

Ivy Kiemle Trindade-Suedam

Estudo comparativo dos resultados de enxerto de vidro bioativo e osso autógeno, associados ou não ao plasma rico em plaquetas, em seio maxilar de coelho: análise fractal, densitométrica e histomorfométrica.

Araraquara - SP

2007



Faculdade de Odontologia de Araraquara
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Ivy Kiemle Trindade-Suedam

Estudo comparativo dos resultados de enxertos de vidro bioativo e osso autógeno, associados ou não ao plasma rico em plaquetas, em seio maxilar de coelho: análise fractal, densitométrica e histomorfométrica.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Doutor em Periodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Gulnara Scaf
Co-orientador: Prof. Dr. Elcio Marcantonio Jr

Araraquara

2007

Trindade-Suedam, Ivy Kiemle

Estudo comparativo dos resultados de enxertos de vidro bioativo e osso autógeno, associados ou não ao plasma rico em plaquetas, em seio maxilar de coelho: análise fractal, densitométrica e histomorfométrica / Ivy Kiemle Trindade-Suedam. – Araraquara : [s.n.], 2007.

148 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia.

Orientador: Profa. Dra. Gulnara Scaf

Co-orientador: Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior

1. Seio maxilar 2. Transplante ósseo 3. Materiais
biocompatíveis 4. Densidade óssea 5. Radiografia
6. Histologia I. Título.

Ivy Kiemle Trindade-Suedam

Estudo comparativo dos resultados de enxertos de vidro bioativo e osso autógeno, associados ou não ao plasma rico em plaquetas, em seio maxilar de coelho: análise fractal, densitométrica e histomorfométrica

COMISSÃO JULGADORA

Tese para obtenção do grau de Doutor

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Gulnara Scaf

2º Examinador: Profa. Dra. Maria Lúcia Rubo de Rezende

3º Examinador: Prof. Dr. Eduardo Sant'Ana

4º Examinador: Prof. Dr. Eduardo Hochuli Vieira

5º Examinador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

Araraquara, 10 de outubro de 2007

DADOS CURRICULARES

Ivy Kiemle Trindade-Suedam

NASCIMENTO	27/01/1977 – Ribeirão Preto
FILIAÇÃO	Alceu Sergio Trindade Junior Inge Elly Kiemle Trindade
1996 – 1999	Curso de graduação Faculdade de Odontologia de Bauru – USP.
2000 - 2002	Curso de aperfeiçoamento em Cirurgia Bucal Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Bauru – USP.
2002 - 2004	Curso de pós-graduação em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais, nível de Mestrado, pela Faculdade de Odontologia, São Paulo, USP.
2004 - 2007	Curso de pós-graduação em Periodontia, nível de Doutorado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

DEDICATÓRIA

Dedico sinceramente este trabalho...

...ao meu marido **Valdey Suedam**, que acompanhou de perto cada etapa deste trabalho e que sempre me estimulou a seguir em frente, mesmo tendo que abrir mão de minha presença constante por alguns anos. Você desperta em mim o que tenho de melhor. Tenho certeza que ainda alcançaremos muitos sonhos além daqueles que já concretizamos juntos.

...aos meus pais, **Alceu e Inge**, professores da Faculdade de Odontologia de Bauru, que são para mim os maiores exemplos profissionais que conheço. Obrigada por torcerem tão firmemente por mim em todas as etapas de minha vida acadêmica e pessoal, como se cada vitória minha fosse também de vocês.

...ao meu irmão **Sergio Henrique**, que com seu olhar atento e tão carinhoso esteve presente, mesmo que de longe, vibrando, em cada fase da minha vida.

...ao meu irmão **Paulo Alceu**, aluno de Odontologia, que aguçou em mim a vontade do saber e me mostrou indiretamente a necessidade da constante atualização, com suas perguntas e dúvidas intrigantes.

...à minha avó **Joana**, que sempre comemorou cada volta minha como se não me visse há anos, mesmo que fizesse apenas alguns dias.

...à minha avó **Hannelore**, que nos deixou no decorrer deste curso e que nunca mediu esforços pessoais para chegar aonde eu cheguei.

AGRADECIMENTOS ESPECIAS

À Profa. **Gulnara Scaf**, orientadora deste trabalho, agradeço imensamente por ter me recebido nesta Faculdade, por ter conduzido cada passo meu de forma tão competente e criteriosa e por ter apoiado cada decisão, confiado e acreditado em mim, mostrando, dia a dia, que eu era capaz de ir além.

Ao Prof. **Elcio Marcantonio Jr**, co-orientador deste trabalho, pessoa que consegue reunir em si três características excepcionais: um excelente professor, um pesquisador de alta qualidade e um primoroso cirurgião, manifesto aqui toda a minha admiração e o meu reconhecimento.

Aos Professores **Guilherme Tosoni, Carlos Benatti Neto, Amauri Leite**
e **Elza Leite**, gostaria de manifestar todo o meu agradecimento pela
orientação precisa e ajuda imprescindível para a realização deste estudo.

À Profa. **Mirian Aparecida Onofre**, que além de professora desta casa, é
também minha prima. Agradeço da forma mais sincera possível, todo o
apoio que recebi, as hospedagens freqüentes e, enfim, o ombro amigo.

À minha querida amiga e companheira de trabalho **Juliana Moraes**, que
fez parte do meu cotidiano em Araraquara, sou grata por dividir comigo
dias de tanto esforço e trabalho, dias tão especiais que valeram a pena...

Aos queridos amigos **Fábio Leite e Rafael Faeda** que me mostraram que
a união de forças torna cada um mais forte.

AGRADECIMENTOS

À Profa. **Adriana Marcantonio**, diretora desta Faculdade, pelo exemplo de liderança e competência.

À Profa. **Marisa Gabrielli e Silvana Perez Orrico**, pelas valiosas sugestões a este trabalho.

Aos amigos **Cacá e Patrícia**, por me acolherem em sua casa nos passos finais este trabalho.

Aos ex-alunos de iniciação científica, **Mário Verzola e Talita Paquier**, pela preciosa ajuda durante a fase experimental deste trabalho.

Aos funcionários **Claudinha, Zé Antônio, Edineide, Marcelo, Ronaldo, Regina Lúcia, Zezé, Alexandre, Leila, Augusto, Wilson e Celso**, que participaram diretamente e que não mediram esforços para a realização deste trabalho.

Aos funcionários da pós-graduação **Mara, Rosângela, Alexandre e Flávia**, por estarem sempre dispostos a ajudar.

e

Aos **professores, funcionários e colegas de pós-graduação** do departamento de Diagnóstico e Cirurgia.

*“No fundo, a pesquisa é a busca da verdade;
sendo esta difícil de encontrar, como é secularmente conhecido,
não surpreende que poucos se disponham a buscá-la.
Portanto, do pesquisador exige-se que trabalhe pelo amor da verdade,
pela emoção da descoberta...”*

Protásio Lemos da Luz, 2002.

InCor, FMUSP.

SUMÁRIO

RESUMO.....	18
ABSTRACT.....	19
1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	23
3 PROPOSIÇÃO.....	41
4 MATERIAL E MÉTODO.....	43
4.1 Amostra e cronograma de desenvolvimento.....	44
4.2 Técnica cirúrgica.....	47
4.3 Preparo do plasma rico em plaquetas.....	58
4.4 Obtenção e análise das imagens radiográficas.....	65
4.5 Processamento e análise das peças anatômicas.....	72
4.6 Análise estatística.....	76
5 RESULTADO.....	77
6 DISCUSSÃO.....	101
7 CONCLUSÃO.....	120
8 REFERÊNCIAS.....	122
9 ANEXOS.....	133

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Divisão de grupos.....	46
Figura 2: Área de acesso ao seio maxilar e da área doadora do enxerto, após tricotomia e antissepsia.....	48
Figura 3: Seqüência cirúrgica de acesso ao seio maxilar.....	50
Figura 4 – Diagrama indicando o local de osteotomia para confecção da janela óssea para acesso ao seio maxilar.....	51
Figura 5 – Diagrama indicando a loja enxertada do seio maxilar (“b” e “p”) e outras lojas anatômicas do mesmo seio maxilar (“rs” e “sc”). “nc” corresponde à cavidade nasal.....	52
Figura 6: Esqueleto de coelho ilustrando o osso íliaco.....	54
Figura 7: Procedimento cirúrgico para obtenção do osso autógeno: exposição (A), remoção (B) e aspecto final (C) do osso íliaco no momento da obtenção do enxerto.....	55
Figura 8: Osso autógeno proveniente do íliaco no triturador ósseo.....	56
Figura 9: Perioglas [®] (Novabone products, llc, Alachua, Florida 32615): frascos esterilizados de 0,5 cc cada (A) e material hidratado em solução salina (B).....	57
Figura 10: Seqüência da coleta sangüínea: animal posicionado em dispositivo para contenção (A), vacutainer [®] , escalpe e seringa para a coleta sangüínea (B); punção da veia auricular (C); sangue coletado em tubo com acd-a, homogenizado manualmente (D).....	60
Figura 11: Seqüência laboratorial de preparo do plasma rico em plaquetas: máquina Coulter t – 890 para contagem dos elementos figurados do sangue (A); coleta de pequena amostra de sangue para contagem (B); centrifuga hermler (C); vista interna da centrífuga (D).....	62
Figura 12: Seqüência laboratorial de obtenção do plasma rico em plaquetas: separação entre plasma e glóbulos vermelhos após 1ª centrifugação (A); pipetagem do plasma para nova centrifugação em tubo plástico (B); tubo esquerdo: plasma após 2ª centrifugação e tubo direito: plasma pobre em plaquetas (C); plasma rico em plaquetas (D); osso autógeno associado ao plasma rico em plaquetas (E); vidro bioativo associado ao plasma rico em plaquetas (F).....	64
Figura 13: Seqüência de procedimentos para a tomada radiográfica: peça anatômica contendo o seio maxilar posicionada sobre o filme (A); filme e peça acondicionados no posicionador radiográfico (B); imagem radiográfica do seio	

maxilar e da escala de alumínio, utilizada para a aferição da densidade óssea (C).....66

Figura 14: Seqüência para obtenção das imagens para a análise radiográfica: seleção da região de interesse (RI) em vermelho e região controle (RC) em amarelo (A); RI (B) e RC (C) prontas para análise da densidade óssea radiográfica.....68

Figura 15: Seqüência de manipulação da região de interesse (RI) para a determinação da dimensão fractal: RI selecionada da imagem original (A); imagem binária (IB) da RI (B); imagem esqueletizada (IE) da IB (C); imagem invertida da IE (D).....70

Figura 16: Seleção da região de interesse na lâmina histológica (em vermelho): tábua óssea vestibular (1); processo alveolar (2); cortical palatina (3); membrana sinusal (4).....75

Figura 17: Valores da densidade óssea radiográfica, expressos em milímetros equivalentes de alumínio, na regiões de interesse (enxertada) e região controle (vazia), nos quatro tratamentos (OA, VB, OA+PRP e VB+PRP). Os traços horizontais representam o valor mediano (Me), o 1º e 3º quartis (Q1 e Q3) e os valores máximo (máx) e mínimo (mín) observados, desconsiderando os valores discrepantes (pontos) identificados conforme critério estabelecido por Tukey (1977).....80

Figura 18: Valores da dimensão fractal, compreendidos entre 1 e 2, na região de interesse (enxertada) e região controle (vazia), nos quatro tratamentos (OA, VB, OA+PRP e VB+PRP). Os traços horizontais representam o valor mediano (Me), o 1º e 3º quartis (Q1 e Q3) e os valores máximo (máx) e mínimo (mín) observados, identificados conforme critério estabelecido por Tukey (1977).....83

Figura 19: Diferença média dos valores de densidade óssea radiográfica e dimensão fractal entre a região enxertada e a região vazia, nos quatro tratamentos (OA, VB, OA+PRP e VB+PRP). Os traços horizontais representam o valor mediano (me), o 1º e 3º quartis (q1 e q3) e os valores máximo (máx) e mínimo (mín) observados, desconsiderando os valores discrepantes (pontos) identificados conforme critério estabelecido por Tukey (1977).....85

Figura 20: Valores da histométrica, expressos em % de preenchimento ósseo, nos quatro tratamentos (OA, VB, OA+PRP e VB+PRP). Os traços horizontais representam o valor mediano (Me), o 1º e 3º quartis (Q1 e Q3) e os valores máximo (máx) e mínimo (mín) observados, desconsiderando os valores discrepantes (pontos) identificados conforme critério estabelecido por Tukey (1977).....87

Figura 21: Correlações estimadas entre as variáveis densidade óssea radiográfica, dimensão fractal e histometria nos quatro tratamentos (OA, VB, OA+PRP e VB+PRP).....88

Figura 22: Corte histológico de um seio maxilar de coelho enxertado com osso autógeno, corado com Tricrômio de Masson.....	90
Figura 23: Corte histológico de um seio maxilar de coelho enxertado com osso autógeno, corado com Tricrômio de Masson: vasos sanguíneos (1), osteócitos (2), canais de Havers (3).....	91
Figura 24: Corte histológico de um seio maxilar de coelho enxertado com vidro bioativo. Corado com Tricrômio de Masson.....	93
Figura 25: Corte histológico de um seio maxilar de coelho enxertado com vidro bioativo. Corado com Tricrômio de Masson: partículas do vidro bioativo (1), tecido conjuntivo fibroso (2), espaço medular amplo (3).....	94
Figura 26: Corte histológico de um seio maxilar de coelho enxertado com uma combinação de osso autógeno e prp, corado com Tricrômio de Masson.....	96
Figura 27: Corte histológico de um seio maxilar de coelho enxertado com uma combinação de osso autógeno e prp, corado com Tricrômio de Masson: linha de reversão mostrando a divisão do osso pré-existente com o osso neoformado (1), espículas ósseas (2), espaços medulares amplos (3), canais de Havers (4).....	97
Figura 28: Corte histológico de um seio maxilar de coelho enxertado com uma associação de vidro bioativo e prp, corado com Tricrômio de Masson.....	99
Figura 29: Corte histológico de um seio maxilar de coelho enxertado com uma associação de vidro bioativo e prp, corado com Tricrômio de Masson: trabécula óssea fina e alongada (1), partícula do biomaterial (2), medular adiposa (3)....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos experimentais.....	45
Tabela 2: Protocolo desenvolvido para obtenção do PRP.....	63
Tabela 3: Valores individuais e médios (desvio padrão) do número de elementos figurados no sangue venoso (SV) e no plasma rico em plaquetas (PRP) e porcentagem de aumento (PA) de plaquetas no PRP relativamente ao SV, nos animais tratados com a combinação de osso autógeno+PRP e vidro bioativo+PRP.....	78
Tabela 4: Valores individuais e médios de densidade óssea radiográfica, da região de interesse (RI) e da região controle (RC), em milímetros equivalentes de alumínio, nos quatro tratamentos: osso autógeno (OA), vidro bioativo (VB), OA+PRP e VB+PRP.....	79
Tabela 5: Comparação entre os valores médios (desvio padrão) de densidade óssea radiográfica, expressos em milímetros equivalentes de alumínio, nas regiões de interesse (RI) e regiões controle (RC), nos quatro tratamentos: osso autógeno (OA), vidro bioativo (VB), OA+PRP e VB+PRP.....	81
Tabela 6: Valores individuais e médios de dimensão fractal, da região de interesse (RI) e da região controle (RC), que podem variar de 1 a 2, nos quatro tratamentos: osso autógeno (OA), vidro bioativo (VB), OA+PRP e VB+PRP.....	82
Tabela 7: Comparação entre os valores médios (desvio padrão) de dimensão fractal, compreendidos entre 1 e 2, nas regiões de interesse (RI) e regiões controle (RC), nos quatro tratamentos: osso autógeno (OA), vidro bioativo (VB), OA+PRP e VB+PRP.....	84
Tabela 8: Valores individuais da quantidade de osso aferida pela histometria, expressa em porcentagem de osso presente. Cada valor representa a média das medidas feitas em 3 cortes de cada seio maxilar, nos quatro tratamentos: osso autógeno (OA), vidro bioativo (VB), OA+PRP e VB+PRP.....	86
Tabela 9: Comparação entre os valores médios (desvio padrão) da histometria, expressos em porcentagem de preenchimento ósseo, nos quatro tratamentos: osso autógeno (OA), vidro bioativo (VB), OA+PRP e VB+PRP.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS

ACD-A - adenina citrato dextrose - Fórmula A

ACS – esponja de colágeno absorvível

BMP - proteína óssea morfogenética

.bmp - bitmap format

C - coelho

CaCl₂ - cloreto de cálcio

CaO – óxido de cálcio

cc – centímetros cúbicos

cm – centímetro

DF - dimensão fractal

DO – densidade óssea radiográfica

dp – desvio padrão

dpi – pontos por polegada

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

EGF – fator de crescimento endotelial

EqAl – equivalentes de alumínio

EVGF - fator de crescimento endotelial vascular

FGF – fator de crescimento fibroblástico

FOAr – Faculdade de Odontologia de Araraquara

G - grupo

g – grama

HU – Hounsfield unit

IB – imagem binária

IE – imagem esqueletizada

IGF - fator de crescimento semelhante à insulina

IL - interleucina

IKTS - Ivy Kiemle Trindade-Suedam

JANDM - Juliana Aparecida Najarro Dearo de Morais

kg - kilograma

kVp - kilovoltagem

LD - lado direito

LE - lado esquerdo

mA – miliamper
Me – mediana
mg - miligramas
mL - mililitro
mm³ – milímetros cúbicos
µL – microlitros
µm - micrômetros
Na₂O - sódio
OA - osso autógeno
P₂O₅ – pentóxido de fósforo
PA – porcentagem de aumento
PAF – fator de ativação plaquetária
PDGF - fator de crescimento derivado das plaquetas
PPP – plasma pobre em plaquetas
PRP - plasma rico em plaquetas
PVPI – polivinilpirrolidona iodo
Q - quartil
r - coeficiente de correlação
RC – região controle
rhBMP-2 - proteína óssea morfogenética recombinante humana
RI – região de interesse
rpm - rotação por minuto
SiO₂ - dióxido de sílica
SM - seio maxilar
SMD - seio maxilar direito
SME - seio maxilar esquerdo
SV – sangue venoso
TGF - fator de crescimento de transformação
TIFF - tagged image file format
VB - vidro bioativo
vs – versus
x - média

Apoio financeiro: CAPES

Trindade-Suedam IK. Estudo comparativo dos resultados de enxertos de vidro bioativo e osso autógeno, associados ou não ao plasma rico em plaquetas, em seio maxilar de coelho: análise fractal, densitométrica e histomorfométrica [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2007.

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da associação de osso autógeno (OA) e de vidro bioativo (VB) ao plasma rico em plaquetas (PRP) como substitutos ósseos no interior de seios maxilares (SM) de coelhos, por meio de análise radiográfica da densidade óssea e da dimensão fractal e análise histomorfométrica. Adicionalmente, pretendeu-se validar os métodos da densidade óssea e dimensão fractal como indicadores da neoformação óssea. Para tanto, 20 coelhos divididos em dois grupos (G1 e G2) foram submetidos à cirurgia de levantamento de SM. No G1, 10 SM esquerdos foram enxertados com OA e 10 SM direitos com VB. No G2, 10 SM esquerdos foram enxertados com uma combinação de OA+PRP e 10 SM direitos com VB+PRP. Após 90 dias, os animais foram sacrificados e radiografias padronizadas dos SMs foram obtidas. Os valores médios (desvio padrão) da densidade óssea, expressa em milímetros equivalentes de alumínio, para os tratamentos OA, VB, OA+PRP e VB+PRP foram, respectivamente, 1,79(0,316), 2,04(0,398), 1,61(0,285) e 1,53(0,309), sendo que diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) foram encontradas entre os valores de VB e OA, e, VB+PRP e VB. Na dimensão fractal, os valores encontrados, que podem variar de 1 a 2, foram 1,48(0,040), 1,35(0,084), 1,44(0,043) e 1,44(0,066), respectivamente. Diferenças significantes ($p < 0,05$) foram encontradas entre os valores de VB e OA, e, OA+PRP e VB. Na histometria, expressa em porcentagem de preenchimento ósseo, os valores obtidos foram $63,30 \pm 8,609$, $52,65(10,415)$, $55,25(7,018)$ e $51,07(10,255)$, respectivamente. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os tratamentos. Não houve correlação estatisticamente significativa entre as variáveis densidade óssea, dimensão fractal e porcentagem de osso. Na análise histológica dos SM tratados com OA observou-se tecido ósseo neoformado, ricamente vascularizado e celularizado, preenchendo quase que a totalidade do SM. Nos demais tratamentos, na maioria dos casos, foram observadas trabéculas ósseas neoformadas que raramente se conectavam entre si, com espaços medulares amplos. Não se observou a presença de células inflamatórias na região. Nos grupos tratados com VB e VB+PRP, observou-se fragmentos do biomaterial. Frente a estes achados, conclui-se que: 1) os melhores resultados foram alcançados com o OA, nas análises histomorfométrica e radiográfica, em relação ao VB ou à associação destes materiais com o PRP, devendo, portanto, o OA ser considerado o material de escolha para a enxertia do seio maxilar; 2) a densidade óssea radiográfica e a dimensão fractal, em função das limitações observadas, devem ser utilizadas como métodos complementares na análise dos resultados cirúrgicos.

Palavras-chave: Seio maxilar; transplante ósseo; densidade óssea; radiografia

Trindade-Suedam IK. Outcomes of bioactive glass and autogenous bone, associated or not with platelet-rich plasma, in the augmentation of the rabbit maxillary sinus: fractal, densitometric and histomorphometric analysis. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2007.

Abstract

The objective of the present study was to evaluate the use of autogenous bone (AB) and bioactive glass (BG) and the association of these materials with platelet-rich plasma (PRP), as bone substitutes in the rabbit maxillary sinus (MS) by means of radiographical bone density and fractal dimension and by histomorphometrical analysis. In addition, the study aimed at validating the two radiographic methods as indicators of bone formation. Twenty rabbits divided into two groups (G1 and G2) were submitted to sinus lift surgery. In G1, 10 left MS were grafted with AB and 10 right MS were grafted with BG. In G2, 10 left MS were grafted with AB+PRP and 10 right MS were grafted with VB+PRP. Ninety days after, the animals were sacrificed and standardized radiographs were taken. Mean values (standard deviation) of bone density, expressed as aluminium equivalent millimeters, in MS grafted with OA, VB, OA+PRP and VB+PRP were $1,79\pm 0,316$, $2,04\pm 0,398$, $1,61\pm 0,285$ and $1,53\pm 0,309$, respectively. Statistically significant differences ($p < 0,05$) were observed in bone density between BG and AB, and between BG+PRP and BG. Mean values of fractal dimension, which can vary from 1 to 2, were $1,48\pm 0,040$, $1,35\pm 0,084$, $1,44\pm 0,043$ and $1,44\pm 0,066$, respectively. Significant differences were observed between BG and AB and AB+PRP and BG. Mean values of percentage of bone inside MS, assessed by histometrical analysis were, respectively, $63,30\pm 8,609$, $52,65\pm 10,415$, $55,25\pm 7,018$ and $51,07\pm 10,255$. Differences were not statistically significant. No correlations were observed among bone density, fractal dimension and percentage of bone. Histological analysis showed that MS treated with AB presented newly formed and mature lamellar bone, with active bone formation presenting several vessels and osteoblasts. The other groups showed minor bone formation, with a diffuse marrow and thin network of newly formed trabeculae. Inflammatory cells were not observed. In the MS grafted with BG, fragments of the biomaterial were also observed. In conclusion, AB achieved better results in relation to BG, AB+PRP and BG+PRP, as assessed by radiographic and histomorphometrical analysis, and therefore should be considered the gold-standard material for maxillary sinus augmentation. Due to the limitations observed, bone density and fractal analysis should be used as complementary methods for the assessment of surgical results.

Keywords: Maxillary sinus; bone transplantation; biomaterials; bone density; radiography; histology.

1 Introdução

1 Introdução

Desde a descoberta do fenômeno biológico da osseointegração por Per-Ingvar Brånemark¹⁵ na década de 50 até os dias atuais, os implantes osseointegráveis tornaram-se procedimento de rotina no tratamento odontológico devido à sua alta previsibilidade. O sucesso clínico dos implantes vem proporcionando um aumento do número de pacientes desdentados reabilitados tanto em relação à estética como à função mastigatória^{1,32}.

Entretanto, alguns casos são considerados críticos para a reabilitação como a região posterior da maxila edêntula que apresenta freqüentemente uma acentuada diminuição da quantidade de osso em decorrência da atrofia do processo alveolar e da pneumatização do seio maxilar, impossibilitando a instalação de implantes^{10,39,98}.

A cirurgia de levantamento da membrana do seio maxilar, com a interposição de enxerto ósseo entre esta membrana e o assoalho do seio, é um procedimento que foi introduzido por Boyne, James¹³ (1980) e que tem sido empregado rotineiramente para viabilizar a colocação dos implantes osseointegráveis^{54,86}. Seu objetivo primordial é corrigir a deficiência em altura de tecido ósseo, permitindo assim a instalação de implantes com comprimento adequado¹¹.

Diversos biomateriais, de origem natural ou sintética, estão disponíveis para enxerto tais como o osso bovino, o osso humano

homógeno, o plasma rico em plaquetas, a hidroxiapatita e o vidro bioativo; porém, o osso autógeno é ainda considerado o material de escolha para o preenchimento de seios maxilares^{14,89}.

A avaliação radiográfica da região enxertada representa o mais importante passo no controle pós-operatório das cirurgias de levantamento de seio maxilar. Diversos métodos de avaliação vêm sendo utilizados como a análise fractal, análise da densidade, da textura e a subtração radiográfica digital, que permitem uma aferição objetiva do processo de integração do enxerto, indicando o sucesso ou insucesso da cirurgia realizada^{8,14,28,69,76,91,101}.

Considerando que não foram encontrados estudos prospectivos controlados que tenham investigado o uso do vidro bioativo e sua associação ao plasma rico em plaquetas (PRP) no interior do seio maxilar, e que tenham estabelecido parâmetros objetivos, como a dimensão fractal ou a densidade, indicativos da neoformação óssea neste tipo de cirurgia, foi nosso objetivo avaliar por meio de análise radiográfica e histomorfométrica, o desempenho do vidro bioativo e do PRP em relação ao osso autógeno, procurando consolidá-los ou não como uma nova opção de tratamento para a reconstrução de rebordos maxilares reabsorvidos e a futura reabilitação protética por meio de implantes osseointegráveis.

2 Revisão da literatura

2 Revisão da literatura

2.1 Osso autógeno e biomateriais

Até o presente momento, o osso autógeno é considerado o material de escolha para cirurgias de reconstrução do processo alveolar^{11,14,92,89} por apresentar propriedades biológicas tais como osteoindução e osteocondução, além de trazer diretamente para a área receptora, um aporte considerável de células osteogênicas.

Apesar dos excelentes índices de sucesso clínicos descritos na literatura, confere-se ao osso autógeno algumas limitações clínicas, quais sejam, disponibilidade de pouco volume em áreas doadoras intrabucais, criação de um segundo sítio cirúrgico para obtenção do enxerto, aumento do tempo cirúrgico e maiores desconforto e morbidade no trans e pós-operatórios, principalmente em se tratando de áreas doadoras extrabucais^{9,21,14,58,59,62,68}.

Assim, em decorrência destas características indesejáveis referentes ao osso autógeno, o desenvolvimento de novos materiais que o substituam assume um papel de destaque na literatura. Neste sentido, vários autores^{11,26,35,44,50,53,95,104,109} vêm estudando a associação do osso autógeno a diferentes tipos de biomateriais ou, até mesmo, o emprego isolado destes enxertos tais como o osso homogêneo, o osso heterogêneo, cerâmicas a base de fosfato de cálcio, as hidroxiapatitas e os vidros

bioativos em diferentes sítios cirúrgicos, com o objetivo de diminuir a quantidade de osso necessária para a cirurgia. Estes estudos têm demonstrado boa previsibilidade e bons resultados em longo prazo.

Outras vantagens dos biomateriais compreendem: o alto grau de biocompatibilidade com o hospedeiro, a ausência de toxicidade, o fato de não desencadearem reação inflamatória expressiva, de serem passíveis de esterilização, o baixo ou o nulo índice de transmissão de doenças, a radiopacidade, a facilidade de obtenção e o custo acessível⁴¹.

Dentre os biomateriais de origem sintética utilizados para enxertia do seio maxilar, encontram-se as cerâmicas derivadas de fosfato de cálcio, tais como as hidroxiapatitas, o β -fosfato tricálcio e o vidro bioativo.

2.2 Vidro Bioativo

O biovidro uma cerâmica sintética composta, em peso, por 45% de SiO_2 , 24,5% de CaO , 24,5% de Na_2O e 6% de P_2O_5 ^{26,37,42,78}. É um material biocompatível⁴³, atóxico¹⁰⁸, reabsorvível²⁶, radiopaco⁸³, apresenta propriedades osteocondutoras^{26,48,78}, hemostáticas^{42,78} e antimicrobiana^{4,5} além de promover uma forte união química com o osso, sua principal característica⁷⁸⁻⁸⁰.

É assim chamado, pois, ao entrar em contato com fluidos corporais, sofre um processo de dissolução gradual, tendo como resultado uma interação bioquímica com células e tecidos^{38,52,78-80}. Com o processo

corrosivo, uma troca de íons com o meio se inicia e uma camada superficial ricamente constituída por moléculas de cálcio e fósforo é formada, assim como uma subcamada localizada no centro das partículas, que é composta por alta concentração de sílica⁷⁸.

Com a continuação do processo bioquímico, ocorre uma quebra da estrutura externa de cálcio e fósforo e o interior da partícula, preenchida por um gel de sílica torna-se exposta ao meio externo e é reabsorvida por fagócitos presentes nos arredores da partícula. Em seguida, células osteoprogenitoras reconhecem as paredes internas formadas por cálcio e fósforo como um ambiente semelhante ao tecido ósseo, aderem-se à essa estrutura e se diferenciam em osteoblastos, levando à formação de ilhas de osso neoformado, que irá se conectar com o osso pré-existente ao redor da partícula⁵². Esta conformação estrutural das partículas de vidro que se ligam firmemente à apatita óssea⁴² é denominada de dupla camada ou dupla estrutura⁷⁸.

Schepers et al.⁷⁸(1991) demonstraram por meio de análise química, que as partículas de vidro bioativo, quando implantadas em defeitos ósseos em mandíbula de cães, apresentavam após 1 mês conexão do centro com o meio externo por meio de pequenos túbulos que, na presença de macrófagos, células mesenquimais indiferenciadas e fibroblastos, levavam a uma gradual desintegração e escavação de seu centro. Após 2 meses, os núcleos das partículas apresentaram-se povoados por osteoblastos, podendo-se notar a presença de tecido

osteóide e tecido ósseo calcificado tanto no interior como ao redor das partículas. Aos 3 meses, toda a massa de material encontrava-se envolvida por osso neoformado e no centro das partículas já era possível notar a presença de tecido ósseo maduro.

Em estudos *in vitro*^{4,5,85} nos quais se investigou os possíveis efeitos do biovidro sobre bactérias comumente encontradas na cavidade bucal, foi observado que, tanto as bactérias supragengivais como as subgengivais tais como *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans*, *Actinomyces viscosus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* e *Agregatibacter actinomycetemcomitans* tornaram-se inviáveis na presença de uma solução de vidro bioativo, sugerindo o potencial antimicrobiano deste material. De acordo com os autores, isto se deve ao fato de que, em um ambiente aquoso, o vidro bioativo libera íons Ca^{2+} , Na^+ , $\text{PO}_4^{(3-)}$, e Si^{4+} , resultando em um aumento do pH e, conseqüentemente, alterando a viabilidade destes microorganismos. Por este motivo, este biomaterial foi considerado uma opção para enxertia de defeitos ósseos periodontais e de seios maxilares, regiões anatômicas que freqüentemente são colonizadas por alguns desses organismos.

Quanto ao uso do vidro bioativo em seios maxilares, Tadjedin et al.⁸⁷ (2000) avaliaram por meio de análise histomorfométrica o comportamento de uma mistura de osso autógeno/biovidro (1:1) em pacientes submetidos à cirurgia de levantamento bilateral do seio maxilar.

Seus resultados demonstraram que as biópsias obtidas do local de instalação dos implantes eram compostas, aos 6 meses, por partículas de vidro em processo ativo de reabsorção envoltas por tecido ósseo trabecular neoformado, sem a presença de células inflamatórias. Aos 16 meses o que se pode notar foi, exclusivamente, a presença de tecido ósseo maduro sem evidências de partículas do vidro bioativo no local.

Turunen et al.⁹⁶ (2004), estudando as propriedades do vidro bioativo associado ao osso autógeno enxertado em seios maxilares de humanos, observaram na análise histomorfométrica que, após 1 ano, as biópsias eram compostas por osso trabecular maduro e por tecido osteóide, além da presença de células hematopoiéticas, tanto no grupo de vidro + osso autógeno como no grupo controle (osso apenas). Frente a estes resultados favoráveis, o vidro bioativo tem sido objeto de intensa investigação como substituto ósseo em cirurgias periodontais e em cirurgias de reconstrução óssea^{26,88,98}.

Neste contexto, Fetner et al.³¹ (1994) desenvolveram um estudo clínico para investigar o comportamento do vidro bioativo em defeitos periodontias criados cirurgicamente em macacos e concluíram que o material foi capaz de aderir firmemente ao osso, viabilizando o restabelecimento do ligamento periodontal, impedindo a formação de epitélio juncional longo e, portanto, favorecendo a reinserção das fibras do ligamento periodontal em níveis normais.

Comparando o uso de uma membrana reabsorvível com o vidro bioativo em defeitos ósseos periodontais de 1 a 3 paredes, de pacientes com periodontite agressiva generalizada, Mengel et al.⁶⁵ (2003), demonstrou que, após 12 meses, houve uma redução na profundidade de sondagem e um ganho de inserção significativos em ambos os grupos, demonstrando que tanto o vidro bioativo como o uso de membranas para recobrimento dos defeitos constituem boas opções de tratamento para regeneração periodontal.

Estudos desenvolvidos por pesquisadores deste departamento^{18,19,30}, investigaram o vidro bioativo em diferentes situações clínicas. Cancian et al.¹⁸ (2004) compararam o osso autógeno e o vidro bioativo (FillerBone[®] e PerioGlas[®]) como materiais para preenchimento de defeitos ósseos cirurgicamente criados em mandíbulas de macacos e concluiu que o biovidro apresentou potencial de reparação similar ao osso autógeno, com reabsorção quase que total do material após 180 dias e substituição por tecido ósseo neoformado, comprovando por meio de análise histológica sua atividade ostecondutora.

Já, Fernandes et al.³⁰ (2005), utilizando vidro bioativo e membrana de colágeno em defeitos de furca grau III em cães, mostraram um preenchimento parcial das furcas com regeneração óssea e cementária limitadas à porção apical das mesmas. Por fim, Cardoso et al.¹⁹ (2006) estudaram o uso de duas formas de vidro bioativo (Biogran[®] e PerioGlas[®]), com diferentes tamanhos de partículas, em defeitos críticos

em calvária de ratos. Por meio de análise histomorfométrica, os autores puderam observar após um período de 60 dias, neoformação óssea apenas nas margens do defeito e a presença de tecido conjuntivo fibroso ao redor das partículas de ambos os materiais.

2.3 Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

As plaquetas, células formadas na medula óssea a partir dos megacariócitos, juntamente com os eritrócitos e leucócitos, fazem parte do conjunto de células que compõem o sangue. Dentre suas funções, duas se destacam: 1) início do processo de hemostasia, ao formarem um tampão, viabilizando a formação do coágulo e 2) liberação de fatores de crescimento, que auxiliam o processo de reparo dos tecidos^{60, 63}.

O plasma rico em plaquetas, introduzido na comunidade científica por Whitman et al.¹⁰⁸ (1997) é um concentrado de células, obtido pelo processo de centrifugação do sangue autógeno, e que tem sido amplamente utilizado nas diversas áreas da Medicina e da Odontologia desde então^{6,20,34,56,60,61,64,71,72,75,90,110}.

O uso do PRP é baseado na premissa de que um elevado número de plaquetas libera quantidades significativas de fatores de crescimento, que são proteínas responsáveis por regularem processos celulares tais como mitose, quimiotaxia, diferenciação, metabolismo, produção de

colágeno e proliferação vascular, acelerando o processo de formação e de maturação ósseas^{24,56,57,108}.

Em contato com os fluidos corpóreos, as plaquetas sofrem o processo de ativação ou degranulação, que consiste na liberação destes fatores de crescimento presentes em grânulos secretórios especializados, os grânulos α ^{77,103}. Entre eles podemos citar o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento epitelial (EGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), fator de crescimento de transformação (TGF) beta 1 e beta 2, fator de crescimento endotelial vascular (EVGF), interleucinas-1 (IL-1), e fator de ativação plaquetária-4 (PAF-4)^{46,64}.

Dentre os principais benefícios clínicos do uso do PRP estão: maior densidade óssea radiográfica e histológica⁶⁴, instalação e ativação precoces do implante bem como uma maior previsibilidade do tratamento⁶³. Por estas razões, tornou-se prática comum em pesquisas clínicas a associação do PRP aos diferentes materiais para reconstrução óssea com o intuito de se investigar os reais benefícios do concentrado de plaquetas^{6,7,20,34,36,56,60,61,63,71,72,74,75,77,82,90,110}.

Em se tratando da obtenção e emprego do PRP em coelhos, três trabalhos constituíram o ponto de partida para a realização deste estudo^{2,17,29}. Cada qual descrevia diferentes metodologias para obtenção do PRP que variavam quanto ao volume de sangue coletado, às velocidades e quantidades de centrifugação, aos diferentes

anticoagulantes, às substâncias para geleificação do PRP, bem como os diferentes resultados referentes às contagens celulares.

Ademais, nenhum dos estudos faz referência aos cuidados necessários para a obtenção de um concentrado de plaquetas com reduzida contaminação leucocitária a qual pode estimular o aumento do número de células inflamatórias na ferida cirúrgica, e com a ativação plaquetária precoce, viabilizando a ação dos fatores de crescimento exclusivamente no leito cirúrgico. Por este motivo, foi objetivo deste trabalho descrever um novo protocolo para obtenção de PRP em coelhos com estes requisitos não considerados pelos protocolos descritos na literatura.

Aghaloo et al.² (2002) coletaram 10mL de sangue venoso autógeno em tubo contendo 1,1mL de anticoagulante ACD-A e submeteram esta amostra a 2 centrifugações sendo que a 1ª foi realizada a 215g por 10 minutos e, após a separação do plasma, este foi novamente centrifugado a 863g por 10 minutos. A metade superior formada no tubo foi desprezada por ser considerada um plasma pobre em plaquetas (10.000 – 50.000/mm³) e a metade inferior do tubo resultou no plasma rico em plaquetas (625.000 – 1.495.000/mm³). Foi acrescentada ao PRP uma solução de trombina bovina 5000 unidades e 5mL CaCl₂ a 10%, sendo que a proporção de cloreto de cálcio com o volume total do plasma foi de 10 PRP:1 CaCl₂.

Por sua vez, Efeoglu et al.²⁹ (2004) descreveram dois protocolos diferentes sendo que no primeiro os pesquisadores coletaram 9ml de sangue venoso autógeno em tubo com EDTA. A 1ª centrifugação foi realizada a 300g por 10 minutos e a camada de eritrócitos foi desprezada mantendo-se no procedimento o conjunto plasma + “pink” plasma (plasma com alguns eritrócitos). Na 2ª centrifugação, feita a 5000g por 5 minutos, somente a metade inferior contida no tubo foi considerada como plasma rico em plaquetas ($1000 \times 10^3 / \mu\text{l}$). O segundo protocolo difere do primeiro ao desprezar os 2/3 superiores do volume de plasma após a 2ª centrifugação considerando como PRP apenas o terço inferior deste volume ($3134 \times 10^3 / \mu\text{l}$).

Butterfield et al.¹⁷ (2005) prepararam o PRP por meio de duas centrifugações utilizando 21cc de sangue autógeno. Na primeira centrifugação, os autores submeteram o sangue total a uma velocidade de 150g por 20 minutos e na segunda centrifugação o plasma foi centrifugado a 400g por 10 minutos. Após este processo trombina e cloreto de cálcio a 10% foram adicionados ao PRP. A contagem de plaquetas alcançada no PRP foi $2061 \times 10^3 / \text{mm}^3$.

Assim sendo, a substituição do osso autógeno por biomateriais é justificada por tornar o procedimento cirúrgico mais simples e de menor morbidade. No entanto, ainda não está definido qual é o melhor biomaterial para ser empregado e nem mesmo a sua real eficácia. Também, ainda há dúvidas em relação à eficácia do PRP, mesmo quando

associado ao enxerto ósseo autógeno, pois os trabalhos apresentados na literatura são, na grande maioria das vezes, relatos de casos e/ou estudos não controlados.

2.4 Análise radiográfica

De acordo com a Academia Americana de Radiologia Oral e Maxilofacial, o sucesso no tratamento com implantes osseointegráveis está relacionado, entre outros, com uma adequada avaliação das estruturas ósseas onde se planeja instalar os implantes⁹⁷. A análise radiográfica pré-operatória viabiliza a determinação da presença de lesões patológicas ou de estruturas anatômicas, a conformação do processo alveolar e a aferição da qualidade e da quantidade de tecido ósseo disponível, tornando o tratamento mais previsível e, portanto, aumentando as chances de sucesso^{33,45,97}.

Cortet et al.²⁷ (2004) afirmaram que a retirada de biópsias ósseas para avaliação dos resultados pós-operatórios, em cirurgias de enxerto ósseo prévio à instalação de implantes, constitui um método invasivo e, portanto, inviável do ponto de vista ético na maioria dos casos. Assim, métodos não invasivos para a avaliação e caracterização da microarquitetura óssea se tornam necessários no campo da Implantodontia.

Os recentes avanços da tecnologia na obtenção de imagens radiográficas médicas e odontológicas, por meio do advento de sistemas de aquisição digital de imagens radiográficas, fizeram aumentar a demanda por métodos computacionais que aferissem de forma objetiva (quantitativa) os fenômenos biológicos relacionados aos procedimentos cirúrgicos, que antes eram avaliados apenas de forma subjetiva (qualitativa)^{28,45}. Da mesma forma, Tosoni et al.⁹¹ (2005) afirmam que a possibilidade de manipulação de imagens digitais compreende uma importante ferramenta para análises objetivas como a densidade óssea e sua microarquitetura, descrita pela dimensão fractal, métodos utilizados neste estudo.

2.4.1 Densidade óssea radiográfica

Densidade radiográfica corresponde ao grau de escurecimento do filme, que depende do poder de penetração dos raios-x nos diversos tecidos do corpo humano. Assim, as imagens obtidas de um tecido que têm a capacidade de absorver mais raios-x são mais radiopacas ou mais densas do que outras partes que absorvem menos raios-x, classificadas como menos densas ou mais radiolúcidas. Em se tratando de tecido ósseo, a densidade indica, em última análise, o grau de mineralização ou calcificação do tecido^{14,81,89}.

Boyne et al.¹⁴ (2005) desenvolveram um estudo clínico multicêntrico controlado e randomizado, no qual 48 pacientes foram submetidos à cirurgias de levantamento de seio maxilar, com enxerto de diferentes concentrações de proteína óssea morfogenética recombinante humana (rhBMP-2) ou enxerto ósseo autógeno (OA). Os resultados da análise histológica descritiva evidenciaram que, 4 meses após a cirurgia, havia a presença de tecido ósseo maduro nos três grupos, sem diferença histológica entre eles. Já, a análise tomográfica detectou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, mostrando que o OA (350mg/cc) apresentou a maior densidade óssea, seguido do grupo com 1.50mg/mL de rhBMP-2/ACS (134mg/cc) e por fim o grupo com 0.75mg/mL de rhBMP-2/ACS (84mg/cc).

Ao avaliar o efeito do vido bioativo como material de preenchimento em defeitos ósseos periodontais por meio dos parâmetros clínicos e radiográficos como a densidade, Zamet et al.¹¹² (1997) constataram que, após 12 meses, os valores mais elevados de densidade foram encontrados nas bolsas enxertadas com Perioglas. Nas bolsas tratadas apenas com raspagem e nas regiões controle (osso marginal ao defeito periodontal), os valores de densidade foram menores, sendo estas diferenças estatisticamente significantes.

Por sua vez, Schultze-Mosgau et al.⁸¹ (2001) avaliaram as alterações da densidade radiográfica do enxerto ósseo autógeno em seios maxilares de seres humanos e correlacionaram estes dados com os

resultados da análise histomorfométrica de biópsias retiradas do local onde se instalou implantes. Após 5 meses, os autores observaram que houve um aumento de densidade da ordem de 76 Hounsfields units (HU) para o osso enxertado no interior do seio maxilar. Ao mesmo tempo, a histometria acusou um ganho de 45% de tecido ósseo em relação à tomografia pós-operatória imediata. Entretanto, as alterações de densidade mostraram um baixo coeficiente de correlação (0.16) com os resultados da análise histométrica, indicando que a medida da densidade radiográfica óssea possui um valor preditivo baixo, devendo ser reconsiderado como instrumento de avaliação dos resultados pós-cirúrgicos.

Outros trabalhos que correlacionassem os dados da densidade com os da análise histomorfométrica, sendo esta última considerada a metodologia padrão, não foram encontrados.

2.4.2 Dimensão fractal

O segundo método de análise radiográfica empregado neste estudo, a análise fractal, também descrita como análise da dimensão fractal, corresponde a um modelo matemático que procura descrever formas complexas e não usuais da natureza, que não podem ser mensuradas por fórmulas matemáticas simples ou tradicionais tais como a

área de um quadrado ou de um círculo^{73,91}. O trabeculado ósseo é um bom modelo de uma estrutura biológica não comumente mensurável.

Este método de avaliação de padrões estruturais complexos utiliza uma fórmula matemática cujos resultados situam-se entre 1 e 2, sendo que 1 corresponde ao valor de uma estrutura que preenche nada ou praticamente nada de um espaço fixo pré-determinado. Já, quando a dimensão fractal corresponde a 2, esta estrutura biológica ocupa todo o espaço disponível de uma região com área pré-determinada^{12,22,91,102,111}. Valores elevados de dimensão fractal, próximos de 2, indicam estruturas ósseas mais complexas; valores mais próximos de 1 representam estruturas menos complexas. Entretanto, valores numéricos semelhantes podem representar estruturas ósseas com padrões microestruturais não necessariamente iguais¹⁰¹.

A análise fractal é um método que tem sido utilizado para o diagnóstico radiográfico da osteoporose^{84,91,101}, para aferir o padrão ósseo em maxilas edêntulas⁹⁹, para estudar o processo de reparo ósseo em lesões periapicais após o tratamento endodôntico²³, após cirurgias ortognáticas⁴⁹ e após a movimentação ortodôntica¹⁰⁶.

Tosoni et al.⁹¹ (2006), avaliaram a capacidade da análise fractal em detectar alterações ósseas em radiografias panorâmicas digitais de mulheres com e sem osteoporose. Seus achados evidenciaram uma baixa correlação entre os dados da dimensão fractal e a presença ou não da doença, sugerindo que este método não foi eficaz em detectar as

alterações no padrão ósseo de pacientes com osteoporose, condição que foi detectada pela análise da intensidade de píxel, no mesmo estudo.

Por outro lado, autores como Heo et al.⁴⁹ (2002) descreveram resultados favoráveis na utilização da dimensão fractal em radiografias panorâmicas digitalizadas para a caracterização do reparo ósseo em mandíbulas após cirurgias ortognáticas. Seus achados demonstraram que os valores da dimensão fractal diminuíram imediatamente após a cirurgia e aumentaram gradativamente de acordo com o passar do tempo (1 e 6 meses). Após um período de 12 meses, os valores da dimensão fractal foram compatíveis com os do início do experimento, no período pré-operatório ($p < 0,05$). Assim, os autores sugerem que a dimensão fractal é um método confiável e efetivo para a avaliação quantitativa do reparo ósseo em radiografias.

Nair et al.⁶⁶ (2001) avaliaram a formação óssea em defeitos criados cirurgicamente em mandíbulas de coelhos, tratados isoladamente com uma cultura de osteoblastos, com uma matriz polimérica ou com a combinação de ambos. Os resultados desta investigação demonstraram que os defeitos ósseos que exibiram valores altos de dimensão fractal apresentaram, ao exame histomorfométrico, um padrão ósseo estrutural complexo, estabelecendo uma alta correlação entre eles ($r = 0,79$; $p < 0,001$), sugerindo que a análise fractal é um método efetivo para a quantificação das alterações do padrão ósseo em cirurgias de enxerto ósseo.

Em decorrência dos resultados divergentes quanto à real capacidade de detecção de variações no padrão estrutural ósseo pela dimensão fractal e pela densidade radiográfica, é também nosso objetivo avaliar esta questão.

3 Proposição

3 Proposição

Objetivo geral:

O presente estudo teve por finalidade avaliar os resultados de enxertos realizados no interior de seio maxilar de coelhos, utilizando osso autógeno e vidro bioativo (PerioGlas[®]), associados ou não ao plasma rico em plaquetas, por meio de análise histomorfométrica e de análise radiográfica da densidade óssea (DO) e da dimensão fractal (DF).

Objetivos específicos:

- 1- Comparar, por meio de análise histomorfométrica e de análise radiográfica (DO e DF), os resultados das seguintes modalidades de enxerto em cirurgias de levantamento do seio maxilar de coelhos:
 - a. Osso autógeno x vidro bioativo
 - b. Osso autógeno + PRP x vidro bioativo + PRP
 - c. Osso autógeno x osso autógeno + PRP
 - d. Vidro bioativo x vidro bioativo + PRP;
- 2- Validar os dois métodos de análise de imagens radiográficas, DF e DO, como indicadores da neoformação óssea, por meio de análise histomorfométrica.

4 Material e método

4 Material e método

4.1 Amostra e cronograma de desenvolvimento

Para a realização do experimento, foram utilizados 20 coelhos machos (*Nova Zelândia*) adultos, com idade média de 28 semanas, pesando aproximadamente 4kg, (Tabela 1A). A experimentação animal foi conduzida de acordo com a aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal/FOAr (Figura 1A).

Os animais foram divididos aleatoriamente em 2 grupos (G1 e G2), de 10 animais cada, sendo que cada grupo recebeu 2 tratamentos diferentes, um para cada seio maxila. No G1, os seios maxilares esquerdos foram enxertados com osso autógeno (OA) e os seios maxilares direitos foram enxertados com vidro bioativo (VB). No G2, os seios maxilares esquerdos foram enxertados com uma combinação de osso OA e PRP e os seios maxilares direitos foram enxertados com uma combinação de VB e PRP (Tabela 1).

Os 10 seios maxilares tratados com OA foram considerados controle e os demais tratamentos como grupos teste (Figura 1). Após 90 dias, os animais foram sacrificados para análise dos resultados.

Tabela 1 - Grupos experimentais

Tratamento		
G1 10 coelhos	10 seios maxilares esquerdos	OA
	10 seios maxilares direitos	VB (PerioGlas [®])
G2 10 coelhos	10 seios maxilares esquerdos	OA + PRP
	10 seios maxilares direitos	VB (PerioGlas [®]) + PRP

*G: grupo

OA = osso autógeno

VB = vidro bioativo

PRP = plasma rico em plaquetas

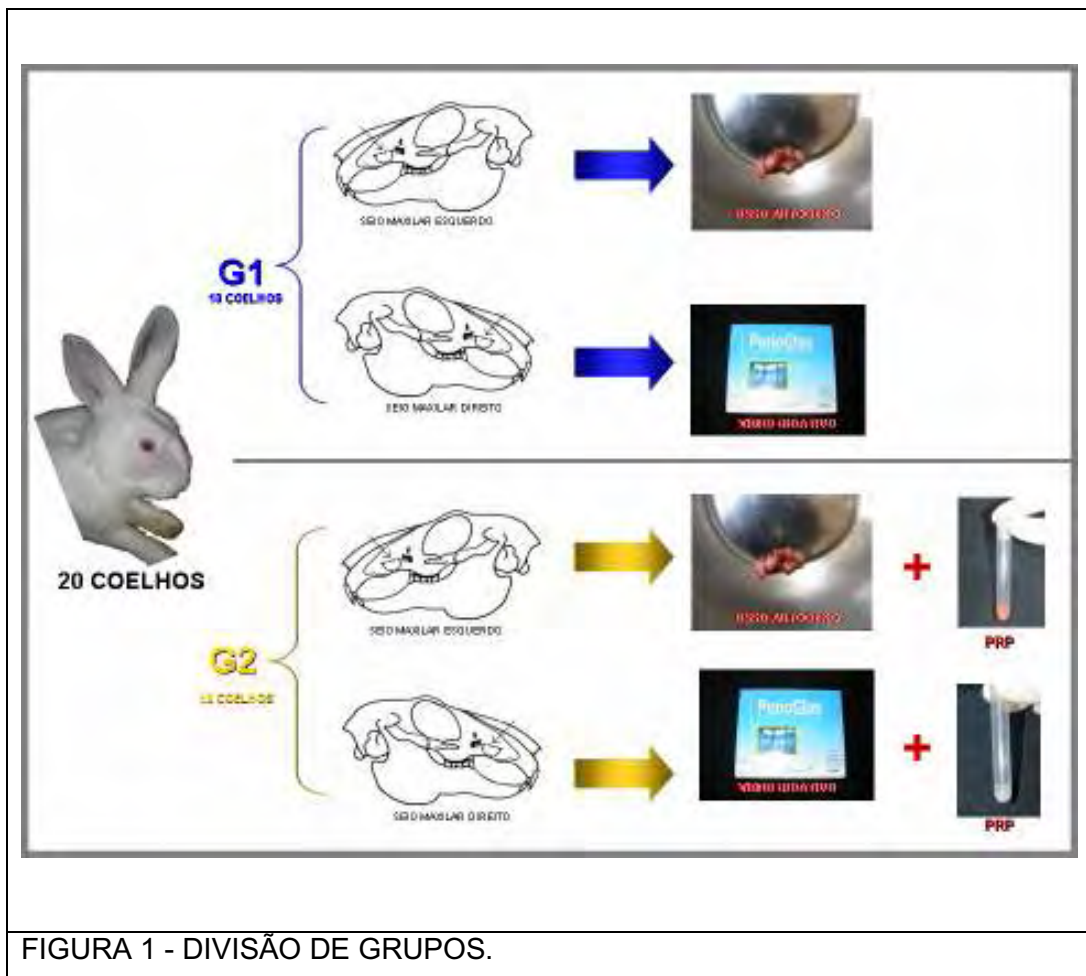


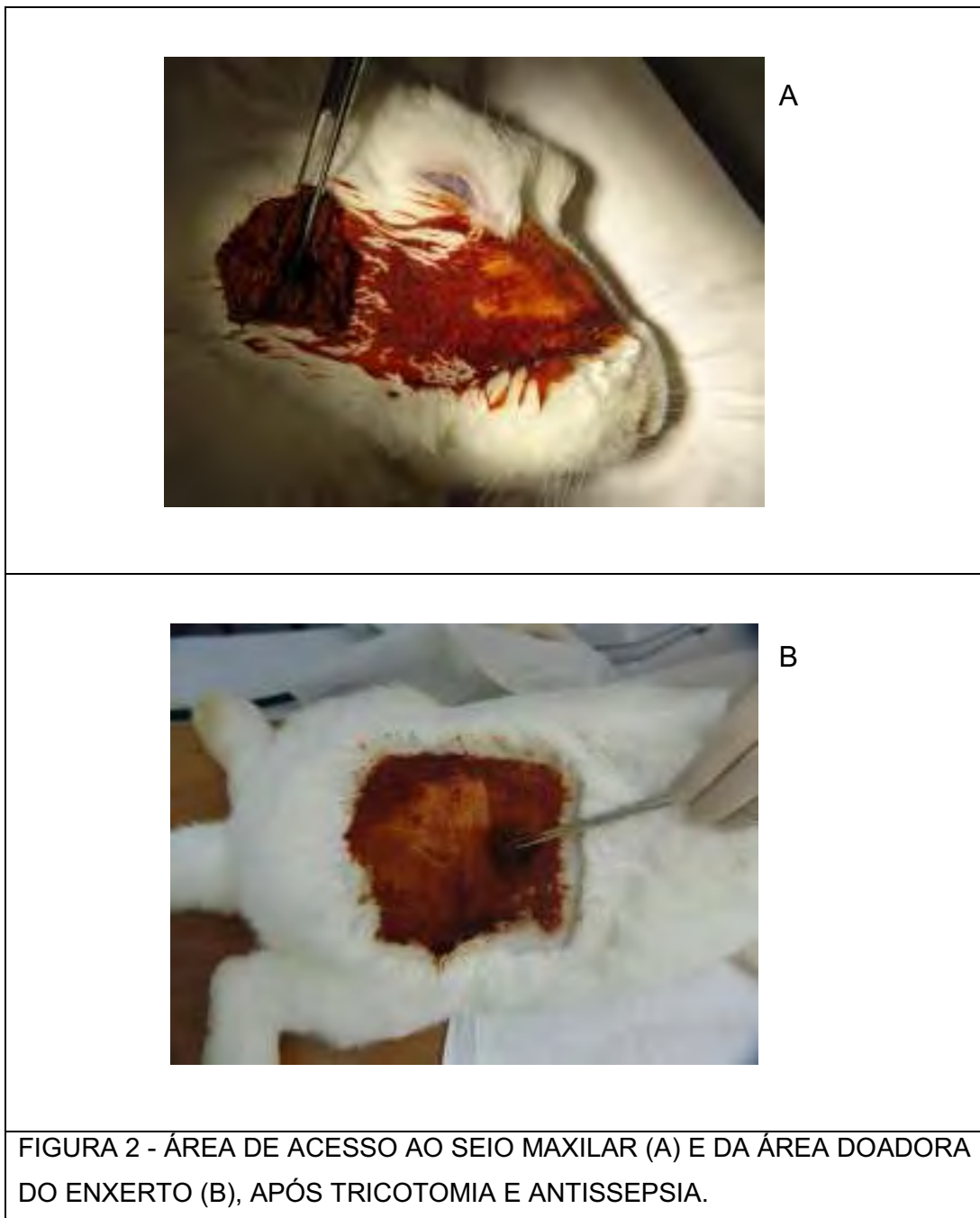
FIGURA 1 - DIVISÃO DE GRUPOS.

4.2 Técnica cirúrgica

Em cada animal foi realizado o levantamento dos seios maxilares direito e esquerdo em um único tempo cirúrgico, de acordo com o protocolo descrito por Watanabe et al.¹⁰⁷ (1999). Para cada seio maxilar foi designado um operador previamente treinado, totalizando dois operadores (IKTS e JANDM).

Durante todo o período do experimento, os animais ficaram alocados em um biotério próprio para coelhos e receberam água e comida *ad libitum*, bem como cuidados especializados, quando necessário.

Para a realização das cirurgias, os coelhos receberam anestesia geral com injeção intramuscular de ketamina a 10% (Ketamina Agener® – Agener União, Brasil – uso veterinário) na proporção de 0,35ml/kg de peso corporal, e também sedação e analgesia com injeção intramuscular de cloridrato de xilasina (Calmium® – Agener União Saúde Animal, Brasil – uso veterinário) na proporção de 0,25ml/kg de peso corporal (Tabela 2A). Repiques eventuais do anestésico geral e do sedativo foram realizados com 1/3 da dose inicial (Tabela 3A), quando os animais mostravam sinais de recuperação dos sentidos no decorrer do ato cirúrgico. Após a anestesia, realizou-se a tricotomia na porção lateral da maxila em ambos os lados e na região do osso íliaco direito, bem como a antisepsia do campo operatório com iodo – PVPI (Aster – Sorocaba – SP – Brasil) (Figura2).



Antes da incisão inicial, tanto na área de acesso ao seio maxilar como na área doadora do enxerto ósseo, injetou-se aproximadamente 0,9mL de anestésico local mepivacaína 2% com epinefrina 1:100.000 (Mepiadre, DFL, Rio de Janeiro, RJ - Brasil), para promover uma vasoconstricção local, facilitando a visualização da área operada.

O acesso cirúrgico ao seio maxilar foi obtido com o animal posicionado em decúbito lateral, por meio de uma incisão cutânea seguida de uma incisão muscular, poucos milímetros acima da borda inferior do osso incisivo e da maxila, com aproximadamente 5 cm de extensão (Figura 3A). Após a dissecação dos tecidos subcutâneo e muscular, o periósteo foi incisado e elevado dorsalmente. Sob irrigação salina constante, foi confeccionada uma janela óssea (Figura 3B) com uma fresa esférica diamantada com diâmetro de 2mm, na porção lateral da maxila, com 10mmx10mm, sendo que a osteotomia vertical distal deveria estar localizada 2mm para mesial do 1º molar¹⁰⁵, conforme ilustra a Figura 4. Estas dimensões foram criteriosamente respeitadas para garantir o acesso à loja mais inferior do seio maxilar, local padronizado para receber o enxerto, uma vez que o seio maxilar do coelho é composto por outras lojas¹⁰⁴, conforme ilustra a Figura 5.

Após a remoção da janela óssea e exposição da membrana sinusal, foi realizado o levantamento cuidadoso da membrana com curetas de Lucas (Figuras 3C, 3D e 3E), sendo que a face romba ficou em

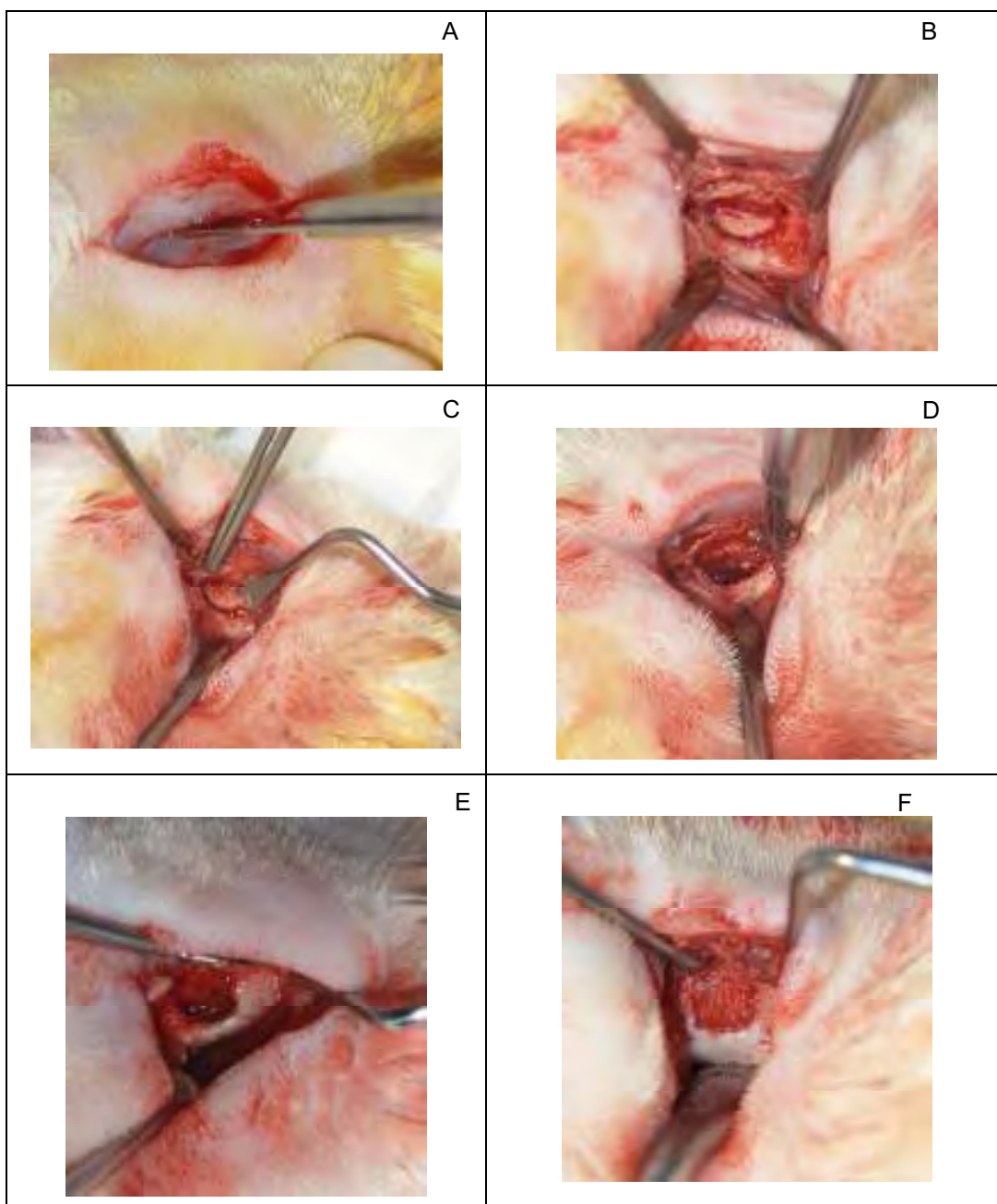


FIGURA 3 - SEQUÊNCIA CIRÚRGICA DE ACESSO AO SEIO MAXILAR: INCISÃO CUTÂNEA E SUBCUTÂNEA (A), CONFECÇÃO DA JANELA ÓSSEA (B), REMOÇÃO DA JANELA ÓSSEA (C), MEMBRANA SINUSAL EXPOSTA (D), MEMBRANA SINUSAL ELEVADA (E), ENXERTO POSICIONADO NA CAVIDADE SINUSAL (F).



* Fonte: Watanabe et al.¹⁰⁷ (1999)

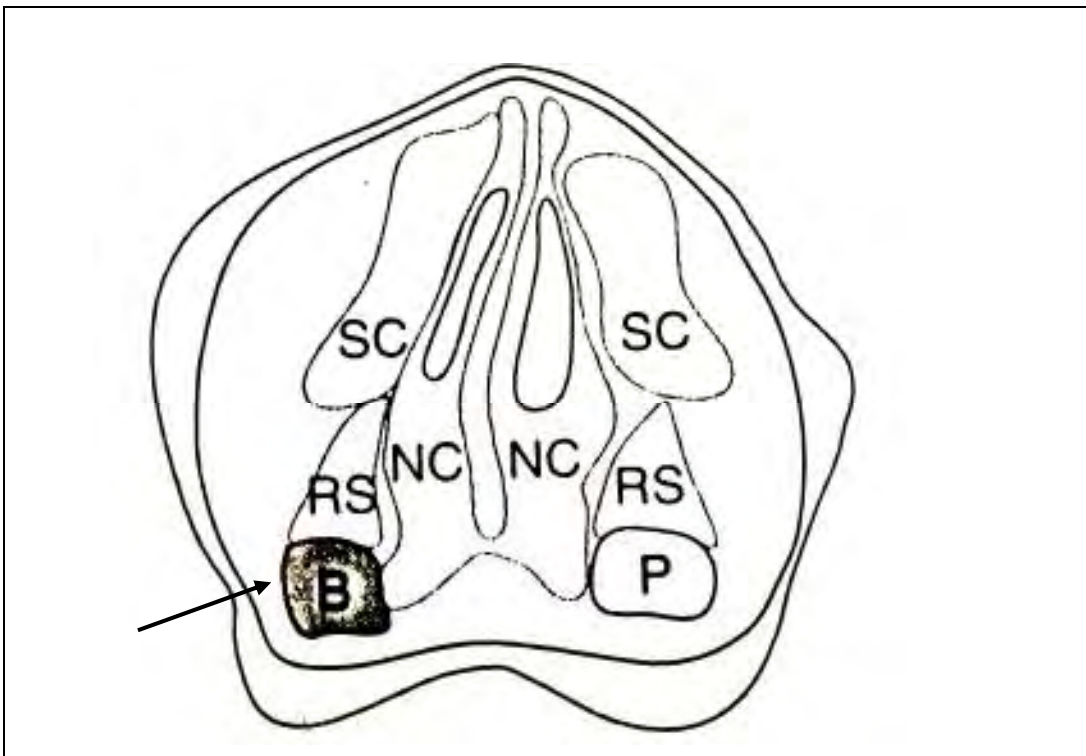


FIGURA 5 – DIAGRAMA INDICANDO A LOJA ENXERTADA DO SEIO MAXILAR (“B” E “P”) E OUTRAS LOJAS ANATÔMICAS DO MESMO SEIO MAXILAR (“RS” E “SC”). “NC” CORRESPONDE À CAVIDADE NASAL.

* Fonte: Wada et al.¹⁰⁵ (2001)

contato com a membrana e a face cortante em contato com a cavidade óssea, evitando-se assim o rompimento da membrana (Figura 5).

Seguido do levantamento da membrana sinusal, deu-se início à obtenção do osso autógeno sendo que a crista ilíaca direita foi padronizada como área doadora, de acordo estudo prévio de Watanabe et al.¹⁰⁷ (1999) (Figuras 6). Para tanto, foi realizada uma incisão cutânea de aproximadamente 4cm, seguida da incisão muscular até se atingir o osso ilíaco. Neste momento, procedeu-se o completo descolamento e exposição da crista ilíaca e a remoção bicortical do enxerto com um osteótomo (Figuras 7).

O volume de osso autógeno removido correspondeu ao volume total necessário para um completo preenchimento da cavidade sinusal, aferida no decorrer da cirurgia. Uma vez removido o enxerto, os componentes cortical e medular do enxerto foram triturados em um triturador ósseo rotatório (Neodent, Curitiba, PR - Brasil) (Figura 8) e imediatamente enxertado no seio maxilar (Figura 3F).

Para os seios maxilares direitos de ambos os grupos, foram utilizados frascos esterilizados de 0,5cc de PerioGlas[®] (NovaBone Products, LLC, Alachua, Florida 32615) (Figura 9A) preparados de acordo coma orientação do fabricante, ou seja, hidratação prévia em solução salina (G1) (Figura 9B) ou associação ao plasma rico em plaquetas (G2). A quantidade de biomaterial utilizada foi aquela suficiente para um completo preenchimento do seio maxilar.

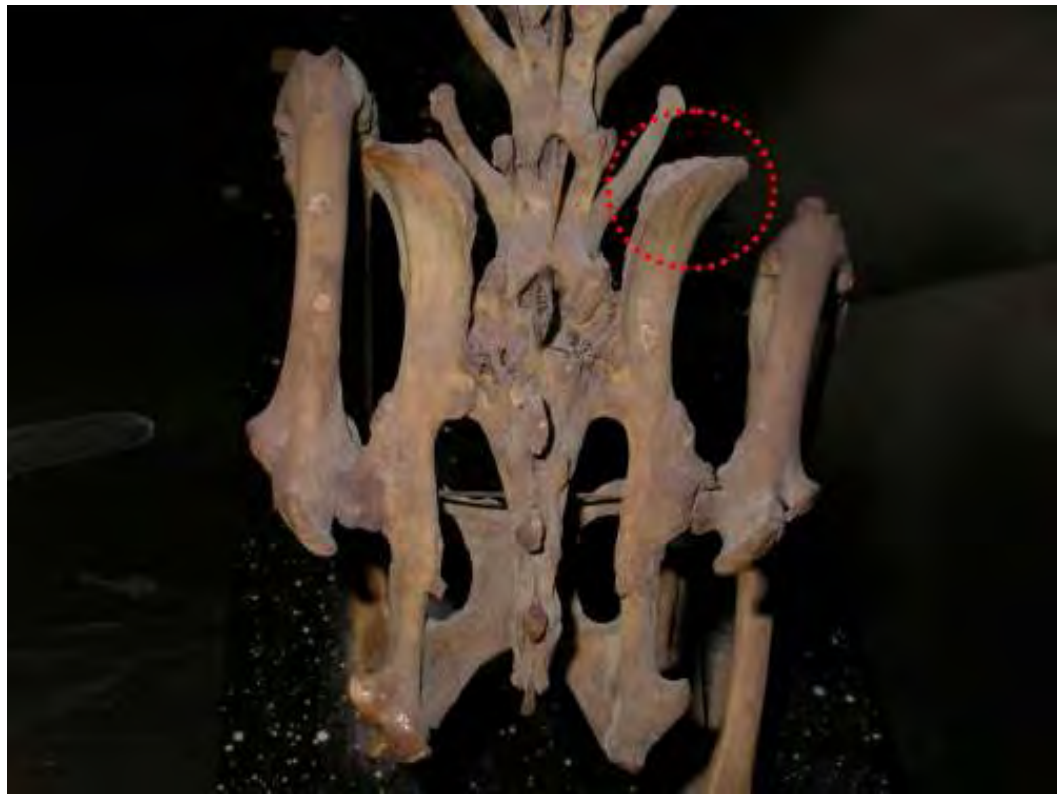


FIGURA 6 - ESQUELETO DE COELHO ILUSTRANDO O OSSO ILÍACO.

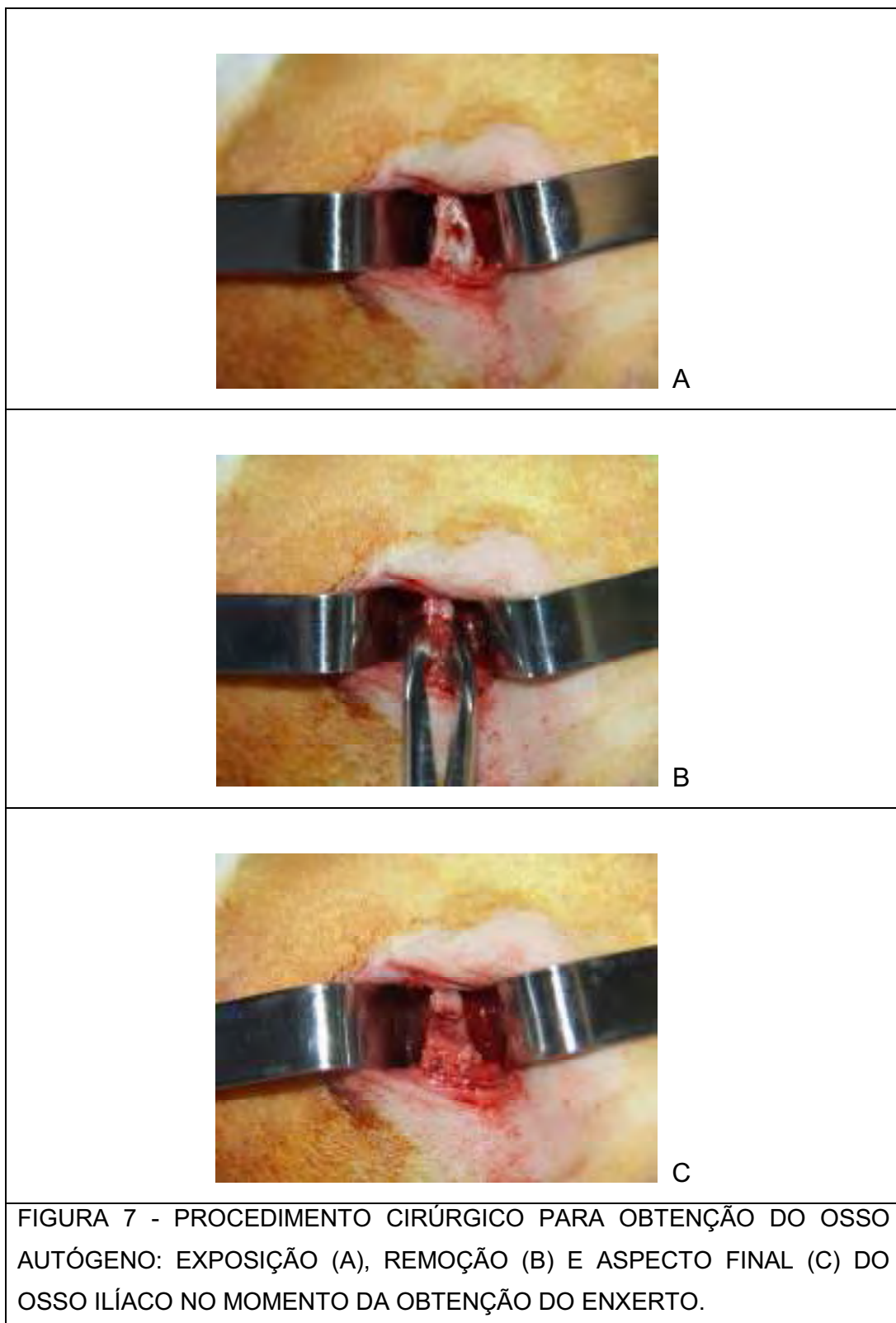




FIGURA 8 - OSSO AUTÓGENO PROVENIENTE DO ILÍACO NO TRITURADOR ÓSSEO.



FIGURA 9 - PERIOGLAS® (NOVABONE PRODUCTS, LLC, ALACHUA, FLORIDA 32615): FRASCOS ESTERILIZADOS DE 0,5cc CADA (A) E MATERIAL HIDRATADO EM SOLUÇÃO SALINA (B).

Tanto a área doadora como o leito receptor foram suturados com Vicryl 3.0 (Ethicon, Johnson & Johnson®) para o plano profundo, com pontos simples. O plano superficial foi suturado com ponto contínuo de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson®). No pós-operatório imediato administrou-se para cada animal injeção intramuscular de antibiótico (Pentabiótico® veterinário – pequeno porte, Fort Dodge, Saúde animal Ltda, Brasil) na proporção de 0,10mg/kg de peso corporal, uma vez por dia, por 3 dias (Tabela 2A). Para o controle da dor, foi administrado logo após a cirurgia paracetamol 100mg/mL (Tylenol Bebê® - JANSEN-CILAG Farmacêutica, São José dos Campos - SP), na proporção de 10mg/kg de peso corporal.

Após 90 dias, os animais receberam uma dose letal de anestésico geral hidrato de cloral a 40%. Toda a região maxilar foi dissecada e acondicionada em vidro com solução de formol neutro tamponado a 10%, pH 7,4 por 48 horas para fixação, em quantidade 30 vezes maior do que o volume da peça.

4.3 Preparo do plasma rico em plaquetas (PRP)

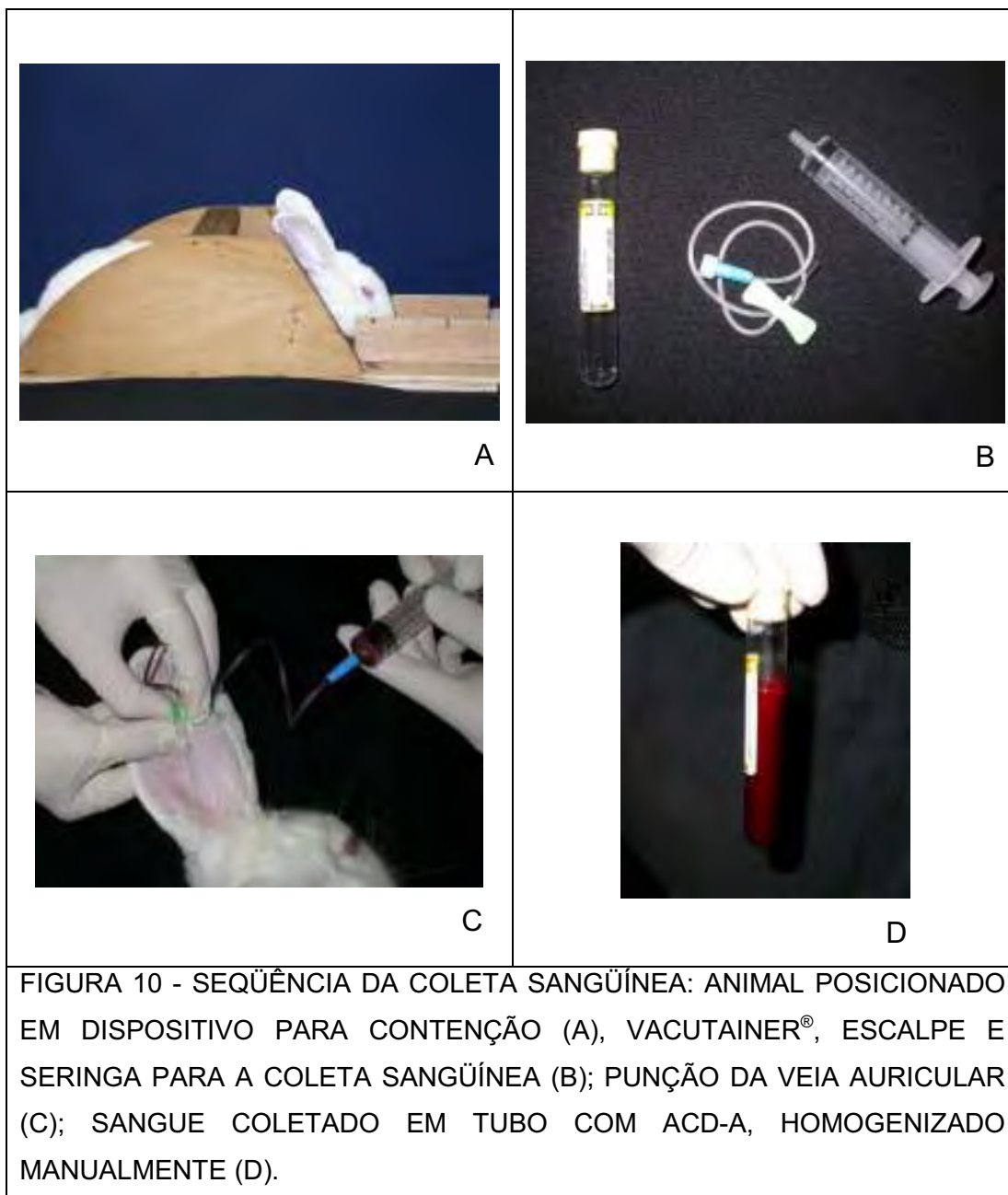
O estabelecimento de um protocolo próprio para obtenção do PRP foi realizado em duas etapas: 1) estudo piloto com 6 animais utilizando diferentes metodologias para o preparo do PRP (Anexo 5) e, 2) realização do experimento propriamente dito, com a metodologia já

estabelecida, nos 10 animais que compuseram a amostra deste estudo e que receberam enxertos associados ao PRP.

Para se evitar a vasoconstricção periférica decorrente da anestesia geral que dificultaria a coleta sangüínea, esta foi realizada com o animal não anestesiado, alocado em uma caixa contensora (Figura 10A). Assim, procedeu-se a coleta de 8mL de sangue autógeno via punção da veia auricular (Figura 10C) com um dispositivo para infusão intravenosa (escaple 23G - BD Assepto– Juiz de Fora, MG - Brasil) e seringa hipodérmica descartável de 10ml (INJEX, Ourinhos - SP - Brasil), ilustrados na Figura 10B.

A coleta sangüínea foi realizada nos 20 coelhos, independentemente destes pertencerem ou não ao grupo no qual se utilizou o PRP, para inferir em todos os animais o mesmo viés. Imediatamente após a coleta, o sangue venoso foi acondicionado em tubos Vacutainer® contendo 1000µL de adenina citrato dextrose – fórmula A (ACD-A) e homogeneizados manualmente, permitindo que o sangue fosse completamente misturado ao anticoagulante, evitando-se a coagulação sangüínea e preservando a integridade plaquetária (Figura 10D).

Em seguida, passou-se à fase laboratorial de preparo do PRP, no Hemonúcleo da Faculdade de Farmácia e Bioquímica, UNESP – Araraquara. Uma pequena amostra do sangue (0,2ml) foi utilizada para



contagem computadorizada de células (COULTER t – 890, COULTER Eletronics, Rio de Janeiro – RJ, Brasil), ilustrada nas Figuras 11A e B. O sangue total foi submetido a 2 centrifugações em centrífuga *Hermle Z380* (Figura 11C) com diâmetro de 16,5cm de o centro de uma caçapa à outra (Figura 11D).

Na Tabela 2, está descrito o protocolo desenvolvido neste experimento para a obtenção do PRP em coelhos. A primeira centrifugação, feita em 302g por 10 minutos, promoveu a decantação dos leucócitos e eritrócitos, levando estes elementos figurados do sangue para o fundo do tubo de vidro e o plasma para a porção mais superior (Figura 12A). O plasma foi coletado com o auxílio de pipetas (BOENCO, Germany) (Figura 12B) e acondicionado em tubo plástico esterilizado (Figura 12C). Assim, procedeu-se a segunda centrifugação do soro em 2862g por 5 minutos. Logo após esta etapa, os 2/3 superiores do soro, designados plasma pobre em plaquetas, foram descartados restando no tubo o terço inferior, ou plasma rico em plaquetas (Efeoglu et al.²⁹, 2004) (Figura 12D). O botão plaquetário aderido ao fundo do tubo foi suspenso e homogenizado ao PRP.

Terminada a fase laboratorial, adicionou-se ao PRP o osso autógeno (Figura 12E) ou ao vidro bioativo (Figura 12F) e uma solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) a 10% na proporção de 10PRP:2 CaCl_2 em volume, para a geleificação da mistura.

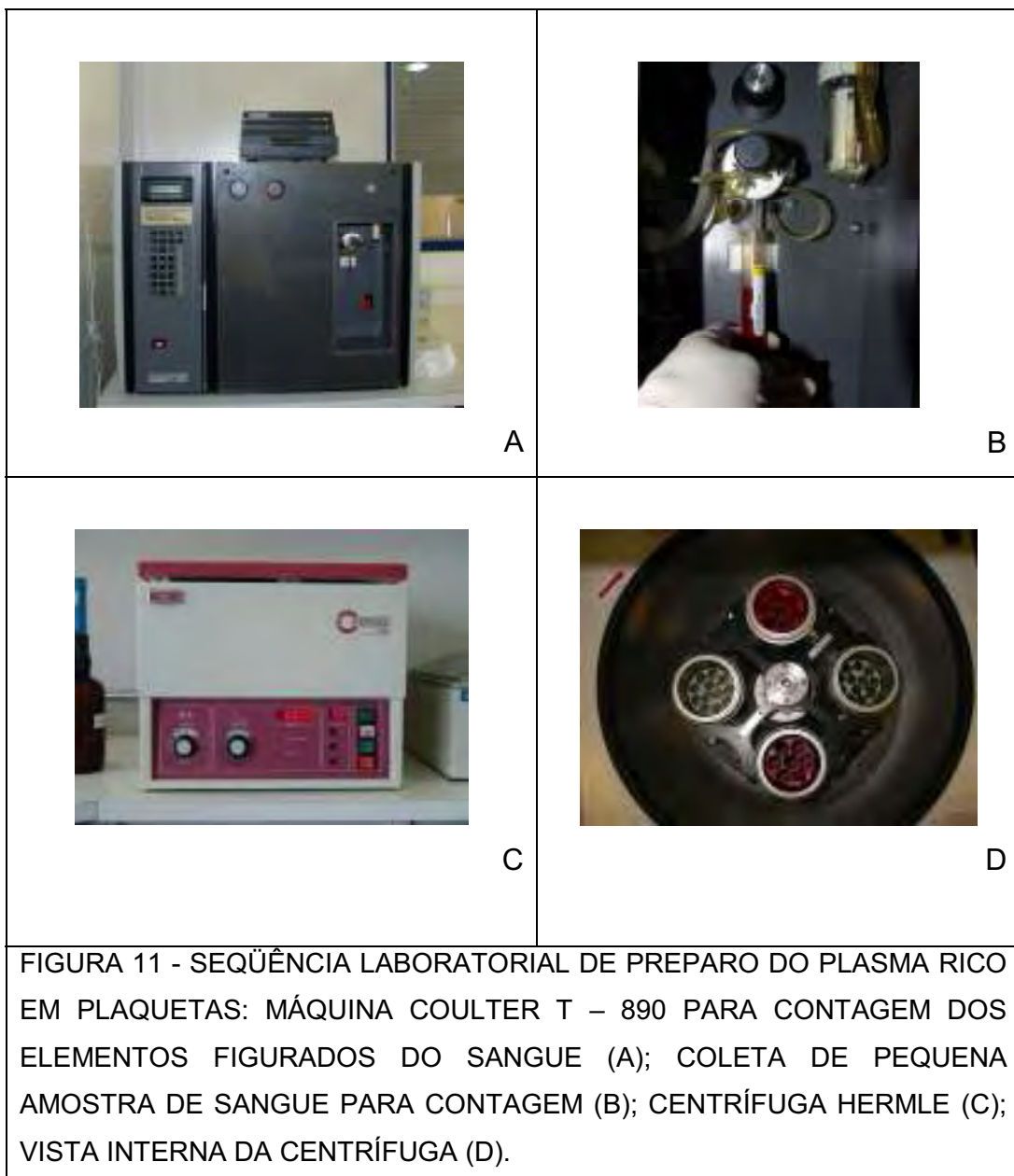
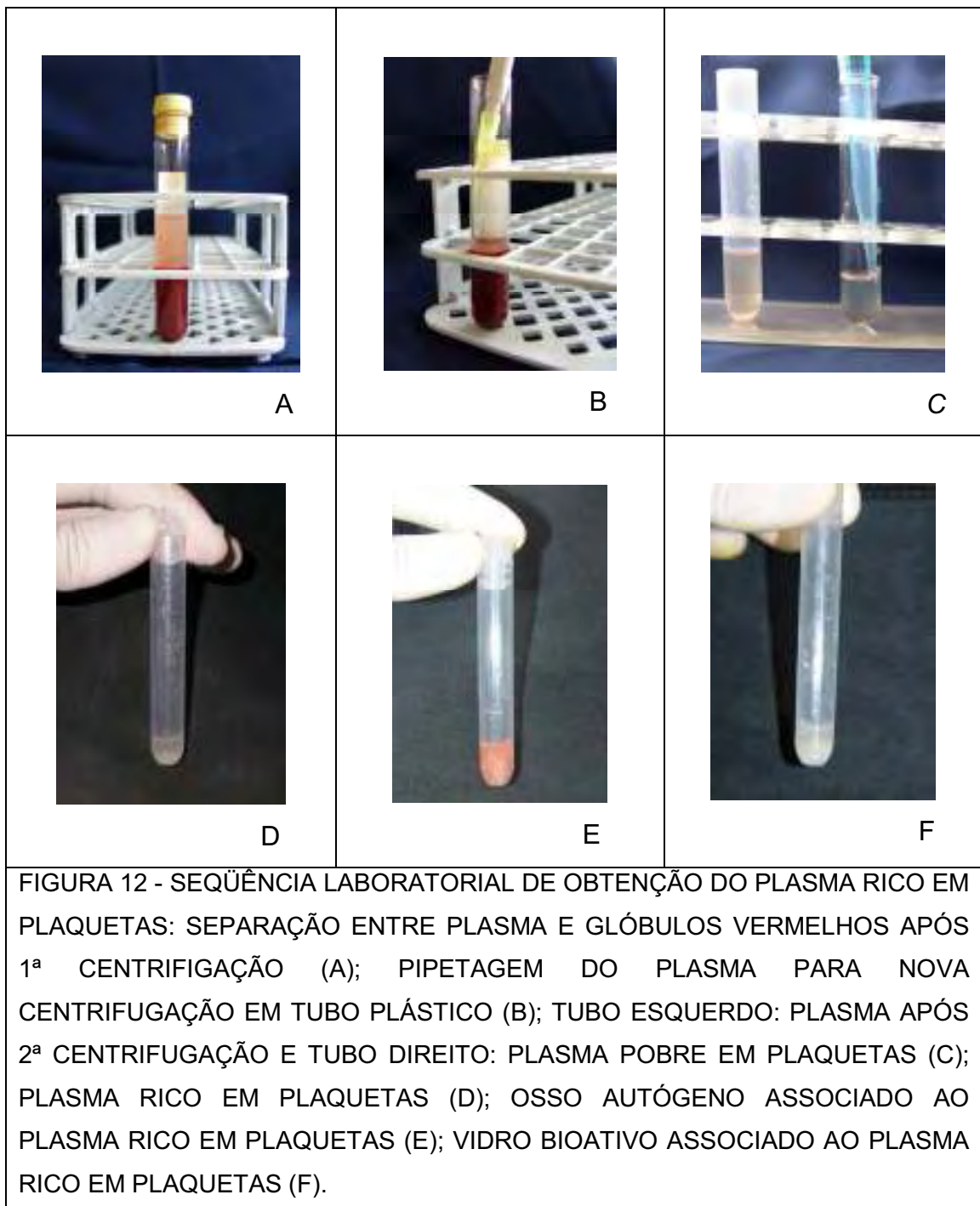


Tabela 2 - Protocolo desenvolvido para obtenção do PRP

PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DO PRP EM COELHOS	
PASSOS	PROCEDIMENTO
1	Coleta de 8mL de sangue venoso em tubo com 1000 μ L de ACD-A
2	Homogeneização do sangue
3	1ª centrifugação: 302g por 10 minutos
4	Separação do soro evitando glóbulos vermelhos e brancos
5	Colocação do soro em tubo plástico
6	2ª centrifugação: 2862g por 5 minutos
7	PRP = terço inferior (descarte do PPP: 2/3 superiores do tubo)
8	Contagem de células no PRP
9	Adição do CaCl ₂ ao PRP (proporção 2:10)
10	Esperar 2 minutos para formação do gel

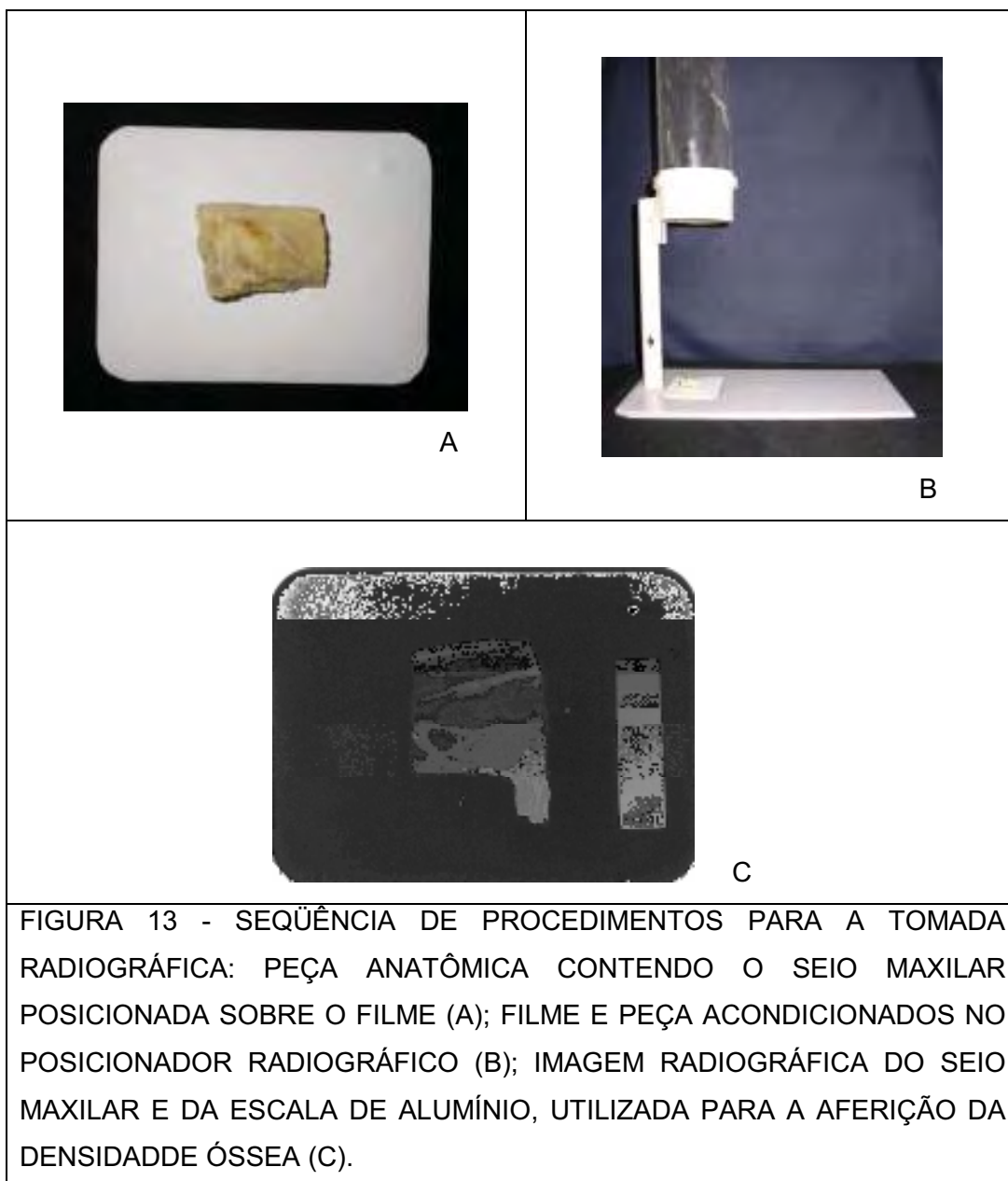


A contagem de leucócitos, eritrócitos e plaquetas antes (SV) e após a centrifugação (PRP) e o cálculo da porcentagem de aumento de plaquetas⁶⁴, foram realizados com o propósito de se confirmar a obtenção de um concentrado com elevado número de plaquetas e reduzido número de leucócitos.

4.4 Obtenção e análise das imagens radiográficas

Para que as imagens dos seios maxilares não contivessem superposição de outras estruturas ósseas além daquelas de interesse para a análise radiográfica, as cabeças foram cortadas na sua linha mediana após o sacrifício, e foram divididas em duas metades iguais, sendo que em cada uma delas estava contido cada um dos seios maxilares enxertados. Novamente as peças foram reduzidas restando apenas a loja enxertada do seio maxilar e tecido ósseo adjacente às estas estruturas (Figura 13A).

Para a realização das tomadas radiográficas foi utilizado o aparelho raios-x GE 1000. Os fatores de exposição foram pré-estabelecidos em estudo piloto: 70kVp, 10mA e 15 impulsos. As radiografias foram obtidas utilizando filme oclusal (Kodak Insight F) posicionado de forma que o feixe de raios-x incidisse perpendicularmente sobre o seio maxilar, com o auxílio de um posicionador especialmente confeccionado para este fim



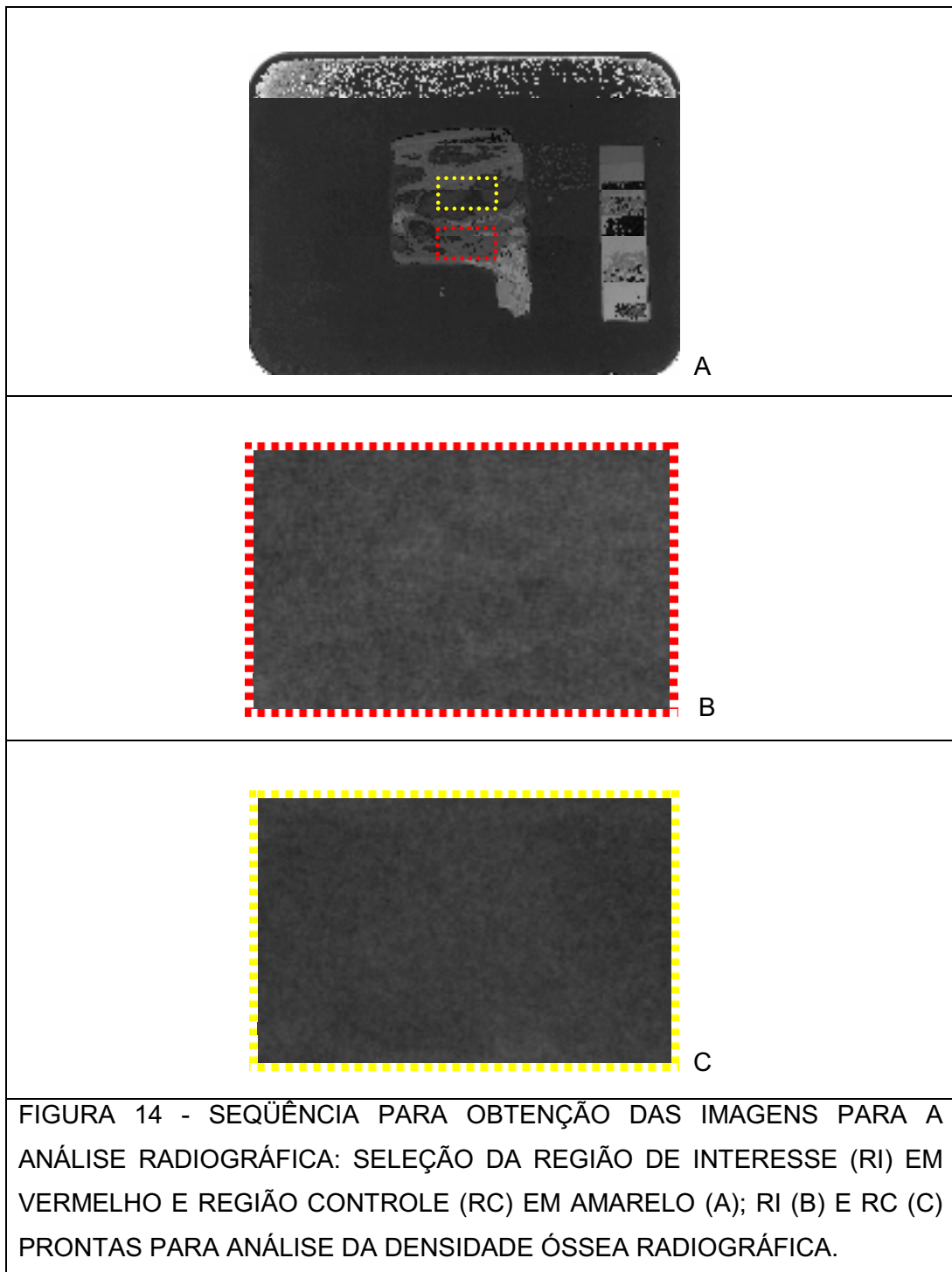
(Figura 13B), mantendo a distância foco-filme padronizada em 53cm, conforme previamente estabelecido em teste piloto.

Uma escala de alumínio, composta por dez degraus, com 1mm de diferença na altura entre os degraus, foi posicionada ao lado da peça, sobre o filme, para viabilizar a avaliação da densidade óssea comparando-a com a densidade da escala (Figura 13C).

Após o processamento radiográfico automático dos filmes (DentX 9000), todas as radiografias foram digitalizadas em “scanner” com tampa de transparência (AGFA, Snapscan 1236^S) e as imagens obtidas foram arquivadas em resolução máxima (2400dpi) no disco rígido do computador, com o formato TIFF (Tagged Image File Format).

A seleção das imagens para o cálculo da densidade foi realizada utilizando-se o programa *ImageJ* (version 1.36b / NIH software) desenvolvido pelo *National Institute of Health – USA* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>). Para fins de análise, selecionou-se uma região de interesse (RI) nas imagens radiográficas digitalizadas, ilustrada nas Figuras 14A e 14B, correspondente à área enxertada do seio maxilar e uma região controle (RC) (Figuras 14A e 14C) para garantirmos, após determinação e comparação dos valores da densidade e da dimensão fractal, que a região designada como RI era, de fato, uma área enxertada.

O tamanho da região de interesse foi determinado tomando como base o menor seio maxilar observado na amostra. Dentro deste seio,



selecionou-se a maior área possível (312x192 pixels) e aplicou-se, então, em todas as RIs a mesma janela para padronização das medidas. Também foram selecionadas em cada radiografia outras 11 janelas (100x100 pixels) correspondentes a cada degrau da escala de alumínio e à região mais radiolúcida, localizada imediatamente acima do degrau de menor espessura da escala, área esta correspondente à região do filme totalmente exposta ao feixe de raios-x.

No cálculo da densidade, os níveis de cinza e a altura em milímetros de cada degrau serviram como parâmetro para a transformação dos níveis de cinza das RIs e RCs em milímetros equivalentes de alumínio (EqAl). A conversão dos valores expressos em níveis de cinza em EqAl permitiu uma comparação padronizada entre os dados de densidade das diferentes radiografias, corrigindo variações de exposição e processamento radiográfico.

A manipulação das imagens para a determinação matemática da dimensão fractal (DF) foi realizada no programa *ImageJ* (version 1.36b / *NIH software*), seguindo os seguintes passos, apresentados na Figura 15: 1) transformação da imagem original (Figura 15A) em imagem binária (Figura 15B), ou seja, áreas onde havia tecido ósseo foram automaticamente transformadas em branco e os espaços medulares em preto; 2) transformação da imagem binária em imagem esqueletizada, onde a área de tecido ósseo foi reduzida a uma única linha de pixels (Figura 15C) e, 3) as imagens esqueletizadas foram invertidas (Figura 15D),

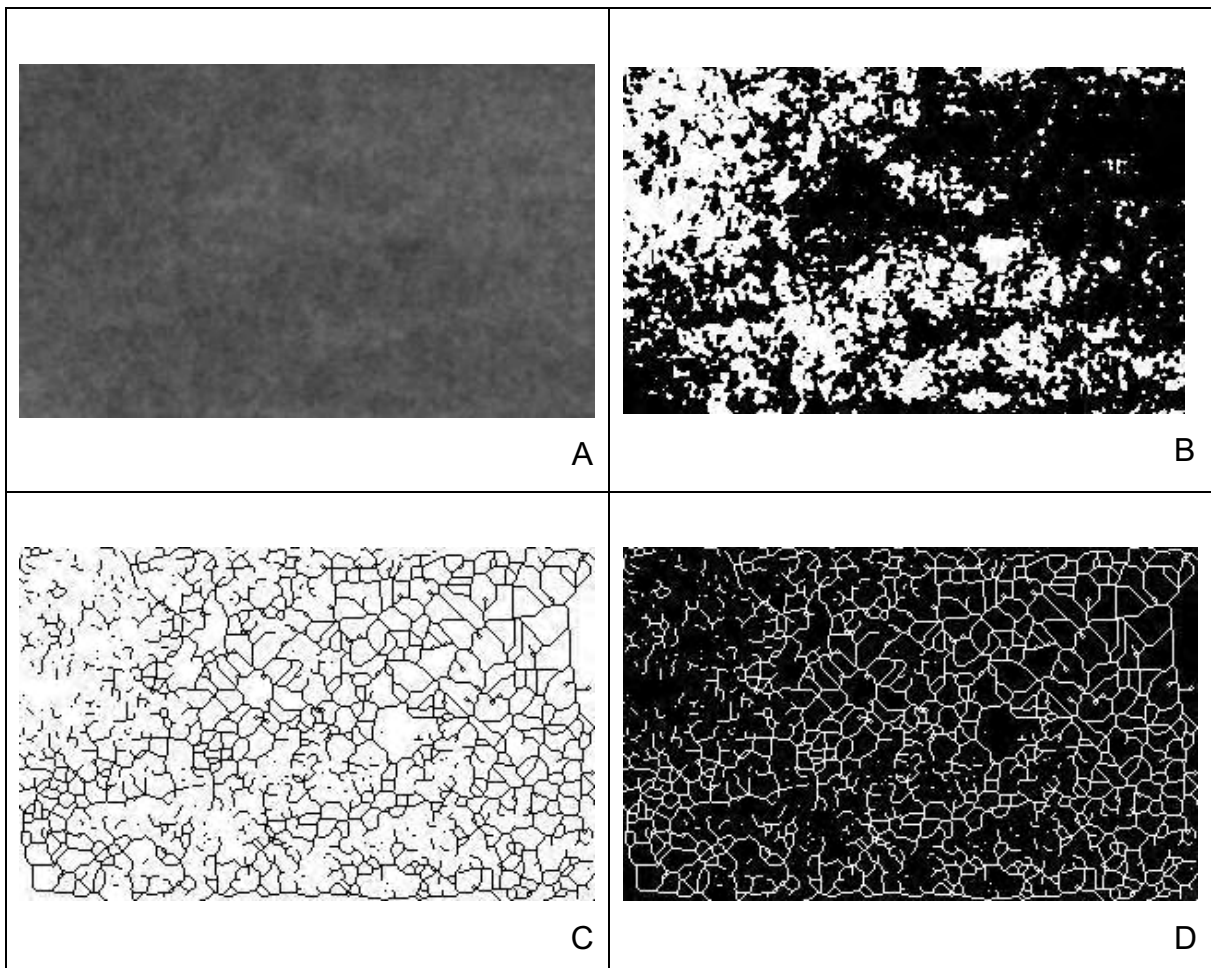


FIGURA 15 - SEQUÊNCIA DE MANIPULAÇÃO DA REGIÃO DE INTERESSE (RI) PARA A DETERMINAÇÃO DA DIMENSÃO FRACTAL: RI SELECIONADA DA IMAGEM ORIGINAL (A); IMAGEM BINÁRIA (IB) DA RI (B); IMAGEM ESQUELETIZADA (IE) DA IB (C); IMAGEM INVERTIDA DA IE (D).

ou seja, a região correspondente ao osso passa a ter uma tonalidade branca e a região medular agora assume a tonalidade preta. Neste último passo, as imagens foram salvas no formato .bmp (bitmap) para a determinação da DF pelo programa Benoit 1.3 (*Trusoft International Inc, St. Petersburg, FL*). O cálculo da DF foi feito pelo método de “box-counting”, com base nas linhas brancas que preenchem cada janela, utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Se: } S = [\text{Log}(\text{número de janelas ocupadas}) \times \text{Log}(\text{tamanho das janelas})]$$

$$\text{Então: } DF = (1 - S)$$

Os valores de DF podem variar de 1 a 2, sendo que valores de 1 correspondem à regiões não preenchidas e valores de 2, ou mais próximos dele, correspondem à regiões mais ocupadas por trabeculado ósseo.

4.5 Processamento e análise histomorfométrica das peças anatômicas

Após o sacrifício dos animais, os seios maxilares foram dissecados, reduzidos, radiografados e imersos em solução de formol a 10% tamponado com pH 7,4 para fixação e conservação. Aproximadamente um mês após, as peças foram acondicionadas individualmente em cassetes plásticos identificados, lavadas em água corrente por 24 horas para a completa remoção do formol impregnado, e submersas em 1 litro de solução de Morse (50% de ácido fórmico a 50% e 50% de citrato de sódio a 20%) para descalcificação. Esta solução foi trocada a cada 48 horas, por um período de 68 dias, quando as peças apresentaram-se adequadamente descalcificadas.

Após este processo, as amostras foram seccionadas ao meio no sentido vestibulo-palatino, formando duas metades, uma mesial e outra distal. Para fins de padronização, selecionou-se para análise a metade mesial. Todas as peças foram lavadas em água corrente por 24 horas, submersas em uma solução de sulfato de sódio a 5% por uma semana, sendo esta trocada duas vezes neste período, com o objetivo de neutralizar o ácido da solução anterior e lavadas, novamente, em água corrente por 24 horas. Logo em seguida, as peças foram mantidas em álcool 70° GL por 1 hora para dar início ao processo de desidratação.

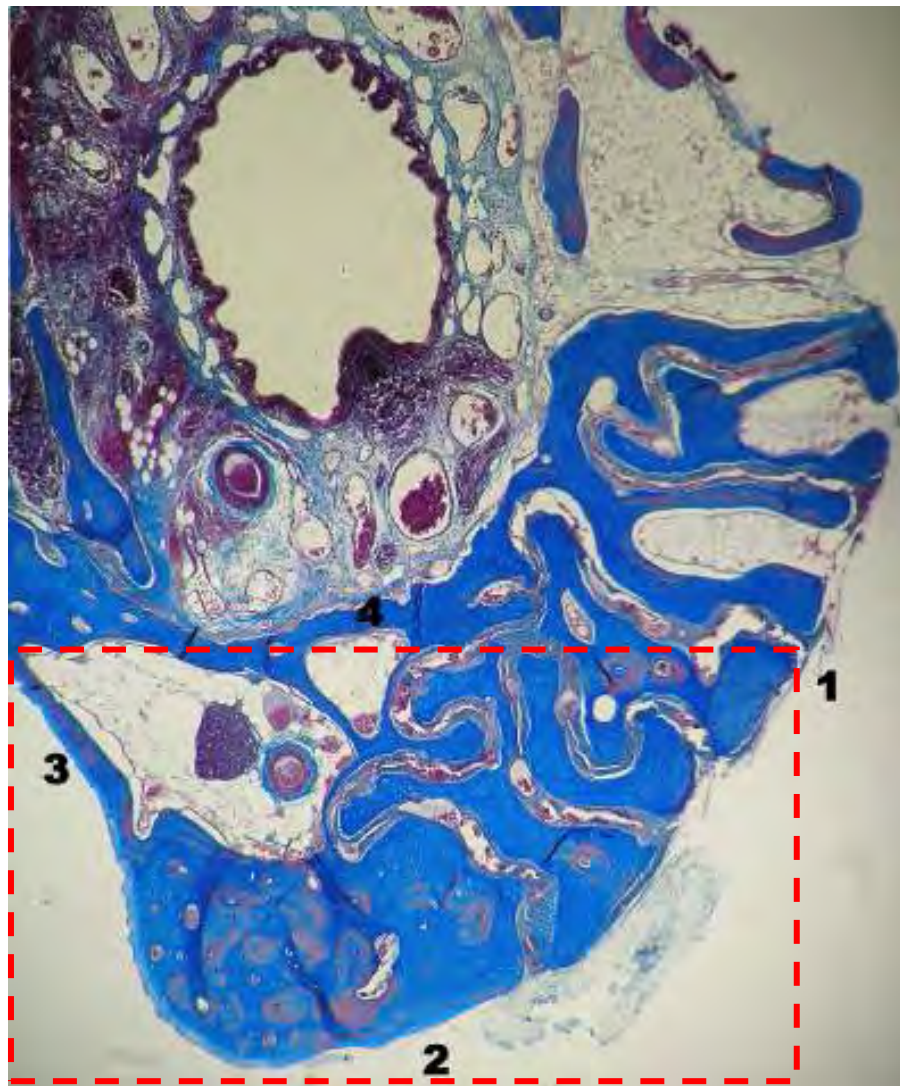
Em seguida, os cassetes contendo as metades mesiais dos seios maxilares foram colocados em uma máquina processadora automática (Leica Jung Histokinette 2000 - LEICA Instruments GmbH, Heidelberg, Germany) onde foram submetidos por aproximadamente 48 horas aos processos sequenciais de *desidratação* em álcool 90° GL e em álcool absoluto, *diafanização*, onde as peças foram purificadas e clarificadas em xilol e, por fim, impregnação em parafina. Posteriormente, as peças foram removidas da auto-processadora e incluídas em parafina na inclusora automática (Histo Embedder Jung – LEICA Instruments GmbH, Heidelberg, Germany).

A microtomia dos blocos de parafina contendo os seios maxilares foi realizada em micrótomo automático (Jung Supercut 2065 - LEICA Instruments GmbH, Heidelberg, Germany), obtendo cortes seriados com 5µm de espessura. Ao todo, foram obtidas as 20 primeiras lâminas do bloco, com 4 cortes cada uma, sendo que a primeira estava localizada no centro do seio maxilar e a última encontrava-se mais próxima à extremidade mesial do mesmo. Foram analisadas ao todo 3 cortes por seio maxilar (dois corados com Hematoxilina e Eosina e um com Tricrômico de Masson). A porcentagem média de preenchimento ósseo dos três cortes, aferida pela análise histométrica, foi considerada para a análise dos dados. Considerou-se como área avaliada toda a extensão óssea formada pela cortical vestibular, pelo rebordo alveolar, pela cortical palatina ou pela cortical interna da cavidade nasal e pelo ponto mais

proeminente da membrana sinusal em relação ao rebordo, localizada superiormente ao enxerto, conforme ilustra a Figura 16.

Na *análise histológica descritiva* foram avaliados o tipo e a qualidade dos tecidos neoformados, as características das células presentes e a presença ou não do vidro bioativo ou do enxerto ósseo, utilizando um microscópio ótico com aumentos de 4x, 10x e 40x (Olympus BX51). A *análise histomorfométrica*¹⁶ foi realizada com o propósito de se aferir a quantidade de formação óssea após os 90 dias. As mensurações foram realizadas utilizando-se um microscópio ótico com objetiva para aumento de 4 vezes (Olympus BX51). As imagens foram selecionadas e transferidas para um microcomputador (Pentium 4 Intel) por meio de uma câmera fotográfica (Olympus CAMEDIA C5060 / wide zoom) acoplada ao microscópio ótico.

Com o auxílio de um "software" analisador de imagens (Image Tool UTHSCSA version 3.0) a área total foi delimitada e quantificada como 100%. Em seguida, as áreas estritamente ósseas foram delimitadas, excluindo-se outras estruturas tais como espaços vazios, células, vasos sanguíneos, feixes nervosos e partículas do biomaterial, quando presentes. Assim, foi possível estabelecer uma porcentagem referente à quantidade de osso presente naquela área pré-determinada. Os valores foram expressos em porcentagem para permitir a comparação estatística entre os grupos, uma vez que as regiões de interesse nas lâminas histológicas possuíam tamanhos diferentes.



magnificação: 4x

FIGURA 16 - SELEÇÃO DA REGIÃO DE INTERESSE NA LÂMINA HISTOLÓGICA (EM VERMELHO): TÁBUA ÓSSEA VESTIBULAR (1); PROCESSO ALVEOLAR (2); CORTICAL PALATINA (3); MEMBRANA SINUSAL (4).

4.6 Análise estatística

Para comparar os tratamentos realizados no mesmo animal (VB com OA e VB+PRP com OA+PRP), comparar as RIs com as RCs e comparar a contagem de leucócitos, eritrócitos, plaquetas e a porcentagem de aumento de plaquetas, antes e após a centrifugação, foi utilizado o teste t de Student pareado. Para as demais comparações utilizou-se o teste t de Student para amostras independentes. Para manter o nível de significância global em 5%, foi utilizada a correção de Bonferroni, considerando um total de 6 comparações, na análise dos tratamentos OA, VB, OA+PRP e VB+PRP⁶⁷.

Para estudar associação entre a densidade e a dimensão fractal com a histometria foi utilizado um modelo de regressão linear múltiplo⁶⁷. Para garantir a suposição de independência do modelo de regressão, a análise foi dividida em duas partes: na primeira consideramos apenas os dados do lado esquerdo dos coelhos (OA e OA+PRP) e na segunda consideramos apenas os dados do lado direito (VB e VB+PRP). Considerou-se como variável resposta a densidade e como variáveis independentes a presença de PRP e a dimensão fractal.

5 Resultado

5 Resultado

5.1 Contagem de elementos figurados do sangue

As contagens de leucócitos, eritrócitos e plaquetas de cada animal, no sangue venoso (SV) e após a centrifugação (PRP) estão apresentadas na Tabela 3. As contagens médias de leucócitos e eritrócitos no PRP diminuíram acentuadamente em relação ao SV (de $3,96 \pm 2,00$ para $0,46 \pm 0,45$ e de $5,64 \pm 0,44$ para $0,02 \pm 0,01$, respectivamente). Já, a contagem média de plaquetas no PRP ($1344,9 \pm 347,5$) aumentou significativamente em relação ao SV ($317,7 \pm 39,9$). O aumento médio de plaquetas no PRP em relação ao SV foi de $327,4\% \pm 97,8$. Todas as diferenças foram estatisticamente significantes.

Tabela 3 - Valores individuais e médios (desvio padrão) do número de elementos figurados no sangue venoso (SV) e no plasma rico em plaquetas (PRP) e porcentagem de aumento (PA) de plaquetas no PRP relativamente ao SV, nos animais tratados com a combinação de osso autógeno+PRP e vidro bioativo+PRP

Animal	Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)		Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{l}$)		Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{l}$)		
	SV	PRP	SV	PRP	SV	PRP	PA
11	6,6	0,7	5,38	0,02	286	1166	342
12	3,6	0,3	5,08	0,03	291	1629	459
13	4,0	0,3	6,66	0,01	357	988	176
14	7,5	-	5,69	0,02	349	1426	308
15	3,5	1,3	5,87	0,02	255	1031	304
16	-	-	5,90	0,05	299	1602	435
17	3,8	0,6	5,78	0,02	288	909	215
18	3,7	1,1	5,36	0,04	365	1297	255
19	3,0	0,2	5,34	0,01	317	1361	329
20	3,9	0,1	5,35	0,01	370	2040	451
x\pmdp	3,96 $\pm 2,00$	0,46 $\pm 0,45$	5,64 $\pm 0,44$	0,02 $\pm 0,01$	317,7 $\pm 39,9$	1344,9 $\pm 347,5$	327,4 $\pm 97,8$

5.2 Análises da densidade óssea, dimensão fractal e histometria

Os valores para cada animal e os valores médios de densidade óssea radiográfica, das RIs e suas respectivas RCs, expressos em milímetros equivalentes de alumínio (EqAl), bem como a comparação entre os valores da DO dos quatro tipos de enxerto, estão descritos nas Tabelas 4 e 5 e ilustrados na Figura 17. Os valores médios da DO, nas RIs dos quatro tipos de enxerto, foram significativamente maiores do que suas respectivas RCs.

Tabela 4 - Valores individuais e médios de densidade óssea radiográfica, da região de interesse (RI) e da região controle (RC), em milímetros equivalentes de alumínio, nos quatro tratamentos: osso autógeno (OA), vidro bioativo (VB), OA+PRP e VB+PRP

DENSIDADE OSSEA RADIOGRAFICA								
Animal	OA		VB		OA+PRP		VB+PRP	
	RI	RC	RI	RC	RI	RC	RI	RC
1	2,555	0,854	2,669	0,194	-	-	-	-
2	1,799	0,795	1,938	0,547	-	-	-	-
3	1,579	0,167	1,533	1,175	-	-	-	-
4	1,507	0,543	1,457	0,577	-	-	-	-
5	1,761	0,054	2,302	0,238	-	-	-	-
6	1,981	1,441	2,288	1,422	-	-	-	-
7	1,521	0,719	1,895	0,929	-	-	-	-
8	1,674	1,031	1,857	0,457	-	-	-	-
9	1,958	0,914	2,517	-0,073	-	-	-	-
10	1,599	0,463	1,935	1,036	-	-	-	-
11	-	-	-	-	1,879	0,626	1,080	0,369
12	-	-	-	-	1,878	0,359	1,565	0,691
13	-	-	-	-	1,254	0,806	1,713	0,902
14	-	-	-	-	1,233	0,056	1,475	0,250
15	-	-	-	-	1,641	1,366	1,325	1,085
16	-	-	-	-	1,971	0,367	1,363	0,316
17	-	-	-	-	1,850	0,475	2,175	0,391
18	-	-	-	-	1,575	0,547	1,455	0,678
19	-	-	-	-	1,586	0,572	1,315	0,536
20	-	-	-	-	1,254	0,114	1,816	0,839
x±dp	1,79± 0,316	0,70± 0,411	2,04± 0,398	0,65± 0,477	1,61± 0,285	0,53± 0,372	1,53± 0,309	0,61± 0,279

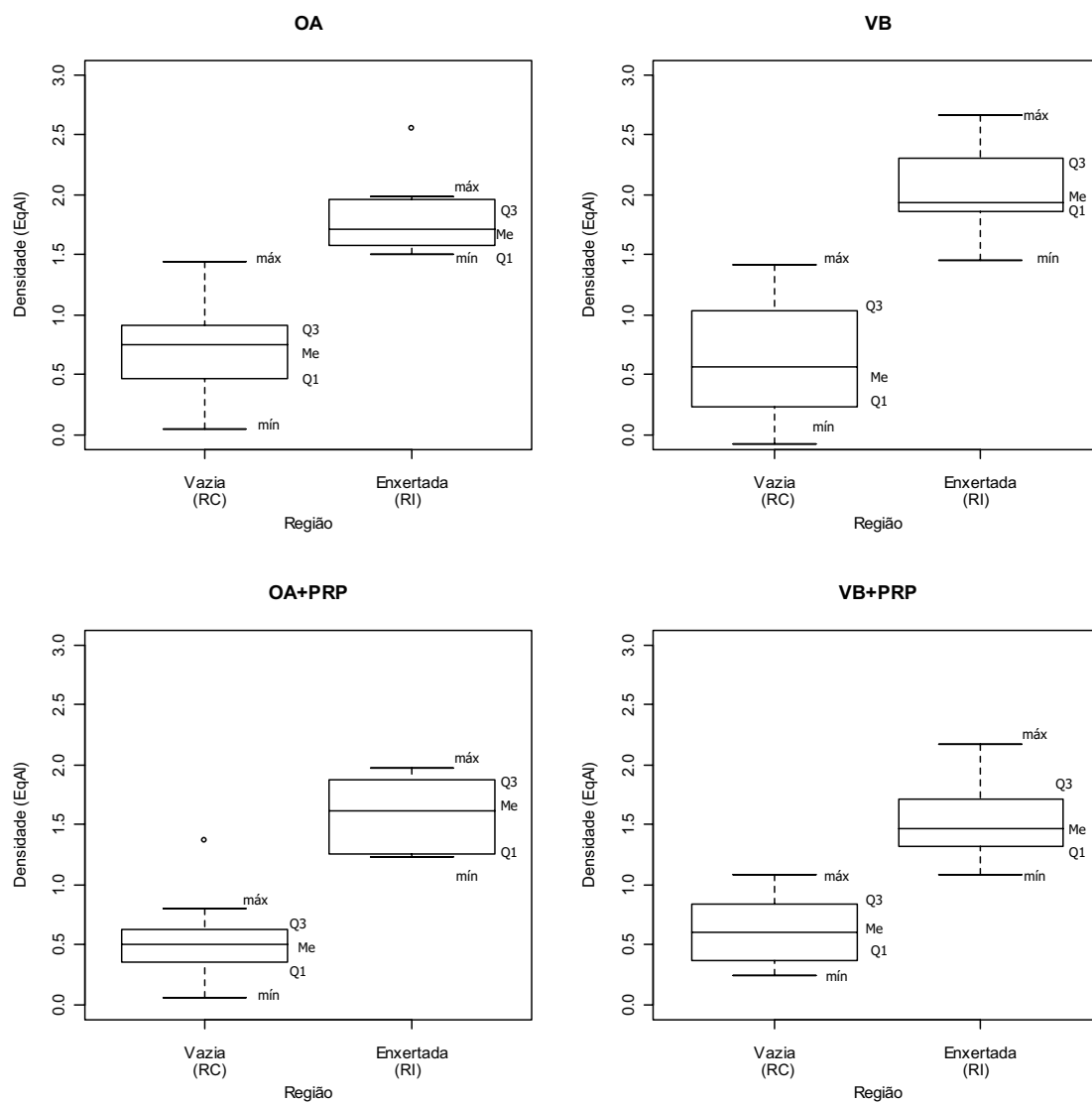


FIGURA 17 - VALORES DA DENSIDADE ÓSSEA RADIOGRÁFICA, EXPRESSOS EM MILÍMETROS EQUIVALENTES DE ALUMÍNIO, NA REGIÃO DE INTERESSE (ENXERTADA) E REGIÃO CONTROLE (VAZIA), NOS QUATRO TRATAMENTOS (OA, VB, OA+PRP E VB+PRP). OS TRAÇOS HORIZONTAIS REPRESENTAM O VALOR MEDIANO (Me), O 1º E 3º QUARTIS (Q1 E Q3) E OS VALORES MÁXIMO (Máx) E MÍNIMO (Mín) OBSERVADOS, DESCONSIDERANDO OS VALORES DISCREPANTES (PONTOS) IDENTIFICADOS CONFORME CRITÉRIO ESTABELECIDO POR TUKEY⁹⁴ (1977).

Valores significativamente mais elevados de DO foram observados na comparação do enxerto de VB (2,04) em relação ao OA (1,79) e na comparação entre VB (2,04) e VB+PRP (1,53). Nas comparações entre os demais tipos de enxerto não foram observadas diferenças significantes.

Tabela 5 - Comparação entre os valores médios (desvio padrão) de densidade óssea radiográfica, expressos em milímetros equivalentes de alumínio, nas regiões de interesse (RI) e regiões controle (RC), nos quatro tratamentos: osso autógeno (OA), vidro bioativo (VB), OA+PRP e VB+PRP

DENSIDADE ÓSSEA RADIOGRAFICA				
Tipo de enxerto	Região	N	Média	Desvio-padrão
OA	RC	10	0.70	0.411
	RI	10	1.79 [#]	0.316
VB	RC	10	0.65	0.477
	RI	10	2.04 ^{#*}	0.398
OA+PRP	RC	10	0.53	0.372
	RI	10	1.61 [#]	0.285
VB+PRP	RC	10	0.61	0.279
	RI	10	1.53 ^{#†}	0.309

[#]p<0,05 diferença estatisticamente significativa (RI vs RC)

* p<0,05 diferença estatisticamente significativa (OA vs VB)

† p<0,05 diferença estatisticamente significativa (VB vs VB+PRP)

Na Tabela 6 e na Figura 18 estão apresentados os valores de DF nas RIs e RCs dos quatro tipos de enxerto. Observou-se valores similares de DF entre as RIs e RCs em todos os tipos de enxerto com exceção para o VB, onde foi encontrado um valor médio significativamente menor de DF na RI (1,35) em relação à sua RC (1,49).

Tabela 6 - Valores individuais e médios de dimensão fractal, da região de interesse (RI) e da região controle (RC), que podem variar de 1 a 2, nos quatro tratamentos: osso autógeno (OA), vidro bioativo (VB), OA+PRP e VB+PRP

Animal	DIMENSAO FRACTAL							
	OA		VB		OA+PRP		VB+PRP	
	RI	RC	RI	RC	RI	RC	RI	RC
1	-	1,453	-	1,416	-	-	-	-
2	1,513	1,416	1,465	1,455	-	-	-	-
3	1,436	1,556	1,390	1,547	-	-	-	-
4	1,519	1,555	1,375	1,544	-	-	-	-
5	1,433	1,425	1,266	1,510	-	-	-	-
6	1,460	1,482	1,284	1,535	-	-	-	-
7	1,519	1,472	1,323	1,487	-	-	-	-
8	1,438	1,381	1,267	1,517	-	-	-	-
9	1,486	1,463	1,311	1,489	-	-	-	-
10	1,525	1,482	1,494	1,435	-	-	-	-
11	-	-	-	-	1,438	1,376	1,340	1,442
12	-	-	-	-	1,475	1,430	1,384	1,481
13	-	-	-	-	1,466	1,453	1,509	1,565
14	-	-	-	-	1,408	1,532	1,479	1,481
15	-	-	-	-	1,450	1,347	1,502	1,482
16	-	-	-	-	1,416	1,547	1,339	1,439
17	-	-	-	-	1,363	1,492	1,446	1,534
18	-	-	-	-	1,437	1,430	1,470	1,426
19	-	-	-	-	1,465	1,491	1,504	1,510
20	-	-	-	-	1,519	1,499	1,411	1,408
X±dp	1,48± 0,040	1,47± 0,056	1,35± 0,084	1,49± 0,046	1,44± 0,043	1,46± 0,065	1,44± 0,066	1,48± 0,050

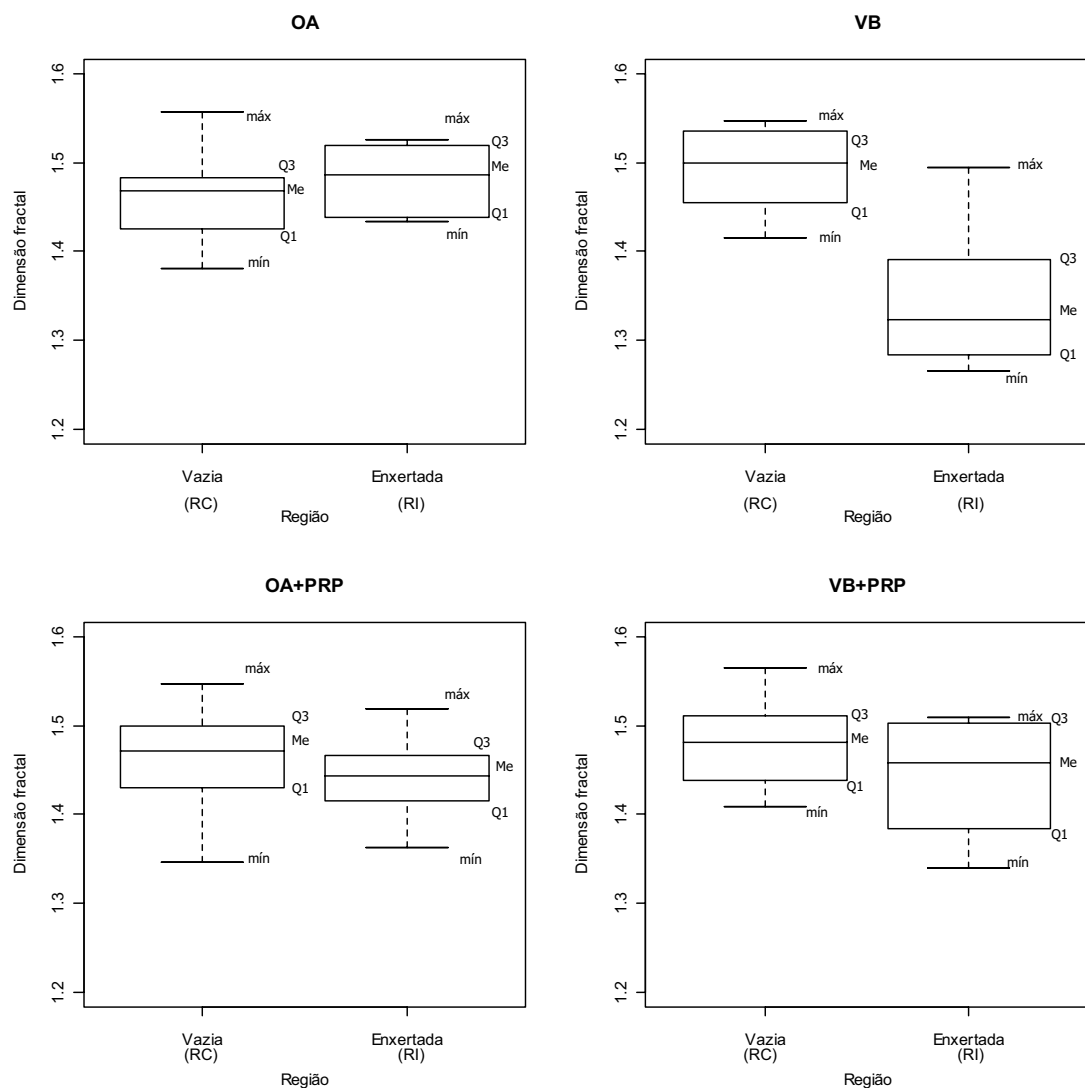


FIGURA 18 - VALORES DA DIMENSÃO FRACTAL, COMPREENDIDOS ENTRE 1 E 2, NA REGIÃO DE INTERESSE (ENXERTADA) E REGIÃO CONTROLE (VAZIA), NOS QUATRO TRATAMENTOS (OA, VB, OA+PRP E VB+PRP). OS TRAÇOS HORIZONTAIS REPRESENTAM O VALOR MEDIANO (Me), O 1º E 3º QUARTIS (Q1 E Q3) E OS VALORES MÁXIMO (Máx) E MÍNIMO (Mín) OBSERVADOS, IDENTIFICADOS CONFORME CRITÉRIO ESTABELECIDO POR TUKEY⁹⁴ (1977).

Quando comparados os valores médios de DF entre as RIs dos quatro tipos de enxerto (Tabela 7), observou-se valor médio significativamente menor do VB (1,35) em relação ao OA (1,48) e valor significativamente maior na RI do OA+PRP (1,44) em relação ao VB (1,35). Não foram encontradas diferenças significativas nas demais comparações.

Tabela 7 - Comparação entre os valores médios (desvio padrão) de dimensão fractal, compreendidos entre 1 e 2, nas regiões de interesse (RI) e regiões controle (RC), nos quatro tratamentos: osso autógeno (OA), vidro bioativo (VB), OA+PRP e VB+PRP

DIMENSÃO FRACTAL				
Tipo de enxerto	Região	N	Média	Desvio-padrão
OA	RC	10	1.47	0.056
	RI	9	1.48	0.040
VB	RC	10	1.49	0.046
	RI	9	1.35 ^{#*}	0.084
OA+PRP	RC	10	1.46	0.065
	RI	10	1.44 [†]	0.043
VB+PRP	RC	10	1.48	0.050
	RI	10	1.44	0.066

[#] p<0,05 diferença estatisticamente significante (RI vs RC)

^{*} p<0,05 diferença estatisticamente significante (VB vs OA)

[†] p<0,05 diferença estatisticamente significante (OA+PRP vs VB)

A Figura 19 ilustra por meio de diagramas de caixa, ou boxplots, as diferenças médias dos valores de DO e DF entre as RIs e RCs, nos quatro tipos de enxertos. Nota-se que houve diferença significativa nos valores de DO em todos os tipos de enxerto. Na análise fractal, valor significativo foi encontrado apenas na diferença da RI com a RC do enxerto de VB.

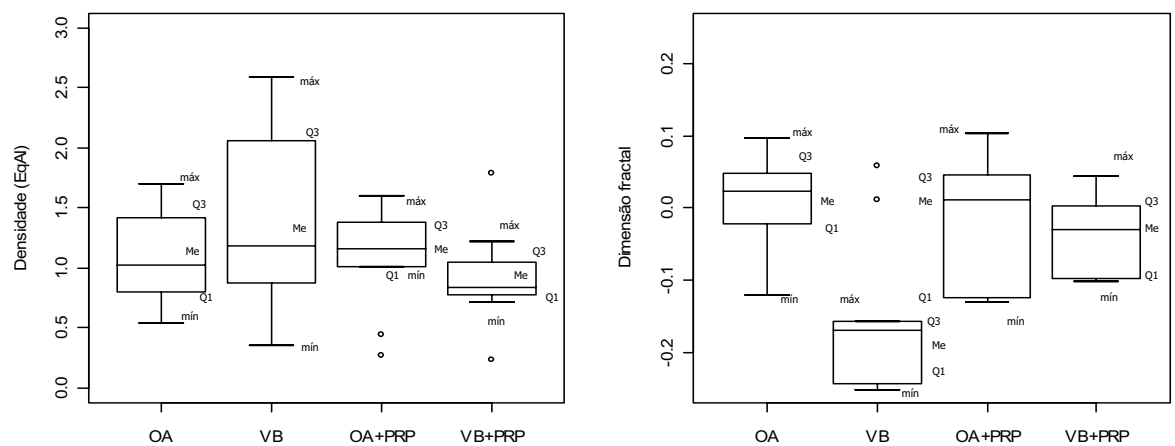


FIGURA 19 - DIFERENÇA MÉDIA DOS VALORES DE DENSIDADE ÓSSEA RADIOGRÁFICA E DIMENSÃO FRACTAL ENTRE A REGIÃO ENXERTADA E A REGIÃO VAZIA, NOS QUATRO TRATAMENTOS (OA, VB, OA+PRP E VB+PRP). OS TRAÇOS HORIZONTAIS REPRESENTAM O VALOR MEDIANO (Me), O 1º E 3º QUARTIS (Q1 E Q3) E OS VALORES MÁXIMO (Máx) E MÍNIMO (Mín) OBSERVADOS, DESCONSIDERANDO OS VALORES DISCREPANTES (PONTOS) IDENTIFICADOS CONFORME CRITÉRIO ESTABELECIDO POR TUKEY⁹⁴ (1977).

As Tabelas 8 e 9 apresentam os valores individuais e médios da análise histométrica, expressa em porcentagem de preenchimento ósseo, dos quatro tipos de enxerto bem como a comparação entre os valores médios de cada enxerto. Observaram-se valores médios bastante próximos entre os seios maxilares enxertados com OA (63,30%), VB (52,65%), OA+PRP (55,25%) e VB+PRP (51,07%), sendo a diferença não significativa. A Figura 20 ilustra por meio de boxplots, os valores médios de porcentagem de preenchimento ósseo, nos quatro tipos de enxertos.

Tabela 8 - Valores individuais da quantidade de osso aferida pela histometria, expressa em porcentagem de osso presente. Cada valor representa a média das medidas feitas em 3 cortes de cada seio maxilar, nos quatro tratamentos: osso autógeno (OA), vidro bioativo (VB), OA+PRP e VB+PRP

Animal	PORCENTAGEM DE OSSO			
	OA	VB	OA+PRP	VB+PRP
1	65,94	61,63	-	-
2	63,28	47,21	-	-
3	67,67	52,14	-	-
4	48,11	68,20	-	-
5	65,45	43,29	-	-
6	74,85	42,90	-	-
7	69,38	60,54	-	-
8	48,32	52,88	-	-
9	66,59	35,62	-	-
10	63,37	62,08	-	-
11	-	-	53,88	63,63
12	-	-	57,96	36,84
13	-	-	49,82	58,91
14	-	-	64,24	54,87
15	-	-	61,02	45,93
16	-	-	48,90	42,37
17	-	-	55,68	48,64
18	-	-	42,15	65,98
19	-	-	54,76	42,42
20	-	-	64,09	-
X±dp	63,30±8,609	52,65±10,415	55,25±7,018	51,07±10,255

Tabela 9 - Comparação entre os valores médios (desvio padrão) da histometria, expressos em porcentagem de preenchimento ósseo, nos quatro tratamentos: osso autógeno (OA), vidro bioativo (VB), OA+PRP e VB+PRP

POCENTAGEM DE OSSO			
Tipo de enxerto	N	Média	Desvio-padrão
OA	10	63,30	8,609
VB	10	52,65	10,415
OA+PRP	10	55,25	7,018
VB+PRP	9	51,07	10,255

Sem diferença estatística entre os quatro tipos de enxerto

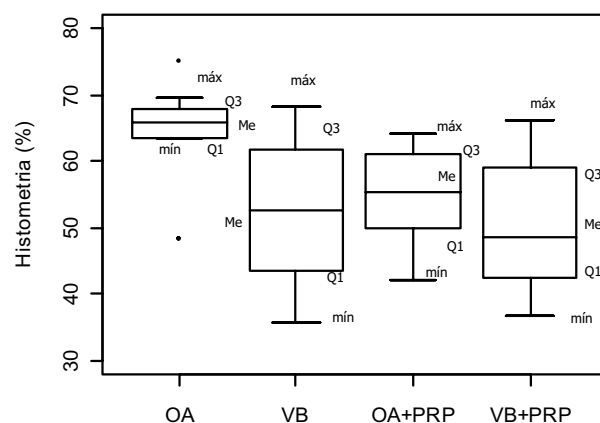


FIGURA 20: VALORES DA ANÁLISE HISTOMÉTRICA, EXPRESSOS EM % DE PREENCHIMENTO ÓSSEO, NOS QUATRO TRATAMENTOS (OA, VB, OA+PRP E VB+PRP). OS TRAÇOS HORIZONTAIS REPRESENTAM O VALOR MEDIANO (Me), O 1º E 3º QUARTIS (Q1 E Q3) E OS VALORES MÁXIMO (Máx) E MÍNIMO (Mín) OBSERVADOS, DESCONSIDERANDO OS VALORES DISCREPANTES (PONTOS) IDENTIFICADOS CONFORME CRITÉRIO ESTABELECIDO POR TUKEY⁹⁴ (1977).

A Figura 21 ilustra os resultados da associação entre a histometria e as variáveis densidade e dimensão fractal. Com base no modelo de regressão linear múltiplo histometria vs densidade (Anexo 6) e histometria vs dimensão fractal, observou-se que não houve correlação entre a histometria, dimensão fractal e densidade.

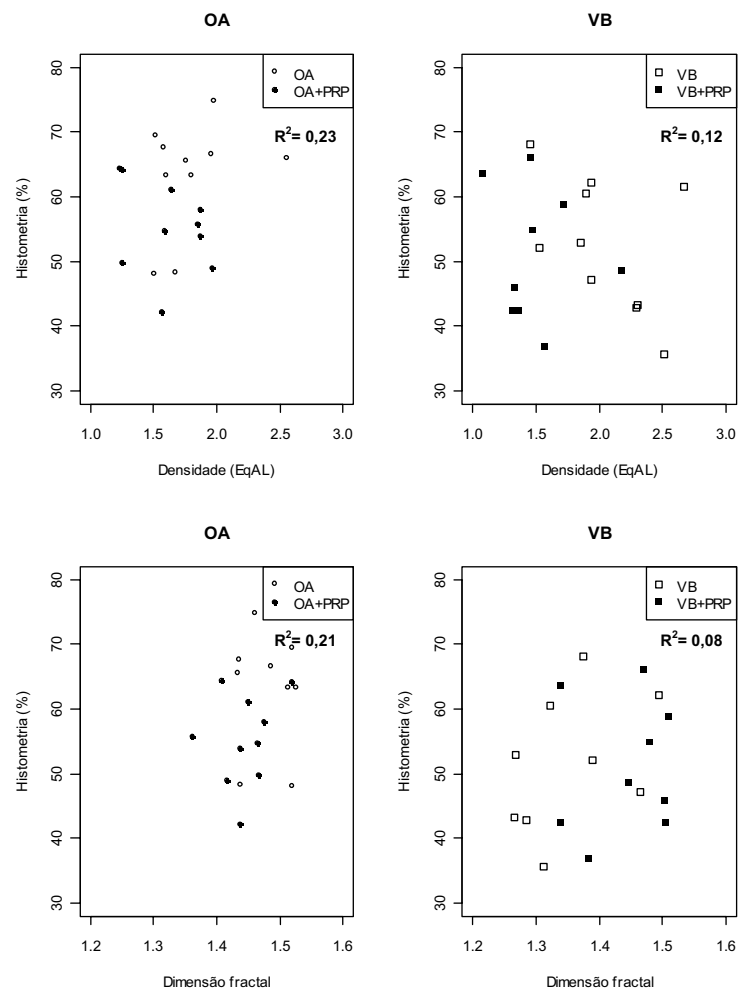


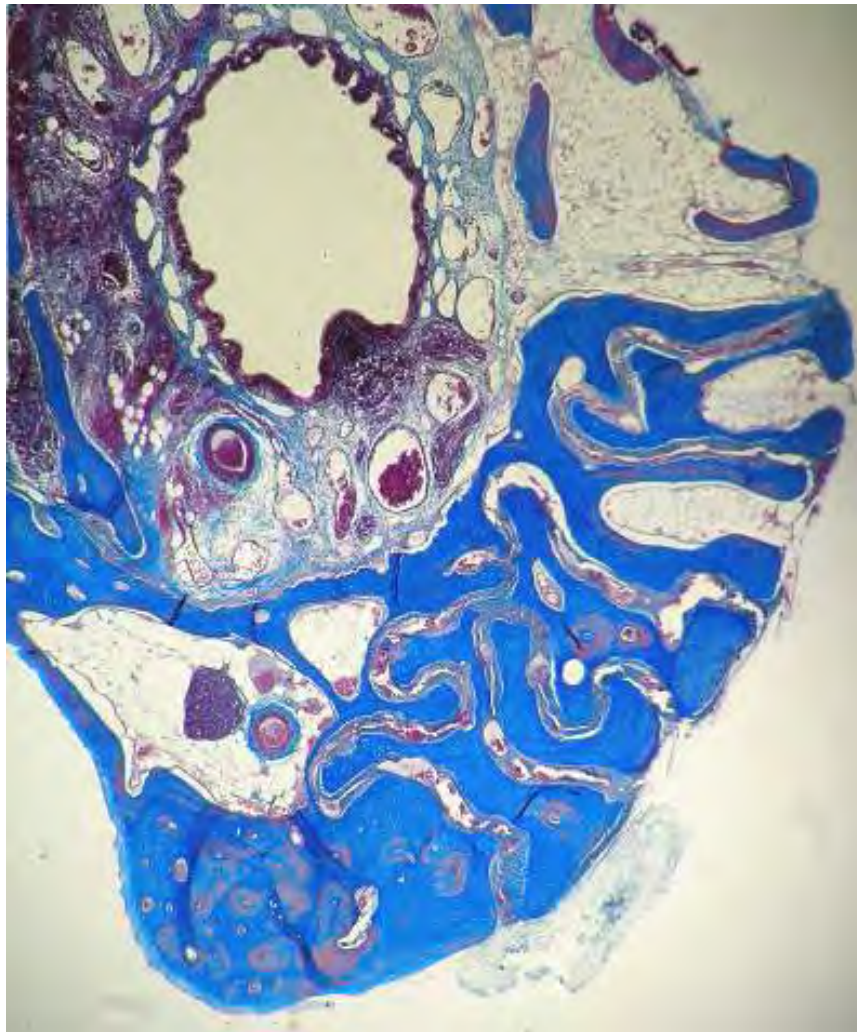
FIGURA 21 - CORRELAÇÕES ESTIMADAS ENTRE AS VARIÁVEIS DENSIDADE ÓSSEA RADIOGRÁFICA, DIMENSÃO FRACTAL E HISTOMETRIA NOS QUATRO TRATAMENTOS (OA, VB, OA+PRP E VB+PRP).

5.3 Análise histológica descritiva

5.3.1 Grupo osso autógeno

A partir da tábua óssea correspondente ao processo alveolar e à parede lateral da cavidade nasal, observou-se formação de osso novo, com diferentes graus de maturação, em arranjo trabecular com disposição nodular, envolvendo medular predominantemente adiposa, por vezes caracterizada por estrutura fibro-adiposa, ricamente vascularizada (Figura 22). Este tecido ósseo neoformado ora se apresentou disposto concentricamente formando canais de Havers, característica de osso maduro, ora ricamente celularizado envolvendo osteócitos dispostos aleatoriamente e com osteoblastos margeando o tecido em formação, em disposição regular, entre osteoclastos (Figura 23). Estas condições sugerem a continuidade do processo de formação e remodelação do tecido pré-existente característica de tecido ósseo em plena atividade

Em poucos animais, observou-ser a presença de tecido ósseo, em forma de espículas, dispersas e irregulares, com espaços medulares amplos (medula adiposa) e sem vascularização expressiva, não apresentando características de tecido em formação, denotando um tecido ósseo, que sofreu estímulo inicial, mas que não teve continuidade, ou seriam fragmentos do tecido implantado.



magnificação: 4x

FIGURA 22 - CORTE HISTOLÓGICO DE UM SEIO MAXILAR DE COELHO ENXERTADO COM OSSO AUTÓGENO, CORADO COM TRICRÔMIO DE MASSON.

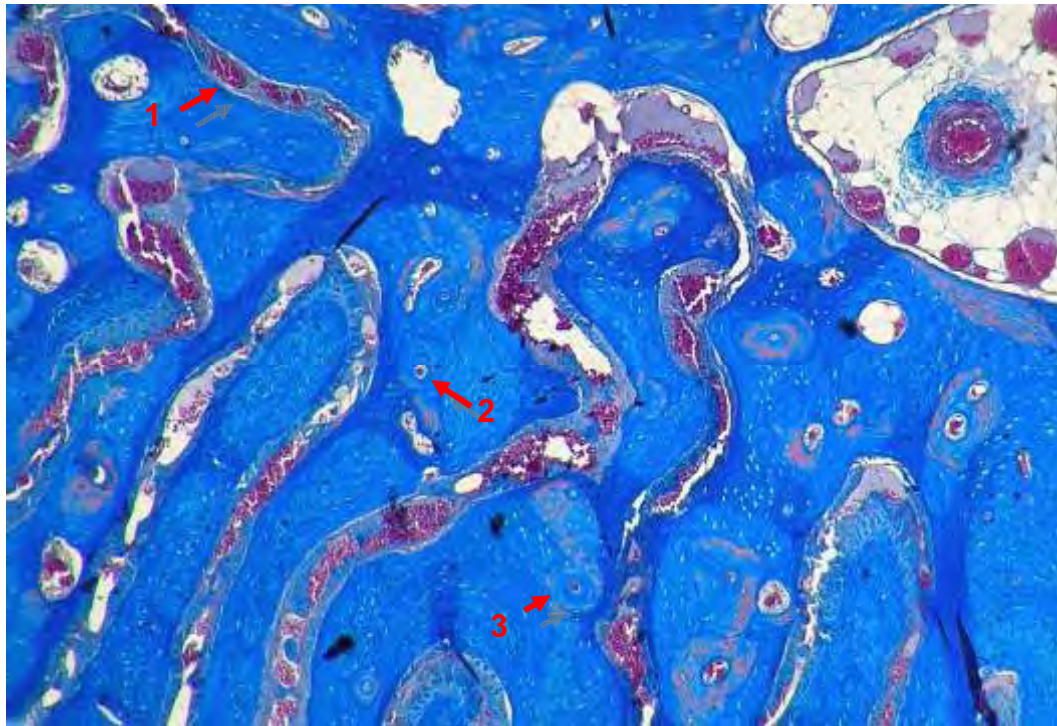


FIGURA 23 - CORTE HISTOLÓGICO DE UM SEIO MAXILAR DE COELHO ENXERTADO COM OSSO AUTÓGENO, CORADO COM TRICRÔMIO DE MASSON: VASOS SANGÜÍNEOS (1), OSTEÓCITOS (2), CANAIS DE HAVERS (3).

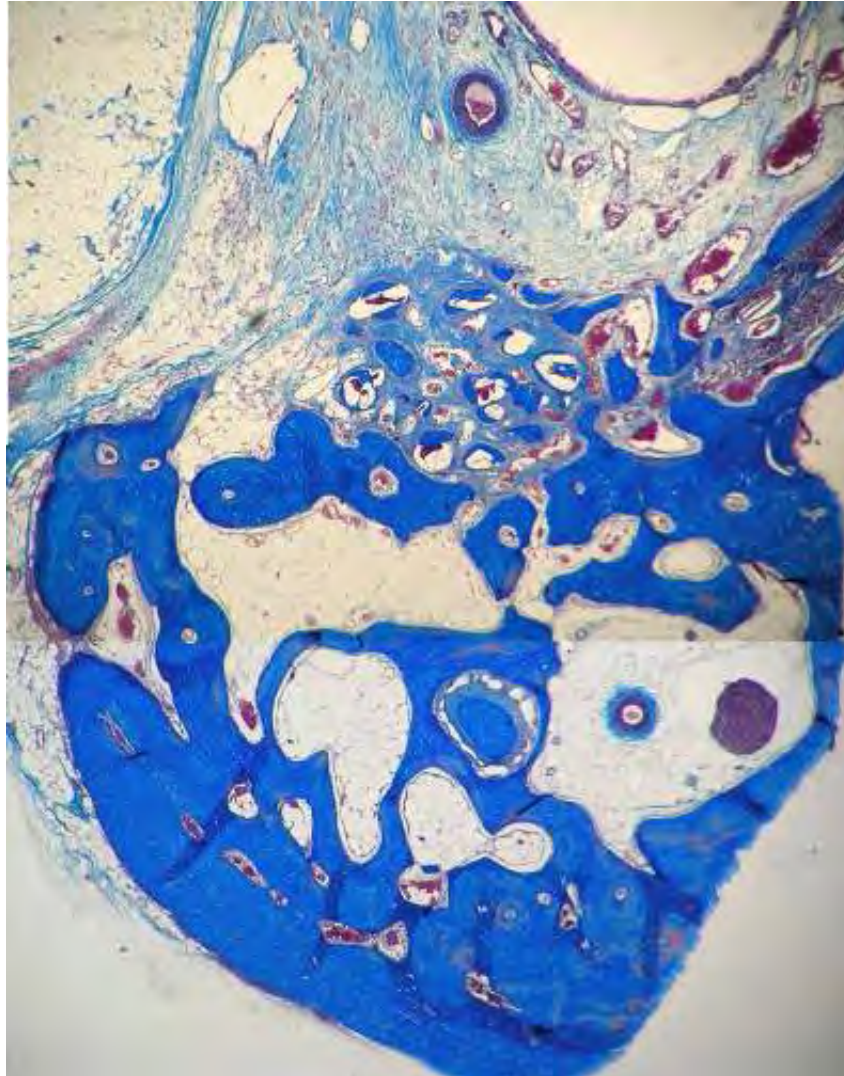
5.3.2 Grupo vidro bioativo

A partir da superfície interna da parede óssea do seio maxilar, notou-se a presença de trabéculas ósseas neoformadas, com espaços medulares amplos, preenchidos por tecido adiposo. Mais próximo à membrana do seio maxilar, observou-se em todos os casos formações vacuolares, com estrutura avermelhada em seu interior, sugestiva de fragmentos remanescentes do vidro bioativo (Figura 24).

Em sua grande maioria, estas estruturas apresentavam-se envoltas por tecido ósseo neoformado, em diferentes graus de maturação habitual. Este conjunto, biomaterial-osso-matriz óssea, encontravam-se em meio a um tecido conjuntivo fibroso em colagenização (Figura 25). Não se observou a presença de células inflamatórias na região. Em um caso, os fragmentos do biomaterial encontravam-se encapsulados por tecido fibroso, sem formação óssea ao redor.

5.3.3 Grupo Osso Autógeno associado ao PRP

A partir da tábua óssea correspondente ao processo alveolar e à parede lateral da cavidade nasal, foi possível observar a presença de tecido ósseo novo, tendendo a formação de canais de Havers. Em toda extensão do seio maxilar trabéculas ósseas estavam presentes,



magnificação: 4x

FIGURA 24 - CORTE HISTOLÓGICO DE UM SEIO MAXILAR DE COELHO ENXERTADO COM VIDRO BIOATIVO. CORADO COM TRICRÔMIO DE MASSON.

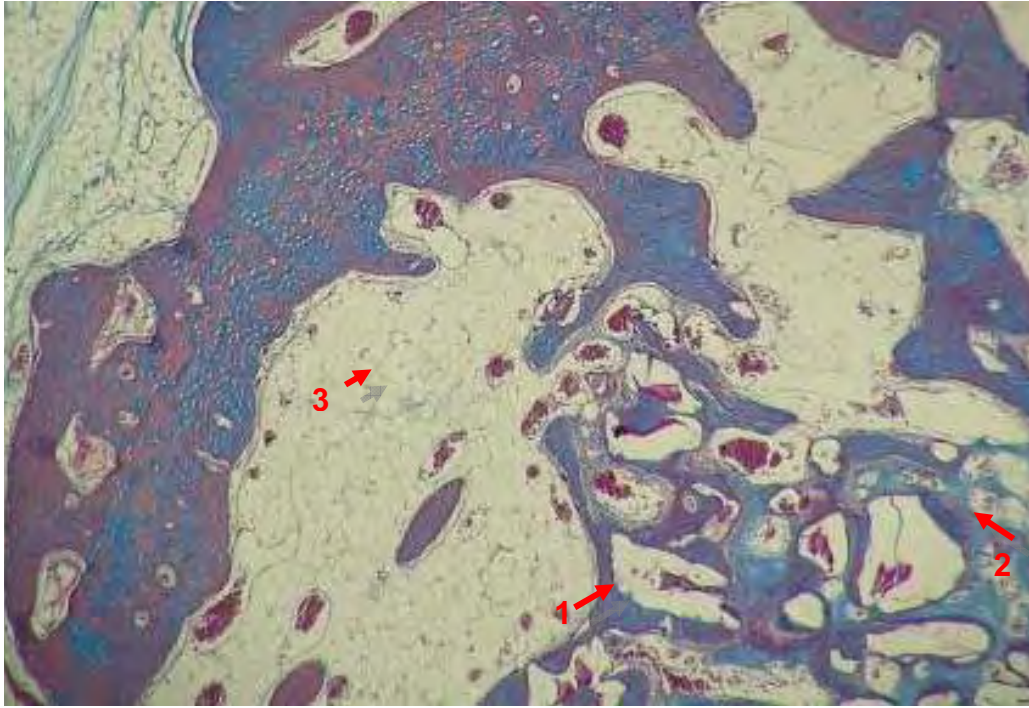


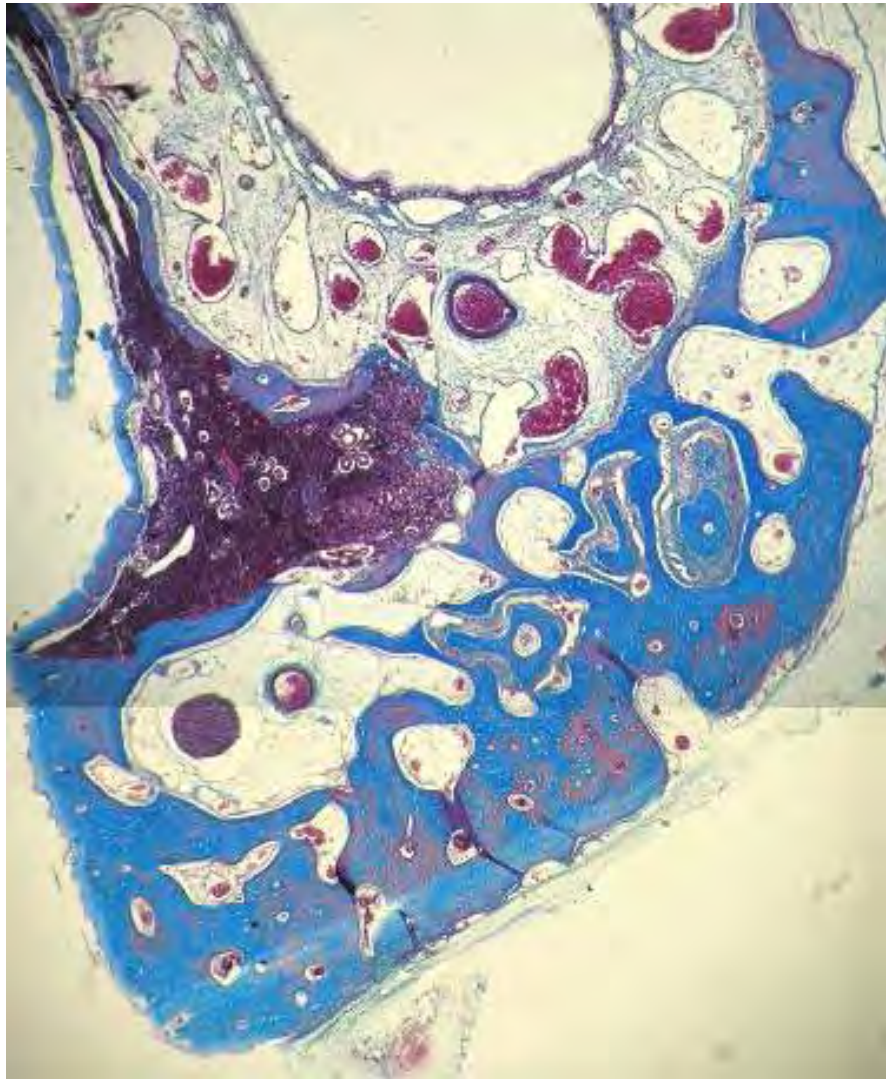
FIGURA 25 - CORTE HISTOLÓGICO DE UM SEIO MAXILAR DE COELHO ENXERTADO COM VIDRO BIOATIVO. CORADO COM TRICRÔMIO DE MASSON: PARTÍCULAS DO VIDRO BIOATIVO (1), TECIDO CONJUNTIVO FIBROSO (2), ESPAÇO MEDULAR AMPLO (3)

ora em forma de espículas, ora em forma ovaladas, que se apresentavam distribuídas irregularmente. Entre essas trabéculas, espaços medulares amplos foram visualizados, preenchidos por medula adiposa, bem como inúmeros vasos sanguíneos (Figuras 26 e 27). O tecido ósseo presente, apesar de ter aspecto de osso maduro, não apresentava caráter de compactação ou solidez, nem características de continuidade de formação ou evolução.

Em poucos animais, observaram-se trabéculas ósseas dispostas de forma regular, preenchendo o seio maxilar. Nestes casos, notou-se tecido ósseo maduro, circundado por tecido ósseo neoformado, envolto em toda a sua extensão por osteoblastos, ou por matriz colagênica em processo de calcificação.

5.3.4 Grupo Vidro Bioativo associado ao PRP

A partir da parede óssea do seio maxilar, observou-se a formação de trabéculas ósseas finas e alongadas, dispostas de forma irregular. O tecido calcificado presente possuía característica de tecido ósseo maduro, sem a presença de osteoblastos ou matriz colagênica ao redor.



magnificação: 4x

FIGURA 26 - CORTE HISTOLÓGICO DE UM SEIO MAXILAR DE COELHO ENXERTADO COM UMA COMBINAÇÃO DE OSSO AUTÓGENO E PRP, CORADO COM TRICRÔMIO DE MASSON.

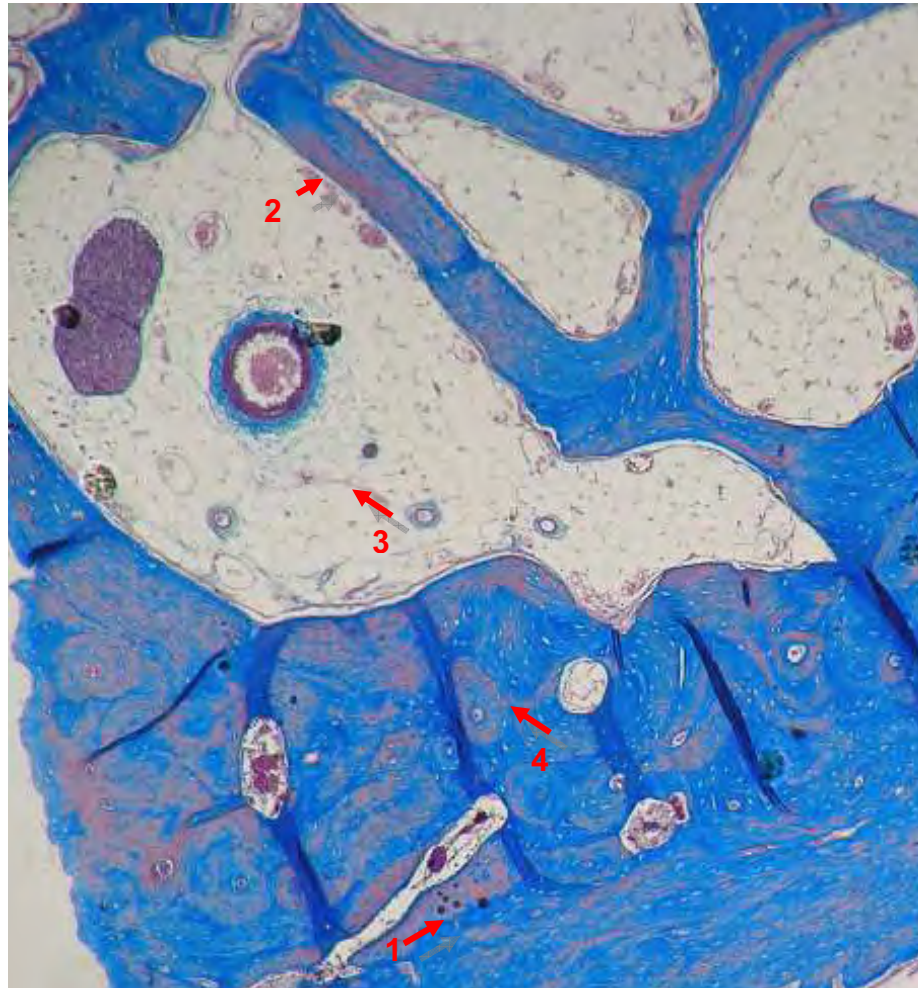
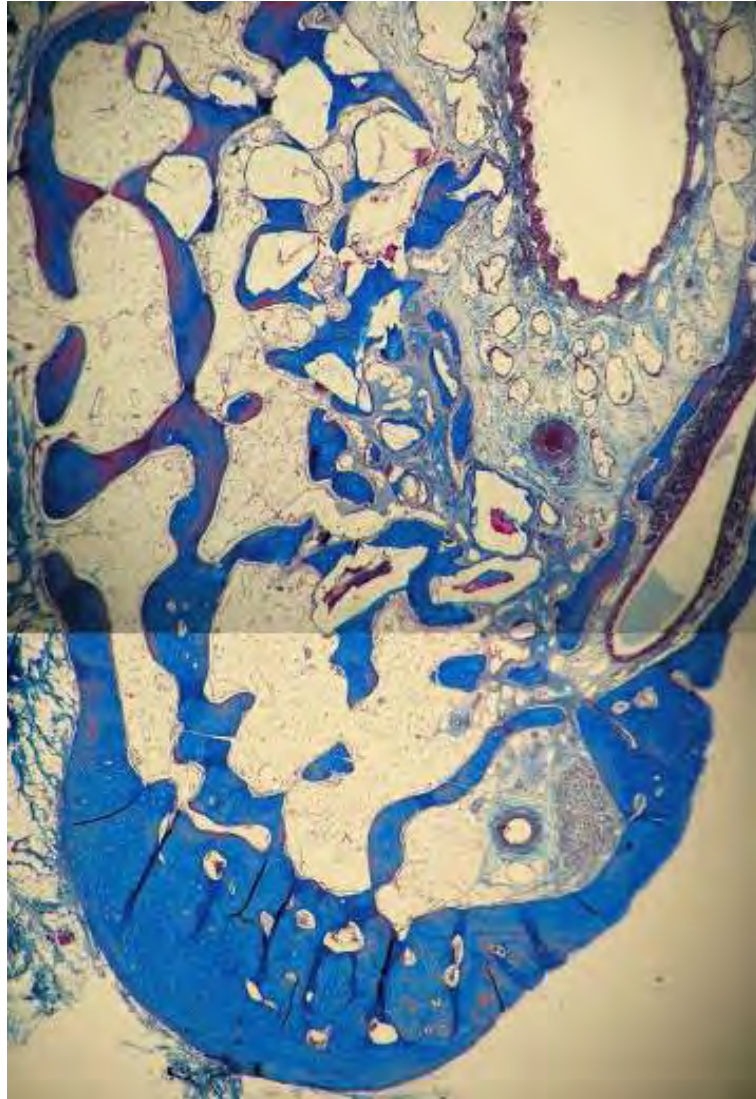


FIGURA 27 - CORTE HISTOLÓGICO DE UM SEIO MAXILAR DE COELHO ENXERTADO COM UMA COMBINAÇÃO DE OSSO AUTÓGENO E PRP, CORADO COM TRICRÔMIO DE MASSON: LINHA DE REVERSÃO MOSTRANDO A DIVISÃO DO OSSO PRÉ-EXISTENTE COM O OSSO NEOFORMADO (1), ESPÍCULAS ÓSSEAS (2), ESPAÇOS MEDULARES AMPLOS (3), CANAIS DE HAVERS (4).

Entre estas trabéculas, havia espaços medulares amplos preenchidos por medula adiposa (Figura 28). Na região mais central, foram observadas formações vacuolares sugestivas da presença do vidro bioativo, ora envoltas por tecido fibroso, ora tecido ósseo (Figura 29). Em um caso, células gigantes foram observadas, reabsorvendo o tecido ósseo neoformado.



magnificação: 4x

FIGURA 28 - CORTE HISTOLÓGICO DE UM SEIO MAXILAR DE COELHO ENXERTADO COM UMA ASSOCIAÇÃO DE VIDRO BIOATIVO E PRP, CORADO COM TRICRÔMIO DE MASSON.

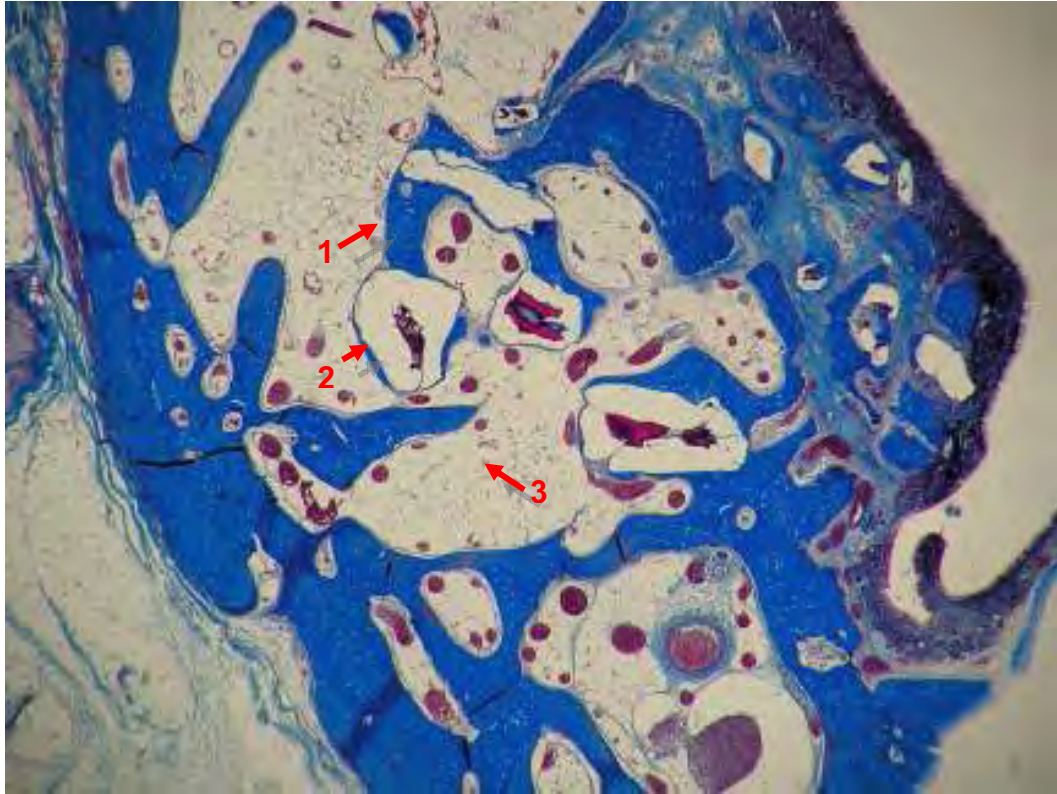


FIGURA 29 - CORTE HISTOLÓGICO DE UM SEIO MAXILAR DE COELHO ENXERTADO COM UMA ASSOCIAÇÃO DE VIDRO BIOATIVO E PRP, CORADO COM TRICRÔMIO DE MASSON: TRABÉCULA ÓSSEA FINA E ALONGADA (1), PARTÍCULA DO BIOMATERIAL (2), MEDULAR ADIPOSA (3).

6 Discussão

6 Discussão

Os resultados da análise histométrica, método que aferiu a quantidade de osso presente no interior do seio maxilar, demonstraram que quando se utilizou o osso autógeno, a porcentagem de preenchimento ósseo foi maior do que os valores alcançados pelos demais enxertos (VB, OA+PRP e VB+PRP), sendo o primeiro da ordem de 63% e os demais 53%, 55% e 51%, respectivamente. Estas diferenças, entretanto, não foram estatisticamente significantes.

Contudo, na análise histológica descritiva, método qualitativo, o que se pôde observar para o enxerto de OA foi um resultado superior em comparação aos demais tratamentos. Os 63% acusados pela histometria eram referentes à presença de tecido ósseo neoformado com características de osso maduro em plena atividade de neoformação e remodelação. Os 37%, que não correspondiam ao osso neoformado, eram, na grande maioria dos casos, espaços medulares, vasos sangüíneos, fibras nervosas e células ósseas, ou seja, estruturas comumente encontradas no tecido ósseo maduro, necessárias para a futura osseointegração de implantes de titânio, que é o objetivo final da cirurgia de levantamento de seio maxilar com enxerto ósseo.

Por outro lado, nos enxertos de VB, OA+PRP e VB+PRP observou-se neoformação óssea pouco expressiva, sendo que as demais porcentagens eram compostas, na maioria os cortes, por espaços

medulares amplos, poucos feixes vsculo-nervosos, espacos vazios, além da presença de partículas do biomaterial ainda em fase de reabsorção, nos grupos VB e VB+PRP.

O resultado da histometria , de certa forma, contraditório em relação ao resultado histológico descritivo, pois a histometria foi realizada considerando-se apenas o parâmetro “tecido ósseo”, desconsiderando-se outros parâmetros tais como a porcentagem de vasos sanguíneos, de partículas do biomaterial, de medular óssea e principalmente de espacos vazios. Assim, resultados mais favoráveis para o OA seriam definitivamente encontrados. Também, é importante considerar no grupo tratado com OA, a presença de “outliers”, resultados discrepantes que, se fossem excluídos da amostra original ($63\pm 8,60\%$), teríamos uma média mais elevada com um desvio padrão bem menor, da ordem de $67\pm 3,74$ de preenchimento ósseo, em porcentagem.

Vale lembrar que as porcentagens descritas pela análise histométrica compreendiam o tecido ósseo neoformado bem como a cortical óssea pré-existente. Isto porque, na maioria dos cortes não era possível visualizar o limite entre estas duas estruturas, ou seja, a linha de reversão presente entre o osso neoformado e a cortical óssea antiga. Acréscimos de osso antigo e exclusões de tecido ósseo neoformado durante a análise histométrica implicariam em erros indesejáveis.

Assim, apesar das porcentagens apresentadas neste estudo não indicarem com exatidão a quantidade de osso neoformado induzido pelos

quatro tipos de enxerto, o viés “osso pré-existente” foi introduzido em toda a amostra, refletindo, portanto a neoformação óssea decorrente do enxerto. Desta forma, sugerimos para um próximo estudo, o uso de marcadores ósseos como fluorocromos que indicariam, no momento da análise, o osso neoformado.

Apesar de o vidro bioativo ser descrito por alguns autores^{18,26,78} como um biomaterial com características osteoindutoras e osteocondutoras, capaz de induzir a proliferação e migração de células osteogênicas, Cardoso et al.¹⁹ (2006) mostraram resultados desfavoráveis para duas formas de vidro bioativo (Biogran[®] e PerioGlas[®]), com diferentes tamanhos de partículas, quando comparado ao coágulo sangüíneo, em defeitos críticos em calvária de ratos. Nos grupos em que o biovidro foi utilizado, os autores observaram, após 60 dias, neoformação óssea apenas nas margens do defeito e a presença de um tecido conjuntivo fibroso ao redor das partículas do biomaterial, descaracterizando o vidro bioativo como um material osteogênico.

Os resultados de Cardoso et al.¹⁹ (2006) estão de acordo com os do presente estudo, que observou uma maior concentração de tecido ósseo neoformado em contato com as paredes internas dos seios maxilares enxertados com vidro bioativo. Este fato também foi observado por Fernandes et al.³⁰ (2005) que descreveu maior formação óssea ao longo das paredes de defeitos periodontais, quando comparado ao centro do defeito.

Observou-se também, no presente estudo, uma maior concentração de partículas não reabsorvidas do biomaterial na região central do seio maxilar, longe de suas paredes e próxima à membrana sinusal. A ausência de partículas de vidro bioativo próximo as corticais internas da cavidade sinusal, bem como a presença de tecido ósseo neoformado devem-se provavelmente ao fato de haver uma maior irrigação sangüínea nas margens ósseas do que no centro do seio maxilar e a presença de células osteogênicas nas paredes das corticais ósseas. Estes achados estão de acordo com estudos anteriores de Boyne, James¹³ (1980) e Hürzeler et al.⁵¹ (1997) que afirmam que as células osteoprogenitoras que povoam os enxertos são provenientes das tábuas ósseas maxilares e não da membrana sinusal que, sabidamente, não possui potencial osteogênico.

Além disso, é de extrema importância considerar que o seio maxilar representa um ambiente único no complexo maxilo-facial, com particularidades anátomo-funcionais que viriam a influenciar os resultados cirúrgicos tais como: 1) vascularização reduzida e, por conseguinte oxigenação reduzida; 2) presença de uma membrana fina e delicada susceptível à perfuração; 3) risco de infecções sinusais¹⁷ e 4) presença de pressão intra-sinusal desencadeada pela entrada e saída de ar durante a respiração^{54,47}.

Assim, o fato de os trabalhos realizados por esta equipe^{18,19,30} terem demonstrado resultados díspares com relação ao desempenho do

vidro bioativo, despertou-nos o interesse de realizar este estudo, como forma de somar conhecimentos a uma linha de pesquisa para a investigação deste biomaterial.

A realização de estudos controlados em humanos que investiguem a aplicação de biomateriais em seio maxilar e a avaliação destes em toda a sua extensão é dificultada pela necessidade da padronização de variáveis como gênero, peso corpóreo, hábitos deletérios e doenças sistêmicas. A impossibilidade de controles radiográficos freqüentes e da realização de biópsias desnecessárias também são dificuldades encontradas em estudos em seres humanos. Estes fatos fazem das pesquisas com animais uma alternativa bastante oportuna para estudos clínicos *in vivo*.

Neste sentido, Watanabe et al.¹⁰⁷ (1999) foram os primeiros a utilizar e validar o coelho como modelo animal para o estudo de cirurgias de levantamento de seio maxilar. Estes autores demonstraram que 50 dias de pós-operatório constituem um período suficiente para que o osso autógeno enxertado sofra o processo de remodelação e integração à cavidade sinusal de coelhos. Albrektsson³ (1980) afirmou, em seu estudo clássico, que a revascularização de enxertos ósseos medulares em coelhos se inicia no 5º dia após sua implantação no leito receptor e, aos 20 e 35 dias, a revascularização e a fase osteogênica de reabsorção e deposição óssea estão completas, respectivamente.

No delineamento da metodologia deste estudo, ficou estabelecido com base nas observações de Cardoso et al.¹⁹ (2006) que o período mais adequado para o sacrifício dos animais seria 90 dias haja visto que estes autores observaram pouca formação óssea ao redor das partículas do biovidro após 60 dias. Talvez, um período experimental mais prolongado, de 90 dias, representaria maiores chances para o biovidro induzir a neoformação óssea. Porém, após a conclusão deste experimento, observou-se uma formação óssea menos expressiva nos seios maxilares enxertados com vidro bioativo. Assim, frente a estes resultados, poderia-se inferir que períodos experimentais maiores e menores aos de 90 dias seriam necessários aos estudos futuros, com o objetivo de investigar o comportamento do vidro bioativo em seios maxilares, ao longo do tempo.

Entretanto, descobriu-se que este argumento não é válido quando se avaliou os resultados do grupo enxertado com osso autógeno onde é possível visualizar uma expressiva formação óssea sugerindo que os 90 dias é, de fato, tempo suficiente para formação óssea no interior do seio maxilar de coelhos e que, portanto, o biovidro não é capaz de formar osso em quantidades comparáveis ao enxerto autógeno. Por fim, quando se avalia as lâminas do grupo enxertado com vidro bioativo, pode-se observar um tecido pouco celularizado, sem a presença de osteoblastos em fase ativa de deposição de matriz óssea, caracterizando aquele tecido como um tecido que concluiu sua fase ativa de neoformação óssea.

A associação do vidro bioativo ao PRP foi fator decisivo no delineamento inicial da pesquisa, isto porque o uso do PRP associado ao osso autógeno ou a outros substitutos ósseos compreende uma nova alternativa de tratamento em Periodontia, Implantodontia e Cirurgia Bucal-Maxilo-Facial. Alguns de seus benefícios incluem ausência de antigenicidade ou transmissão de doenças infectocontagiosas, além da presença de grandes quantidades de fatores de crescimento que seriam capazes de promover a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos, acelerando os processos de formação óssea e de reparação de outros tecidos⁷⁸.

Apesar de muitos estudos utilizando o PRP terem sido desenvolvidos e seus resultados profundamente investigados^{6,7,20,34,36,56,60,61,64,70-72,74,75,77,82,90,110}, muitos aspectos referentes ao seu mecanismo de ação, aos efeitos colaterais e à metodologia de obtenção ainda permanecem incertos. Ademais, existem poucos estudos prospectivos controlados que elucidem os reais benefícios do PRP.

Butterfield et al.¹⁷ (2005) afirmam que o coelho é um modelo animal apropriado para o estudo do PRP, uma vez que possui um “status” hematológico semelhante ao ser humano, no que se refere à quantidade de fatores da coagulação e de plaquetas, além de oferecer volume sanguíneo suficiente para a obtenção de um concentrado de plaquetas.

Em se tratando dos métodos para o preparo do PRP em coelhos, diferentes protocolos são descritos na literatura. As variações principais

consistem no volume de sangue coletado, no número e velocidade das centrifugações e no tipo de anticoagulante. Assim, frente às diferentes metodologias empregadas, os trabalhos de Aghaloo et al.² (2002) e Efeoglu et al.²⁹ (2004) foram o ponto de partida para o estabelecimento de um protocolo próprio para a obtenção do PRP em coelhos.

Neste sentido, vários protocolos foram testados em estudo piloto⁹³ (Anexo 5) e modificações foram feitas de acordo com as dificuldades encontradas, tais como, 1) escolha do anticoagulante ideal que poderia ser infundido no animal; 2) quantidade ideal de sangue para se obter um volume suficiente de PRP; 3) quantidade, velocidade e tempo das centrifugações para se obter um concentrado de plaquetas livre de eritrócitos e de leucócitos, com plaquetas íntegras; 4) volume do centrifugado final que continha uma quantidade elevada de plaquetas (PRP) e 5) decisão pelo uso ou não de ativadores plaquetários como a trombina bovina.

Em relação ao item 1, apesar de Efeoglu et al.²⁹ (2004) ter recomendado o uso do EDTA como anticoagulante no preparo do PRP em coelhos, o anticoagulante utilizado neste protocolo foi o ACD-A (adenina citrato dextrose). Isto porque, Landesberg et al.⁵⁷ (2000) afirmaram que o EDTA é capaz de romper a parede das plaquetas mais facilmente que os anticoagulantes compostos por citrato, ocorrendo a liberação dos fatores de crescimento muito antes do momento desejado.

Ítem 2: De acordo com Efeoglu et al.²⁹ (2004), a quantidade de sangue que pode ser coletada de um coelho adulto é de 15 mL, sem a necessidade de repor a volemia com infusão de soro fisiológico. Nos testes piloto deste estudo, ficou determinado que 8mL de sangue era um volume adequado para obter 2mL de PRP, quantidade esta suficiente para o uso no interior de seios maxilares de coelho.

Ítems 3 e 4) Ficou estabelecido no estudo piloto que 2 centrifugações, sendo a primeira a 302g por 10 minutos e a segunda a 2862g por 5 minutos, promoveram a maior concentração de plaquetas. Entretanto, questionou-se no estudo piloto se a centrifugação dupla, com altas velocidades como a utilizada na segunda etapa, e um tempo de 10 minutos não romperiam a parede das plaquetas, inviabilizando o seu uso ou as deixariam muito compactadas entre si ocorrendo um erro na contagem. Assim, ao testar velocidades inferiores (Anexo 5), observou-se que a contagem plaquetária no PRP era inferior aos resultados com velocidades maiores e, ao se aferir a mesma contagem no plasma pobre em plaquetas, uma alta concentração de plaquetas foi detectada, mostrando que a centrifugação mais lenta foi insuficiente para decantar todas as plaquetas⁹³.

No estudo piloto⁹³, a dificuldade em desagregar o botão plaquetário formado no fundo do tubo de vidro após a 2ª centrifugação foi considerada, pois contagens inferiores de plaquetas poderiam ser observadas. Usando o tubo plástico, tornou-se mais fácil de dissociar as

plaquetas. Uma possível explicação para este fato é que o vidro pode danificar a parede plaquetária, causando sua agregação e ativação.

De acordo com Efeoglu et al.²⁹ (2004), a contagem de plaquetas no sangue venoso em coelhos New Zealand varia entre 250 e 750x10³/μl. Os resultados do presente estudo, fazendo uso do novo protocolo estabelecido, estão dentro destes limites, apontando uma contagem média de 317,7x10³/μl ±39,9. Já, a contagem de plaquetas no PRP foi significativamente maior, atingindo valores de 1344,9x10³/μl ±347,5, enquanto esta contagem em outros estudos foi de 3134 x10³/μl²⁹, 1050x10³/mm³² e 2061 x10³/μl¹⁷.

A porcentagem de aumento de plaquetas no PRP em relação ao sangue venoso foi de 327,4±97,8%, valor estatisticamente significativo. No estudo de Efeoglu et al.²⁹ (2004) este índice foi de 429%. Este é um dado importante a ser considerado, pois leva em conta a contagem inicial de plaquetas no sangue venoso, permitindo comparações entre valores de diferentes animais. Marx⁶³ (2004), ao discutir a concentração ideal de plaquetas capaz de promover uma maior formação óssea, afirma que uma resposta celular decorrente do estímulo plaquetário e de seus fatores de crescimento ocorre quando um aumento plaquetário da ordem de 4 a 5 vezes é alcançado.

No presente estudo, este aumento foi alcançado em 7 animais. Nos animais 13, 17 e 18 o aumento foi da ordem de 3 vezes. É importante ressaltar que estes animais apresentaram valores individuais de

densidade óssea, dimensão fractal e porcentagem de preenchimento ósseo similares às médias do grupo ao qual pertenciam. Sendo assim, o aumento de três vezes não influenciou negativamente os resultados.

Assim, a contagem de plaquetas no PRP alcançada em todos os animais, bem como os valores obtidos na porcentagem de aumento destas células sanguíneas no PRP em relação ao sangue venoso, confirma que o protocolo desenvolvido neste estudo resulta em um centrifugado com elevada contagem de plaquetas.

Outro fator de extrema relevância diz respeito à contaminação indesejada do concentrado de plaquetas por leucócitos que viriam a povoar o ambiente cirúrgico, atraindo por quimiotaxia um elevado aporte de células inflamatórias ao leito receptor. No presente estudo, a contagem média leucócitos no PRP foi significativamente menor ($0,46 \pm 0,45 \times 10^3 / \mu\text{l}$) do que no sangue venoso ($3,96 \pm 2,00 \times 10^3 / \mu\text{l}$). Este é um ponto forte do presente estudo que se preocupou em confirmar a obtenção de um concentrado livre de leucócitos, detalhe este pouco investigado por outros estudos descritos na literatura.

Entretanto, de acordo com Zimmermann et al.¹¹³ (2001), uma lacuna metodológica encontrada no presente experimento diz respeito à não quantificação dos fatores de crescimento presentes no PRP, detalhe este que deve ser aferido em próximos estudos.

Ítem 5) A trombina bovina, substância comumente empregada para geleificar o PRP, não foi utilizada com o propósito de se evitar

qualquer risco de contaminação por um material xenógeno como sugeriu Christgau et al.²⁵ (2006), apesar de Marx⁶³ (2004) ter afirmado que este composto é um iniciador seguro para a coagulação, sem risco de infecção ou aumento da inflamação. Na verdade, a trombina bovina não foi necessária, pois a adição de cloreto de cálcio a 10% foi suficiente para a geleificação do PRP, que ocorreu em 2 minutos.

De acordo com a Associação Europeia de Osseointegração⁴⁵, existe uma forte associação entre a falha na osseointegração de um implante e a qualidade óssea onde este material está inserido. Assim, torna-se clara a necessidade de se utilizar métodos objetivos de análise dos resultados cirúrgicos, sendo que estes devem ser o menos invasivos possível para o paciente. Neste sentido, métodos radiográficos de análise vêm sendo constantemente desenvolvidos. Entre eles podemos citar a densidade óssea radiográfica^{14,40,69,81}, a análise fractal^{66,91,101}, a análise da textura e lacunaridade^{28,101} e a subtração radiográfica digital⁷⁶.

A aferição da densidade óssea radiográfica é um método amplamente utilizado e consagrado em pesquisas clínicas em Radiologia. Suas aplicações incluem a detecção precoce de doenças sistêmicas como a diabetes⁸, a osteoporose^{40,69,76} e a avaliação pós-operatória de enxertos ósseos^{89,97,100}.

A dimensão fractal, por sua vez, é uma metodologia que vem sendo cada vez mais empregada, por seu baixo custo e caráter inovador. Entretanto, as opiniões díspares dos autores^{66,84,91,101} sobre a efetividade

e validade das informações que este método pode trazer têm sido motivo de questionamento quanto aos seus reais benefícios clínicos e científicos.

Os resultados do presente estudo mostraram que quando comparamos um seio maxilar enxertado, aqui denominado região de interesse (RI) e um seio maxilar vazio, ou região controle (RC), o método “densidade” foi capaz de diferenciar as RIs das RCs, independentemente do tipo de enxerto presente (OA, VB, OA+PRP ou VB+PRP). Este é um fato esperado e condizente com a realidade clínica haja visto que uma cavidade preenchida por um determinado material deve ter uma densidade radiográfica maior do que outra cavidade semelhante à primeira, só que vazia.

A dimensão fractal, entretanto, não detectou diferenças significantes entre as RIs e RCs dos grupos tratados com OA, OA+PRP e VB+PRP, apenas entre as RIs e RCs tratadas com VB. Partindo-se da premissa que a dimensão fractal afere o padrão radiográfico do trabeculado ósseo e que o seio maxilar é uma cavidade margeada por cortical óssea em toda a sua extensão, que estará superposta ao seio maxilar não enxertado na imagem radiográfica, é de se esperar que os valores das RIs sejam semelhantes aos das RCs. Na verdade, o ideal seria que todas as RIs possuíssem valores de dimensão fractal semelhantes às RCs, pois assim, presumiria-se que o material enxertado, inclusive o vidro bioativo teria sido substituído por tecido ósseo. Contudo, vale lembrar que, na análise fractal, valores numéricos semelhantes

podem representar estruturas ósseas com padrões microestruturais não necessariamente iguais¹⁰¹.

Na análise da densidade óssea radiográfica dos diferentes tipos de enxerto, os resultados mostram que os valores mais elevados foram encontrados nos seios maxilares enxertados com VB, seguido daqueles enxertados com OA. Entretanto, diferenças significantes foram observadas apenas entre o VB e o OA e entre o VB e o VB+PRP, que apresentou o menor valor de densidade. Da mesma forma, Zamet et al.¹¹² (1997), encontraram valores mais elevados de densidade radiográfica em bolsas peridontais enxertadas com Perioglas após 12 meses, quando compararam estes dados com os valores de densidade de regiões de osso pré-existente ou de bolsas tratadas apenas com raspagem.

Na análise fractal, diferenças estatisticamente significantes foram encontradas entre os enxertos de OA e VB e entre OA+PRP e VB. Ao interpretar os dados gerados pela análise fractal, vemos que o enxerto de OA apresentou valor médio bastante próximo ao valor médio das RCs, sendo o primeiro 1,48 e o segundo 1,47, evidenciando a similaridade estrutural, bem como a integração do enxerto autógeno com o osso original pré-existente. Já, o VB (1,35) foi o tipo de enxerto que apresentou um padrão estrutural mais distante da média do OA (1,48) ou da média das RCs (1,47), sendo este resultados também esperado haja visto que muitas partículas do biomaterial ainda estavam presentes aos 90 dias, o

que modificou a distribuição do trabeculado ósseo desta região em relação ao osso autógeno.

A semelhança dos valores de dimensão fractal entre as RIs tratadas com OA e as RCs no período pós-operatório tardio também foi descrita por Heo et al.⁴⁹ (2002) que observaram valores similares de dimensão fractal, nos períodos pré e pós-operatórios em radiografias panorâmicas de mandíbulas submetidas à osteotomia em cirurgia ortognática. Por outro lado, Tosoni et al.⁹⁰ (2006) demonstraram que a análise fractal não foi capaz de diferenciar as alterações do trabeculado ósseo de mulheres com e sem osteoporose, condição detectada pela análise da intensidade de pixel no mesmo estudo.

Assim como afirmou Tosoni et al.⁹⁰ (2006) em relação à dimensão fractal, acreditamos que a variabilidade de resultados apresentados na literatura para ambos os métodos, análise fractal e da densidade, é decorrente principalmente das diferenças no processo de obtenção das radiografias e na técnica utilizada para a aferição dos mesmos.

Para a determinação da densidade e da dimensão fractal, o ideal seria que radiografias digitais diretas fossem utilizadas ao invés de radiografias digitais indiretas, pois as últimas sofrem interferências decorrentes da tomada radiográfica, do processamento químico do filme e, por fim, da digitalização da imagem. Desta forma, talvez valores mais precisos fossem observados, pois imagens digitais diretas são mais definidas e nítidas e os métodos não sofreriam interferências na

imagem^{55,66}. O uso da escala de alumínio em cada radiografia, além de permitir a comparação dos resultados nas diferentes radiografias, permitiu que diferenças de exposição e de processamento fossem anuladas, tornando os resultados mais confiáveis.

Do ponto de vista estatístico, diz-se que existe correlação ou associação entre duas ou mais variáveis quando as alterações sofridas por uma delas são acompanhadas por modificações nas outras⁶⁷. Assim, também foi objetivo deste estudo estimar a correlação entre as três variáveis: densidade, dimensão fractal e histometria (% de preenchimento ósseo). Assim sendo, no estudo da associação entre a histometria e a densidade ou entre a histometria e a dimensão fractal, os resultados mostraram que em todos os casos, não houve associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

Estes dados estão de acordo com os de Schultze-Mosgau et al.⁸¹ (2001) que estabeleceram um baixo coeficiente de correlação ($r=0.16$) entre os dados da densidade e da análise histométrica de cirurgias de enxerto “onlay” e “inlay” em maxilas atróficas, sugerindo que o método da densidade possui um valor preditivo baixo, devendo ser reconsiderado com instrumento de avaliação dos resultados pós-cirúrgicos. Já, Nair et al.⁶⁶ (2001) observaram uma alta correlação dos resultados da análise fractal com a análise histométrica ($r=0.79$) em cirurgias para preenchimento de defeitos ósseos em mandíbulas de coelhos, sugerindo

que a análise fractal é um método efetivo para a quantificação das alterações do padrão ósseo.

É importante ressaltar que ambos os métodos radiográficos, densidade e dimensão fractal, detectaram diferenças importantes entre os tratamentos com especial atenção para o OA e o VB e também entre as RIs e RCs. Entretanto, estes métodos não foram capazes de detectar, em alguns casos, diferenças onde de fato estavam presentes como na comparação entre o OA e VB+PRP, comprovadas pela análise histológica descritiva. Assim, conclui-se que os métodos apresentam limitações e que devem ser complementares na análise dos resultados cirúrgicos.

Da mesma forma, a histometria não detectou diferenças entre os tratamentos, uma vez que se aferiu unicamente a porcentagem de preenchimento por tecido ósseo. Para os próximos estudos, fica clara a necessidade de se quantificar outras estruturas não aferidas por este experimento, que naturalmente fazem parte da anatomia histológica do tecido ósseo, diferenciando-as de espaços meramente vazios. Assim, resultados mais favoráveis serão detectados, principalmente nos grupos tratados com osso autógeno. Por outro lado, como era de se esperar, a análise histológica descritiva permitiu uma análise visual e direta dos resultados, sendo considerada o padrão-ouro para a avaliação dos resultados pós-operatórios.

Com relação aos tratamentos empregados como enxerto no interior dos seios maxilares, conclui-se que os melhores resultados foram

encontrados no grupo tratado com osso autógeno. O vidro bioativo, por sua vez, apresentou os piores resultados, tendo este um baixo potencial osteocondutor e osteoindutor. Por fim, a associação do PRP ao osso autógeno e ao vidro bioativo também não foi eficaz. Na verdade, o que se pôde observar é que, além deste composto não ser capaz de acelerar a neoformação óssea, como alguns trabalhos afirmam, ele alterou para menos a quantidade óssea formada, como é possível observar nas comparações entre o grupo tratado com osso autógeno exclusivamente e o grupo tratado com a associação do osso autógeno e PRP.

Por fim, a extrapolação destes dados para seres humanos deve ser cautelosa. Estudo prospectivo, randomizado, controlado que investigue os aspectos clínicos e radiográficos de toda a extensão do seio maxilar de seres humanos, bem como o comportamento dos enxertos aqui testados em contato com a superfície de implantes é sobremaneira necessário.

7 Conclusão

7 Conclusão

Com base nos achados do presente estudo, conclui-se, em relação aos materiais utilizados como enxerto em cirurgias de levantamento de seio maxilar de coelho, que:

- O osso autógeno levou aos melhores resultados, comparativamente ao vidro bioativo ou à associação destes materiais com o PRP, devendo, portanto, ser considerado o material de escolha para a reconstrução da região posterior da maxila.
- O PRP reduziu a capacidade do osso autógeno em formar tecido ósseo.
- O vidro bioativo não induziu neoformação significativa de tecido ósseo nas cavidades sinusais, tampouco quando associado ao PRP.

Com relação aos métodos radiográficos, conclui-se que:

- A densidade óssea e a dimensão fractal apresentaram limitações na aferição da neoformação óssea, comparativamente à histomorfometria, devendo ser utilizados como métodos complementares na análise dos resultados cirúrgicos.

8 Referências

8 Referências *

- 1 Adell R, Lekholm U, Rockler B, Branemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg.* 1981;10:387-416.
- 2 Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002;60:1176-81.
- 3 Albrektsson T. Repair of bone grafts. A vital microscopic and histological investigation in the rabbit. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1980;14:1-12.
- 4 Allan I, Newman H, Wilson M. Antibacterial activity of particulate bioglass against supra- and subgingival bacteria. *Biomaterials.* 2001;22:1683-7.
- 5 Allan I, Newman H, Wilson M. Particulate Bioglass reduces the viability of bacterial biofilms formed on its surface in an in vitro model. *Clin Oral Implants Res.* 2002;13:53-8.
- 6 Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999;14:529-35.
- 7 Anitua E. The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in oral surgery. *Pract Proced Aesthet Dent.* 2001;13:487-93.
- 8 Ay S, Gursoy UK, Erselcan T, Marakoglu I. Assessment of mandibular bone mineral density in patients with type 2 diabetes mellitus. *Dentomaxillofac Radiol.* 2005;34:327-31.
- 9 Begley CT, Doherty MJ, Mollan RA, Wilson DJ. Comparative study of the osteoinductive properties of bioceramic, coral and processed bone graft substitutes. *Biomaterials.* 1995;16:1181-5.
- 10 Block MS, Kent JN, Kallukaran FU, Thunthy K, Weinberg R. Bone maintenance 5 to 10 years after sinus grafting. *J Oral Maxillofac Surg.* 1998;56:706-14.
- 11 Boeck-Neto RJ, Gabrielli M, Lia R, Marcantonio E, Shibli JA, Marcantonio E Jr. Histomorphometrical analysis of bone formed after maxillary sinus floor augmentation by grafting with a combination of autogenous bone and demineralized freeze-dried bone allograft or hydroxyapatite. *J Periodontol.* 2002;73:266-70.

• De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

13 Boyne PJ, James RA. Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. *J Oral Surg.* 1980;38:613-6.

14 Boyne PJ, Lilly LC, Marx RE, Moy PK, Nevins M, Spagnoli DB, et al. De novo bone induction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in maxillary sinus floor augmentation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63:1693-707.

15 Branemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindstrom J, Ohlsson A. Intraosseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1969;3:81-100.

16 Bravenboer N, Holzmann P, de Boer H, Blok GJ, Lips P. Histomorphometric analysis of bone mass and bone metabolism in growth hormone deficient adult men. *Bone.* 1996;18:551-7.

17 Butterfield KJ, Bennett J, Gronowicz G, Adams D. Effect of platelet-rich plasma with autogenous bone graft for maxillary sinus augmentation in a rabbit model. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63:370-6.

18 Cancian DC, Hochuli-Vieira E, Marcantonio RA, Garcia Junior IR. Utilization of autogenous bone, bioactive glasses, and calcium phosphate cement in surgical mandibular bone defects in *Cebus apella* monkeys. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2004;19:73-9.

19 Cardoso AK, Barbosa Ade A Jr, Miguel FB, Marcantonio E Jr, Farina M, Soares GD, et al. Histomorphometric analysis of tissue responses to bioactive glass implants in critical defects in rat calvaria. *Cells Tissues Organs.* 2006;184:128-37.

20 Carlson NE, Roach RB Jr. Platelet-rich plasma: clinical applications in dentistry. *J Am Dent Assoc.* 2002;133:1383-6.

21 Chan C, Thompson I, Robinson P, Wilson J, Hench L. Evaluation of Bioglass/dextran composite as a bone graft substitute. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2002;31:73-7.

22 Chappard D, Grizon F, Brechet I, Basle MF, Rebel A. Evolution of the bone-titanium interface on implants coated/noncoated with xenogeneic bone particles: quantitative microscopic analysis. *J Biomed Mater Res.* 1996;32:175-80.

23 Chen SK, Oviir T, Lin CH, Leu LJ, Cho BH, Hollender L. Digital imaging analysis with mathematical morphology and fractal dimension for evaluation of periapical lesions following endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;100:467-72.

24 Choi BH, Im CJ, Huh JY, Suh JJ, Lee SH. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004;33:56-9.

- 25 Christgau M, Moder D, Wagner J, Gläsi M, Hiller K-A, Wenzel A, et al. Influence of autologous platelet concentrate on healing in intrabony defects following guided tissue regeneration therapy: a randomized prospective clinical split-mouth study. *J Clin Periodontol* 2006;33:908–921.
- 26 Cordioli G, Mazzocco C, Schepers E, Brugnolo E, Majzoub Z. Maxillary sinus floor augmentation using bioactive glass granules and autogenous bone with simultaneous implant placement. Clinical and histological findings. *Clin Oral Implants Res*. 2001;12:270-8.
- 27 Cortet B, Boutry N, Dubois P, Legroux-Gerot I, Cotten A, Marchandise X. Does quantitative ultrasound of bone reflect more bone mineral density than bone microarchitecture? *Calcif Tissue Int*. 2004;74:60-7.
- 28 Costa LF, Cesar Jr RM. Shape analysis and classification: theory and practice. Boca Raton: CRC Press, 2001. v. 1. 659 p.
- 29 Efeoglu C, Akcay YD, Erturk S. A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004;62:1403-7.
- 30 Fernandes JM, Rego RO, Spolidorio LC, Marcantonio RA, Marcantonio Junior E, Cirelli JA. Enamel matrix proteins associated with GTR and bioactive glass in the treatment of class III furcation in dogs. *Pesqui Odontol Bras*. 2005;19:169-75.
- 31 Fetner AE, Hartigan MS, Low SB. Periodontal repair using PerioGlas in nonhuman primates: clinical and histologic observations. *Compendium*. 1994;15:932, 935-8; quiz 939.
- 32 Fiorellini JP, Weber HP. Clinical trials on the prognosis of dental implants. *Periodontol* 2000. 1994;4:98-108.
- 33 Frederiksen NL. Diagnostic imaging in dental implantology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1995;80:540-54.
- 34 Froum SJ, Wallace SS, Tarnow DP, Cho SC. Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts: three bilateral case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2002;22:45-53.
- 35 Froum SJ, Tarnow DP, Wallace SS, Rohrer MD, Cho SC. Sinus floor elevation using anorganic bovine bone matrix (OsteoGraf/N) with and without autogenous bone: a clinical, histologic, radiographic, and histomorphometric analysis--Part 2 of an ongoing prospective study. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1998;18:528-43.
- 36 Furst G, Gruber R, Tangl S, Zechner W, Haas R, Mailath G, et al. Sinus grafting with autogenous platelet-rich plasma and bovine hydroxyapatite. A histomorphometric study in minipigs. *Clin Oral Implants Res*. 2003;14:500-8.

37 Furusawa T, Mizunuma K, Yamashita S, Takahashi T. Investigation of early bone formation using resorbable bioactive glass in the rat mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1998;13:672-6.

38 Gatti AM, Valdre G, Tombesi A. Importance of microanalysis in understanding mechanism of transformation in active glassy biomaterials. *J Biomed Mater Res*. 1996;31:475-80.

39 Geurs NC, Wang IC, Shulman LB, Jeffcoat MK. Retrospective radiographic analysis of sinus graft and implant placement procedures from the Academy of Osseointegration Consensus Conference on Sinus Grafts. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2001;21:517-23.

40 Giro G, Sakakura CE, Goncalves D, Pereira RM, Marcantonio E Jr, Orrico SR. Effect of 17beta-estradiol and alendronate on the removal torque of osseointegrated titanium implants in ovariectomized rats. *J Periodontol*. 2007;78:1316-21.

41 Grisdale J. The clinical applications of synthetic bone alloplast. *J Can Dent Assoc*. 1999;65:559-62.*

42 Gross JS. Bone grafting materials for dental applications: a practical guide. *Compend Contin Educ Dent*. 1997;18:1013-8, 1020-2, 1024.

43 Gross U, Strunz V. The interface of various glasses and glass ceramics with a bony implantation bed. *J Biomed Mater Res*. 1985;19:251-71.

44 Hallman M, Cederlund A, Lindskog S, Lundgren S, Sennerby L. A clinical histologic study of bovine hydroxyapatite in combination with autogenous bone and fibrin glue for maxillary sinus floor augmentation. Results after 6 to 8 months of healing. *Clin Oral Implants Res*. 2001;12:135-43.

45 Harris D, Buser D, Dula K, Grondahl K, Haris D, Jacobs R, et al. E.A.O. guidelines for the use of diagnostic imaging in implant dentistry. A consensus workshop organized by the European Association for Osseointegration in Trinity College Dublin. *Clin Oral Implants Res*. 2002;13:566-70.

46 Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. *Bood Rev*. 1993;7:52-62.

47 Hatano N, Shimizu Y, Ooya K. A clinical long-term radiographic evaluation of graft height changes after maxillary sinus floor augmentation with a 2:1 autogenous bone/xenograft mixture and simultaneous placement of dental implants. *Clin Oral Implants Res*. 2004;15:339-45.

48 Hench LL, Paschall HA. Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle. *Biomed Mater Res*. 1973;7:25-42.

49 Heo MS, Park KS, Lee SS, Choi SC, Koak JY, Heo SJ, et al. Fractal analysis of mandibular bony healing after orthognathic surgery. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002;94:763-7.

- 50 Hurzeler MB, Quinones CR, Kirsch A, Gloker C, Schupbach P, Strub JR, et al. Maxillary sinus augmentation using different grafting materials and dental implants in monkeys. Part I. Evaluation of anorganic bovine-derived bone matrix. *Clin Oral Implants Res.* 1997;8:476-86.
- 51 Hurzeler MB, Quinones CR, Kirsch A, Schupbach P, Krausse A, Strub JR, et al. Maxillary sinus augmentation using different grafting materials and dental implants in monkeys. Part III. Evaluation of autogenous bone combined with porous hydroxyapatite. *Clin Oral Implants Res.* 1997;8:401-11.
- 52 Huygh A, Schepers EJ, Barbier L, Ducheyne P.J Microchemical transformation of bioactive glass particles of narrow size range, a 0-24 months study. *Mater Sci Mater Med.* 2002;13:315-20.
- 53 Jensen, OT. *The sinus bone graft.* Illinois: Quintessence; 1999. 234 p.
- 54 Jensen OT, Shulman LB, Block MS, Iacono VJ. Report of the Sinus Consensus Conference of 1996. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1998;13 Suppl:11-45.
- 55 Jolley L, Majumdar S, Kapila S. Technical factors in fractal analysis of periapical radiographs. *Dentomaxillofac Radiol.* 2006;35:393-7.
- 56 Kassolis JD, Rosen PS, Reynolds MA. Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: case series. *J. Periodontol.* 2000;71:1654-61.
- 57 Landesberg R, Roy M, Glickman RS. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000;58:297-300.
- 58 Lee YM, Park YJ, Lee SJ, Ku Y, Han SB, Choi SM, et al. Tissue engineered bone formation using chitosan/tricalcium phosphate sponges. *J Periodontol.* 2000;71:410-7.
- 59 Leonetti JA, Rambo HM, Thronsdon RR Osteotome sinus elevation and implant placement with narrow size bioactive glass Implant Dent. 2000;9:177-82.
- 60 Lozada JL, Caplanis N, Proussaefs P, Willardsen J, Kammeyer G. Platelet-rich plasma application in sinus graft surgery: Part I--Background and processing techniques. *J Oral Implantol.* 2001;27:38-42.
- 61 Maiorana C, Sommariva L, Brivio P, Sigurta D, Santoro F. Maxillary sinus augmentation with anorganic bovine bone (Bio-Oss) and autologous platelet-rich plasma: preliminary clinical and histologic evaluations. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2003;23:227-35.
- 62 Marden LJ, Hollinger JO, Chaudhari A, Turek T, Schaub RG, Ron E. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 is superior to demineralized

bone matrix in repairing craniotomy defects in rats. *J Biomed Mater Res.* 1994;28:1127-38.

63 Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62:489-96.

64 Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85:638-46.

65 Mengel R, Soffner M, Flores-de-Jacoby L. Bioabsorbable membrane and bioactive glass in the treatment of intrabony defects in patients with generalized aggressive periodontitis: results of a 12-month clinical and radiological study. *J Periodontol.* 2003;74:899-908.

66 Nair MK, Seyedain A, Webber RL, Nair UP, Piesco NP, Agarwal S, et al. Fractal analyses of osseous healing using tuned aperture computed tomography images. *Eur. Radiol.* 2001;11:1510-15.

67 Neter J, Kutner MH, Wassrman W, Nachtsheim CJ. *Applied Linear Statistical Models.* 4ed. New York: McGraw-Hill/Irwin; 1996.1408p.

68 Ong MM, Eber RM, Korsnes MI, MacNeil RL, Glickman GN, Shyr Y, et al. Evaluation of a bioactive glass alloplast in treating periodontal intrabony defects. *J Periodontol.* 1998;69:1346-54

69 Orrico SR, Giro G, Goncalves D, Takayama L, Pereira RM. Influence of the period after ovariectomy on femoral and mandibular bone density and on induced periodontal disease. *J Periodontol.* 2007;78:164-9.

70 Petrungraro PS. Using platelet-rich plasma to accelerate soft tissue maturation in esthetic periodontal surgery. *Compend Contin Educ Dent.* 2001;22:729-32, 734, 736 passim; quiz 746.

71 Petrungraro P. Platelet-rich plasma for dental implants and soft-tissue grafting. *Dent Implantol Update.* 2001;12:41-6.

72 Philippart P, Brasseur M, Hoyaux D, Pochet R. Human recombinant tissue factor, platelet-rich plasma, and tetracycline induce a high-quality human bone graft: a 5-year survey. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003;18:411-6.

73 Richardson ML, Gillespy T. Fractal analysis of trabecular bone. University of Washington, 2007. Disponível em: <http://www.rad.washington.edu/exhibits/fractal.html>

74 Robiony M, Polini F, Costa F, Politi M. Osteogenesis distraction and platelet-rich plasma for bone restoration of the severely atrophic mandible: preliminary results. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002;60:630-5.

75 Rosenberg ES, Torosian J. Sinus grafting using platelet-rich plasma--initial case presentation. *Pract Periodontics Aesthet Dent.* 2000;12:843-50.

76 Sakakura CE, Marcantonio E Jr, Wenzel A, Scaf G. Influence of cyclosporin A on quality of bone around integrated dental implants: a radiographic study in rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2007;18:34-9.

77 Sanchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003;18:93-103.

78 Schepers E, de Clercq M, Ducheyne P, Kempeneers R. Bioactive glass particulate material as a filler for bone lesions. *J Oral Rehabil.* 1991;18:439-52.

79 Schepers EJ, Ducheyne P. Bioactive glass particles of narrow size range for the treatment of oral bone defects: a 1-24 month experiment with several materials and particle sizes and size ranges. *J Oral Rehabil.* 1997;24:171-81.

80 Schepers EJ, Ducheyne P, Barbier L, Schepers S. Bioactive glass particles of narrow size range: a new material for the repair of bone defects. *Implant Dent.* 1993;2:151-6.

81 Schultze-Mosgau S, Keweloh M, Wiltfang J, Kessler P, Neukam FW. Histomorphometric and densitometric changes in bone volume and structure after avascular bone grafting in the extremely atrophic maxilla. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2001;39:439-47.

82 Shanaman R, Filstein MR, Danesh-Meyer MJ. Localized ridge augmentation using GBR and platelet-rich plasma: case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2001;21:345-55.

83 Shapoff CA, Alexander DC, Clark AE. Clinical use of a bioactive glass particulate in the treatment of human osseous defects. *Compend Contin Educ Dent.* 1997;18:352-4, 356, 358.

84 Southard TE, Southard KA, Krizan KE, Hillis SL, Haller JW, Keller J, Vannier MW. Mandibular bone density and fractal dimension in rabbits with induced osteoporosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000;89:244-9.

85 Stoor P, Söderling E, Salonen JI. Antibacterial effects of a bioactive glass paste on oral microorganisms. *Acta Odontol Scand.* 1998;56:161-5.

86 Suguimoto RM, Trindade IK, Carvalho RM. The use of negative pressure for the sinus lift procedure: a technical note. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2006;21:455-8.

87 Tadjoeidin ES, de Lange GL, Holzmann PJ, Kulper L, Burger EH. Histological observations on biopsies harvested following sinus floor elevation using a bioactive glass material of narrow size range. *Clin Oral Implants Res.* 2000;11:334-44.

88 Tadjedin ES, de Lange GL, Lyaruu DM, Kuiper L, Burger EH. High concentrations of bioactive glass material (BioGran) vs. autogenous bone for sinus floor elevation. *Clin Oral Implants Res.* 2002;13:428-36.

89 Thorwarth M, Srour S, Felszeghy E, Kessler P, Schultze-Mosgau S, Schlegel KA. Stability of autogenous bone grafts after sinus lift procedures: a comparative study between anterior and posterior aspects of the iliac crest and an intraoral donor site. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;100:278-84.

90 Tischler M. Platelet rich plasma. The use of autologous growth factors to enhance bone and soft tissue grafts. *N Y State Dent J.* 2002;68:22-4.

91 Tosoni GM, Lurie AG, Cowan AE, Bureson JA. Pixel intensity and fractal analyses: detecting osteoporosis in perimenopausal and postmenopausal women by using digital panoramic images. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;102:235-41.

92 Trindade IK, Mazzottini R, Silva Filho OG, Trindade IE, Deboni MC. Long-term radiographic assessment of secondary alveolar bone grafting outcomes in patients with alveolar clefts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;100:271-7.

93 Trindade-Suedam IK, Leite FRM, Morais JAND, Leite ERM, Marcantonio Jr E, Leite AA. Avoiding leukocyte contamination and early platelet activation in platelet-rich plasma. *Journal of Oral Implantology.* 2007;33 – *In Press.*

94 Tukey JW. *Exploratory data analysis.* 1^a ed. Massachusetts:Reading; 1977. v1/3.

95 Turonis JW, McPherson JC 3rd, Cuenin MF, Hokett SD, Peacock ME, Sharawy M. The effect of residual calcium in decalcified freeze-dried bone allograft in a critical-sized defect in the *Rattus norvegicus* calvarium. *J Oral Implantol.* 2006;32:55-62.

96 Turunen T, Peltola J, Yli-Urpo A, Happonen RP. Bioactive glass granules as a bone adjunctive material in maxillary sinus floor augmentation. *Clin Oral Implants Res.* 2004;15:135-41.

97 Tyndall DA, Brooks SL. Selection criteria for dental implants site imaging: a position paper of the American Academy of Oral and Maxillofacial Radiology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000;89:630-7.

98 Uchida Y, Goto M, Katsuki T, Akiyoshi T. Measurement of the maxilla and zygoma as an aid in installing zygomatic implants. *J Oral Maxillofac Surg.* 2001;59:1193-8.

99 Ulm C, Kneissel M, Schedle A, Solar P, Matejka M, Schneider B, et al. Characteristic features of trabecular bone in edentulous maxillae. *Clin Oral Implants Res.* 1999;10:459-67.

- 100 Verhoeven JW, Ruijter J, Cune MS, Terlouw M, Zoon M. Onlay grafts in combination with endosseous implants in severe mandibular atrophy: one year results of a prospective, quantitative radiological study. *Clin Oral Implants Res.* 2000;11:583-94.
- 101 Yasar F, Akgunlu F. Fractal dimension and lacunarity analysis of dental radiographs. *Dentomaxillofac Radiol.* 2005;34:261-7.
- 102 Yasar F, Akgunlu F. The differences in panoramic mandibular indices and fractal dimension between patients with and without spinal osteoporosis. *Dentomaxillofac Radiol.* 2006;35:1-9.
- 103 Yazawa M, Ogata H, Nakajima T, Watanabe N. Influence of antiplatelet substances on platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62:714-8.
- 104 Yildirim M, Spiekermann H, Handt S, Edelhoff D. Maxillary sinus augmentation with the xenograft Bio-Oss and autogenous intraoral bone for qualitative improvement of the implant site: a histologic and histomorphometric clinical study in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2001;16:23-33.
- 105 Wada K, Niimi A, Watanabe K, Sawai T, Ueda M. Maxillary sinus floor augmentation in rabbits: a comparative histologic-histomorphometric study between rhBMP-2 and autogenous bone. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2001;21:252-63.
- 106 Wagle N, Do NN, Yu J, Borke JL. Fractal analysis of the PDL-bone interface and implications for orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2005;127:655-61; quiz 754.
- 107 Watanabe K, Niimi A, Ueda M. Autogenous bone grafts in the rabbit maxillary sinus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999;88:26-32.
- 108 Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997;55:1294-9.
- 109 Wilson J, Low SB. Bioactive ceramics for periodontal treatment: comparative studies in the Patas monkey. *J Appl Biomater.* 1992;3:123-9.
- 110 Wiltfang J, Schlegel KA, Schultze-Mosgau S, Nkenke E, Zimmermann R, Kessler P. Sinus floor augmentation with beta-tricalciumphosphate (beta-TCP): does platelet-rich plasma promote its osseous integration and degradation? *Clin Oral Implants Res.* 2003;14:213-8.
- 111 Wojtowicz A, Chaberek S, Kryst L, Urbanowska E, Ciechowicz K, Ostrowski K. Fourier and fractal analysis of maxillary alveolar ridge repair using platelet rich plasma (PRP) and inorganic bovine bone. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2003;32:84-6.

112 Zamet JS, Darbar UR, Griffiths GS, Bulman JS, Bragger U, Burgin W, et al. Particulate bioglass as a grafting material in the treatment of periodontal intrabony defects. *J Clin Periodontol*. 1997;24:410-8.

113 Zimmermann R, Jakubietz R, Jakubietz M, Strasser E, Schlegel A, Wilfang J, et al. Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. *Transfusion*. 2001;41:1217-24

9 Anexos

Tabela 1 A - Caracterização da amostra

ANIMAL	GRUPO	SEXO	PESO – DATA*	PESO – DATA**
1	1	M	3,900 - 07/12/05	3,900 - 30/01/06
2	1	M	4,250 - 05/12/05	4,250 - 30/01/06
3	1	M	3,700 - 05/12/05	4,200 - 30/01/06
4	1	M	3,950 - 09/12/05	4,050 - 30/01/06
5	1	M	4,000 - 07/12/05	4,250 - 30/01/06
6	1	M	4,400 - 08/12/05	4,250 - 30/01/06
7	1	M	4,700 - 08/12/05	4,150 - 30/01/06
8	1	M	3,800 - 08/12/05	3,900 - 30/01/06
9	1	M	3,650 - 09/12/05	4,200 - 30/01/06
10	1	M	4,350 - 08/12/05	4,150 - 30/01/06
11	2	M	4,600 - 05/12/05	4,450 - 30/01/06
12	2	M	3,950 - 05/12/05	3,750 - 30/01/06
13	2	M	4,250 - 07/12/05	3,900 - 30/01/06
14	2	M	4,250 - 06/12/05	4,350 - 30/01/06
15	2	M	3,700 - 06/12/05	4,300 - 30/01/06
16	2	M	4,350 - 06/12/05	3,900 - 30/01/06
17	2	M	3,550 - 06/12/05	3,650 - 30/01/06
18	2	M	4,050 - 06/12/05	4,050 - 30/01/06
19	2	M	4,150 - 07/12/05	4,150 - 30/01/06
20	2	M	3,650 - 08/12/05	4,000 - 30/01/06

* no momento da cirurgia de levantamento de seio maxilar

** aproximadamente 2 meses após a cirurgia de levantamento de seio maxilar

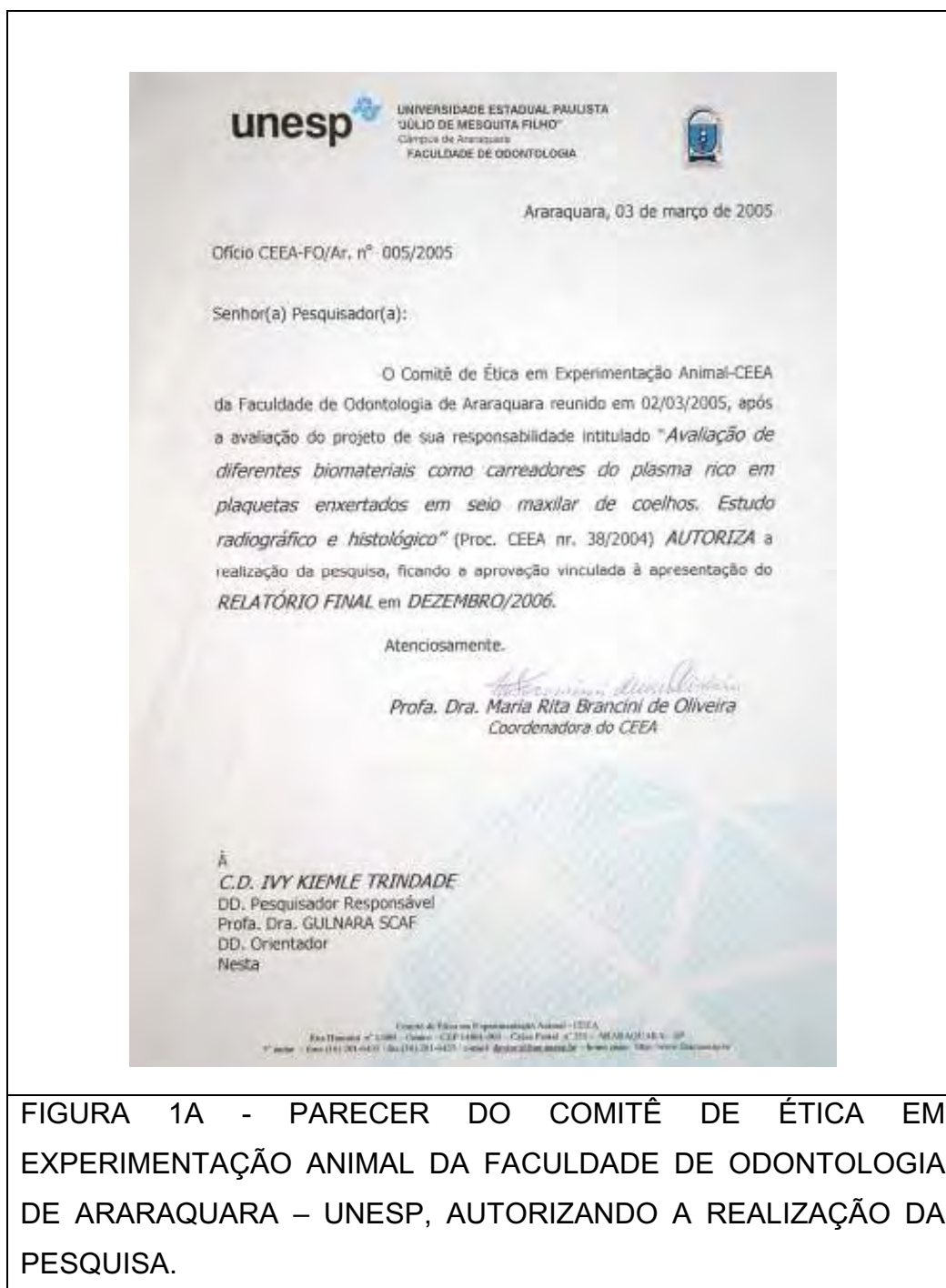


FIGURA 1A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA – UNESP, AUTORIZANDO A REALIZAÇÃO DA PESQUISA.

Tabela 2A - Doses do anestésico geral, sedativo, antibiótico e analgésico para cada animal, de acordo com o peso no dia da cirurgia

ANIMAL	GRUPO	PESO	DOSE	DOSE	DOSE	DOSE
			KETAMINA (0,35ml/kg)	XILASINA (0,25ml/kg)	PENTABIÓTICO (0,10ml/kg)	PARACETAMOL (0,10ml/kg)
1	1	3,900	1,30ml	1,0ml	0,39ml	0,39ml
2	1	4,250	1,48ml	1,0ml	0,42ml	0,42ml
3	1	3,700	1,29ml	1,0ml	0,37ml	0,37ml
4	1	3,950	1,38ml	1,0ml	0,39ml	0,39ml
5	1	4,000	1,40ml	1,0ml	0,40ml	0,40ml
6	1	4,400	1,54ml	1,1ml	0,44ml	0,44ml
7	1	4,700	1,64ml	1,2ml	0,47ml	0,47ml
8	1	3,800	1,33ml	1,0ml	0,38ml	0,38ml
9	1	3,650	1,27ml	0,9ml	0,36ml	0,36ml
10	1	4,350	1,52ml	1,0ml	0,43ml	0,43ml
11	2	4,600	1,61ml	1,2ml	0,46ml	0,46ml
12	2	3,950	1,38ml	1,0ml	0,39ml	0,39ml
13	2	4,250	1,48ml	1,0ml	0,42ml	0,42ml
14	2	4,250	1,48ml	1,0ml	0,42ml	0,42ml
15	2	3,700	1,29ml	0,9ml	0,37ml	0,37ml
16	2	4,350	1,52ml	1,1ml	0,43ml	0,43ml
17	2	3,550	1,24ml	0,9ml	0,35ml	0,35ml
18	2	4,050	1,41ml	1,0ml	0,40ml	0,40ml
19	2	4,150	1,45ml	1,0ml	0,41ml	0,41ml
20	2	3,650	1,27ml	0,9ml	0,36ml	0,36ml

Tabela 3A - Repiques do anestésico geral e do sedativo para cada animal, de acordo com o peso no dia da cirurgia

ANIMAL	GRUPO	PESO	REPIQUE	REPIQUE
			KETAMINA (1/3 da dose inicial)	XILASINA (1/3 da dose inicial)
1	1	3,900	0,7ml	0,5ml
2	1	4,250	0,7ml	0,5ml
3	1	3,700	0,6ml	0,5ml
4	1	3,950	0,7ml	0,5ml
5	1	4,000	0,7ml	0,5ml
6	1	4,400	0,8ml	0,5ml
7	1	4,700	0,8ml	0,6ml
8	1	3,800	0,6ml	0,5ml
9	1	3,650	0,6ml	0,4ml
10	1	4,350	0,7ml	0,5ml
11	2	4,600	0,8ml	0,6ml
12	2	3,950	0,7ml	0,5ml
13	2	4,250	0,7ml	0,5ml
14	2	4,250	0,7ml	0,5ml
15	2	3,700	0,6ml	0,5ml
16	2	4,350	0,8ml	0,5ml
17	2	3,550	0,6ml	0,4ml
18	2	4,050	0,7ml	0,5ml
19	2	4,150	0,7ml	0,5ml
20	2	3,650	0,6ml	0,4ml

Anexo 5: Artigo aceito para publicação no periódico internacional
Journal of Oral Implantology

RESEARCH ARTICLE

AVOIDING LEUKOCYTE CONTAMINATION AND EARLY PLATELET ACTIVATION IN PLATELET-RICH PLASMA

I. K. Trindade-Suedam, DDS, MS; F. R. M. Leite, DDS, MS; J. A. N. D. Morais, DDS, MS; E. R. M. Leite, MS; E. Marcantonio, Jr, DDS, MS, PhD; A. A. Leite, MS, PhD

? The objective of this study was to describe a new platelet-rich plasma (PRP) protocol with a reduced concentration of leukocytes and intact platelets. We collected 8 mL of venous blood (VB) from marginal ear veins of 10 male New Zealand white rabbits in acid dextrose citrate Vacutainer tubes. Tubes were centrifuged at 302g for 10 minutes. All plasma was collected in plastic tubes to avoid buffy-coat contamination and centrifuged at 286g for 5 minutes. A 10% calcium chloride activator (10 PRP:2 CaCl₂) was added to the lower third of this plasma (PRP), and the PRP gel was obtained. Mean platelet count was $317.7 \times 10^3 \pm 39.9/\mu\text{L}$ in VB and $1344.9 \times 10^3 \pm 347.5/\mu\text{L}$ in PRP. Leukocyte counts were $3.96 \times 10^3 \pm 2.01/\mu\text{L}$ and $0.46 \times 10^3 \pm 0.45/\mu\text{L}$ in VB and PRP, respectively. Mean platelet enrichment was $327.4 \pm 97.8\%$. All differences were statistically significant ($P > .05$). This protocol is practical and reproducible, resulting in a high concentration of intact platelets to help tissue repair and low levels of leukocytes.

Key Words: Platelet-rich plasma; Leukocyte; Protocol

INTRODUCTION

Platelets are cells originating from megakaryocytes in the bone marrow; together with erythrocytes and leukocytes they form the blood tissue. Some important platelet functions are hemostasis induction by clot formation and growth factor availability, which helps the healing process.^{1,2}

Platelet-rich plasma (PRP), first introduced to the

oral surgery community by Whitman et al,³ is a cell concentrate obtained by an autologous blood centrifugation process and has been widely used in medicine and dentistry since then. PRP use is based on the premise that it contains a larger number of platelets than whole blood, thereby releasing a significantly higher amount of growth factors at the surgical site compared with clotting. These growth factors contribute to increased vascularity and bone maturation.⁴⁻⁶

Platelet-derived growth factor, transforming growth factor, vascular endothelial growth factor, platelet-derived endothelial cell growth factor, basic fibroblast growth factor, and platelet activating factor are present at platelet alpha-granule; they regulate mitosis, cellular differentiation, metabolism, collagen production, and vascular in-growth,^{7,8} enhancing bone formation qualitatively.³

As cited in the literature, the main clinical benefits of using PRP are faster radiographic maturation and a histomorphometrically denser bone,¹ earlier implant placement, earlier function, and greater predictability.⁹

I. K. Trindade-Suedam, DDS, MS, F. R. M. Leite, DDS, MS, and J. A. N. D. Morais, DDS, MS, are with the Department of Diagnostic and Surgery, Division of Periodontics, School of Dentistry at Araraquara, São Paulo State University-UNESP. Address correspondence to Dr Ivy Kiemle Trindade-Suedam at Rua Dr. Antônio Prudente 4-141, Jardim Estoril II, Bauru - SP, Brazil, CEP 17016-010 (e-mail: ivytrin@uol.com.br).

E. R. M. Leite, MS, is with the Immunohematology Division, Araraquara Blood Bank, São Paulo State University-UNESP.

E. Marcantonio, Jr, DDS, MS, PhD, is an assistant professor, Department of Diagnostic and Surgery, Division of Periodontics, School of Dentistry at Araraquara, São Paulo State University-UNESP.

A. A. Leite, MS, PhD, is an assistant professor, Department of Clinical Analysis, School of Pharmacy at Araraquara - UNESP.

According to some studies considered to be references in PRP obtention in rabbits, there are several protocols and methodologies for preparing PRP. These studies describe different centrifugation speeds, different sites for blood collection, different volumes of blood required, different proportions of plasma considered to be PRP, and different substances for gelling PRP.¹⁰⁻¹²

73 Aghaloo et al¹⁰ collected 10 mL of autologous venous blood (VB) from New Zealand white rabbits in a Vacutainer tube containing 1.1 mL of acid dextrose citrate (ACD) anticoagulant. Samples were centrifuged twice, first at 215g for 10 minutes and then, after plasma separation, at 863g for 10 minutes. The top half was discarded (platelet-poor plasma = 10 000 to 50 000 platelets/mm³), and the lower half resulted in PRP (625 000 to 1 495 000 platelets/mm³). Then, 5000 units of topical bovine thrombin was reconstituted with 5 mL of 10% calcium chloride (CaCl₂) and added to PRP. The ratio of PRP to CaCl₂ activator was 10:1.

Efeoglu et al¹¹ described 2 protocols. In the first protocol, 9 mL of VB was collected in ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) tubes. The whole blood was centrifuged at 300g for 10 minutes, and the pink plasma (plasma with a few erythrocytes) was centrifuged again at 5000g for 5 minutes. Only the lower half of the plasma was called PRP ($1000 \times 10^3/\mu\text{L}$). In the second protocol, after pink plasma centrifugation, the upper two thirds of the plasma was discarded and only the lower third was considered PRP ($3134 \times 10^3/\mu\text{L}$).

Butterfield et al¹² prepared PRP by acquiring 21 mL of rabbit blood and using different centrifugation speeds. For the initial spin, the authors centrifuged the whole blood at 150g for 20 minutes; for the second spin, the plasma was centrifuged at 400g for 10 minutes. Afterward, bovine topical thrombin and 10% CaCl₂ was mixed with PRP. The average PRP platelet count was $2.061 \times 10^5/\text{mm}^3$.

Considering the many differences among the methodologies used to prepare PRP, including platelet counts, gelling substances used, and especially the lack of care regarding leukocyte contamination, this study describes a new protocol for PRP isolation. This protocol takes into consideration the amount of leukocytes in PRP, which chemotactically attracts inflammatory cells to the surgical site, and platelet integrity maintenance until PRP placement at the surgical site once the early platelet activation decreases growth factor kinetics.

MATERIAL AND METHODS

This study was approved by the Ethics Review Committee for Animal Research at the São Paulo

State University of Araraquara. The study was divided into 2 steps. In the pilot phase, a total of 12 tubes containing VB collected from 6 New Zealand white male rabbits weighing approximately 4 kg were submitted to different protocols in order to establish a new one. In the second step, 10 tubes from 10 New Zealand white male rabbits with the same weight had 8 mL of VB collected and the new protocol was tested. Animals were not anesthetized, although they were manually restrained while the sample was drawn.

As seen in Table 1, different protocols were tested using different anticoagulants, centrifugation speeds, and CaCl₂ solution volumes. A methodology was standardized (Table 2), and in this study, 8 mL of VB was drawn from the marginal ear vein of each rabbit with a scalpel and a 10-mL syringe. Immediately, to prevent clot formation, VB was combined inside Vacutainer tubes containing 1 mL of acid ACD anticoagulant.

The PRP was prepared via a 2-step protocol. First, VB was centrifuged (centrifuga Hermle Z380) at 300g for 10 minutes. The plasma, separated from the red blood cells (RBCs) and most of the white blood cells (WBCs), was set apart in a sterile plastic tube and centrifuged again at 2860g for 5 minutes. The upper two thirds of the preparation was designated PPP, and the lower third was designated PRP, as described by Efeoglu et al.¹¹ The platelet pellet that adhered to tube walls in PRP was resuspended before its clinical use. Blood cell counts for each sample were determined electronically (Coulter T-890, Coulter Electronics, Illinois) before and after centrifugation to confirm the obtention of a platelet concentrate with a low leukocyte value.

After this step, 10% CaCl₂ was added to it in a ratio of 10 PRP to 2 CaCl₂ vol/vol for gelling PRP. Bovine topical thrombin was not used to avoid contamination and infection by a xenogenous material.¹³ Platelet enrichment percentage as well as WBC, RBC, and platelet counts were determined before and after centrifugation, in the pilot study, and after the new protocol was established, just as proposed by Marx et al.¹

RESULTS

The volume of PRP obtained was approximately 2 mL including the volume of CaCl₂ used (approximately 0.35 mL). The time spent was 2 minutes for PRP gelling and 30 minutes for PRP preparation.

In the pilot study, the average platelet counts in VB, in PPP, and in PRP of each tube were $402.4 \times 10^3 \pm 121$, $26.2 \times 10^3 \pm 44.5$ and $740.8 \times 10^3 \pm 472.8$

TABLE 1
Protocols tested, platelet counts in venous blood, platelet-poor plasma, platelet-rich plasma and enrichment percentage in the pilot study*

Tube	Protocols			Platelet counts ($\times 10^3/\mu\text{L}$)						
	Blood Volume	Anticoagulant	1st spin	2nd spin	CaCl ₂ /PRP	PRP	VB	PPP	PRP	EP
1	4 mL	0.25 mL sodium citrate	-	-	-	-	-	-	-	-
2	4 mL	0.25 mL sodium citrate	-	-	-	-	-	-	-	-
3	4 mL	0.25 mL sodium citrate	-	-	-	-	-	-	-	-
4	4 mL	0.5 mL sodium citrate	128g 10 min	410g 10 min	1/10	Lower half	383	68	377	1.5
5	4 mL	0.5 mL sodium citrate	160g 10 min	2500g 5 min	1/10	Lower third	435	4	921	111
6	4 mL	0.5 mL sodium citrate	160g 10 min	2500g 5 min	1/10	Lower half	616	13	135	-78
7	4 mL	0.5 mL sodium citrate	160g 10 min	2500g 5 min	1/10	Lower third	461	5	1520	279
8	4 mL	1.0 mL CPD-A	160g 10 min	2500g 5 min	4/10	Lower third	884	131	995	159
9	4 mL	0.5 mL ACD	160g 10 min	2500g 5 min	2/10	Lower third	268	6	766	183
10	4 mL	0.8 mL ACD	160g 10 min	2500g 5 min	3/10	Lower third	256	2	713	178
11	4 mL	0.5 mL ACD	160g 10 min	2500g 5 min	2/10	Lower third	557	7	94	83
12	4 mL	0.5 mL ACD	302g 10 min	2862g 5 min	2/10	Lower third	322	-	1447	266
Mean \pm SD							402.4 \pm 121	26.2 \pm 44.5	740.8 \pm 472.8	111.7 \pm 135.7

*VB indicates venous blood; PPP, platelet-poor plasma; PRP, platelet-rich plasma; EP, enrichment percentage; CaCl₂, calcium chloride; ACD, add dextrose citrate; CPD-A, citrate phosphate dextrose-adenine.

platelets/ μL . The average enrichment percentage of platelet count in PRP related to VB in the pilot study was 111.7 ± 135.7 . The counts for figured elements, platelet enrichment percentage of each tube in the pilot study, and mean counts are shown in Table 1.

Table 3 shows WBC, RBC, and platelet counts in VB and in PRP for each animal after the new protocol was established. The average counts of each type of cell in VB were $3.96 \times 10^3 \pm 2.00$; $5.64 \times 10^6 \pm 0.44$, and $317.7 \times 10^3 \pm 39.90/\mu\text{L}$, respectively. The average counts for each type of cell in PRP were $0.46 \times 10^3 \pm 0.45$; $0.02 \times 10^6 \pm 0.01$ and $1344.9 \times 10^3 \pm 347.50/\mu\text{L}$, respectively. The average enrichment percentage of platelets in PRP in relation to VB in the new protocol was $327.4\% \pm 97.8$. Table 3 also illustrates the platelet enrichment percentage for each rabbit in the new protocol.

Differences between groups were analyzed using the Student *t* test for a level of significance of 5%.

Discussion

Nowadays, the use of PRP in combination with autogenous or artificial bone grafts presents an alternative treatment in oral and maxillofacial surgery.

Some PRP benefits include the absence of concerns regarding antigenicity or infectious diseases and the presence of large amounts of growth factors that promote the proliferation and differentiation of mesenchymal cells into osteoblasts, enhancing wound healing and bone formation.

Although many studies applying PRP have been extensively developed and the results deeply investigated,^{1,2,4,7,14-26} many aspects are still uncertain. Some of these aspects include side effects,²⁷ quantification

TABLE 2
Platelet-rich plasma protocol in rabbits*

Step	Procedure
1	Collect 8 mL of VB in glass tube containing 1 mL of ACD
2	Gently mix the blood
3	1st centrifugation: 302g for 10 minutes
4	Collect plasma, avoiding red and white cells
5	Place plasma into a plastic tube
6	2nd centrifugation: 2862g for 5 minutes
7	PRP = lower third (discard top two thirds)
8	Count PRP cells
9	Add CaCl ₂ to PRP (ratio 2:10)
10	Wait 2 minutes for PRP gel

*PRP indicates platelet-rich plasma; ACD, adenine citrate dextrose; VB, venous blood; CaCl₂, calcium chloride.

TABLE 3.
Elements in venous blood and platelet-rich plasma and enrichment percentage of platelets in the new protocol

Animal	White cells ($\times 10^3/\mu\text{L}$)		Red cells ($\times 10^3/\mu\text{L}$)		Platelets ($\times 10^3/\mu\text{L}$)		EP (%)
	VB	PRP	VB	PRP	VB	PRP	
1	6.6	0.7	5.38	0.02	286	1166	342
2	3.6	0.3	5.08	0.03	291	1629	459
3	4.0	0.3	6.66	0.01	357	988	176
4	7.5	-	5.69	0.02	349	1426	308
5	3.5	1.3	5.87	0.02	255	1031	304
6	-	-	5.90	0.05	299	1602	435
7	3.8	0.6	5.78	0.02	288	909	215
8	3.7	1.1	5.36	0.04	365	1297	255
9	3.0	0.2	5.34	0.01	317	1361	329
10	3.9	0.1	5.35	0.01	370	2040	451
Mean \pm SD	3.96 \pm 2	0.46 \pm 0.45	5.64 \pm 0.44	0.02 \pm 0.01	317.7 \pm 39.9	1344.9 \pm 347.5	327.4 \pm 97.8

76 VB indicates venous blood; PRP, platelet-rich plasma; EP, enrichment percentage.

of the ideal amount of platelets and growth factors to be used at the surgical site, the best protocol for obtaining PRP, and especially the fact that few controlled studies support the real benefits of PRP.

The presence of deleterious habits, systemic diseases, and standardization of gender and body weight that could interfere with the results, and the difficulty in obtaining frequent radiographs or biopsies, make studies in animals an important alternative for in vivo controlled studies.

Butterfield et al¹² stated that rabbits are an appropriate model for PRP investigations because they have equal amounts of coagulation factors compared with humans and offer a sufficient volume of blood for preparing PRP. According to Efeoglu et al,¹¹ the quantity of blood that can be collected from an adult rabbit is 15 mL. In our pilot study, it was determined that 8 mL of blood would be a sufficient volume to obtain PRP (2 mL) without the need for transfusion or saline infusion.

Anesthesia during blood collection was not used to avoid peripheral vasoconstriction caused by the anesthetic, a fact that could complicate the procedure. Moreover, Vacutainer tubes were not directly used because the negative pressure closes the ear vein. After the blood was collected with the help of a syringe and placed inside the tube, it was gently manipulated allowing the blood to mix entirely with the anticoagulant, preserving platelet integrity and avoiding clot formation.

Considering the fact that anticoagulants based on citrate are considered to be the choice for PRP preparation in human surgeries,^{1,2,5,11,28} the ACD anticoagulant was used in this study instead of EDTA, as Efeoglu et al¹¹ recommended in their experiment. According to Landesberg et al,³ citrate is better for

preserving platelet membrane integrity than EDTA. This way, platelet growth factors are only released at the surgical site and not during PRP preparation.

In the present study, no bovine thrombin was used to avoid the risk of contamination and infection by a xenogenous material, as suggested by Christgau et al,¹³ even though Marx²⁹ has stated that bovine topical thrombin is a safe initiator of clotting with no risk of infection or inflammation enhancement. Actually, bovine thrombin was not necessary in this new protocol because PRP gelling occurred within 2 minutes.

Concerning the methods for preparing PRP, different centers have different protocols. Most of the variations are found in the volume of blood collected, the number and speed of centrifugation, and the type of anticoagulant used. The data obtained by Aghaloo et al¹⁰ and Efeoglu et al¹¹ were used as the starting point to establish this new protocol. As seen in Table 1, some tests were made and, according to the difficulties found, modifications were implemented.

In the pilot study, upon visual inspection the first 3 tubes revealed small amounts of clot. Probably the volume of sodium citrate was not sufficient to avoid blood coagulation. Because of this, the volume of citrate was doubled (0.5 mL) in tube 4, and no clot formation was observed. A slow rotation protocol was also designed for tube 4. The first rotation used was 120g for 10 minutes and then a new plasma centrifugation was performed at 410g for 10 minutes. However, platelets were not separated from erythrocytes and leukocytes as observed at the PRP negative enrichment percentage.

Rotation speed was increased to 160g for 10 minutes and then to 2500g for 5 minutes. These

modifications showed better results for the enrichment percentage, except in tubes 6 and 11, which also had negative results.

The citrate phosphate dextrose-adenine (CPD-A), an anticoagulant based on citrate as well as ACD, is commonly used in blood banks for platelet conservation. However, it is not commercially available in Vacutainer tubes. Moreover, ACD is part of CPD-A and had already been used by Aghaloo et al.¹⁰ For this reason, ACD was present in tubes 9, 10, 11, and 12 and showed good results in all except sample 11.

According to data from Efeoglu et al.,¹¹ in this study the lower third of the total volume of plasma after the second centrifugation was named PRP. Also, CaCl_2 was used at 2:10 proportion with gelling around 2 minutes. No differences were found from tube 10, which contained 0.8 mL of ACD in relation to tubes 9, 11, and 12, which had only 0.5 mL of anticoagulant. The low amount of anticoagulant was chosen as pattern.

The difficulty in releasing the platelet pellet from the tube wall after the second centrifugation was considered. It was easier to release the pellet using the plastic tube than the glass tube, especially when the second speed of centrifugation had to be increased to more than 600g. This may be attributable to the fact that the glass can damage the platelets causing their aggregation and activation.

Because platelet counts in the pilot study were still beyond the counts cited in the literature, it was decided to increase the first and the second spins to achieve better results, as seen in Table 1.

According to Efeoglu et al.,¹¹ platelet counts in VB of New Zealand white rabbits varied from $250 \times 10^3/\mu\text{L}$. Our results were within normal limits, with mean counts of 317.7×10^3 platelets/ $\mu\text{L} \pm 39.9$. The number of platelets in PRP in this study was $1344.9 \times 10^3/\mu\text{L} \pm 347.5$ while platelet counts in other studies were approximately $3134 \times 10^3/\mu\text{L}$,¹¹ $1050 \times 10^3/\text{mm}^3$,¹⁰ and $2061 \times 10^3/\mu\text{L}$.¹² Platelet enrichment percentage in our study was $327.4\% \pm 97.8$. In Efeoglu et al.¹¹ it was approximately 429%.

Marx,²⁹ discussing the ideal concentration of platelets to enhance bone and soft tissue regeneration, indicated that a sufficient cellular response to platelet concentrations first begins when a 4-fold to 5-fold increase over baseline platelet numbers is achieved. In this study we were able to achieve a 4-fold to 5-fold increase in 7 rabbits. In rabbits 3, 7, and 8 the increase was around 3 times.

A study investigating the real benefits of the association of PRP and autogenous bone in *in vivo* surgeries is being developed and is the aim of future research.

CONCLUSION

This protocol is a practical and low-cost method to obtain a gel with high amount of platelets and few leukocytes, ready to be used in surgical sites.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to acknowledge Professor Gulnara Scaf for her permanent support. We are also thankful to Dr Rafael Silveira Faeda for his help during the experiment.

REFERENCES

1. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85:638-646.
2. Lozada JL, Caplanis N, Proussaefs P, Willardsen J, Kammeyer G. Platelet-rich plasma application in sinus graft surgery: part I—background and processing techniques. *J Oral Implantol.* 2001;27:38-42.
3. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997;55:1294-1299.
4. Kassolis JD, Rosen PS, Reynolds MA. Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: case series. *J Periodontol.* 2000;71:1654-1661.
5. Landesberg R, Roy M, Glickman RS. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000;58:297-300.
6. Choi BH, Im CJ, Huh JY, Suh JJ, Lee SH. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004;33:56-59.
7. Anitua E. The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in oral surgery. *Pract Proced Aesthet Dent.* 2001;13:487-493.
8. Freymiller EG, Aghaloo TL. Platelet-rich plasma: ready or not? *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62:484-488.
9. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.* 2001;10:225-228.
10. Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: a pilot study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002;60:1176-1181.
11. Efeoglu C, Akçay YD, Ertürk S. Modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62:1403-1407.
12. Butterfield KJ, Bennett J, Gronowicz G, Adams D. Effect of platelet-rich plasma with autogenous bone graft for maxillary sinus augmentation in a rabbit model. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63:370-376.
13. Christgau M, Moder D, Wagner J, et al. Influence of autologous platelet concentrate on healing in intrabony defects following guided tissue regeneration therapy: a randomized prospective clinical split-mouth study. *J Clin Periodontol.* 2006;33:908-921.
14. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999;14:529-535.

LEUKOCYTE CONTAMINATION AND PLATELET ACTIVATION IN PLATELET-RICH PLASMA

15. Carlson NE, Roach RB Jr. Platelet-rich plasma: clinical applications in dentistry. *J Am Dent Assoc.* 2002;133:1383-1386.
16. Froum SJ, Wallace SS, Tarnow DP, Cho SC. Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts: three bilateral case reports. *Int J Periodont Restorative Dent.* 2002;22:45-53.
17. Furst G, Gruber R, Tangl S, et al. Sinus grafting with autogenous platelet-rich plasma and bovine hydroxyapatite. A histomorphometric study in minipigs. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14:500-508.
18. Maiorana C, Sommariva L, Brivio P, Sigurta D, Santoro F. Maxillary sinus augmentation with anorganic bovine bone (Bio-Oss) and autologous platelet-rich plasma: preliminary clinical and histologic evaluations. *Int J Periodont Restorative Dent.* 2003;23:227-235.
19. Petrunger PS. Using platelet-rich plasma to accelerate soft tissue maturation in esthetic periodontal surgery. *Compend Contin Educ Dent.* 2001;22:729-732.
20. Philippart P, Brasseur M, Hoyaux D, Pochet R. Human recombinant tissue factor, platelet-rich plasma, and tetracycline induce a high-quality human bone graft: a 5-year survey. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003;18:411-416.
21. Robiony M, Polini F, Costa F, Politi M. Osteogenesis distraction and platelet-rich plasma for bone restoration of the severely atrophic mandible: preliminary results. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002;60:630-635.
22. Rosenberg ES, Torosian J. Sinus grafting using platelet-rich plasma—initial case presentation. *Pract Periodont Aesthet Dent.* 2000;12:843-850.
23. Sanchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003;18:93-103.
24. Shanaman R, Filstein MR, Danesh-Meyer MJ. Localized ridge augmentation using GBR and platelet-rich plasma: case reports. *Int J Periodont Restorative Dent.* 2001;21:345-355.
25. Tischler M. Platelet rich plasma. The use of autologous growth factors to enhance bone and soft tissue grafts. *N Y State Dent J.* 2002;68(3):22-24.
26. Wiltfang J, Schlegel KA, Schultze-Mosgau S, Nkenke E, Zimmermann R, Kessler P. Sinus floor augmentation with beta-tricalciumphosphate (beta-TCP): does platelet-rich plasma promote its osseous integration and degradation? *Clin Oral Implants Res.* 2003;14:213-218.
27. Border WA, Ruoslahti E. Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. *J Clin Invest.* 1992;90:1-7.
28. Zimmermann R, Jakubietz R, Jakubietz M, et al. Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. *Transfusion.* 2001;41:1217-1224.
29. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62:489-496.

Anexo 6 -Modelos de regressão linear múltiplo Histometria vs Densidade e Presença de PRP

Tratamentos	Fatores	Coefficiente	Erro-padrão	t	p	R²
OA e OA+PRP	Intercepto	60,66	11,62	5,22	0,0000	0,23
	Densidade	1,47	6,32	0,23	0,819	
	Presença de PRP	-7,78	3,79	-2,05	0,056	
VB e VB+PRP	Intercepto	72,18	14,20	5,08	0,0000	0,12
	Densidade	-9,58	6,79	-1,41	0,177	
	Presença de PRP	-6,78	5,91	-1,15	0,268	

*OA: osso autógeno

VB: vidro bioativo

PRP: plasma rico em plaquetas

RI: região de interesse

RC: região controle

Anexo 7 - Modelos de regressão linear múltiplo Histometria vs Dimensão fractal e Presença de PRP

Tratamentos	Fatores	Coefficiente	Erro-padrão	t	p	R²
OA e OA+PRP	Intercepto	45,21	72,41	0,62	0,54	0,21
	Dimensão fractal	12,01	48,85	0,25	0,809	
	Presença de PRP	-7,30	4,22	-1,73	0,103	
VB e VB+PRP	Intercepto	-0,34	45,25	-0,01	0,994	0,08
	Dimensão fractal	38,43	33,35	1,15	0,267	
	Presença de PRP	-3,99	5,68	-0,70	0,493	

*OA: osso autógeno

VB: vidro bioativo

PRP: plasma rico em plaquetas

RI: região de interesse

RC: região controle

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 10 de outubro de 2007.

IVY KIEMLE TRINDADE-SUEDAM