP, mas uma mistura de PPP com PRP.

Não apenas o número de plaquetas das preparações deve ser observado, mas também os aspectos qualitativos, ou seja, a função das plaquetas. Um número considerável de plaquetas, porém com viabilidade comprometida, certamente não proporcionará o efeito desejado, já que os fatores de crescimento essenciais para o sucesso da preparação podem ser eliminados em consequência de procedimentos inadequados (DUSSE et al., 2008).

A avaliação da atividade biológica dos fatores de crescimento derivados das plaquetas é complexa, de modo que não há como avaliar previamente a qualidade do gel produzido (LANDSBERG & GLICKMAN, 2000).

Independente do número de centrifugações utilizado, depois de obtido, o plasma pode ser gelificado por meio da adição de trombina bovina ou autógena e gluconato de cálcio. A trombina, na presença do cálcio, promove a clivagem do fibrinogênio plasmático em fibrina e atua promovendo a polimerização dessa enzima. Forma-se um composto insolúvel, de consistência semelhante à de um gel, que estimula a

degranulação das plaquetas e a liberação de ocitocinas que funcionam como fatores de crescimento (OBARRIO et al., 2000; VENDRAMIN et al., 2006).

O gel de plaquetas obtido após gelificação facilita sua aplicação em diversas cirurgias e também ativa plaquetas (EFEUGLU et al., 2004; VENDRAMIN et al., 2006). A trombina bovina pode ser substituída, com sucesso, pelo Soluplastin®¹, coagulante contendo, em sua composição, tromboplastina de cérebro de coelho, cloreto de cálcio e cloreto de sódio, formando um gel consistente (BARBOSA et al., 2008).

Na literatura, observa-se resultados paradoxais com relação à neoformação óssea, após o uso de PRP, uma vez que utilizam-se diferentes protocolos para obtenção de gel de plaquetas. A obtenção de número reduzido de plaquetas no PRP, bem como a fragmentação ou ativação precoce das plaquetas durante a coleta e manipulação do sangue, pode resultar na liberação dos fatores de crescimento antes do preparo do gel, influenciando no sucesso do procedimento (DUSSE et al., 2008).

3. UTILIZAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM FALHAS ÓSSEAS

Os trabalhos têm demonstrado que o uso da técnica do PRP pode representar estratégia disponível para modular e acelerar a reparação óssea, fornecendo matriz osteocondutiva natural, além de aumentar a velocidade e a densidade de formação do osso (MARX et al., 1998).

WILSON et al. (2006) utilizaram o PRP para reparar falha óssea diafisária segmentar, de meia espessura e 2 cm de comprimento, produzida no rádio de coelhos.

¹ Soluplastin – Wiener lab. S.A.I.C, Rosário, Argentina

Os resultados da investigação indicaram que o PRP proporciona reação favorável em ossos longos.

MARX et al. (1998) e ANUITA (1999) informaram sobre a capacidade do PRP, utilizado isoladamente de acelerar o reparo ósseo, promovendo osso maduro e compacto. Segundo os autores, o período de vida das plaquetas no gel é de três a cinco dias e a atividade de seus fatores se extingue em sete a 10 dias, porém o reforço inicial oferecido é benéfico, pois acelera a cascata de eventos da reparação.

Segundo NUNES FILHO et al. (2007), PRP é um gel e não apresenta consistência para comportar-se como material de preenchimento em falhas ósseas.

Em estudos recentes, nos quais se utilizou o PRP isoladamente em falhas ósseas, quando comparadas com falhas sem preenchimento (controle), não foram observadas diferenças significativas. Além disso, os autores afirmaram que o PRP isoladamente não forma osso novo por estimulação e diferenciação de células mesenquimais. Como o PRP não é citodiferenciador, biomateriais osteoindutores ou precursores de osteoblastos presentes na medula e em enxertos autógenos, seriam necessários para iniciar a neoformação óssea (ARPORNMAEKLONG et al., 2004; NUNES FILHO et al., 2007; SILVA et al., 2009).

4. UTILIZAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS ASSOCIADO A ENXERTOS ÓSSEOS E BIOMATERIAIS

O gel de plaquetas constituído essencialmente por PRP tem sido utilizado, na medicina, em cirurgia oral, bucomaxilofacial e em procedimentos de reconstrução para

implantodontia, visando a acelerar o reparo da ferida cirúrgica e a reparação óssea (MARX et al., 1998; KIM et al., 2002; ALBUQUERQUE et al., 2008). Em ortopedia, a associação do PRP ao tratamento convencional tem proporcionado resultados animadores no tratamento de fraturas, em associação com enxertos ósseos autógenos ou alógenos e outros materiais substitutos como a hidroxiapatita sintética, vidros bioativos e polímeros (WILSON et al., 2006; ANDRADE et al., 2007; DUSSE et al., 2008). Há, todavia, poucos relatos sobre efeitos benéficos sobre a cicatrização dos ossos longos (LUCARELLI et al., 2005).

MARX et al. (1998) relataram que a eficiência dos fatores de crescimento liberados pelas plaquetas ocorre desde o início da cirurgia, contribuindo para a neoformação óssea desde o primeiro estágio, determinando a aceleração no reparo dos tecidos e produzindo tecido ósseo de maior densidade. Os resultados da associação do PRP com enxertos ósseos têm mostrando consolidação mais rápida e mineralização do enxerto em 50% do tempo requerido, além de aumento de 15% a 30% na densidade do osso trabecular.

A associação de enxerto autógeno e PRP em falhas ósseas aumentam a eficiência do reparo já na segunda semana, sugerindo que a associação é benéfica para os momentos iniciais da reparação e favorece a estabilidade do osso neoformado, a longo prazo (ANDRADE et al., 2007).

O PRP associado ao enxerto ósseo representa instrumento para minimizar a absorção da matriz enxertada e incrementar o potencial osteocondutor do osso aposicionado (ANDRADE et al., 2007). Não obstante, o enxerto ósseo particulado associado ao PRP permite melhor acomodação do enxerto, que pode ser utilizado em

menor quantidade e ser melhor incorporado ao leito receptor, sem risco de extrusão (ROMEIRO et al., 2008).

Outro importante fator adicional que sustenta a mais rápida reparação do osso é a melhora do reparo dos tecidos moles que revestem defeitos ósseos tratados com enxerto e PRP, resultando em melhor cobertura do microambiente ósseo em cicatrização (ANDRADE et al., 2007)

A maioria das pesquisas encontradas na literatura mostra melhora significativa na regeneração óssea e tecidual, quando o PRP, associado a enxerto ósseo, é utilizado. BARBOSA et al. (2008) comprovaram a eficácia do PRP com enxertos autógenos em cirurgias da tíbia; WILSON et al. (2006) o fizeram em cirurgias no rádio de coelhos; LUCARELLI et al. (2005) especificamente em ossos metatarsianos em ovelhas; KIM et al. (2002) em defeitos periodontais e NUNES FILHO et al. (2007) com enxerto autógeno e PRP em cães.

Apesar de bons resultados com a utilização de enxertos ósseos associados ao PRP, algumas pesquisas não demonstram diferenças significativas em relação à reparação óssea, quando comparada à utilização apenas da enxertia (VIEGAS et al., 2006) especificamente quando se faz a associação de enxerto de osso esponjoso autógeno ao PRP.

CAMARINI et al. (2006) avaliaram possível atividade aceleradora na reparação óssea, quando utilizaram PRP associado a biomateriais em cavidades ósseas produzidas em mandíbula de cães. Em cada grupo utilizaram-se os seguintes materiais: Grupo I: sangue (Grupo Controle); Grupo II: sangue e PRP; Grupo III: vidro bioativo e sangue; Grupo IV: vidro bioativo, PRP e sangue; Grupo V: hidroxiapatita natural de

origem bovina e sangue; Grupo VI: hidroxiapatita, PRP e sangue. Da análise microscópica, concluíram que os biomateriais estudados não interferiram com a evolução da reparação, e a presença ou não do PRP não interferiu com a evolução do reparo ósseo.

SILVA et al. (2007) avaliaram os efeitos do PRP combinado à hidroxiapatita não-absorvível na formação óssea em fraturas diafisárias, induzidas experimentalmente em rádio de cães e fixadas com placas e parafusos ósseos. Tanto na avaliação radiográfica como na densitométrica não se observaram diferença significativa na evolução do calo ósseo entre os grupos. Concluíram os autores, que o PRP autógeno combinado à hidroxiapatita não acelerou o processo de formação do calo ósseo, quando da comparação com hidroxiapatita somente.

Com o objetivo de se avaliar clinicamente aspectos da reparação óssea, BARBOSA et al. (2008) induziram falhas mediais no terço proximal de cada tíbia de cães. Assim, a falha 1 não foi preenchida, constituindo o controle, a falha 2 foi preenchida com 3mg de enxerto ósseo autógeno da crista da tíbia, a falha 3 com gel de plaquetas (PRP) e a falha 4 com a associação PRP e 3mg de enxerto ósseo autógeno. A comparação da radiopacidade na região da falha, em todos os tratamentos, e ao longo do tempo mostrou que o PRP associado ao enxerto determina maior precocidade e uniformidade de radiopacidade, quando comparada à falha preenchida pelo PRP e ao enxerto usados isoladamente. Ambos proporcionam melhores resultados de preenchimento, que a falha mantida sem preenchimento.

NUNES FILHO et al. (2007) avaliaram, histologicamente, os efeitos do PRP associado ou não ao osso autógeno particulado no reparo de falhas ósseas em cães.

Em seus resultados, observou-se que nas cavidades preenchidas pelo gel de PRP havia a presença, em todos os animais, de tecido conjuntivo no centro da loja enquanto no grupo da associação do PRP com osso autógeno a cavidade estava totalmente preenchida por osso neoformado. Segundo o autor, o gel de PRP, isoladamente, não promove reparo da falha óssea.

SILVA et al. (2009) avaliaram a influência do PRP, associado ou não, ao autoenxerto esponjoso na reparação de falhas ósseas criadas no crânio de coelhos. O comportamento dos dois tratamentos, em relação a reparação óssea, foi semelhante ao final do período de observação.

VIEGAS et al. (2006) testaram a capacidade osteogênica, à histologia e à histomorfometria óssea, de enxerto de osso esponjoso autógeno isolado e da sua associação com PRP, em modelo de defeito ósseo cortical circular em ovelhas. A associação possibilitou a obtenção de resultados idênticos na formação de tecido ósseo aos dos defeitos ósseos preenchidos apenas com enxerto, porém, reduzindo para metade a quantidade de enxerto ósseo requerido, o que implicaria em menor morbidade do local doador.

Segundo ARPORNMAEKLONG et al. (2004), a forma dos defeitos ósseos criados em alguns estudos pode facilitar a proteção do micro ambiente em regeneração. Quando a área cirúrgica em cicatrização está em contato direto com os tecidos moles vizinhos, os fatores de crescimento podem estimular a proliferação de fibroblastos, resultando em maior fibrose no tecido neoformado. Isso porque a secreção de fibras ocorre mais precocemente, quando a comparada à formação da matriz óssea, demonstrando a importância do leito cirúrgico nos procedimentos de enxertias.

Métodos inadequados pode ser fator determinante na ineficácia de enxertos ósseos, justificando alguns resultados controversos, quanto à utilização do PRP em enxertos ósseos (PAGLIOSA & ALVES, 2007).

III. MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados, para o estudo, ovinos que não apresentaram alterações clínicas, radiográficas e laboratoriais, provenientes de fazenda destinada à reprodução. Os protocolos anestésicos, cirúrgicos e a manutenção dos animais foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética e Bem Estar animal da FCAV - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

A fase experimental do estudo foi realizada na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Garça – FAMED, Garça - SP.

1. ANIMAIS

1.1 Grupos experimentais

Foram utilizados 12 animais da espécie ovina, mestiços, da raça Santa Inês, fêmeas, entre um e dois anos de idade, pesando entre 30 e 35 kg, distribuídos em três grupos (GP, GO e GPO), com quatro animais cada.

Os animais foram submetidos à ostectomia bilateral da porção proximal da ulna, resultando em falha óssea de segmento osteoperiosteal, em todo o seu diâmetro, com 1,5cm de comprimento. Implantou-se, no local da falha óssea do membro torácico direito do grupo GP, plasma rico em plaquetas e plasma pobre em plaquetas; no grupo GO, somente osso cortical alógeno (OCA); e no grupo GPO, implantou-se PRP, PPP e OCA.

A falha óssea induzida no membro torácico esquerdo de todos os animais permaneceu vazia, para servir como controle (Tabela 1).

Tabela 1. Protocolo experimental, por grupo de ovelhas, relacionado à enxertia com plasma rico em plaquetas (PRP) e plasma pobre em plaquetas (PPP), implante de osso cortical alógeno (OCA), associação de OCA ao PRP+PPP (OCA/PRP/PPP) e sem enxertia na falha óssea da ulna do membro torácico esquerdo (S/TTO).

ANIMAIS	GRUPOS	FALHA ÓSSEA	FALHA ÓSSEA
		MEMBRO TORÁCICO DIREITO	MEMBRO TORÁCICO ESQUERDO
1	GP	PRP + PPP	S/TTO
2	GP	PRP + PPP	S/TTO
3	GP	PRP + PPP	S/TTO
4	GP	PRP + PPP	S/TTO
5	GO	OCA	S/TTO
6	GO	OCA	S/TTO
7	GO	OCA	S/TTO
8	GO	OCA	S/TTO
9	GPO	OCA/PRP/PPP	S/TTO
10	GPO	OCA/PRP/PPP	S/TTO
11	GPO	OCA/PRP/PPP	S/TTO
12	GPO	OCA/PRP/PPP	S/TTO

GP: grupo plasma; GO: grupo osso cortical; GPO: grupo plasma associado ao osso cortical; S/TTO: sem tratamento.

1.2 Doadores de ossos

Como doadores, foram utilizados dois ovinos, fêmeas, mestiços da raça Santa Inês, com idade estimada de um a dois anos, com peso entre 30 e 40 Kg, livres de doenças infecto-contagiosas, metabólicas e neoplásicas, ou de alterações musculoesqueléticas, provenientes da mesma propriedade dos demais animais do estudo.

A colheita de fragmentos ósseos foi efetuada em sala cirúrgica, sob todos os princípios de assepsia, imediatamente após a eutanásia dos animais. Com o auxílio de serra oscilatória, realizou-se a remoção dos ossos longos dos oito membros. Epífises, restos musculares e periósteo foram removidos com auxílio de serra manual e bisturi. Para a remoção da medula óssea, foi utilizado pino metálico com rosca sob água corrente. A seguir, os fragmentos ósseos foram imersos em glicerina a 98%², os frascos identificados com data de colheita, idade, peso e sexo, fechados e mantidos à temperatura ambiente, por no mínimo 30 dias.

1.3 Avaliação geral dos pacientes e cuidados pré-operatórios

Os animais foram submetidos a período de adaptação de 30 dias antes de serem encaminhados à cirurgia. Durante o período, realizaram-se hemograma completo e contagem de plaquetas foi determinada no período pré-operatório imediato.

No dia anterior a confecção das falhas ósseas, os animais foram submetidas à tricotomia dos membros torácicos, mantidos em baias sob jejum de sólidos e de líquidos de 12 e duas horas, respectivamente.

Durante o período experimental, os animais foram mantidos confinados a pasto, com suplementação de silagem de milho, concentrado (0,5 kg/animal/dia), sal mineral e água *ad libitum*.

² Glicerina a 98% - Labynt, Prod. Lab. Ltda, Diadema - SP

2. PROCEDIMENTOS PRÉ-OPERATÓRIOS

2.1 Coletas de sangue

Previamente ao início do ato cirúrgico, foi coletado um volume total de 10,8ml de sangue de cada animal, por punção venosa jugular, para extração do PRP e do PPP. Para este procedimento foram utilizados três tubos de vacutainer de 3,6ml, estéreis, contendo 0,5ml de citrato de sódio cada tubo.

2.2. Protocolo de obtenção dos plasmas rico e pobre em plaquetas

Os tubos de vacutainer contendo sangue foram centrifugados³ durante três minutos a velocidade de 3.500 rpm, promovendo a separação das células vermelhas que, por terem peso específico maior, depositaram-se na parte inferior do tubo. A parte superior de cada tubo permaneceu o plasma com as plaquetas e, entre estas duas camadas (células vermelhas e plasma com plaquetas), encontrava-se uma coluna fina e esbranquiçada, denominada zona de névoa (plasma riquíssimo em plaquetas), que contém células brancas, principalmente leucócitos e plaquetas maiores.

Com o auxílio de pipeta milimetrada, foi coletado 1,0 ml de plasma de cada tubo, contendo a zona de névoa (plasma riquíssimo em plaquetas) e parte da porção superior do plasma (plasma rico em plaquetas). Do total de 3 ml de plasma obtidos dos três

³ Centrífuga Fanem Ltda. (Excelsa II 206 MP) – Guarulhos - SP

tubos de vacutainer, 2 ml foram transferidos para um único tubo visando à obtenção de plasma rico em plaquetas (Figuras 1 e 2).

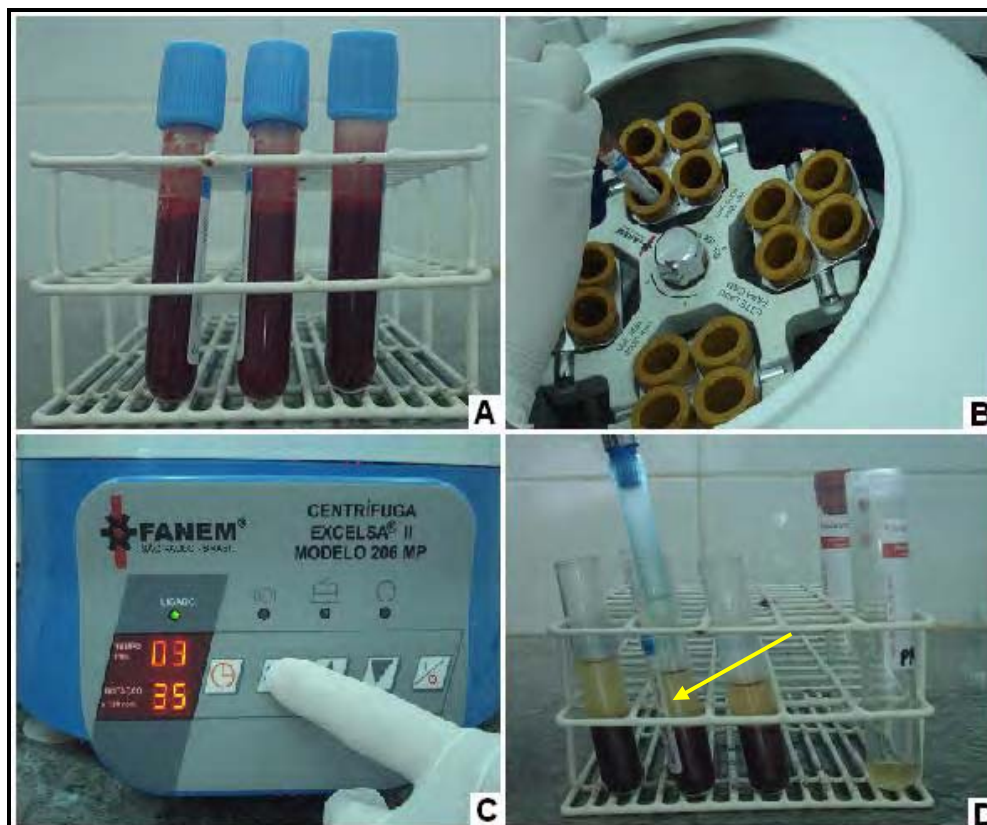


Figura 1. Imagem fotográfica ilustrando obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP). A) sangue coletado do animal no período pré-operatório; B) colocação dos tubos em centrífuga; C) centrifugação do sangue por três minutos a 3.500rpm; D) pipetagem do PRP (seta).

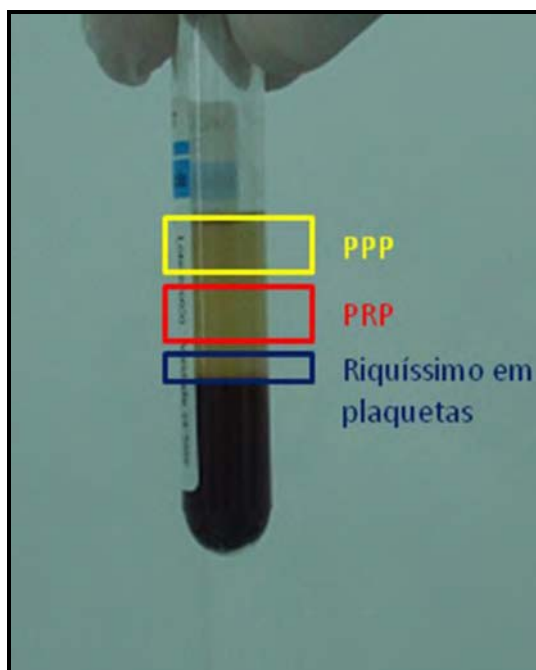


Figura 2. Localização das colunas de plasma riquíssimo em plaquetas, plasma rico em plaquetas (PRP) e de plasma pobre em plaquetas (PPP), após primeira centrifugação.

Ato contínuo, os três tubos de vacutainer foram novamente centrifugados, por 15 minutos e a 3.500 rpm, para a separação do plasma e das células vermelhas restantes. Após esta segunda centrifugação, 1 ml do plasma sobrenadante de cada um dos tubos foi pipetado e dos 3 ml de plasma obtidos, 2 ml foram transferidos para um único tubo obtendo-se, desta maneira, o plasma pobre em plaquetas (Figura 3 e 4).

O processo para a obtenção do PRP e do PPP foi realizado em 35 minutos, em temperatura ambiente, de forma estéril e com mínima manipulação do material. Amostras desses plasmas foram separadas para a contagem manual do número de plaquetas presentes por amostra.

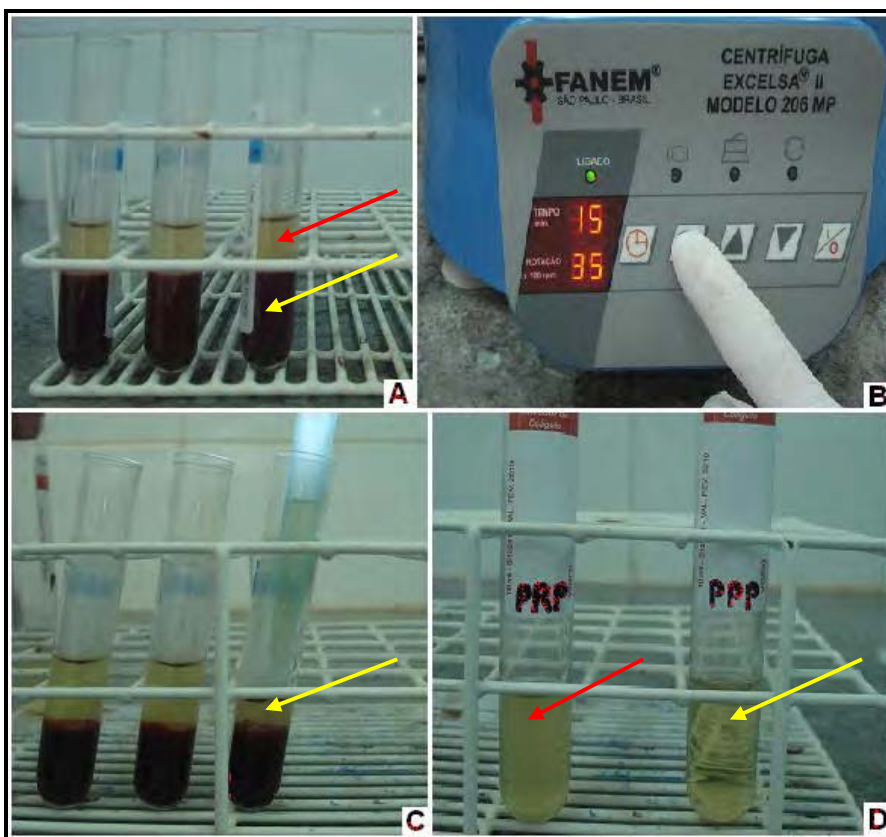


Figura 3. Imagem fotográfica ilustrando a obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). A) plasma sobrenadante da primeira centrifugação (seta vermelha) e células vermelhas (seta amarela); B) centrifugação; C) pipetagem do plasma PPP (seta); D) tubos com 2 ml de PRP (seta vermelha) e 2 ml de PPP (seta amarela).

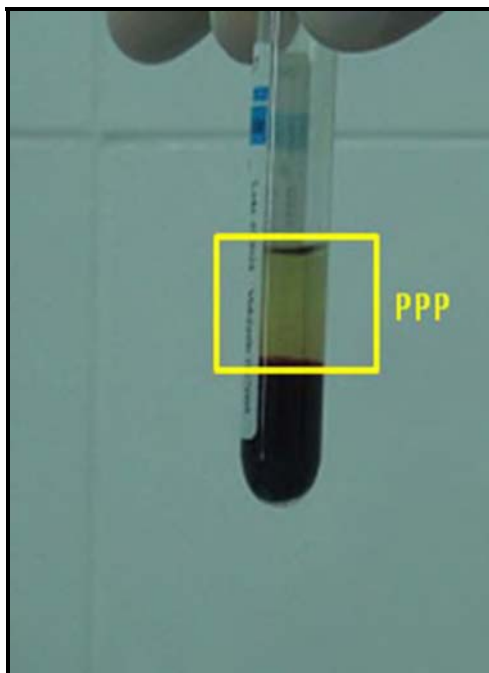


Figura 4. Localização do plasma pobre em plaquetas (PPP), após a segunda centrifugação.

2.3 Procedimentos anestésicos.

Enquanto o PRP e o PPP foram processados, os animais foram pré-anestesiados com acepromazina⁴ (dose 0,2mg/kg) por via intramuscular e, decorridos 20 minutos, receberam indução anestésica com tiopental sódico⁵ (dose 8mg/kg), por via intravenosa. Para a manutenção, utilizou-se anestésico halogenado⁶ (halotano) diluído em oxigênio, administrado por sonda endotraqueal, em circuito com reinalação de gases. A concentração dos gases foi suficiente para manter o paciente no 2º plano do III estágio de Guedel.

⁴ Acepran 10% - UNIVET, Cambuci - SP

⁵ Thiopental Sódico 1g - Cristália, Itabira - SP

⁶ Tanohalo 250ml – Cristália, Itabira - SP

Os animais foram posicionados em mesa cirúrgica, com auxílio de calha, em decúbito dorsal, de forma a permitir a abordagem cirúrgica à porção proximal da ulna. Procedeu-se preparação do campo cirúrgico. Realizaram-se antissepsia e colocação dos panos de campo. A extremidade dos membros foi isolada, com atadura estéril.

3. PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

3.1 Ostectomia de ulna

A abordagem cirúrgica da ulna foi realizada pela face caudal proximal dos antebraços. Realizada a incisão longitudinal de pele, com aproximadamente 10 cm, e após a divulsão do tecido ulnar subcutâneo e fáscia, os músculos locais foram rebatidos com auxílio de afastadores (Figura 5).

Após exposição da ulna, primeiramente a do membro torácico direito, esta foi submetida à ostectomia transversa, com auxílio de micro serra elétrica⁷, removendo-se um segmento osteoperiosteal em todo o seu diâmetro com 1,5 cm de comprimento. Durante a secção óssea, a área local foi constantemente irrigada com solução salina estéril (Figura 6). De maneira semelhante, realizou-se a ostectomia da ulna do membro torácico esquerdo.

⁷Micro-serra cirúrgica sagital elétrica – Dentsclear, Ribeirão Preto - SP

A ferida cirúrgica de ambos os membros torácicos, após a aplicação das enxertias, tiveram a fáscia muscular, o tecido subcutâneo e a pele suturadas com fio de náilon⁸ 2-0 não absorvível.

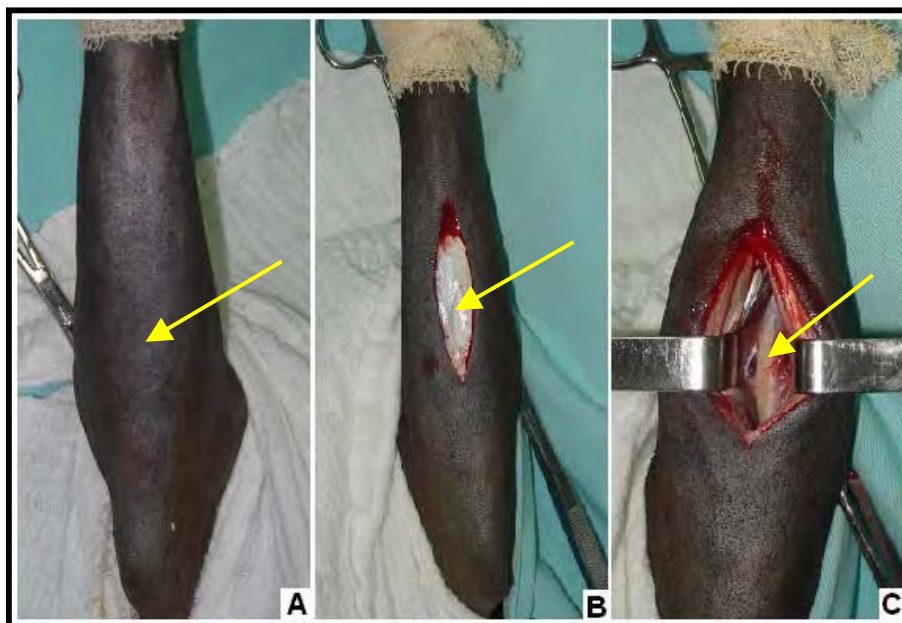


Figura 5. Imagem fotográfica ilustrando o acesso cirúrgico a ulna em ovino. A) face caudal do membro torácico para abordagem da porção proximal da ulna (seta); B) incisão de pele, subcutâneo e fáscia (seta) e C) músculos afastados para exposição da ulna (seta).

⁸ Mononylon – Ethicon – Johnson & Johnson, São José dos Campos - SP

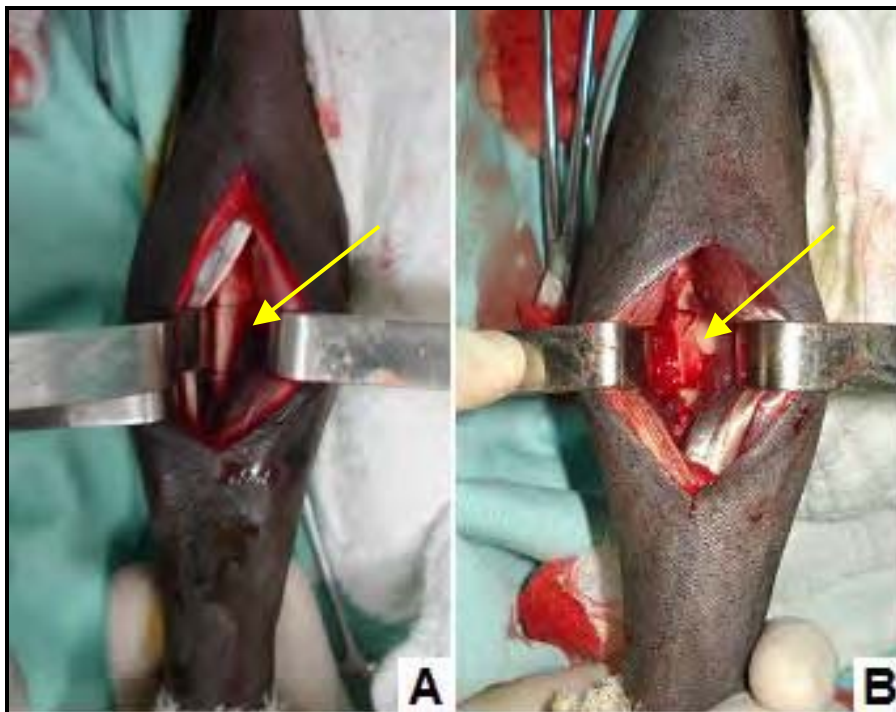


Figura 6. Imagem fotográfica ilustrando trans-operatório de ostectomia da ulna direita em ovino. A) Nota-se fragmento osteoperiosteal em todo o seu diâmetro (seta) e B) falha óssea de 1,5 cm de comprimento (seta).

3.2 Enxertia de plasma rico e plasma pobre em plaquetas no grupo GP

Para a enxertia da falha óssea ulnar nos animais do grupo GP, os PRP e PPP, foram removidos dos tubos e colocados separadamente em cuba e placa de Petri. Foi adicionado aos plasmas 1ml de Soluplastin⁹, proporção 2:1, ou seja, 2ml de plasma para 1ml do coagulante, para promover a coagulação (Figuras 7 e 8).

⁹ Soluplastin – Wiener Lab. . S.A.I.C, Rosário, Argentina

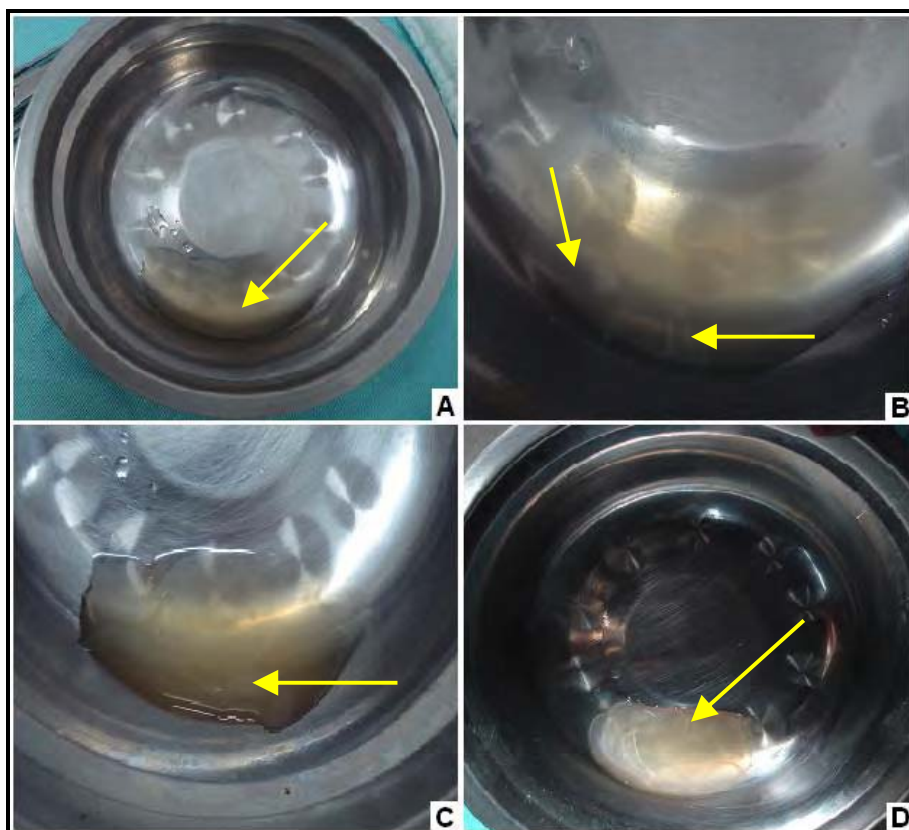


Figura 7. Imagem fotográfica ilustrando sequência de gelificação do plasma rico em plaquetas (PRP). A) 2 ml de PRP (seta); B) Início de agregação plaquetária após adição de soluplastin® (setas); C) coagulação plaquetária (seta); e D) gel de plaquetas (seta).

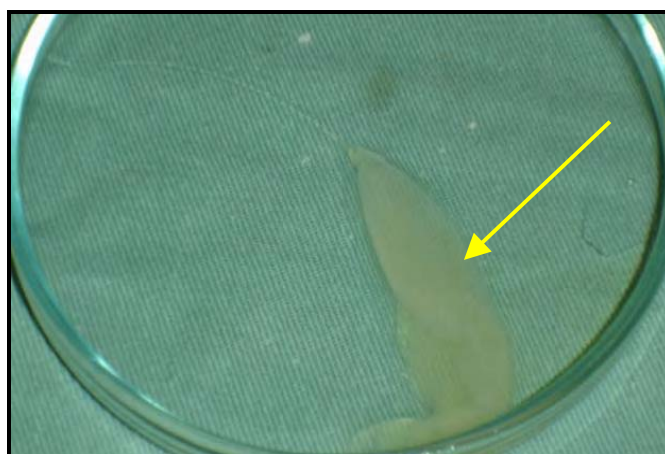


Figura 8. Imagem fotográfica ilustrando processo de gelificação do plasma pobre em plaquetas (PPP). Observar coagulação após adição de soluplastin® (seta).

O gel de PRP foi implantado na falha ulnar, preenchendo-a em sua totalidade, e o PPP foi acomodado sobre o PRP para atuar como membrana natural (Figura 9).

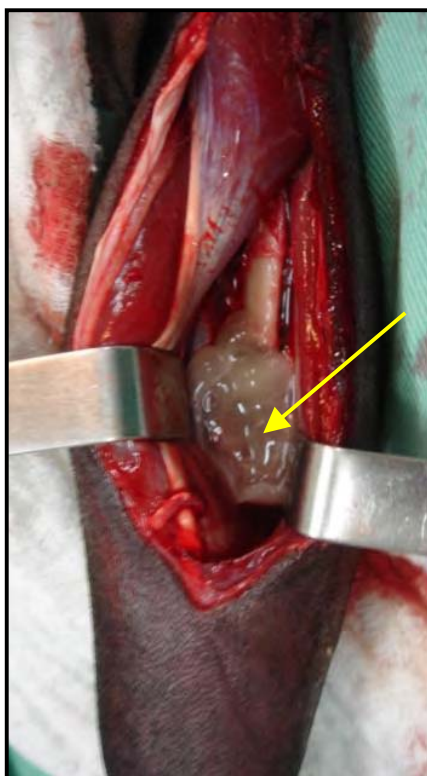


Figura 9. Imagem fotográfica ilustrando trans-operatório de enxertia da ulna direita em ovino. Notar falha óssea preenchida por plasmas rico e pobre em plaquetas (seta).

3.3 Enxertia de osso cortical no grupo GO

Após a ostectomia, efetuou-se a seleção do implante ósseo cortical, retirado da glicerina à 98% foi mantido submerso para reidratação em cuba contendo solução salina estéril por 15 minutos, foi submetido posteriormente a três lavagens utilizando-se a mesma solução.

Uma vez reidratado, o segmento ósseo cortical acondicionado dentro do triturador¹⁰ em forma de pilão foi fragmentado fazendo-se uso de movimentos manuais de socos (Figura 10). Posteriormente, o osso triturado foi implantado na falha ulnar, preenchendo totalmente o defeito cirúrgico (Figura 11).

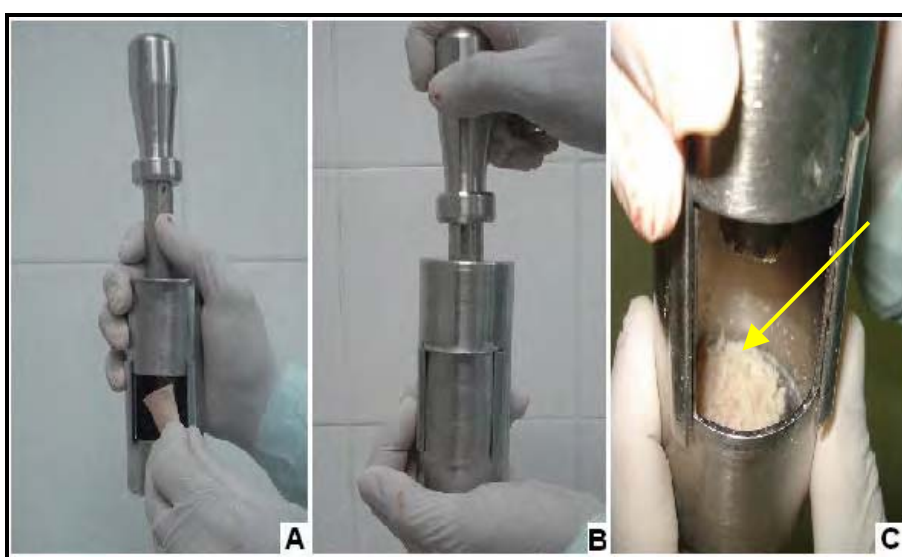


Figura 10. Imagem fotográfica ilustrando a sequência para a obtenção de osso cortical alógeno triturado. A) acondicionamento do fragmento ósseo no triturador; B) movimentos manuais em socos; C) osso cortical triturado (seta).

¹⁰ Triturador de osso tipo pilão – A Nossa dental (AND), Belo Horizonte - MG.



Figura 11. Imagem fotográfica ilustrando trans-operatório de enxertia da ulna direita em ovino. Notar falha óssea totalmente preenchida por osso cortical alógeno triturado (seta).

3.4 Enxertia de osso cortical, PRP e PPP no grupo GPO

Neste grupo experimental, o PRP e o PPP foram removidos dos tubos e colocados separadamente em placas de petri. Ao PRP foi adicionado osso cortical triturado e, posteriormente, 1ml de Soluplastin® (Figura 12). Ao PPP adicionou-se apenas, 1ml de Soluplastin®.



Figura 12. Imagem fotográfica ilustrando gelificação do plasma rico em plaquetas (PRP) associado ao osso cortical alógeno triturado (seta).

Após a gelificação do enxerto, gel de PRP associado ao osso cortical foi implantado na falha óssea da ulna preenchendo o defeito. O plasma pobre em plaquetas (PPP) foi acomodado sobre o enxerto cortical com PRP, fazendo a função de membrana natural (Figura 13).

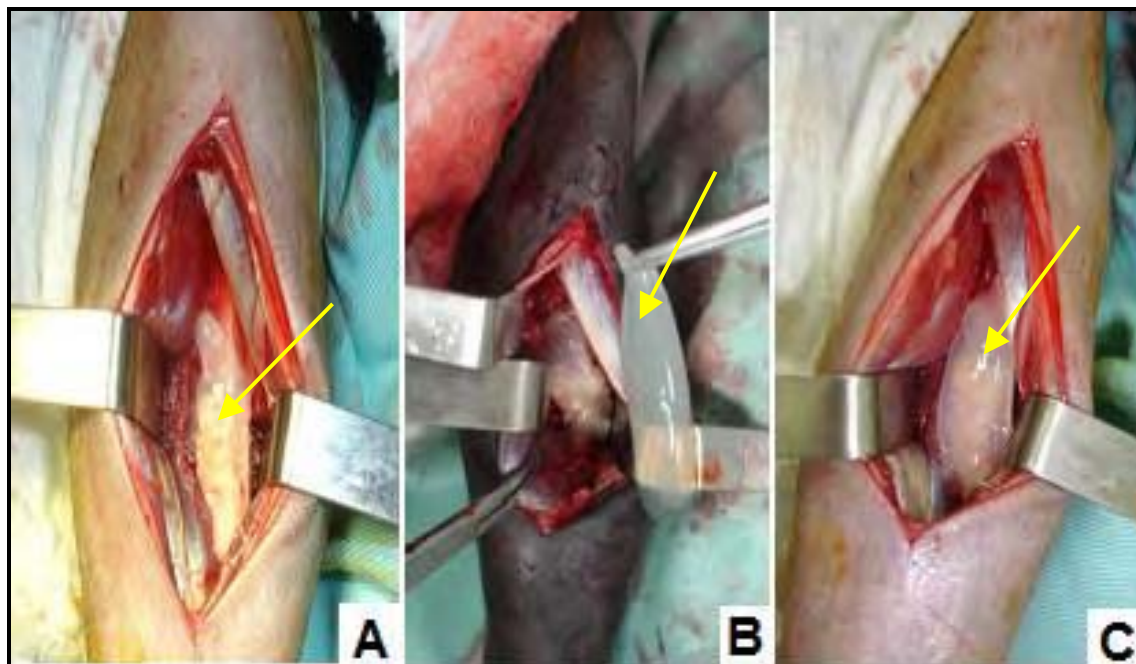


Figura 13. Imagem fotográfica ilustrando trans-operatório de enxertia da ulna direita em ovino. A) Notar falha óssea preenchida por osso cortical triturado associado ao plasma rico em plaquetas (PRP) (seta); B) membrana de plasma pobre em plaquetas (PPP) (seta); C) falha óssea preenchida por osso cortical alógeno triturado associado ao PRP e PPP (seta).

4. CUIDADOS NO PÓS-OPERATÓRIO

Após a completa recuperação anestésica, os animais receberam flunixin meglumine¹¹ (1mg/kg) pela via intramuscular, a cada 24 horas, por 5 dias. Como medida terapêutica antibacteriana, foi administrada florfenicol¹² (20mg/Kg) pela via intramuscular, a cada 24 horas, por 10 dias. As feridas cirúrgicas foram limpas, diariamente, com solução salina até a remoção dos pontos de pele, aos 10 dias de pós-operatório.

¹¹ Banamine 50ml – Intervet Shering Plough Animal Health, Cruzeiro - SP

¹² Nuflor – Intervet – Intervet Shering Plough Animal Health, Cruzeiro - SP

Durante o período de observação, as ovelhas ficaram confinadas em piquetes menores, ventilados, com alimentação própria para a espécie e água *ad libitum*.

5. AVALIAÇÕES CLÍNICA E LABORATORIAL

Os animais foram examinados diariamente, quanto ao seu estado geral e as condições da ferida cutânea, sensibilidade à palpação e quanto ao momento de apoio do membro operado.

O grau de apoio do membro foi classificado em quatro categorias: **excelente** – nos casos em que havia total suporte do peso sem claudicação; **bom** – claudicação leve; **satisfatório** – claudicação moderada, mas com suporte do peso e; **insatisfatório** – claudicação permanente, sem suporte do peso.

Amostras de sangue, de todos os animais, foram colhidas por venopunção da jugular para hemograma, a cada 30 dias, durante todo o período de observação.

6. AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA

Procedimentos radiográficos foram realizados no pré-operatório, no pós-operatório imediato e aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias das intervenções cirúrgicas.

O aparelho radiográfico utilizado neste experimento, presente no Hospital Veterinário da FAEF-FAMED Garça – SP, foi do modelo SRX DM 125¹³. Utilizaram-se

¹³ SRX – Indústria de comércio de equipamentos de RX Ltda – São Paulo - SP

filmes radiográficos¹⁴ montados em chassi metálico com um par de écrans intensificador Lanex Regular.

A revelação e a fixação dos filmes, previamente identificados, foram realizadas em processo manual.

A porção proximal da ulna foi radiografada na projeção mediolateral em todos os momentos de observação.

Em cada momento de avaliação radiográfica das falhas ósseas, as imagens foram analisadas, considerando-se quatro parâmetros: presença de ponte óssea, linha de falha óssea, formação de calo ósseo e reabsorção do enxerto cortical, quando implantado.

Em relação à formação de ponte óssea, considerou-se a presença de neoformação óssea nas extremidades dos segmentos ósseo proximal e distal da falha óssea. Com relação à linha de falha óssea, considerou-se a reparação do defeito entre as extremidades da falha. No que se refere à formação de calo ósseo, considerou-se a reparação óssea unindo as extremidades da falha e remodelação óssea. Quanto à reabsorção do enxerto, considerou-se sua reabsorção quando implantado na falha óssea. O percentual comparativo dos grupos foi de 12,5%, 25%, 50%, 75%, 87,5% e 100%, em relação à evolução dos quatro parâmetros.

As radiografias foram analisadas, sem que o examinador tivesse conhecimento sobre a qual grupo pertencia as imagens.

¹⁴ Kodak MXG/plus – Kodak brasileira Com. Ind. Ltda – São Paulo - SP.

IV. RESULTADOS

1. OBTENÇÃO DO PLASMA RICO E DO PLASMA POBRE EM PLAQUETAS

O protocolo de obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP) e do plasma pobre em plaquetas (PPP) foi de fácil execução, rápido e com baixo custo. Não houve a necessidade de especialista na área de hematologia para a sua confecção e, foi processado, em todas as fases, por única pessoa. O protocolo laboratorial proposto permitiu obter, no PRP, três vezes mais plaquetas em 1 μ L quando comparado ao número de plaquetas do sangue total.

Observou-se que o resultado final do número de plaquetas no PRP foi dependente da contagem inicial no sangue total. Quanto maior o número inicial, mais rico em plaquetas era o PRP (Tabela 2).

Tabela 2. Contagem plaquetária em 1 μ L do sangue total, plasma rico em plaquetas (PRP) e plasma pobre em plaquetas (PPP) em 12 ovinos.

ANIMAIS	PLAQUETAS		
	plaquetas por μ L de sangue total	plaquetas por μ L de PRP	plaquetas por μ L de PPP
1	300.000	1.050.000	28.000
2	420.000	1.350.000	35.000
3	315.000	1.010.000	33.000
4	350.000	980.000	19.000
5	555.000	1.665.000	28.000
6	600.000	1.880.000	44.000
7	550.000	1.780.000	50.000
8	450.000	1.450.000	38.000
9	550.000	1.950.000	65.000
10	405.000	1.390.000	42.000
11	390.000	1.450.000	40.000
12	500.000	1.620.000	35.000

μ L: microlitro; PRP: plasma rico em plaquetas; PPP: plasma pobre em plaquetas

2. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Não houve complicações trans-operatórias em qualquer dos 12 animais.

O tempo de cirurgia despendido foi, em média, de duas horas, e o preparo do gel de PRP e do osso cortical triturado foram os procedimentos mais demorados.

A associação do enxerto ósseo cortical triturado ao PRP permitiu que o enxerto permanecesse misturado ao gel, ficando bem distribuído em toda falha, evitando perda durante a aplicação e reduziu pela metade a quantidade necessária de osso cortical para preencher totalmente a falha ulnar. Além disso, ao depositar o PRP sobre as falhas ósseas, observou-se menor sangramento local em relação à quantidade notada quando o osso cortical foi utilizado de forma isolada.

A deposição da membrana de PPP, sobre o enxerto ósseo, favoreceu a permanência do enxerto na falha óssea durante a sutura da ferida cirúrgica.

O Soluplastin®, utilizado na confecção dos plasmas, promoveu coagulação adequada, formando gel consistente.

3. AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL PÓS-OPERATÓRIA

Todos os animais apresentaram edema do membro torácico direito, por tempo médio de três dias nos grupos GP e GPO, e do membro torácico esquerdo e grupo GO de dois dias, com posterior redução progressiva em ambos os membros.

Na avaliação subjetiva da dor, todos os animais, à manipulação dos membros torácicos, apresentaram sensibilidade dolorosa acentuada durante quatro dias de pós-operatório.

Com relação ao momento de apoio, nos 12 animais, a função dos membros, direito e esquerdo, foi classificada em categoria boa (claudicação leve), porém, em aproximadamente 48 horas, já se enquadravam na categoria excelente (suporte do peso sem claudicação).

Não houve alteração significativa nos resultados dos hemogramas controles durante o período de observação.

4. AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA PÓS-OPERATÓRIA

Ao exame radiográfico do membro torácico esquerdo (controle), o percentual comparativo em relação à formação de ponte óssea, redução da linha de falha óssea e a formação de calo ósseo foram avaliadas em todos os períodos de observação. Entretanto, somente aos 90 dias de pós-operatório, nos animais 7, 8 e 9, foi observada alteração radiográfica percentual (Tabela 3 e Figura 14).

Em todas as falhas ósseas ulnar do membro torácico direito, ao longo do período de observação, houve tendência à reparação óssea. Quando comparados os resultados dos três grupos (GP, GO e GPO), em relação aos parâmetros de formação de ponte óssea, redução de linha de falha óssea e formação de calo ósseo, percebe-se, aos 15 dias de pós-operatório, precocidade de reparo no grupo GP (Tabelas 4, 5 e 6).

Na análise do parâmetro formação de ponte óssea o grupo GPO mostrou melhor evolução aos 90 dias de pós-operatório, quando comparado aos demais grupos (Tabela 4). Em relação à diminuição da linha de falha óssea, a maioria dos animais com 0% de falha óssea aos 90 dias de pós-operatório pertencia aos grupos GO e GPO (Tabela 5).

Nas avaliações radiográficas sequenciais, quanto à formação de calo ósseo, observou-se que os grupos GO e GPO apresentaram menor tempo de evolução quando comparados ao grupo GP. Detectou-se, ainda, que a maioria dos animais do grupo GPO apresentou 100% de formação de calo ósseo aos 90 dias de pós-operatório (Tabela 6). No que refere ao parâmetro reabsorção do enxerto, a maioria dos animais que apresentou tempo de reabsorção do enxerto tardio pertencia ao grupo GPO (Tabela 7).

Tabela 3. Avaliação radiográfica percentual comparativa para as falhas ósseas ulnar do membro torácico esquerdo (controle), em função dos grupos de tratamento e em relação à ponte óssea, linha de falha óssea e formação de calo ósseo aos 90 dias de pós-operatório.

GRUPO CONTROLE 90 DIAS				
ANIMAIS	GRUPOS	PONTE ÓSSEA	LINHA DE FALHA ÓSSEA	CALO ÓSSEO
1	GP	0%	100%	0%
2	GP	0%	100%	0%
3	GP	0%	100%	0%
4	GP	0%	100%	0%
5	GO	0%	100%	0%
6	GO	0%	100%	0%
7	GO	12,5%	87,5%	12,5%
8	GO	12,5%	25%	0%
9	GPO	25%	87,5%	12,5%
10	GPO	0%	100%	0%
11	GPO	0%	100%	0%
12	GPO	0%	100%	0%

D: dias; GP: grupo plasma; GO: grupo osso cortical; GPO: grupo plasma associado ao osso cortical.

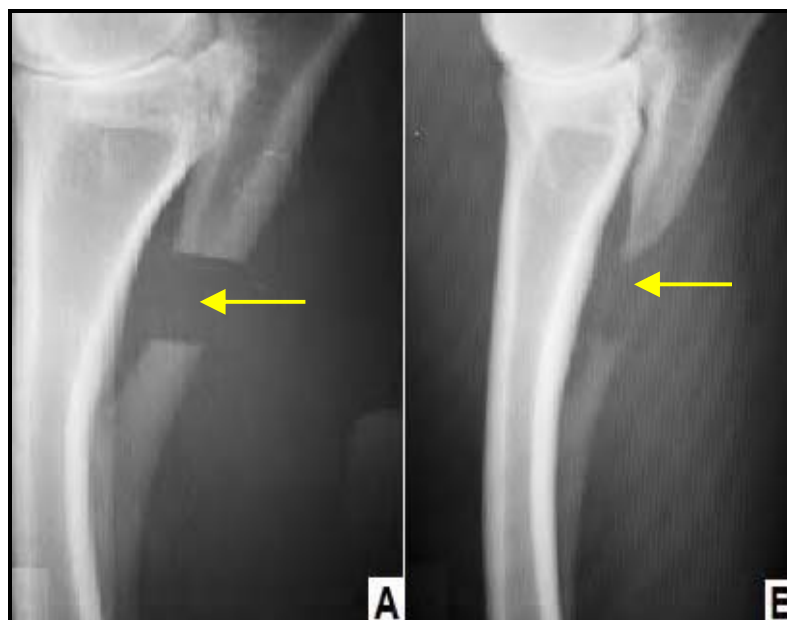


Figura 14. Imagem radiográfica da ulna esquerda do ovino nº 8 (GO). A) pós-operatório imediato (seta); B) ausência de formação de calo ósseo (seta) aos 90 dias do pós-operatório.

Tabela 4. Avaliação radiográfica percentual comparativa dos animais dos grupos GP, GO e GPO, em relação à formação de ponte óssea, em função dos dias de observação de pós-operatório.

FORMAÇÃO DE PONTE ÓSSEA						
ANIMAIS/GRUPOS	15 D	30 D	45 D	60 D	75 D	90 D
1/GP	12,5%	25%	25%	50%	75%	75%
2/GP	0%	50%	75%	100%	100%	100%
3/GP	12,5%	25%	50%	75%	100%	100%
4/GP	25%	50%	75%	100%	100%	100%
5/GO	0%	0%	12,5%	75%	75%	75%
6/GO	0%	12,5%	100%	100%	100%	100%
7/GO	0%	0%	25%	100%	100%	100%
8/GO	0%	0%	25%	25%	25%	25%
9/GPO	0%	25%	50%	100%	100%	100%
10/GPO	0%	25%	75%	87,5%	87,5%	100%
11/GPO	0%	25%	87,5%	100%	100%	100%
12/GPO	0%	12,5%	25%	75%	100%	100%

D: dias; GP: grupo plasma; GO: grupo osso cortical; GPO: grupo plasma associado ao osso cortical.

Tabela 5. Avaliação radiográfica percentual comparativa dos animais dos grupos GP, GO e GPO, em relação à linha de falha óssea, em função dos dias de observação de pós-operatório.

LINHA DE FALHA ÓSSEA						
ANIMAIS/GRUPOS	15 D	30 D	45 D	60 D	75 D	90 D
1/GP	87,5%	75%	75%	50%	25%	25%
2/GP	100%	50%	25%	12,5%	12,5%	0%
3/GP	87,5%	75%	25%	25%	25%	25%
4/GP	75%	50%	50%	25%	25%	25%
5/GO	100%	100%	87,5%	50%	25%	25%
6/GO	100%	87,5%	12,5%	0%	0%	0%
7/GO	100%	100%	75%	25%	0%	0%
8/GO	100%	100%	100%	100%	100%	100%
9/GPO	100%	75%	50%	25%	0%	0%
10/GPO	100%	75%	25%	12,5%	12,5%	12,5%
11/GPO	100%	75%	12,5%	0%	0%	0%
12/GPO	100%	87,5%	75%	25%	12,5%	0%

D: dias; GP: grupo plasma; GO: grupo osso cortical; GPO: grupo plasma associado ao osso cortical.

Tabela 6. Avaliação radiográfica percentual comparativa dos animais dos grupos GP, GO e GPO, em relação à formação de calo ósseo, em função dos dias de observação de pós-operatório.

FORMAÇÃO DE CALO ÓSSEO						
ANIMAIS	15 D	30 D	45 D	60 D	75 D	90 D
1/GP	0%	12,5%	12,5%	25%	50%	50%
2/GP	0%	25%	50%	75%	75%	75%
3/GP	0%	12,5%	25%	50%	75%	75%
4/GP	12,5%	50%	50%	75%	75%	75%
5/GO	0%	0%	12,5%	50%	75%	75%
6/GO	0%	12,5%	87,5%	100%	100%	100%
7/GO	0%	0%	0%	75%	100%	100%
8/GO	0%	0%	0%	0%	0%	0%
9/GPO	0%	12,5%	25%	50%	87,5%	100%
10/GPO	0%	25%	25%	75%	75%	75%
11/GPO	0%	12,5%	50%	87,5%	100%	100%
12/GPO	0%	0%	0%	25%	87,5%	100%

D: dias; GP: grupo plasma; GO: grupo osso cortical; GPO: grupo plasma associado ao osso cortical.

Tabela 7. Avaliação radiográfica percentual comparativa dos animais dos grupos GO e GPO, em relação à reabsorção óssea, em função dos dias de observação de pós-operatório.

REABSORÇÃO DO ENXERTO						
ANIMAIS	15 D	30 D	45 D	60 D	75 D	90 D
5	0%	50%	100%	100%	100%	100%
6	12,5%	50%	100%	100%	100%	100%
7	0%	50%	75%	100%	100%	100%
8	25%	75%	100%	100%	100%	100%
9	12,5%	25%	50%	87,5%	100%	100%
10	12,5%	25%	87,5%	100%	100%	100%
11	0%	25%	87,5%	100%	100%	100%
12	12,5%	50%	75%	100%	100%	100%

D: dias; GO: grupo osso cortical; GPO: grupo plasma associado ao osso cortical.

No que se refere ao grupo GP (grupo plasma), todos os animais apresentaram percentual comparativo semelhante nos diferentes períodos de observação. Relativamente aos animais 2, 3 e 4 deste grupo, observou-se formação de 75% de calo ósseo aos 90 dias de pós-operatório (Figuras 15 e 16).

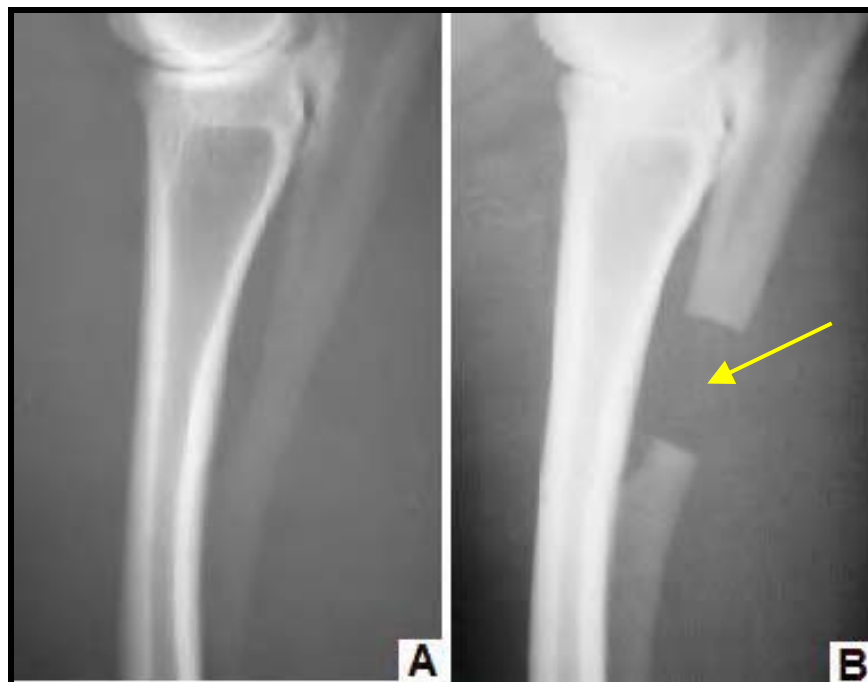


Figura 15. Imagem radiográfica, em projeção mediolateral, da ulna direita do ovino nº 3 (GP). A) pré-operatória; B) pós-operatório imediato. Notar falha óssea osteoperiosteal de 1,5 de comprimento (seta).

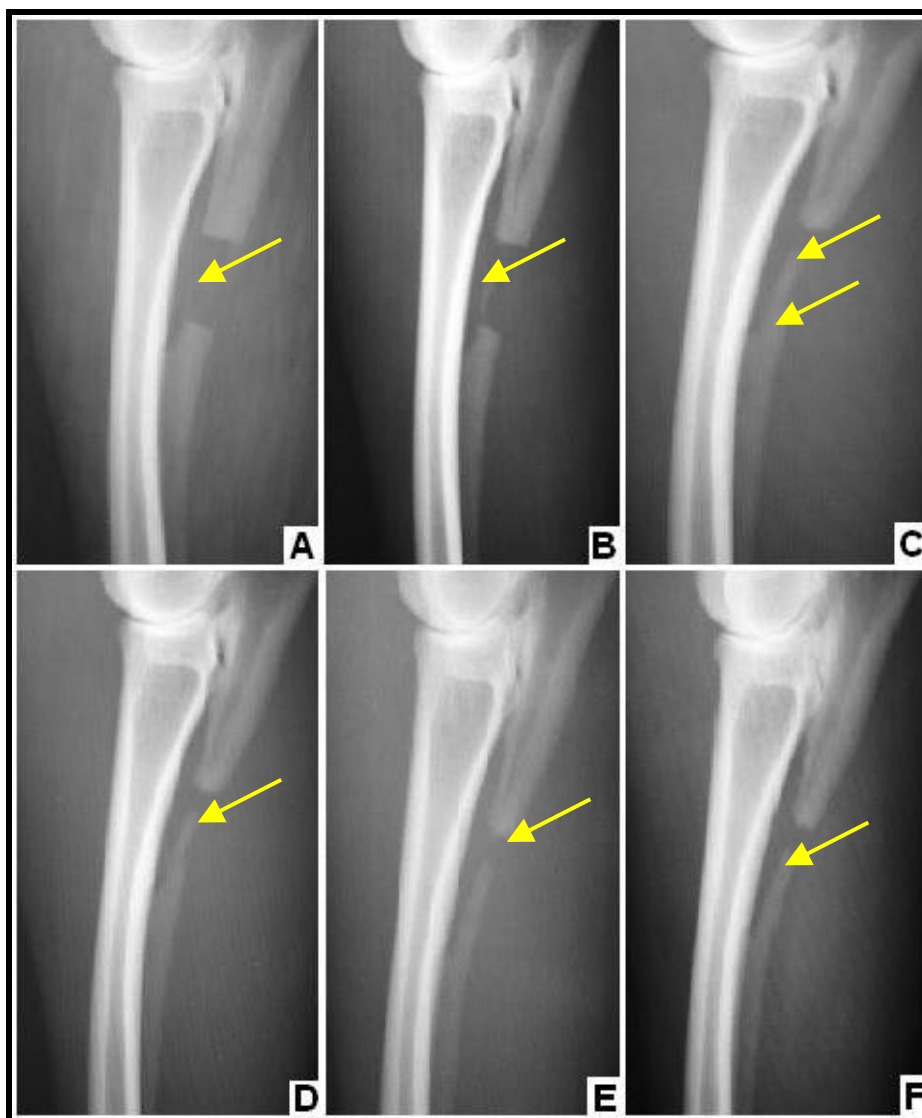


Figura 16. Imagem radiográfica, em projeção mediolateral, da ulna direita do ovino nº 3 (GP), obtida nos diferentes momentos de observação pós-operatória. A) 15 dias - início de formação de ponte óssea (12,5%) (seta); B) 30 dias - formação de ponte óssea de 25% (seta); C) 45 dias ponte óssea (75%) e formação de calo ósseo (25%) (setas); D) 60 dias - formação de calo ósseo mais intenso (50%) (seta); E e F) aos 75 e 90 dias - notar 100% de ponte óssea e formação de calo ósseo mais intenso (75%) (setas).

Quanto ao grupo GO, com exceção do animal 8 (Figuras 17 e 18), todos os animais apresentaram percentual comparativo semelhante em relação à formação de ponte óssea, linha de fratura e formação de calo ósseo. Notou-se 100% de formação de calo ósseo aos 60 dias de pós-operatório no animal 6 (Figuras 19 e 20).

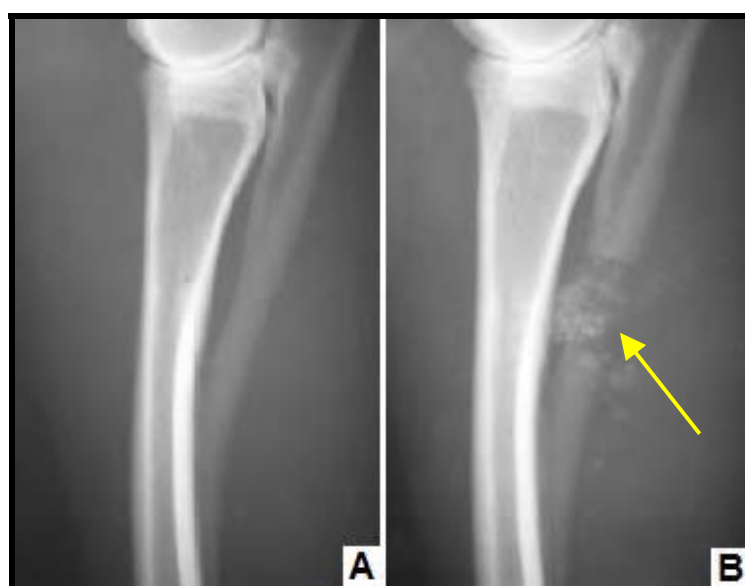


Figura 17. Imagem radiográfica, em projeção mediolateral, da ulna direita do ovino nº 8 (GO). A) pré-operatória; B) aspecto no pós-operatório imediato. Notar falha óssea osteoperiosteal de 1,5cm de comprimento preenchida por enxerto cortical alógeno triturado (seta).

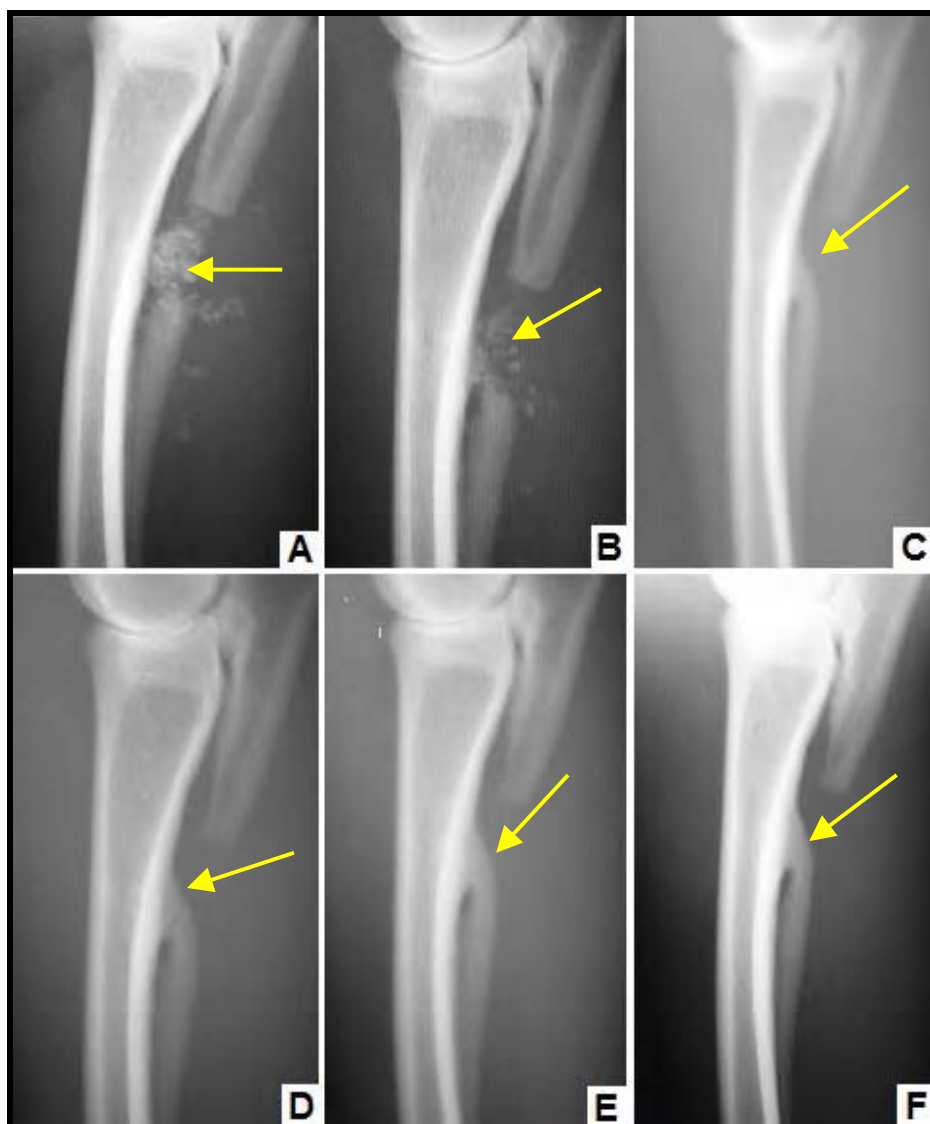


Figura 18. Imagem radiográfica, em projeção mediolateral, da ulna direita do ovino nº 8 (GO), obtida nos diferentes momentos de observação pós-operatória. A) aos 15 dias - início de reabsorção do enxerto de 25% (seta); B) aos 30 dias - notar reabsorção do enxerto de 75% (seta); C) aos 45 dias - 100% de reabsorção do enxerto e união da ulna distal com o rádio (seta); D, E e F) aos 60, 75 e 90 dias - observar união do segmento distal da falha da ulna com o rádio (setas).



Figura 19. Imagem radiográfica, em projeção mediolateral, da ulna direita do ovino nº 6 (GO). A) pré-operatória; B) aspecto no pós-operatório imediato. Notar falha óssea osteoperiosteal de 1,5cm de comprimento preenchida por enxerto cortical alógeno triturado (seta).

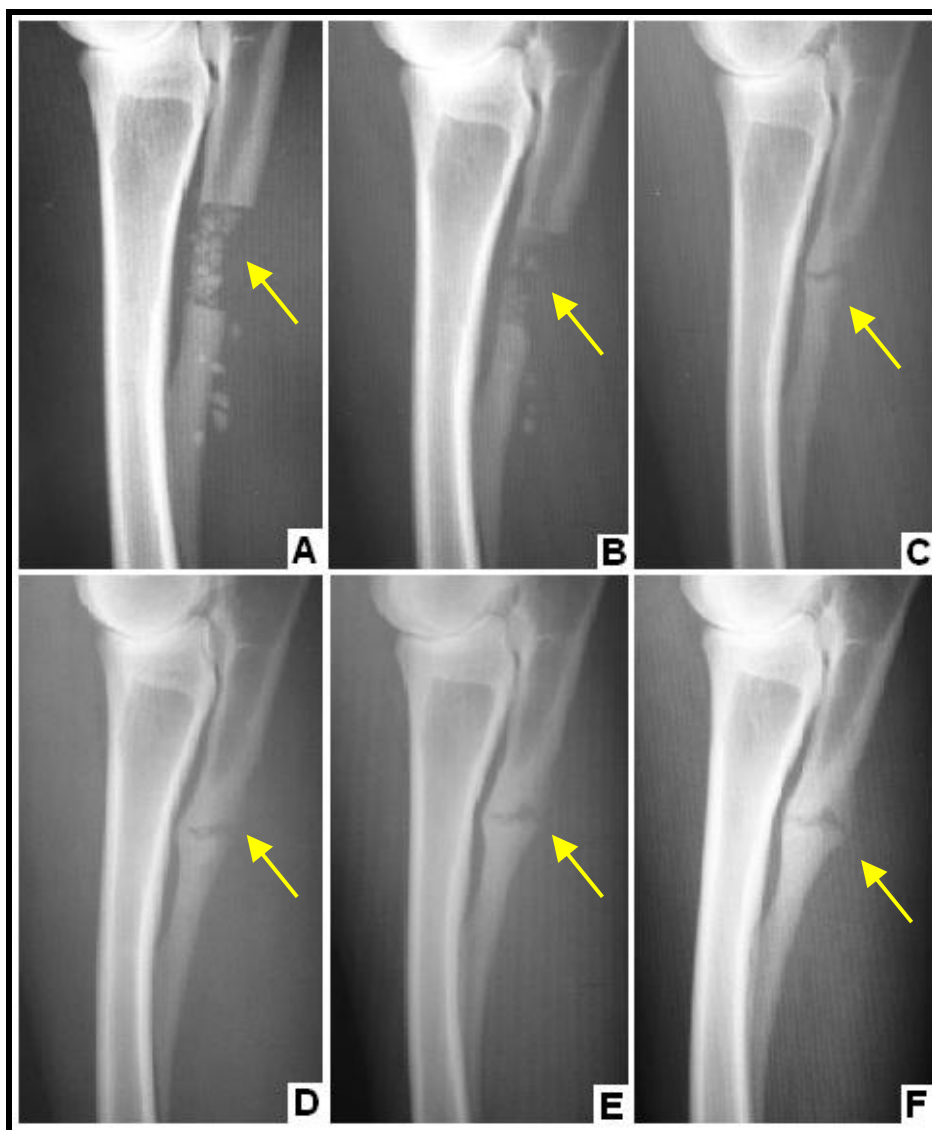


Figura 20. Imagem radiográfica, em projeção mediolateral, da ulna direita do ovino nº 6 (GO), obtida nos diferentes momentos de observação pós-operatória. A) aos 15 dias - início de reabsorção do enxerto (seta); B) aos 30 dias - início de formação calo ósseo (12,5%) e reabsorção do enxerto de 50% (seta); C) aos 45 dias - 100% de reabsorção do enxerto (seta); D) aos 60 dias - formação de calo ósseo mais intenso (100%) e remissão da linha de falha óssea (seta); E e F) aos 75 dias e 90 dias - formação completa de calo ósseo (setas).

No que se refere ao grupo GPO, todos os animais apresentaram percentual comparativo semelhante em relação à formação de ponte óssea, linha de fratura e formação de calo ósseo. Notou-se formação de 100% de calo ósseo aos 75 dias de pós-operatório no animal 11 (Figuras 21 e 22).

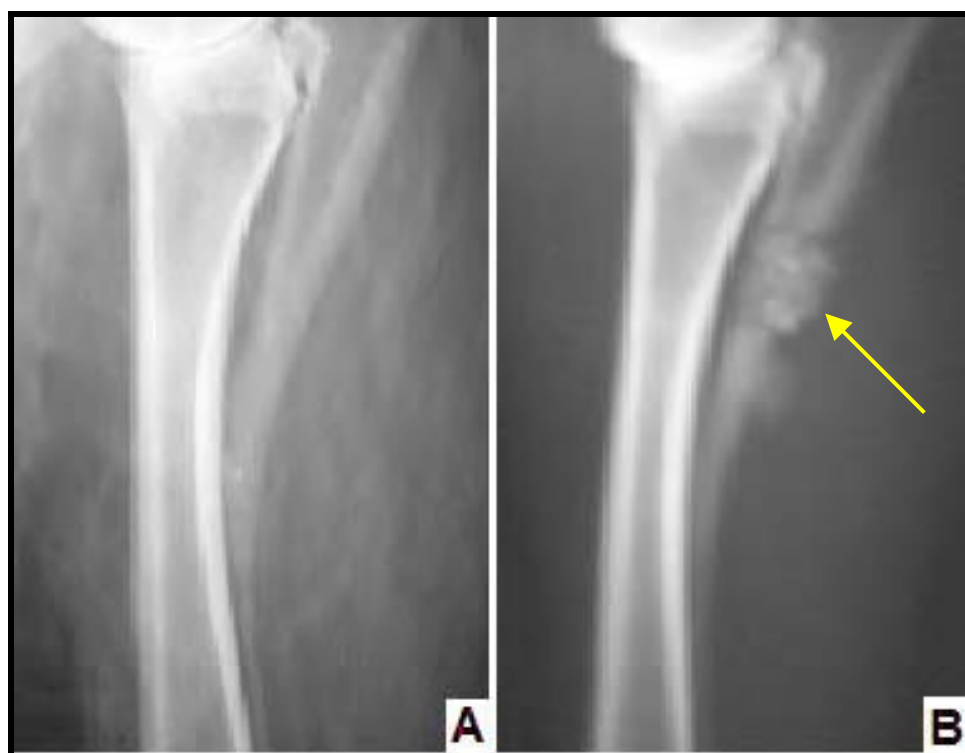


Figura 21. Imagem radiográfica, em projeção mediolateral, da ulna direita do ovino nº 11 (GPO). A) pré-operatória; B) aspecto no pós-operatório imediato. Notar falha óssea osteoperiosteal de ulna de 1,5cm de comprimento preenchida totalmente por enxerto ósseo cortical triturado associado ao PRP e PPP (seta).

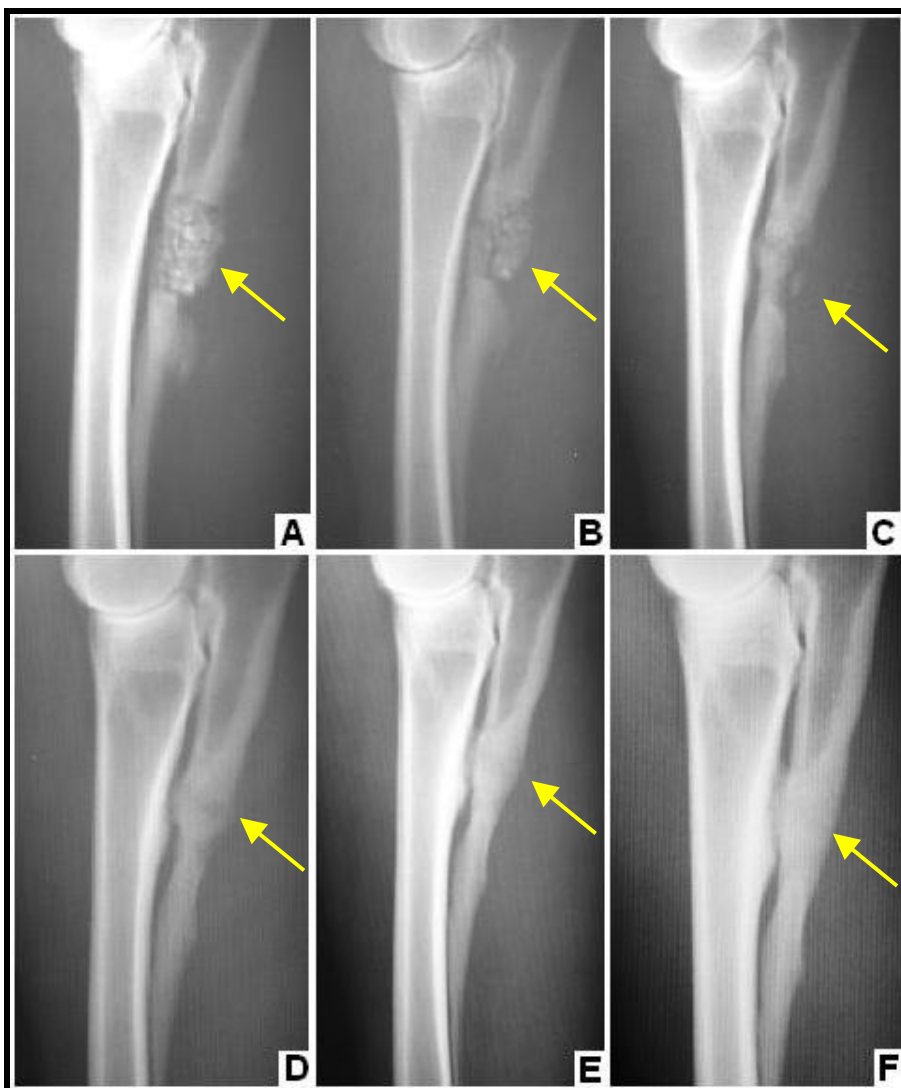


Figura 22. Imagem radiográfica, em projeção mediolateral, da ulna direita do ovino nº 11 (GPO), obtida nos diferentes momentos de observação pós-operatória. A) aos 15 dias - sem absorção do enxerto (seta); B) aos 30 dias - observar início de formação de ponte óssea (25%) e 25% de reabsorção do enxerto (seta); C) aos 45 dias - notar ponte óssea (87,5%) e reabsorção do enxerto de 87,5% (seta); D) aos 60 dias - observar formação de calo ósseo mais intenso (87,5%) e absorção de 100% do enxerto (seta); D e F) aos 75 dias e 90 dias de pós-operatório, com formação completa de calo ósseo (setas).

V. DISCUSSÃO

A busca por enxertos ósseos é antiga. Desde o século XVI, o homem vem investigando alternativas para a substituição de ossos perdidos (COSTA, 1996; ZILIOOTTO et al., 2003; WILSON et al., 2006; PAGLIOSA & ALVES, 2007; BARBOSA et al., 2008; SILVA et al., 2009). Com o desenvolvimento da teoria de osteointegração, a procura por substâncias naturais ou sintéticas capazes de substituir tecidos ósseos tornou-se alvo de muitas pesquisas contemporâneas (ANDRADE et al., 2007; DUSSE et al., 2008).

O material de enxertia utilizado neste trabalho, foi o osso cortical alógeno. A literatura o cita como excelente material de enxerto; dispensando um segundo procedimento cirúrgico; favorecendo o preenchimento adequado de toda a loja óssea sendo eficaz no reparo de falhas, nos servir como arcabouço para o crescimento celular, sofrendo reabsorção e substituições por osso (GIOSO et al., 2002).

Segundo GIOSO et al. (2002) e ZILIOOTTO et al. (2003), a glicerina à 98% é o método de conservação de fragmentos ósseos mais utilizado na medicina veterinária, possui ação redutora da antigenicidade e preserva as funções de osteoindução e osteocondução. De fato, não foram encontradas durante o exame clínico e histológico evidências de contaminação bacteriana ou fúngica nos animais dos grupos submetidos à técnica de enxertia com osso cortical (GO e GPO). O custo de manutenção do banco de osso com o uso da glicerina à 98% foi bem reduzido, sendo o mesmo observado por PINTO JR et al. (1996) e DEL CARLO et al. (1999).

O PRP é fonte autógena, atóxica e não imunogênica de fatores de crescimento, que apresenta, em sua constituição, plasma, leucócitos e plaquetas. Os leucócitos conferem resistência natural aos agentes infecciosos (MARX et al., 1998).

A utilização isolada do PPP em falha óssea não foi avaliada neste estudo, porém, MAN et al. (2001), BROWN et al. (2006) e ALMEIDA et al. (2008), relataram que o PPP auxilia na cicatrização de tecidos moles, diminui o sangramento capilar local, elimina a necessidade de dreno, reduz o uso de curativos de pressão e diminui a dor pós-operatória. Ao se depositar o plasma sobre as falhas ósseas, no presente estudo, observou-se menor sangramento local em relação ao notado quando o osso cortical foi utilizado de forma isolada, embora não se tenha evidenciado diferença em relação à sensibilidade entre os grupos tratados por enxerto cortical, com ou sem PPP.

BARBOSA et al. (2008) observaram cicatrização mais rápida de pele e menos edema em membros tratados com PRP. No presente estudo, todos os ovinos apresentaram edema dos membros torácicos após procedimentos cirúrgicos, porém, observou-se a sua redução mais precoce nos membros esquerdos, que não receberam enxertia, e nos animais do grupo GO.

Os protocolos simplificados têm sugerido a obtenção do PRP com custos menores e utilizando-se de centrífugas convencionais (ANUITA, 1999; LANDENBERG et al., 2000; VENDRAMIN et al., 2006), o que fora confirmado no presente estudo.

Observou-se que o resultado final do número de plaquetas no PRP foi dependente da contagem inicial no sangue total do animal, conforme relatado por SILVA et al. (2007) e BARBOSA et al. (2008). Segundo os autores, quanto maior o número de plaquetas no sangue total, mais rico em plaquetas fica o PRP.

No presente estudo não foi possível se avaliar qualitativamente o PRP antes da aplicação cirúrgica. A avaliação da atividade biológica dos fatores de crescimento derivados das plaquetas é complexa, de modo que não há como avaliar o gel produzido, apontamento este também citado por LANDSBERG et al. (2000).

Messora et al. (2009) descreveram a técnica de obtenção do PRP com protocolo de única centrifugação e conseguiram, com este método, concentrar plaquetas em níveis menores que o dobro da quantidade presente no sangue periférico. O protocolo laboratorial proposto, neste estudo, foi de única centrifugação e, permitiu obter, no PRP, três vezes mais plaquetas em 1 μ L, comparativamente ao número de plaquetas do sangue total, diferentemente de MARX et al. (1998) que afirmam que um protocolo de dupla centrifugação é essencial para que possa, verdadeiramente, concentrar as plaquetas durante o preparo de PRP.

A média do número de plaquetas, por 1 μ L do PRP, foi 750.000, de conformidade com as informações de ANUITA et al. (1999); OBARRIO et al. (2000); MARX (2001) e SILVA et al. (2009), os quais afirmaram que para ser considerado PRP, a concentração mínima deve ser de 500.000 a 1.000.000 plaquetas por μ L ou possuir aumento de 300 a 400% de plaquetas em relação à quantidade presente no sangue periférico para que seja capaz de acelerar a reparação cicatricial.

O gel de plaquetas obtido após gelificação facilita a aplicação em diversas cirurgias e também ativa as plaquetas (EFEUGLU et al., 2004; VENDRAMIN et al., 2006). Neste trabalho, a associação do enxerto ósseo cortical triturado, ao PRP, permitiu que ele permanecesse misturado ao gel, ficando bem distribuído em toda falha e evitando perda durante a sua aplicação. A adição do Soluplastin® aos plasmas

promoveu coagulação adequada, formando gel consistente, assim como observado por BARBOSA et al. (2008).

Por ser uma estrutura inervada e irrigada, os ossos apresentam grande sensibilidade e alto potencial de regeneração, porém esta capacidade pode não se manifestar nos defeitos ósseos de grandes dimensões, e nestes casos, o tecido ósseo não exibe capacidade de regeneração espontânea, exigindo procedimentos operatórios reconstrutivos (LYNCH et al., 1989; MARX et al., 1998). Neste estudo, com relação à análise radiográfica do preenchimento ósseo das falhas, os grupos tratados com enxertia de PRP e PPP, osso cortical e naqueles com osso cortical associado ao PRP, em todos os momentos de observação, apresentaram melhor reparação óssea, quando comparados a falha controle (membro torácico esquerdo), pois de acordo com os autores citados acima, a falha do membro sem enxertia (controle) não apresenta capacidade de regeneração espontânea.

Em relação à utilização de PRP isoladamente, no reparo de falha óssea, os resultados observados no presente estudo não foram os relatados por ARPORNMAEKLONG et al. (2004); NUNES FILHO et al. (2007); SILVA et al. (2009). Segundo os autores, o PRP é um gel e não apresenta consistência para se comportar como material de preenchimento em falhas ósseas, além disso, o PRP, isoladamente, não forma osso novo por estimulação e diferenciação de células mesenquimais. No entanto, a maioria dos animais que receberam enxertia apenas de PRP e PPP apresentou formação de calo ósseo de 75% aos 90 dias de pós-operatório, sugerindo ter havido aumento da velocidade de regeneração, comparativamente à falha óssea que não recebeu o material. Assim, a reparação óssea foi considerada devido ao uso

do PRP que fornece fatores de crescimento e acelera o reparo ósseo (MARX et al., 1998; MARX, 2001; WILSON et al., 2006).

O PRP associado ao enxerto ósseo representa instrumento para minimizar a absorção da matriz enxertada e incrementar o potencial osteocondutor do osso aposicionado (ANDRADE et al., 2007). Neste trabalho, em relação à reabsorção do enxerto, a maioria dos animais que apresentou tempo de reabsorção do enxerto tardio pertenciam ao grupo do osso cortical associado aos plasmas, fato este similar ao citado pelos autores acima.

A associação de enxerto ósseo e PRP em falhas ósseas aumenta a eficiência do reparo já na segunda semana, sugerindo que essa associação é conveniente para os momentos iniciais e favorece a estabilidade do osso neoformado em longo prazo (ANDRADE et al., 2007). Desta forma, semelhante com o autor acima citado, em todas as falhas ósseas ulnar do membro torácico direito, ao longo do período de observação e comparativamente aos resultados dos três grupos, houve, aos 15 dias de pós-operatório, precocidade de reparo nos grupos plasma e osso cortical associado aos plasmas.

A maioria das pesquisas encontradas na literatura mostra melhora significativa na regeneração óssea e tecidual, quando o PRP associado a enxerto ósseo é utilizado, em várias situações (BARBOSA et al., 2008; WILSON et al., 2006; LUCARELLI et al., 2005; KIM et al., 2002; NUNES FILHO et al., 2007). No entanto, no presente estudo, quando comparadas a falha tratada com osso cortical e aquelas tratadas com osso cortical associado ao PRP e PPP, não foram observadas diferenças significativas em relação a formação de calo ósseo, entretanto, o enxerto ósseo triturado associado aos

plasmas permitiu melhor acomodação do enxerto, que pode ser utilizado em menor quantidade e melhor incorporado ao leito receptor sem risco de extrusão, conforme descreveram ANDRADE et al. (2007).

A literatura revela resultados paradoxais com relação à neoformação óssea após o uso de PRP. A provável explicação é a utilização de diferentes protocolos para obtenção de gel de plaquetas (DUSSE et al., 2008).

VI. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas condições do presente estudo permitem concluir que:

- O osso cortical alógeno triturado, utilizado de forma isolada, promoveu o preenchimento completo de defeito ósseo de ossos longos e formação óssea satisfatória.
- A utilização de osso cortical associado aos plasmas diminui a quantidade de fragmentos ósseos necessário para o preenchimento de falha óssea e permitiu melhor acomodação do implante no defeito.
- A associação do PRP e do PPP em defeitos ósseos de ossos longos determinam, ao exame radiográfico, precocidade de reparação óssea e formação de calo ósseo satisfatória.
- Ao final do período de observação, o comportamento dos grupos osso cortical e osso cortical associado ao PRP e PPP, em relação a preenchimento ósseo, foi semelhante.

VII. REFERÊNCIAS

ALIEVI, M. M.; SCHOSSLER, J. E. W.; GUIMARÃES, L. D.; OLIVEIRA, A. N. C.; TRAESLEL, C. K.; FERREIRA, P. A. Implante ósseo cortical alógeno conservado em mel na reconstrução de falha óssea diafisária em fêmur de cães: avaliação clínica e radiográfica. **Ciência Rural**, v.37, n.2, p. 450-457, 2007.

ALBUQUERQUE, D. P.; OLIVEIRA, T. M. F.; MARANHÃO FILHO, A. W. A.; MILHOMENS FILHO, J. A.; GUSMÃO, E. Aplicação clínico-cirúrgica do plasma rico em plaquetas: estudo revisional. **Odontologia Clínico Científica**, v.7, n.2, p. 119-122, 2008.

ANDRADE, M. G. S.; DANTAS, D. B.; SADIGURSKY, M. Efeitos biológicos do plasma rico em plaquetas. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.6, n.2, p. 204-213, 2007.

ANUITA, E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. **International Journal Oral Maxillofacial Implants**, v.14, n.4, p.529-35, 1999.

ARPORNMAEKLONG, P et al. Influence of platelet-rich plasma (PRP) on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells: an in vitro study. **International Journal Oral Maxillofacial**, v.333, n.1, p.60-70, 2004.

ALMEIDA, A. R. H.; MENEZES, J. A.; ARAÚJO, G. K. M.; MAFRA, A. V. C. Utilização de plasma rico em plaquetas, plasma pobre em plaquetas e enxerto de gordura em ritidoplastias: análise de casos clínicos. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v.23, n.2, p. 82-88, 2008.

BARBOSA, A. L. T.; DEL CARLO, R. J.; GOMES, H. C.; OLIVEIRA, A. C.; MONTEIRO, B. S.; DEL CARLO, B. N. Plasma rico em plaquetas para reparação de falhas ósseas em cães. **Ciência Rural**, v.38, n.5, p. 1335-1340, 2008.

BESSHO, K.; IZUKA, T. Activit and solubility of boné morphogenetic protein derived from porcine boné matrix. **British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v.32, p. 86-90, 1994.

BROWN, S. A.; APPELT, E. A.; LIPSCHITZ, A.; SOROKIN, E. S.; ROHRICH, R. J. Platelet gel sealant use in rhytidectomy. **Plastic Reconstructive Surgery**, v.118, n.4, p. 1019-11025, 2006.

CAMARINI, E. T.; IAMASHITA, H. Y.; MORESCHI, E.; PAVAN, A. J.; IEAKI FILHO, L. Biomateriais associados ou não ao Plasma Rico em Plaquetas em cavidades ósseas mandibulares. **ImplantNews**, v. 3, n.5, p. 475-479, 2006.

CAVASSANI, M. M.; MORAES, J. R. E.; PADILHA FILHO, J. Função osteoindutora de fragmentos ósseos conservados em glicerina a 98%. Estudo Experimental em ratos. **Ciência rural**, v.31, n.3, p. 445-448, 2001.

COSTA, J. L. Reconstrução de grande falha óssea com enxerto cortical alógeno conservado em glicerina, fixado com placas e parafusos de aço inoxidável da série 304: estudo experimental em cães (**Dissertação – Mestrado**), Universidade Estadual de São Paulo – Jaboticabal; 1996.

DALAPICULA, S. S.; VIDIGAL JUNIOR, G. M.; CONZ, M. B.; CARDOSO, E. S. Características físico-químicas dos biomateriais utilizados em enxertias ósseas. Uma revisão crítica. **Implantnews**, v.3, n.5, p. 487-491, 2006.

DEL CARLO, R. J.; GALVÃO, S. R.; VITÓRIA, M. I.; SOUZA, T. D.; FILHO, A. M. Aloenxertos ósseos caninos diferentemente preservados. **Revista Brasileira Ciência Veterinária**, v.6, n.3, p. 121-126, 1999.

DUSSE, L. M. S.; MACEDO, A. P.; BATSCHAUER, A. P.; CARVALHO, M. G. Plasma rico em plaquetas (PRP) e sua aplicação em odontologia. **Revista Brasileira de Análises Clínica**, v.40, n.3, p. 193-197, 2008.

EFEUGLU, C.; AKCAY, Y. D.; ERTÜRK, S. A. A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. **Journal Oral maxillofacial Surgery**, v.62, n.11, p. 1403-1407, 2004.

GARG, A. K. The future role of growth factors in bone grafting. **Dental Implantology Update**, v.1, p. 5-7, 1999.

GIOSSO, M. A.; BENITES, N. R.; KÄMPF, G. Análise microbiológica de ossos de cães conservados por longo período de tempo na glicerina a 98 por cento à temperatura ambiente, objetivando a enxertia óssea. **Acta. Cirúrgica Brasileira**, v.17, n.4, p. 242-246, 2002.

KIM, S. G.; KIM, W. K.; PARK, J. C.; KIM, H. J. A comparative study of osseointegration of Avana implants in a demineralized freeze-dried bone alone or with platelet-rich plasma. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.60, n.9, p. 1018-25, 2002.

LANDSBERG, R.; ROY, M.; GLICKMAN, R. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet rich plasma gel preparation. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.58, n.3, p. 297-300, 2000.

LUCARELLI, E.; FINI, M.; BECCHERONI, A.; GIAVARESI, G.; ALDINI, N. N et al. Stromal stem cells and platelet-rich plasma improve bone allograft integration. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.435, p. 62-68, 2005.

LYNCH, S. E.; WILLIAMS, R. C.; POLSON, A. M.; HOWEL, T. H.; REDDY, M. S.; ZAPPA, U. E. et al. A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. **Journal Clinical Periodontal**, v.16, n.8, p. 545-548, 1989.

MAN, D.; PLOSKER, H.; WINLAND-BROWN, J. E. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. **Plastic Reconstructive Surgery**, v.107, n.1, p. 229-239, 2001.

MARX, R. E.; CARLSON, E. R.; EICHSTAEDT, R. M.; SCHIMMELE, S. R.; STRAUSS, J. E.; GEORGEFF, K. R. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology e Endodontics**, v.85, n.6, p. 638-646, 1998.

MARX, R. E. Platelet-rich plasma (PRP): What is PRP and What is not PRP? **Implant Dentistry**, v.10, n.4, p. 225-228, 2001.

MARX, R. E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. **Journal Oral Maxillofacial Surgery**, v.62, p. 489-496, 2004.

MARIA, P. P.; PADILHA FILHO, J. G.; CASTRO, M. B. Análise macroscópica e histológica do emprego da poliuretana derivada do óleo de mamona (*Ricinus communis*) aplicada na tíbia de cães em fase de crescimento. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 18, n.4, p. 332-336, 2003.

MELO, E. G.; REZENDE, C. M. F.; BORGES, A. P. B.; NÓBREGA NETO, P. I. Aloenxerto ósseo cortical: avaliação do seu emprego em tíbia de cão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.50, n.4, p.385-94, 1998.

MESSORA, M. R.; NAGATA, M. J. H.; MELO, L. G. N.; FURLANETO, F. A. C.; DELIBERADOR, T. M.; GARCIA, V. G.; BOSCO, A. F. Análise de um protocolo de única centrifugação para o preparo do plasma rico em plaquetas (PRP) – estudo em coelhos. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia**, v.6, n.2, p. 136-141, 2009.

MORELLO, E.; BURACCO, P.; MARTANO, M.; PEIRONE, B.; CAPURRO, C.; VALAZZA, A.; COTTO, D.; FERRACINI, R.; SORA, M. Bone allografts and adjuvant cisplatin for the treatment of canine appendicular osteosarcoma in 18 dogs. **Journal Small Animal Practice**, v.42, n.2, p. 61-66, 2001

NUNES FILHO, D. P.; LUPPINO, F.; YAEDÚ, R. Y. F.; CARVALHO, P. S. P. Avaliação microscópica da ação do osso autógeno associado ou não ao PRP em cavidades ósseas de cães. **Implantnews**, v.4, n.3, p. 263-269, 2007.

OBARRIO, J. J.; ARAUZ-DUTARI, J. I.; CHAMBERIAIN, T. M.; CROSTON, A. The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology – case reports. **International Journal Periodontics Restorative Dentistry**, v.20, p. 487-497, 2000.

PAGLIOSA, G. M.; ALVES, G. E. S. Considerações sobre a obtenção e o uso do plasma rico em plaquetas e das células mesenquimais indiferenciadas em enxertos ósseos. **Ciência Rural**, v.37, n.4, p.1202-1205, 2007.

PINTO JUNIOR, H. S.; ALVARENGA, J.; IWASAKI, M. Enxertos ósseos homólogos preservados em glicerina a 98%. Técnica de enxertia e avaliação clínico-cirúrgica. **A Hora Veterinária**, v.16, n.92, p. 72-76, 1996.

ROMEIRO, R. L.; OLIVEIRA, S.; OLIVEIRA, S. H. F.; CHAGAS, L. F.; CARVALHO, S. Utilização do PRP em cirurgia de elevação de assoalho de seio maxilar: relato de caso. **Odontologia Clínico-Científica**, v.7, n.3, p. 253-256, 2008.

SANTOS, F. C.; RAHAL, S. C. enxerto ósseo esponjoso autógeno em pequenos animais. **Ciência Rural**, v.34, p. 1969-1975, 2004.

SILVA, S. B.; FERRIGNO, C. R. A.; STERMAN, F. A.; BACCARIN, D. C. B.; YAZBEK, K. V. B.; MURAMOTO, C.; AMAKU, M. Plasma rico em plaquetas combinado a hidroxiapatita na formação do calo ósseo em fraturas induzidas experimentalmente no rádio de cães. **Ciência Rural**, v.37, n.4, p.1045-1051, 2007.

SILVA, P. S. A.; DEL CARLO, R. J.; SERAKIDES, R. MONTEIRO, B. S.; BAIBINOT, P. Z.; ELEOTÉRIO, R. B.; PAEZ, O. L. A.; VILORIA, M. I. V. V. Plasma rico em plaquetas associado ou não ao osso esponjoso autógeno no reparo de falhas ósseas experimentais. **Ciência Rural**, v.39, n.1, p.129-134, 2009.

TÖNZÜM, T. F.; DEMIRALP, B. Platelet-rich plasma: A promising innovation in dentistry. **Oral Surgery Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics**, v.95, n.5, p.521-528, 2003.

VENDRAMIN, F. S.; FRANCO, D.; NOGUEIRA, C. M.; PEREIRA, M. S.; FRANCO, T. R. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de preparo e utilização em cirurgia plástica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.33, n.1, p. 24-28, 2006.

VIEGAS, C. A. A.; DIAS, M. I. R.; AZEVEDO, A. J. ; FERREIRA, F.; SAN ROMAN, F.; CABRITA, A. M. S. A utilização de Plasma Rico em Plaquetas na regeneração do tecido ósseo alveolar e cortical. Estudos experimentais num modelo de defeito ósseo periodontal em cão Beagle (*Canis familiaris*) e num modelo de defeito ósseo periodontal na ovelha (*Ovis aries*). **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.101, n.559-560, p. 193-213, 2006.

WEIBRICH, G.; HANSEN, T.; KLEIS, W.; BUCH, R.; HITZLER, W. E. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. **Bone**, v.34, n.4, p. 665-667, 2004.

WILSON, E. M. K.; BARBIERI, C. H.; MAZZER, N. Estimulação da cicatrização óssea pelo plasma autógeno rico em plaquetas. Estudo experimental em coelhos. **Acta Ortopédica Brasileira**, v14, n. 4, p. 208-212, 2006.

ZILIOTTO, L.; DALECK, C. R.; PADILHA FILHO, J. G.; SOUZA, A. P.; FANTINATTI, A. P.; DINIZ, P. P. V. P. Utilização de implante ósseo cortical alógeno conservado em glicerina para preservação de membro torácico, Estudo experimental em cães. **Acta. Cirúrgica Brasileira**, v.18, n.2, p.107-115, 2003