

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**EXPRESSÃO DOS FATORES DE CRESCIMENTO
OBTIDOS DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS, NO
TRATAMENTO DE FRATURAS EXPERIMENTAIS DO
RADIO DE CÃES**

Talita Floering Brêda Souza
Médica Veterinária

Araçatuba – SP
2010

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**EXPRESSÃO DOS FATORES DE CRESCIMENTO
OBTIDOS DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS, NO
TRATAMENTO DE FRATURAS EXPERIMENTAIS DO
RADIO DE CÃES**

Talita Floering Brêda Souza

Orientador: Prof. Ass. Dr. Alexandre Lima de Andrade

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

ARAÇATUBA – SP
2010

Catalogação na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S729e Souza, Talita Floering Brêda.
Expressão dos fatores de crescimento obtidos do plasma rico em plaquetas no tratamento de fraturas experimentais do radio de cães / Talita Floering Brêda Souza. – Araçatuba : [s.n.], 2010
73 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, 2010
Orientador: Prof. Dr. Alexandre Lima de Andrade

1. Fator transformador de crescimento beta 2. Plasma rico em plaquetas 3. Imunoistoquímica 4. Osso e osso 5. Cães

CDD 636.0896

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

TALITA FLOERING BRÊDA SOUZA – nascida em Maceió em 20 de março de 1982 iniciou e concluiu o Curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural de Pernambuco (2000 – 2005), como primeira aluna da turma. Durante o período acadêmico desenvolveu atividades relacionadas à pesquisa como estágios extracurriculares e curriculares, monitoria e participação em projetos de pesquisa, sendo integrante do Programa Institucional de Bolsas concedido pela Capes/Pibic CNPq a alunos pesquisadores, tendo durante todo o período acadêmico desenvolvido trabalhos científicos e participado de projetos científicos relacionados à área acadêmica. Realizou Residência na área de Clínica Cirúrgica do Hospital Veterinário da Faculdade de Odontologia Curso de Medicina Veterinária na Unesp-Araçatuba de 2006 a 2008. Iniciou o Curso de Mestrado pela Universidade Estadual Paulista no ano de 2008 no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal – Unesp, Câmpus Araçatuba, área de concentração Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, tendo sido classificada como primeira aluna na seleção. Foi bolsista da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Durante o período de pós-graduação a aluna continuou a desenvolver projetos junto ao orientador, que resultaram em trabalhos científicos, além de participar como co-autora de projetos de outros discentes. Realizou estágio de docência, como parte de iniciação à docência tendo colaborado nas aulas práticas e teóricas da disciplina de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais. Integralizou os créditos em 2009, tendo desenvolvido seu projeto de pesquisa durante o ano de 2008 e 2009, o qual resultou na presente dissertação.

EPÍGRAFE

“Os cães vivem menos que as pessoas, pois já nascem sabendo o que a maioria dos homens leva mais de uma vida para aprender:
AMAR INCONDICIONALMENTE!”
(Autor desconhecido)

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação...

...as pessoas que mais amo: meus pais, José Domingos e Sônia, minha irmã Lívia e meu amor Gabriel, com todo amor, respeito e gratidão, pelo apoio incondicional na trajetória da realização deste trabalho, pelo amor, carinho que sempre tiveram por mim e por tudo que representam em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Papai do Céu pela vida e privilégio de ter me tornado uma Médica Veterinária e pela sua companhia e apoio neste trabalho.

À minha família em especial à painho (Domingos), mainha (Sônia) e minha irmã (Livia) por agüentar a saudade, e mesmo de longe me darem todo apoio e conforto necessários durante 30 horas por dia; pelo amor incondicional que me deu força todo esse tempo.

Ao meu amor (Gabriel) pelo amor, companheirismo, paciência e colaboração 30 horas por dia tanto no ambiente de trabalho como nos meus estresses em casa.

Ao meu orientador Prof. Ass. Dr. Alexandre Lima de Andrade pela orientação e oportunidade de fazer o que gosto, mesmo fugindo de sua linha de pesquisa e sobretudo pela paciência durante esta trajetória.

Às professoras Maria Cecília Rui Luzivotto e Suely Regina Mogami Bomfim pelos ensinamentos, conselhos e paciência na realização da parte experimental da histologia/imunoistoquímica e patologia clínica respectivamente. Vocês foram fundamentais e muito importantes para mim e para este trabalho.

A minha excelente equipe Gabriel Ferreira, Silmara Sakamoto, Verônica Albuquerque, Maria Carolina Vivan (e Malu) e Karina Hirata, por terem sido um verdadeiro grupo participando integralmente de todas as etapas deste trabalho, desde cuidar do canil a idéias na metodologia.

A todos os professores do Hospital Veterinário, em especial as professoras Flávia Eugênio e Gisela Laranjeira pelos ensinamentos, conselhos, orientações, oportunidade de participação na rotina hospitalar e na colaboração em aulas, e sobretudo pelo apoio e incentivo nesta fase difícil.

Ao professor Mário Jefferson Q. Louzada e Bruna Biffe pelo auxílio na realização da densitometria óssea, e a professora Luciana pela utilização da radiologia.

Aos meus filhos Preta, Nutella (minha anjinha em memória) Trakinas, Amarula, Opereta, Caramelo, Trufa, Cocada, Nara, Toddy, Avelã, Rosquinha, Laka, Charge, Garoto, Torrone, Paçoca, Pipoca, Neguinho, Goiabinha, Galak, Jujuba e Amandita; pelo carinho e pela possibilidade de realização deste projeto e aos seus novos donos que lhes deram um lar e a chance de serem felizes. Aos anjinhos Chokito Crunch, Amandita, Prestígio, Bono e Lola em memória.

A Professora Valeria Oliva por ceder o espaço e os equipamentos do laboratório experimental para realização dos procedimentos cirúrgico-anestésicos.

Aos professores Marcelo Vasconcelos e Caris Nunes por cederem seus laboratórios para preparação do PRP.

A todos os residentes e pós-graduandos: Joana, Tatianna, Camila Matias, Camila Vieira, Juliana Pelloi, Juliana Tersalia, Caio, Fernando, Acácio, Everton, Maíra, Tatiana Barbosa, Monale, Vanessa, Anaisa, Breno e Simone pela boa vontade de nunca negarem ajuda quando precisei.

À todos os funcionários do Hospital Veterinário que direta ou indiretamente ajudaram-me no decorrer deste projeto; em especial Beatriz, Paula, Valéria, Magna, Lucila, Sônia, Marilda. Além da Izabel (Biblioteca) e Diogo e Valéria (Pós-graduação).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo pela bolsa de mestrado concedida.

Aos Meus Pais e à FUNDUESP pelo financiamento do projeto de pesquisa.

À Universidade Estadual Paulista, pela oportunidade de realização do mestrado.

A todos que por algum motivo deixaram de ser citados mas que também contribuíram neste trabalho.

SUMÁRIO

Assunto	Página
I - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	15
II - REVISÃO DE LITERATURA.....	18
II.I Tecido ósseo	18
II.II Cicatrização óssea.....	19
II.III Uniões tardias, não uniões ósseas e más uniões.....	21
II.IV Fixação esquelética externa.....	22
II.V Fatores de crescimento ósseo.....	23
II.V.I Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)	23
II.V.II Fator de crescimento transformador beta (TGF- β)	24
II.VI Plasma rico em plaquetas (PRP).....	25
II.VII Diagnóstico por imagem como método de acompanhamento da cicatrização óssea.....	28
II.VIII Histologia e imunoistoquímica como métodos de acompanhamento da cicatrização óssea.....	28
III – MATERIAL E MÉTODO.....	31
III.I Animais.....	31
III.II Grupos experimentais	32
III.III Procedimentos anestésicos.....	33
III.IV Preparo do PRP em laboratório	34
III.V Procedimentos cirúrgicos	35
III.VI Avaliação clínica	39
III.VII Avaliação radiográfica e densitométrica	40
III.VIII Avaliação histológica	41
III.IX Avaliação imunoistoquímica dos fatores de crescimento.....	42
III.X Avaliação estatística	43
IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
V – CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS.....	62
APÊNDICES	71

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Representação esquemática da distribuição dos animais entre os grupos experimentais..... **33**
- FIGURA 2** - Imagem ilustrativa do preparo do PRP em laboratório até sua utilização no centro cirúrgico. **(a)**. Sedimentação obtida após a primeira centrifugação. **(b)**. Separação do plasma sobrenadante juntamente com a capa leucocitária e dois milímetros de hemácias para segunda centrifugação. **(c)**. Sedimentação após a segunda centrifugação, com visualização do PRP ao fundo do tubo. **(d)**. Retirada do PRP do tubo tipo “eppendorf” após sua gelificação **(e)**. PRP pronto para uso no trans-operatório. Legenda: PRP= Plasma Rico em Plaquetas.....**35**
- FIGURA 3-** Procedimento cirúrgico de osteotomia do radio direito de cão pelo acesso medial. Em **(a)**. osteotomia com disco diamantado após passagem dos dois primeiros pinos transfixados. Em **(b)**. lacuna óssea de 2,0mm no terço médio da diáfise. Em **(c)**. G-PRP com lacuna óssea preenchida. Legenda: PRP=Plasma Rico em Plaquetas.....**37**
- FIGURA 4-** Imagens fotográficas da biópsia no foco de fratura pelo acesso cranial. Em **(a)**. Aparência do foco de fratura aos sete dias de pós-operatório. Em **(b)**. Aparência do foco de fratura aos 60 dias de pós-operatório. Em **(c)**. Utilização da tréfina para obtenção do fragmento de biopsia. Em **(d)**. Retirada do fragmento aos sete dias. Em **(e)**. Retirada do fragmento aos 60 dias. Em **(f)**. Aparência do foco de fratura após colheita do fragmento.**39**
- FIGURA 5** - Imagem radiográfica do radio de cão no pós-operatório imediato, ilustrando a colocação da escada de alumínio (abaixo) paralela ao osso, para realização da densitometria óssea.....**41**
- FIGURA 6** - Imagens radiográficas da evolução de um animal do G-Controle (acima na figura) e de um do G-PRP (abaixo na figura) desde o pós-operatório imediato até os 60 dias de pós-operatório. Observa-se uma contínua redução da linha de fratura apenas no G-PRP.....**48**
- FIGURA 7** - Imagens radiográficas de 60 dias de pós-operatório sendo: (a). animal do G-PRP com união clínica e (b). animal do G-Controle com visível linha de fratura, proliferação periosteal, sem união de calo em ponte..... **50**
- FIGURA 8** - Fotomicrografia. Corte histológico do foco de fratura do radio de cão aos 60 dias de pós-operatório. Em **(a)**. e **(b)**. G-PRP com maior formação e organização do tecido ósseo, comparado a **(c)**. e **(d)**. G-Controle, evidenciando tecido cartilaginoso em reabsorção e início de formação óssea. Coloração hematoxilina-eosina, **a. e c.** (10X). Legenda: PRP=Plasma Rico em Plaquetas.....**51**
- FIGURA 9** - Fotomicrografia. Corte histológico do foco de fratura do radio de cão aos sete dias de pós-operatório. **(a)**. G-PRP com maior proliferação celular

e vascular, comparado a **(b)**. G-Controle. Coloração hematoxilina-eosina. Legenda: PRP=Plasma Rico em Plaquetas. 52

FIGURA 10 - Fotomicrografia. Corte histológico do foco de fratura do radio de cão aos sete dias de pós-operatório. **(a)**. G-PRP mostrando imunorreatividade do TGF- β no citoplasma de osteoblastos, células mesenquimais e endoteliais **(b)**. G-Controle exibe marcação difusa no coágulo em organização. Kit LSAB[®]/Diaminobenzidina contracoloração hematoxilina de Harris. Legenda: PRP=Plasma Rico em Plaquetas.....54

FIGURA 11 - Fotomicrografia. Corte histológico do foco de fratura do radio de cão aos sete dias de pós-operatório. **(a)**. G-PRP mostrando imunorreatividade do TGF- β no citoplasma de osteoblastos, células mesenquimais e endoteliais **(b)**. G-Controle quase não exibe marcação. Kit LSAB[®]/diaminobenzidina contracoloração hematoxilina de Harris. Legenda: PRP=Plasma Rico em Plaquetas. 55

FIGURA 12 - Fotomicrografia. Corte histológico do foco de fratura do radio de cão aos 60 dias de pós-operatório mostrando imunorreatividade do TGF- β no citoplasma de osteoblastos e células endoteliais, de maneira mais intensa em **(a)**. G-PRP, do que em **(b)**. G-Controle. Kit LSAB[®]/diaminobenzidina contracoloração hematoxilina de Harris. Legenda: PRP=Plasma Rico em Plaquetas.....57

FIGURA 13 - Fotomicrografia. Corte histológico do foco de fratura do radio de cão aos 60 dias de pós-operatório mostrando imunorreatividade do PDGF- β no citoplasma de osteoblastos e células endoteliais, de maneira mais intensa em **(a)**. G-PRP, do que em **(b)**. G-Controle. Kit LSAB[®]/diaminobenzidina contracoloração hematoxilina de Harris. Legenda: PRP=Plasma Rico em Plaquetas.....58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Representação esquemática da distribuição dos animais entre os grupos experimentais..... **45**

Tabela 2 - Imagem ilustrativa do preparo do PRP em laboratório até sua utilização no centro cirúrgico. **(a)**. Sedimentação obtida após a primeira centrifugação. **(b)**. Separação do plasma sobrenadante juntamente com a capa leucocitária e dois milímetros de hemácias para segunda centrifugação. **(c)**. Sedimentação após a segunda centrifugação, com visualização do PRP ao fundo do tubo. **(d)**. Retirada do PRP do tubo tipo “eppendorf” após sua gelificação **(e)**. PRP pronto para uso no trans-operatório. Legenda: PRP= Plasma Rico em Plaquetas.....**47**

Tabela 3- Procedimento cirúrgico de osteotomia do radio direito de cão pelo acesso medial. Em **(a)**. osteotomia com disco diamantado após passagem dos dois primeiros pinos transfixados. Em **(b)**. lacuna óssea de 2,0mm no terço médio da diáfise. Em **(c)**. G-PRP com lacuna óssea preenchida. Legenda: PRP=Plasma Rico em Plaquetas.....**49**

**EXPRESSÃO DOS FATORES DE CRESCIMENTO OBTIDOS DO PLASMA
RICO EM PLAQUETAS NO TRATAMENTO DE FRATURAS
EXPERIMENTAIS DO RADIO DE CÃES**

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi o de avaliar a cicatrização óssea de fraturas experimentais do radio de cães, tratadas ou não com o PRP autógeno, por meio de estudos radiográfico, densitométrico e histológico; bem como avaliar a expressão dos fatores de crescimento do PRP. Foram utilizados 21 cães inicialmente agrupados de acordo com o tempo de colheita de biopsia: aos sete dias (n=10) ou 60 dias (n=11) que foram alocados aleatoriamente em dois grupos experimentais: o grupo controle (G-controle, n=11) e o grupo PRP (G-PRP, n=10). Todos os animais foram submetidos à osteotomia e osteossíntese (fixador esquelético externo) do rádio direito, gerando-se um “gap” de 2,0mm, que foi preenchido ou não com PRP. Os estudos radiográficos e densitométricos foram realizados no pós-operatório imediato e até 60 dias de pós-operatório. As avaliações histológicas e imunistoquímicas foram realizadas aos sete e 60 dias. Os dados encontrados foram tratados estatisticamente ($p < 0,05$). Houve diferença significativa nas avaliações radiográficas e densitométricas entre os grupos. A avaliação histológica evidenciou uma cicatrização óssea mais avançada aos 60 dias no G-PRP e união óssea tardia no G-controle. Houve imunomarcagem intensa do PDGF-B e TGF- β no G-PRP aos sete e 60 dias de pós-operatório. Conclui-se, que o PRP pode ser utilizado como terapia adjuvante, pois promoveu melhor cicatrização óssea em fraturas experimentais (“gap” de 2,0mm) do radio de cães tratadas com fixador esquelético externo. Ainda houve maior expressão do PDGF-B e TGF- β nos períodos, precoce e tardio, dos animais tratados com PRP.

Palavras-chave: Cães, fator transformador de crescimento beta, imunistoquímica, osso e ossos e plasma rico e plaquetas

EXPRESSION OF GROWTH FACTORS OBTAINED FROM THE PLATELET-RICH PLASMA IN THE TREATMENT OF EXPERIMENTAL FRACTURES IN DOGS RADIO

SUMMARY - The present article aimed to assess bone healing of experimental radial fractures, treated or not with autologous PRP, by means of radiographic, densitometric and histological studies and evaluate the expression of growth factors in PRP. Were used 21 dogs initially grouped according to the time of biopsy collection: seven days (n = 10) or 60 days (n = 11) were randomly assigned to two groups: the control group (G-control, n = 11) and the PRP group (G-PRP, n = 10). All animals underwent osteotomy and fixation (external skeletal fixation) of the right radius, generating a gap of 2.0 mm, which was filled or not with PRP. Radiographic and densitometry studies were performed in the immediate postoperative period and to 60 days after the surgery. The histological and immunohistochemical evaluations were performed at seven and 60 days. The data were treated statistically (p <0.05). There were significant differences in densitometric and radiographic evaluations between the groups. Histological evaluation showed a more advanced bone healing at 60 days in G-PRP and bone union late in the G-control. There was intense expression of PDGF-B and TGF- β in G-PRP from seven to 60 days postoperatively. It is concluded that the PRP can be used as adjuvant therapy, because it provided better bone healing in experimental fractures (gap of 2.0 mm) radius of dogs treated with external skeletal fixation. Although there was a higher expression of PDGF-B and TGF- β in periods, early and late, the animals treated with PRP.

Key-works: Transforming growth factor beta, platelet rich plasma, dogs, immunohistochemistry and bone and bones.

INTRODUÇÃO

I INTRODUÇÃO

Fraturas de rádio e ulna representam aproximadamente 8,5% a 18% de todas as fraturas em cães e gatos, sendo a região de diáfise média e distal de ambos os ossos as mais acometidas (HULSE; JOHNSON, 2002; BOUDRIEU, 2007).

Os tecidos moles circunjacentes à fratura fornecem ao calo periosteal a irrigação sanguínea extra-óssea para a consolidação óssea inicial (HULSE; JOHNSON, 2002). Fraturas em locais com escasso revestimento de tecido muscular (rádio-ulna, tibia-fíbula), normalmente consolidam mais lentamente, por ser limitado o aporte sanguíneo (JACKSON; MILLIS, 2007). As técnicas clássicas de estabilização e enxertias ósseas, nem sempre fornecem resultados satisfatórios, culminando em cicatrização óssea tardia e não união óssea (MASTROCINQUE et al., 2004; NORDSLETEN, 2006; JACKSON; MILLIS, 2007; WROTNIK et al., 2007).

Além do correto método de fixação, materiais biológicos como proteínas ósseas morfogenéticas, medula óssea, células tronco, plasma rico em plaquetas, entre outros, são utilizados com o intuito de acelerar o processo de cicatrização óssea e minimizar complicações (OBARRIO et al., 2000; HENDERSON et al., 2003; MARX, 2004; BOUDRIEU, 2007; JACKSON; MILLIS, 2007).

O plasma rico em plaquetas (PRP) consiste em uma concentração autóloga de plaquetas em um pequeno volume de plasma, obtido a partir da centrifugação de sangue total e rico em fatores de crescimento (FC) liberados por elas. Ainda, estão presentes proteínas osteocondutoras (fibrina, fibronectina e vitronectina), que também servem de matriz para migração celular, favorecendo a osteocondução, a epitelização e a osteointegração (OBARRIO et al., 2000; HENDERSON et al., 2003; MARX, 2004). Para ser eficiente o PRP obtido deve ter, no mínimo, um incremento de 338% no valor basal da contagem de plaquetas (MARX et al., 1998).

O PRP aumenta, no foco das lesões, principalmente a concentração de fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGFs – AA, BB, AB), fator de crescimento transformador β (TGF- β 1 e β 2), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento epidérmico (EGF), que estão contidos nos grânulos α das plaquetas (MARX, 2001; SANCHEZ et al., 2003; MASTROCINQUE et al., 2004; WILSON et al., 2006; SILVA et al., 2007; WROTNIAC et al., 2007). A presença de PDGFs e TGF- β foi demonstrada no PRP autógeno humano por meio da imunomarcação empregando-se anticorpos monoclonais. No mesmo estudo, células osteoprogenitoras e células-tronco da medula óssea obtidas em enxerto esponjoso com porção medular foram marcadas com anticorpos de receptores de membrana para PDGFs e TGF- β , confirmando assim, serem fatores que possuem ação direta na reparação do tecido ósseo (MARX et al., 1998).

As plaquetas atuam no processo de hemostasia, cicatrização de feridas e re-epitelização. Os FC por elas liberados estimulam a angiogênese, promovendo crescimento vascular e proliferação de fibroblastos, proporcionando aumento na síntese de colágeno. Estudos comparativos demonstraram que a utilização do PRP, associado ou não a outros tipos de enxerto, abrevia o tempo requerido para cicatrização óssea (SANCHEZ et al., 2003; MARX, 2004; GERARD et al., 2006; WILSON et al., 2006; WROTNIAC et al., 2007).

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a cicatrização óssea de fraturas experimentais do radio de cães, tratadas ou não com o PRP autógeno, por meio de estudos radiográfico, densitométrico, histológico e imunoistoquímico por meio da imunomarcação dos fatores de crescimento contidos no PRP (PDGF-B e TGF- β).

REVISÃO DA LITERATURA

II REVISÃO DA LITERATURA

II.1 Tecido ósseo

O osso é um tecido metabolicamente ativo que sofre um contínuo processo de renovação e remodelação, modificando sua estrutura em resposta aos estresses internos e externos e também dotados de habilidade regenerativa e adaptativa (PARALKAR et al., 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; MASTROCINQUE et al., 2004).

O osso contém material orgânico (30%) que inclui células osteogênicas e a matriz orgânica, e material mineral (70%) que consiste de cálcio e fósforo em forma de cristais de hidroxiapatita que associada ao colágeno responde pela dureza e resistência do osso (HERRON, 1996; REMEDIOS, 1999; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Sua atividade é resultado da ação de três tipos de células: os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Os osteoblastos são células cubóides, geralmente encontrados em forma de folhetos, com espessura unicelular, que secretam matriz óssea não mineralizada ao longo da superfície óssea (REMEDIOS, 1999; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Os osteócitos são células fusiformes resultantes do aprisionamento de osteoblastos na matriz óssea recém produzida, sendo abrigados em lacunas individuais e responsáveis pela manutenção da matriz (HERRON, 1996; REMEDIOS, 1999; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Os osteoclastos são células móveis, gigantes, extensamente ramificadas e geralmente multinucleadas, muito próximas uma das outras formando camadas até próximo à superfície óssea. Participam da remodelação óssea por meio de reabsorção (HERRON, 1996; REMEDIOS, 1999; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

II.II Cicatrização óssea

O processo de reparação de um osso fraturado depende de um suprimento sanguíneo adequado, da quimiotaxia de células inflamatórias para a fratura e do fenômeno de remodelagem óssea (HULSE; JOHNSON, 2002).

No momento da fratura os componentes do sistema vascular aferente normal (artéria nutriente, artérias metafisária e periosteal) ganham reforço de um suprimento temporário derivado dos tecidos moles adjacentes e denominado de suprimento sanguíneo extra-ósseo de consolidação, sendo fundamental no suprimento sanguíneo nas fases iniciais de cicatrização (HULSE; JOHNSON, 2002; HULSE; HYMAN, 2007).

A capacidade de revascularização eficiente é diretamente influenciada pela estabilidade no foco da fratura (REMEDIOS, 1999; HULSE; JOHNSON, 2002), de modo que, o método de fixação empregado neutralize as forças que agem na fratura (rotação, compressão, cisalhamento, distração e angulação) (PIERMATTEI; FLO, 1999; HULSE; JOHNSON, 2002; HULSE; HYMAN, 2007).

O único tecido que pode sobreviver precocemente no foco de fratura é o tecido de granulação. Com o avanço do processo de cicatrização ocorre reabsorção osteoclástica das extremidades do fragmento, aumentando a largura da lacuna e em seguida o tecido de granulação se torna gradualmente mais fibroso (HULSE; JOHNSON, 2002; HULSE; HYMAN, 2007). Se a lacuna de fratura for demasiadamente ampla, se a irrigação vascular estiver prejudicada ou se a deformação interfragmentar não permite a sobrevivência do tecido ósseo, ocorre consolidação óssea indireta (HULSE; HYMAN, 2007).

O osso se consolida quando o tecido ósseo é formado através da substituição do tecido fibroso ou cartilagem. Esse processo ocorre quando a deformação interfragmentar, a irrigação sanguínea comprometida ou a largura da lacuna da fratura não permitem a formação direta do osso lamelar. Os tecidos que podem sobreviver no foco de fratura são depositados até que haja

condições biológicas para sobrevivência das células ósseas (HULSE; HYMAN, 2007).

A união óssea pode ocorrer por consolidação direta (reconstrução osteonal) e consolidação indireta (formação de calo intermediário). A eficácia do implante, quanto à estabilidade, juntamente com o ambiente biológico na superfície fraturada, determinarão se irá ocorrer união óssea direta ou indireta (PIERMATTEI; FLO, 1999; HULSE; HYMAN, 2007).

A consolidação óssea indireta pode ser dividida em três fases sequenciais: inflamatória, reparação (calo mole e calo duro) e remodelação (PIERMATTEI; FLO, 1999; HULSE; HYMAN, 2007).

A fase inflamatória inicia-se imediatamente após a fratura de forma aguda, envolvendo tecidos moles e periósteo que circundam o osso lesado, e persiste até o início da formação de tecido fibroso ou cartilaginoso. A formação do hematoma no foco da fratura proporciona a presença de plaquetas que liberam fatores de crescimento quimiotáticos para macrófagos e fibroblastos, e servem de sustentação para formação do tecido de granulação (REMEDIOS, 1999, MEDEIROS JUNIOR et al., 2004; HULSE; HYMAN, 2007; PAGLIOSA; ALVES, 2007).

Na fase de reparação ocorre angiogênese e liberação de fatores de crescimento pelas células endoteliais. Células mesenquimais indiferenciadas, fibroblastos e macrófagos iniciam a formação do calo periosteal. (REMEDIOS, 1999; MILLIS, 1999; PIERMATTEI; FLO, 1999;). O tecido de granulação marca o início do estágio de calo mole que pode evoluir para tecido fibroso ou fibrocartilaginoso, dependendo das condições ambientais locais. O tecido fibroso se forma na periferia externa do calo onde a irrigação sanguínea é abundante, já no centro do calo onde o suprimento sanguíneo é limitado forma-se fibrocartilagem. Ambos os tecidos do calo mole têm propriedades mecânicas suficientes para fazer a ponte na fratura, mas não para diminuir a deformidade local que conduza à sobrevivência dos osteoblastos (HULSE; HYMAN, 2007). É importante que as forças de tensão no foco de fratura não excedam a

tolerância do tecido de granulação e resulte em laceração dos vasos sanguíneos que tentam cruzar a lacuna da fratura (JACKSON; MILLIS, 2007).

A mineralização da matriz fibrocartilaginosa progride das extremidades para o centro marcando o início do calo duro. A rigidez da estrutura garante a redução da deformidade, manutenção de vascularização e início da formação óssea. O tecido fibroso mineralizado e fibrocartilagem são gradativamente substituídos para formar osso esponjoso que tem rigidez suficiente para permitir o retorno à função do membro quando da união completa (PIERMATTEI; FLO, 1999; HULSE; HYMAN, 2007).

O processo de remodelação inicia quando a fratura já tem um calo em ponte, ocorre substituição de osso esponjoso por osso lamelar até obtenção de osso cortical com contorno e diâmetros restaurados (PIERMATTEI; FLO, 1999; REMEDIOS, 1999).

II.III Uniões tardias, não uniões ósseas e más uniões

A violação dos princípios da cirurgia ortopédica, falha em processos biológicos do paciente e infecções são fatores que influenciam nas etapas do reparo ósseo (PIERMATTEI & FLO, 1999; SCHMAEDECKE et al., 2003; JACKSON; PACCHIANA, 2004).

A união tardia é quando uma fratura tem sua consolidação óssea em tempo superior à esperada em comparação a outras semelhantes com técnicas de fixação similares. A não união óssea ocorre quando aparentemente cessou a progressão da cicatrização e é improvável que a mesma progrida sem intervenção. Uma fratura com má união é aquela que consolidou fora da sua posição anatômica (PIERMATTEI; FLO, 1999; JACKSON; MILLIS, 2007).

A ocorrência da união tardia e conseqüentemente da não união óssea tem sido associada a fatores físicos como instabilidade, comprometimento vascular, grandes lacunas no foco de fratura, interposição de tecidos moles,

infecção e o uso inadequado de implantes ortopédicos (PIERMATTEI; FLO, 1999; JACKSON; MILLIS, 2007).

Os tecidos moles circunjacentes à fratura fornecem ao calo periosteal a irrigação sanguínea extra-óssea para a consolidação óssea inicial (HULSE; JOHNSON, 2002). Fraturas em locais com escasso revestimento de tecido muscular (rádio-ulna, tibia-fíbula), normalmente consolidam mais lentamente, por ser limitado o aporte disponível de vasos para o processo de consolidação (JACKSON; MILLIS, 2007). Infecções nos locais da fratura retardam o processo de consolidação, ao promover isquemia e necrose dos tecidos, aumentando a lacuna no foco de fratura (JACKSON; PACCHIANA, 2004; JACKSON; MILLIS, 2007).

Uma fratura com união tardia pode possuir evidencia de vários estágios de ossificação intramembranosa e endocondral, incluindo tecido fibroso, cartilagem, cartilagem calcificada e matriz óssea mineralizada no foco da fratura. O calo está presente nas superfícies periosteal e endosteal, com remodelamento intracortical. Numa não união óssea viável a evidência de atividade osteogênica pode estar presente nos bordos, mas nenhum suprimento vascular é observado cruzando a lacuna da fratura (JACKSON; MILLIS, 2007).

II.IV Fixação esquelética externa

A fixação esquelética externa é utilizada para a estabilização de fraturas por meio de pinos percutaneamente transfixados, mantidos unidos por uma estrutura externa rígida. Uma vantagem exclusiva do fixador em relação as placas ou pinos é a possibilidade de ajustes após a cirurgia (PIERMATTEI; FLO, 1999; MARCELLIN-LITTLE, 2007).

Deve ser colocado o maior número possível de pinos por fragmento sendo dois o mínimo aceitável. Pinos rosqueados podem ser colocados sem angulação ao osso facilitando a colocação de mais pinos por fragmento, entretanto são mais sujeitos a quebra na transição entre a porção lisa e

rosqueada (perfil negativo) (HULSE; JOHNSON, 2002; MARCELLIN-LITTLE, 2007). Pinos mais curtos e de diâmetro maiores são mais rígidos. O diâmetro recomendado é de 20 a 30% do diâmetro ósseo (PIERMATTEI; FLO, 1999; MARCELLIN-LITTLE, 2007).

II.V Fatores de crescimento ósseo

Fatores de crescimento (FC) são polipeptídeos específicos, presentes no plasma e em alguns tecidos, que regulam a diferenciação e a proliferação celulares e, portanto, a regeneração e cicatrização dos tecidos (WILTFANG et al., 2004).

Os osteoblastos produzem muitos desses FC que podem ter ação parácrina ou autócrina (MARX, 2004; JACKSON; MILLIS, 2007). Desempenham sua função em concentrações muito baixas nos líquidos corporais, da ordem de picogramas; seu estímulo é transmitido via receptores de superfície de membrana, que ativam proteínas reguladoras no citoplasma, gerando respostas por meio da indução da expressão de genes (SÁNCHEZ et al., 2003; MARX, 2004).

Os FC que atuam no tecido ósseo podem ser de origem local ou sistêmica. Os FC locais são secretados por células ósseas e difundem-se no meio extracelular ou são armazenados na matriz calcificada, sendo recrutados, respectivamente, de forma imediata ou tardia em casos de injúria tissular (MILLIS, 1999). Os FC locais e sistêmicos atuam nas fases de inflamação, reparo e remodelamento, durante a cicatrização óssea, exercendo funções importantes que variam de acordo com cada fator de crescimento (MILLIS, 1999).

II.V.I Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)

Os fatores derivados de plaquetas são sintetizados por essas células e estocados em grânulos, sendo também produzidos por macrófagos, células endoteliais, fibroblastos e células musculares. Possuem potente atividade

mitogênica para células mesenquimais incluindo fibroblastos e osteoblastos e estimulam a expressão de TGF β proveniente de macrófagos, além de angiogênese e quimiotaxia para macrófagos e fibroblastos (MARX et al., 1998; REMEDIOS, 1999; MILLIS, 1999; MASTROCINQUE et al., 2004).

O PDGF é um polipeptídeo dimérico, produto de dois genes, o PDGF A e o B. Existem, portanto três formas de PDGF: AA, BB e AB. Em geral o PDGF BB é mais mitogênico que o PDGF AB e este por sua vez, têm essa ação mais marcada que o PDGF AA. As plaquetas e o soro são ricos em PDGF AB e BB, enquanto os tecidos periféricos (esqueléticos e não esqueléticos) contêm principalmente PDGF AA (CANALIS, 1991; RUTKOWSKI, et al. 2008).

O PDGF é o primeiro fator de crescimento presente em um ferimento. Inicia o processo de cura, incluindo o reparo ósseo emergindo da degranulação das plaquetas quando ocorre uma injúria tecidual (MARX et al., 1998; GARG, 1999).

II.V.II. Fator de crescimento transformador beta (TGF- β)

Os TGF β são peptídeos sintetizados por muitos tecidos, sendo considerada uma super família de fatores de crescimento e diferenciação (CANALIS, 1991).

É um fator de crescimento multifuncional que demonstra ser um mediador normal da fisiologia celular e embriogênese dos tecidos. A maior quantidade de TGF- β no organismo está presente na matriz óssea extracelular, e o segundo encontra-se nas plaquetas (MILLIS, 1999; MARTINEZ; WALKER, 1999; RUTKOWSKI, et al. 2008).

O TGF- β participa dos processos inflamatórios e de reparação. Apresenta efeito mitogênico para fibroblastos e é um potente estimulador de colágeno, fibronectina e produção de proteoglicanos pelos fibroblastos. São importantes no recrutamento de células mesenquimais indiferenciadas para formação de calo ósseo (MILLIS, 1999). Ele tem grande espectro de ação de atividades celulares, incluindo controle da proliferação e da atividade metabólica de células precursoras mesenquimais ósseas tais como:

condrócitos, osteoblastos e osteoclastos, assim como potente ação quimiotóxica para macrófagos (MARTINEZ; WALKER, 1999).

II.VI Plasma rico em plaquetas (PRP)

O plasma rico em plaquetas é uma concentração autóloga de plaquetas em um pequeno volume de plasma, obtido a partir da centrifugação de sangue total, com a consequente presença de fatores de crescimento (FC) liberados por estas plaquetas, além de proteínas osteocondutoras (fibrina, fibronectina e vitronectina), que também servem de matriz para migração celular, favorecendo osteocondução, epitelização e osteointegração (OBARRIO et al., 2000; HENDERSON et al., 2003; MARX, 2004). Por ser autógeno, impede a transmissão de doenças infecto-contagiosas e reações imunológicas (OBARRIO et al., 2000). Para ser eficiente o PRP deve promover um incremento de, no mínimo, 338% no valor basal da contagem de plaquetas (MARX et al., 1998).

O PRP aumenta principalmente a concentração de fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGFs – AA, BB, AB), fator de crescimento transformador β (TGF- β 1 e β 2), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento epidérmico (EGF), que estão contidos nos grânulos α das plaquetas (MARX, 2001; SANCHEZ et al., 2003; MASTROCINQUE et al., 2004; WILSON et al., 2006; SILVA et al., 2007; WROTNIAK et al., 2007). A presença de PDGFs e TGF- β foi demonstrada por meio da imunomarcção empregando-se anticorpos monoclonais, que também indicaram a presença de receptores para estes fatores nas células osteoprogenitoras e nas células-tronco da medula óssea; sendo assim, são fatores que possuem ação direta na reparação do tecido ósseo (MARX, et al., 1998; MARX, 2001).

Inúmeros estudos em odontologia foram conduzidos empregando-se o PRP, principalmente em pequenos enxertos ósseos na região alveolar para futuros implantes dentários e em cirurgias periodontais e maxilo-faciais

(THORN et al., 2004; GERARD et al., 2006; VENDRAMIN et al., 2006; SCHWARTZ-ARAD et al., 2007).

Estudos comparativos vêm demonstrando que a utilização do PRP associados ou não, a outros tipos de enxerto, abrevia o tempo requerido para cicatrização óssea (SANCHEZ et al., 2003; GERARD et al., 2006; WILSON et al., 2006). Rutkowski et al. (2007) demonstraram que o uso do PRP após extração dentária promoveu intensa redução de osteíte alveolar, entretanto segundo Vasconcelos Gurgel et al. (2007) o PRP não apresentou efeito adicional em pesquisa realizada com implantes dentários em cães. Silva et al. (2007) ao utilizarem o PRP associado à hidroxiapatita não observaram diferença entre grupos nas avaliações radiográficas e densitométricas.

As plaquetas atuam no processo de hemostasia, cicatrização de feridas e re-epitalização. Os FC por elas liberados estimulam a angiogênese, promovendo crescimento vascular e proliferação de fibroblastos, proporcionando aumento na síntese de colágeno. Essas propriedades das plaquetas tornam o PRP um produto com grande potencial de melhorar a integração de enxertos, sejam eles ósseos, cutâneos, cartilagosos ou gordurosos (MARX, 2004; WROTNIAK et al., 2007). Estudos *in vitro* demonstraram a ação do PRP na proliferação de osteoblastos humanos (FERREIRA et al., 2005; MARKOPOULOU et al., 2009).

As plaquetas apresentam a desvantagem de ter uma vida média curta no enxerto, considerando-se o tempo que já permaneceram no sistema vascular. Elas se fragmentam totalmente em torno de 3 a 5 dias, e a atividade de seus fatores se extinguem entre 7 a 10 dias (SCARSO FILHO et al., 2001; MARX, 2004).

O PRP pode ser obtido através de diferentes protocolos necessitando de equipamentos com altos custos (OBARRIO et al., 2000; MARX, 2004), como também por técnicas relativamente simples e de custo mais baixo como a centrifuga laboratorial comum (PAGLIOSA; ALVES, 2007; RUTKOWSKI, et al. 2008). O sangue a ser utilizado deve ser colhido em tubos contendo

preferencialmente, citrato de sódio como anticoagulante (CAMARGO et al., 2002; BRAGA-SILVA et al., 2006).

A manipulação do sangue durante a centrifugação deve ser realizada de forma cuidadosa e asséptica, e processada em rotação adequada para assegurar a separação das células plaquetárias das demais presentes no sangue, e também para evitar ruptura ou danos à sua membrana. A centrifugação pode ser realizada de maneira única ou repetida em duas etapas (PAGLIOSA; ALVES, 2007).

Há vários autores que utilizaram única centrifugação variando entre eles o número de rotações por minuto (rpm) e o tempo de centrifugação. Camargo et al. (2002) utilizaram 5600rpm por seis minutos. Marchesano (2005) utilizou 1400rpm por 10 minutos. Braga-Silva et al. (2006) utilizaram uma velocidade de 160G durante 8 minutos. Wilson et al. (2006) centrifugou o sangue a 1800rpm por 15 minutos.

Há também autores que utilizaram duas centrifugações sequenciais com resultados igualmente positivos. Dias et al. (2002) utilizaram na primeira centrifugação uma velocidade de 160G por 20 minutos e na segunda 400G por 15 minutos. Oyama et al. (2004) centrifugaram a 160G por 20 minutos e o plasma sobrenadante resultante, juntamente com 6 mm da fração vermelha, foi centrifugado a 400G por 15 minutos. Silva et al. (2007) utilizou 1000rpm (ou 90G) por 10 minutos e realizou uma segunda centrifugação a 1500rpm por 10 minutos.

Após a extração do PRP, com o auxílio de uma pipeta, deve-se adicionar o gluconato ou cloreto de cálcio 10% para induzir coagulação, formação de um gel e promover ativação das plaquetas. Uma vez coagulado está pronto para seu uso. Sua consistência gelatinosa e adesiva facilita o manejo cirúrgico dos enxertos ósseos (MARCHESANO, 2005; BRAGA-SILVA et al., 2006; WILSON et al., 2006; PAGLIOSA; ALVES, 2007), porém passado três horas da centrifugação apenas o PDGF mantém sua concentração e o TGF-beta decresce consideravelmente (RUTKOWSKI, et al. 2008).

II.VII Diagnóstico por imagem como método de acompanhamento da cicatrização óssea

A avaliação radiográfica periódica é muito importante para determinar a taxa de redução da fratura, a situação do reparo ou fixação e a evolução do restabelecimento da lesão, mostrando se o processo está normal, retardado, se há má união ou não união dos fragmentos (HULSE; JOHNSON, 2002; MEDEIROS JUNIOR et al., 2004).

A Densitometria Óptica Radiográfica é um método de análise para quantificação da matéria mineral óssea através de radiografias com a colocação de uma escada de alumínio. Estas radiografias são digitalizadas e analisadas por meio de um *software* de análise de imagens (ImageJ®) e compara as tonalidades de cinza da escala com a região óssea analisada, obtendo-se valores em milímetros de alumínio (mmAl) (LOUZADA et al., 2001; MACHADO et al., 2005; ROBSON et al., 2006; SILVA et al., 2007).

A densitometria radiográfica é um método que nos fornece valores numéricos sem a subjetividade do radiologista, mas a radiologia simples ainda é considerada o exame por imagem mais utilizado na rotina clínica em Medicina Veterinária (LOUZADA et al., 2001).

II.VIII Histologia e imunoistoquímica como métodos de acompanhamento da cicatrização óssea

A histopatologia tem sido utilizada para quantificação celular nos enxertos além de qualificar a estrutura tecidual e angiogênese precoces uma vez que os achados radiográficos e densitométricos demonstram de forma indireta a cicatrização, além disso são métodos cujos achados demoram a ser visualizados (MARX et al., 1998; WILSON et al., 2006; GERARD et al., 2007; SILVA et al., 2009).

Devido à meia vida curta dos FC no foco de fratura a avaliação invasiva por meio da histologia e imuno-histoquímica é mais indicada para identificação dos mesmos (GERARD et al., 2006).

Apesar das plaquetas se fragmentarem totalmente em torno de 3 a 5 dias, e a atividade de seus fatores se extingue entre 7 a 10 dias (SCARSO FILHO et al., 2001), mas a presença de PDGFs e TGF- β foi demonstrada por meio da imunomarcção com anticorpos monoclonais, que também indicaram a presença de receptores para estes fatores nas células osteoprogenitoras e nas células-tronco da medula óssea, até o trigésimo dia de pós-operatório (MARX et al., 1998).

MATERIAL E MÉTODO

III MATERIAL E MÉTODO

O estudo foi conduzido nas dependências do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Odontologia da UNESP Câmpus de Araçatuba. As cirurgias se realizaram no Laboratório Experimental de Disciplinas Aplicadas, a elaboração do PRP no Laboratório de Patologia Clínica e as análises histológicas e imunoistoquímicas no Laboratório Experimental de Histologia e Oncologia. O referido trabalho foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal seguindo as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) sob o protocolo 2007-008690 (Apêndice A).

III.1 Animais

Para o presente estudo, foram utilizados 21 cães, entre machos e fêmeas, sem raça definida, com peso variando entre quatro e seis quilos e idade aproximada de adultos jovens. Os animais foram mantidos em canil localizado nas dependências do Hospital Veterinário “Luiz Quintiliano de Oliveira” do Curso de Medicina Veterinária da Unesp – Campus de Araçatuba, sob condições higiênico-sanitárias adequadas, principalmente no se refere ao controle de ectoparasitas.

Os animais eram provenientes dos Centros de Controle de Zoonoses das cidades de Lençóis Paulista (SP) e Araçatuba (SP). Todos os cães foram submetidos a exame físico geral e exames de triagem (sorologia para leishmaniose, hemograma completo e contagem total de plaquetas) para exclusão de doenças concomitantes. Somente incluíram-se no estudo os animais negativos na sorologia e aqueles em condições clínicas satisfatórias com base nos resultados dos exames físico geral e laboratorial. Previamente ao início da execução dos procedimentos aqui propostos, os animais passaram por um período de 15 dias de adaptação junto aos canis da instituição.

Os cães selecionados para o experimento foram vermifugados, vacinados¹ e castrados. Os animais eram alimentados com ração seca² duas vezes ao dia e água a vontade; o local era higienizado diariamente com desinfetantes, com o intuito de promover um local adequado à permanência dos animais e que fatores ambientais, como proliferação de contaminantes, pudessem ser controlados. Como a região aonde foi conduzido os experimentos trata-se de uma região endêmica para a Leishmaniose Visceral Canina, empregou-se como métodos de prevenção o uso de repelente tópico a base de citronela que era pulverizado diariamente sobre o corpo dos animais e ainda, o uso de coleira repelente³, que era trocada a cada quatro meses, conforme recomendações do fabricante. Para a prevenção de infestação por ectoparasitas, utilizou-se Fipronil⁴ a cada 30 dias.

III.II Grupos experimentais

Os cães foram inicialmente distribuídos de forma aleatória em dois grupos experimentais de acordo com o tempo em que seriam realizadas as biopsias ósseas para os estudos, histoquímico e imunoistoquímico. Desta forma, 11 animais foram avaliados durante 60 dias até a colheita do fragmento ósseo, denominado grupo de biópsia longa (GBL), enquanto os demais (n=10) foram submetidos à biópsia aos sete dias de pós-operatório, sendo denominados como grupo de biópsia curta (GBC).

Dos cães que sofreram a biópsia aos 60 dias (GBL), seis fizeram parte do grupo controle (G-controle) e cinco do grupo tratado com plasma rico em plaquetas (G-PRP). Os animais submetidos às biopsias aos sete dias (GBC) alocaram-se cinco cães em cada grupo (G-controle e G-PRP). A Figura 1 ilustra esquematicamente a divisão dos animais entre os grupos.

¹ Vacina V8[®] Merial

² Ração de Vegetais - Special Dog[®]

³ Coleira repelente - Scalibor[®] - Intervet

⁴ Fipronil - Top Line[®] - Merial

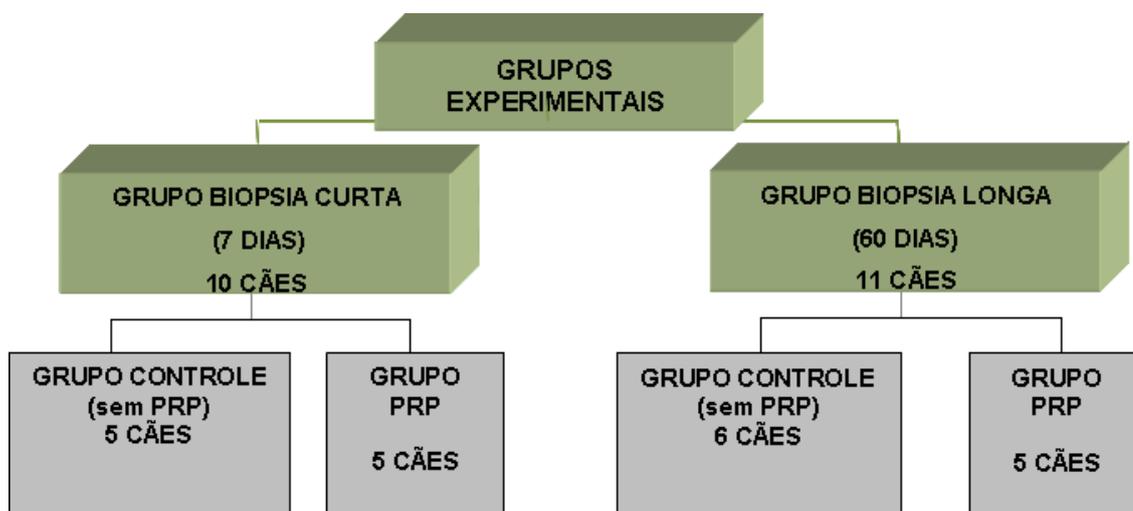


FIGURA 1- Representação esquemática da distribuição dos animais entre os grupos experimentais.

III.III Procedimentos Anestésicos

Os cães foram submetidos a jejum hídrico e alimentar de duas e 12 horas, respectivamente. Como medicação pré-anestésica utilizou-se Cloridrato de Morfina⁵ (0,5mg/Kg) e Midazolan⁶ (0,2mg/Kg) por via intramuscular; seguida da indução anestésica intravenosa com Propofol⁷ (4mg/Kg, dose resposta) associado ao Midazolan⁶ (0,2mg/Kg), e foram mantidos sob anestesia geral inalatória com Isoflurano⁸ em circuito semifechado com vaporização inicial de 3V%, que variou ao longo do procedimento de acordo com o requerimento anestésico individual. Ato contínuo, foi realizado bloqueio do plexo braquial (o volume total foi baseado na dose de Cloridrato de Lidocaína⁹ 7mg/Kg e dividido na proporção 1:1 com Cloridrato de Bupivacaína¹⁰, ambas com vasoconstritor (TRANQUILLI et al., 2007). Concomitantemente, foi administrado o antibiótico Cefalotina¹¹ na dose de 30mg/Kg por via intravenosa, no momento da indução anestésica, visando a profilaxia da infecção. Durante todos os procedimentos

⁵ Cloridrato de Morfina - Dimorf[®] 10mg/mL-Cristália

⁶ Midazolan - Dormire[®] 5mg/mL - Cristália

⁷ Propofol – Propovan[®] 10mg/mL - Cristália

⁸ Isoflurano - Isororine[®] 240mL - Cristália

⁹ Cloridrato de Lidocaína - Xylestesin[®] 2% - Cristália

¹⁰ Cloridrato de Bupivacaína - Neocaína[®] 0,5% - Cristália

¹¹ Cefalotina sódica – Keflin[®] 1g –abl-antibiotios

cirúrgicos, os parâmetros dos animais foram acompanhados por um membro da equipe cirúrgica.

III.IV Preparo do PRP em laboratório

Depois de decorridos 15 minutos da medicação pré-anestésica, houve colheita asséptica de 8,0 mL de sangue por venopunção da jugular em tubo estéril contendo 2,0 mL de citrato de sódio como anticoagulante, para o preparo do PRP autógeno. Foi utilizado um protocolo de dupla centrifugação¹² modificado segundo Dias et al. (2002) e Oyama et al. (2004). Separou-se uma alíquota do sangue para a contagem total de plaquetas basal, submetendo o restante à primeira centrifugação (160 G/20 minutos). Em seguida, todo o sobrenadante juntamente com a capa leucocitária e mais dois milímetros de hemácias foram transferidos para outro tubo para realização da segunda centrifugação (400 G/15 minutos), obtendo-se um volume final de 1,0 mL de PRP. Ao final do processamento uma nova contagem manual de plaquetas foi realizada para confirmação de um incremento mínimo de 338% do valor basal. No momento de utilização, o PRP foi adicionado a cloreto de cálcio 10% (25µL/0,5mL de PRP) para gelificação e ativação do mesmo, em banho Maria, que ficou pronto para uso no trans-operatório (Figura 2).

¹² Centrifuga - Centrifuge 5810 R - Eppendorf

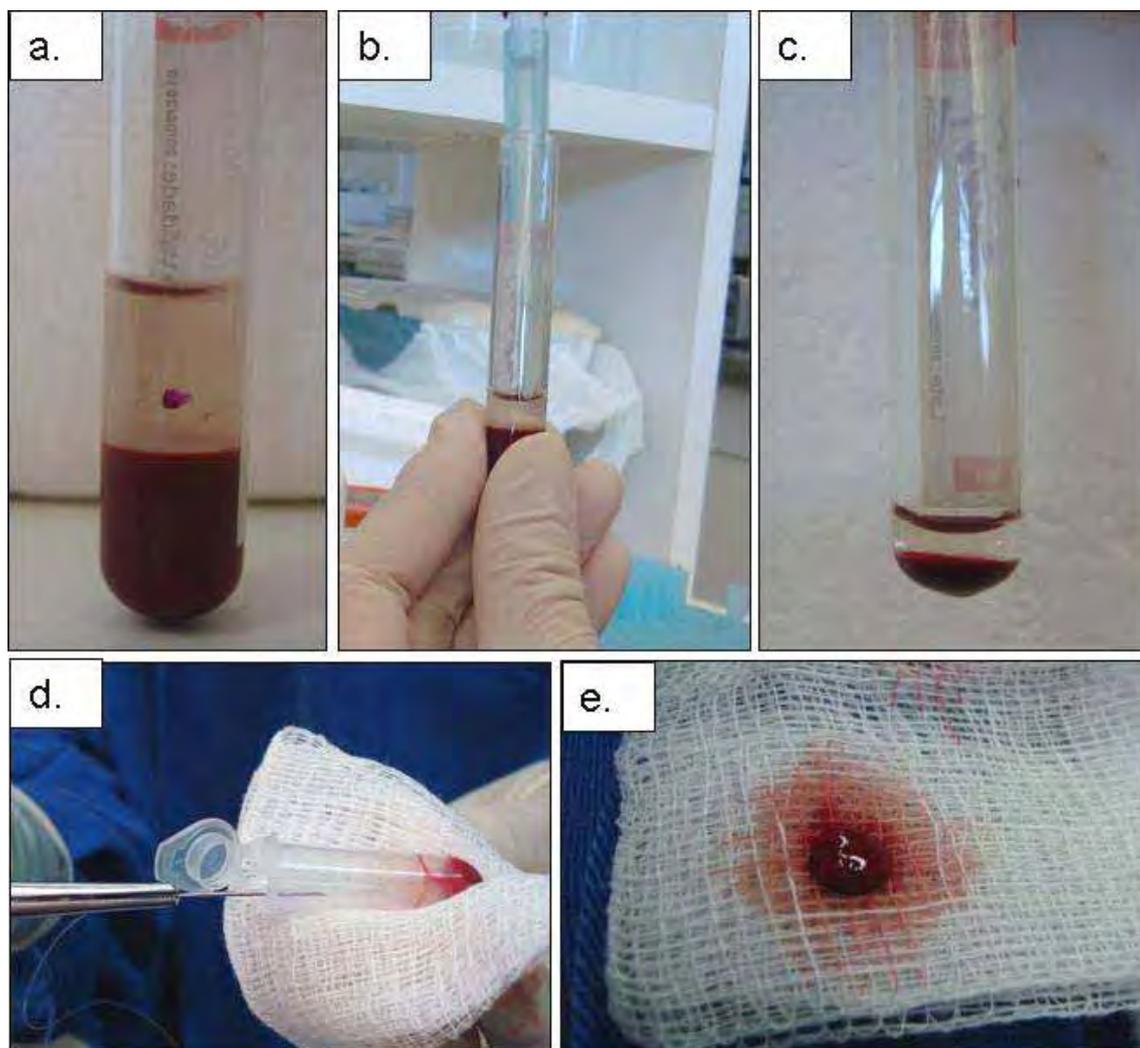


FIGURA 2- Imagem ilustrativa do preparo do PRP em laboratório até sua utilização no centro cirúrgico. **(a).** Sedimentação obtida após a primeira centrifugação. **(b).** Separação do plasma sobrenadante juntamente com a capa leucocitária e dois milímetros de hemácias para segunda centrifugação. **(c).** Sedimentação após a segunda centrifugação, com visualização do PRP ao fundo do tubo. **(d).** Retirada do PRP do tubo tipo "ependorf" após a adição do cloreto de cálcio com sua consequente gelificação **(e).** PRP pronto para uso no trans-operatório. Legenda: PRP= Plasma Rico em Plaquetas.

III.V Procedimentos cirúrgicos

O preparo do paciente para a cirurgia ocorreu de maneira rotineira, com tricotomia e antisepsia de todo membro torácico direito empregando-se álcool iodado e iodo povidine com o auxílio de gaze. Com o animal posicionado em decúbito dorsal sobre a calha, iniciou-se abordagem cirúrgica do rádio por acesso medial, segundo Piermattei e Flo (1999) até visualização da diáfise óssea para então, realização da osteotomia total do radio.

A fratura foi realizada empregando-se inicialmente disco diamantado¹³ e em seguida houve um desgaste do osso com o auxílio de broca odontológica¹⁴ acoplados à caneta de baixa rotação¹⁵, gerando-se um “gap” de fratura de 2,0 mm, que foi preenchido no grupo G-PRP com o gel de plasma rico em plaquetas. A osteotomia criou uma linha de fratura completa e transversal em terço médio do rádio direito dos cães, cuja estabilização foi feita com fixador externo uniplanar bilateral por meio de pinos de 1,5mm¹⁶. Nos animais do grupo controle não houve o preenchimento do “gap” de fratura com PRP.

A aplicação do fixador externo uniplanar bilateral foi realizada com o auxílio de furadeira¹⁷ para a passagem de quatro pinos lisos (dois no fragmento distal e dois no proximal). Inicialmente passaram-se os pinos distantes ao foco de fratura que foram colocados paralelos um em relação ao outro (para facilitar a manutenção do eixo ósseo) e os demais pinos (n=2) próximos à linha de fratura foram inclinados, para promover menor estresse na interface pino osso. Durante todo o procedimento de osteotomia e passagem dos pinos, o campo operatório foi irrigado com solução fisiológica estéril pelo auxiliar a fim de se evitar o aquecimento do osso pela perfuração.

Quando o fixador estava montado o cirurgião retirava-se da sala e era então realizado o sorteio por um dos membros da equipe para utilização ou não do PRP, constituindo-se, assim, um estudo “cego”. A síntese dos planos cirúrgicos ocorreu rotineiramente, utilizando-se fio Poliglactina 910¹⁸ para musculatura e subcutâneo e Náilon¹⁹ para pele. O primeiro curativo foi realizado imediatamente após a cirurgia, sob condições estéreis. A Figura 3 ilustra o procedimento cirúrgico descrito.

¹³ Disco Diama. Flex. Dupla face s/ haste[®] - Microdont

¹⁴ Broca N 702 – Carbine JET[®] - Labordental

¹⁵ Caneta de baixa rotação - Micro motor a chicote[®] - Bethil

¹⁶ Pinos lisos de 1,5mm - Caomedica[®].

¹⁷ Furadeira autoclavável[®] - Ortovet

¹⁸ Fio Poliglactina 910 - Vicryl 3-0[®] Ethicon

¹⁹ Fio Náilon - Nylon 3-0[®] - Ethicon

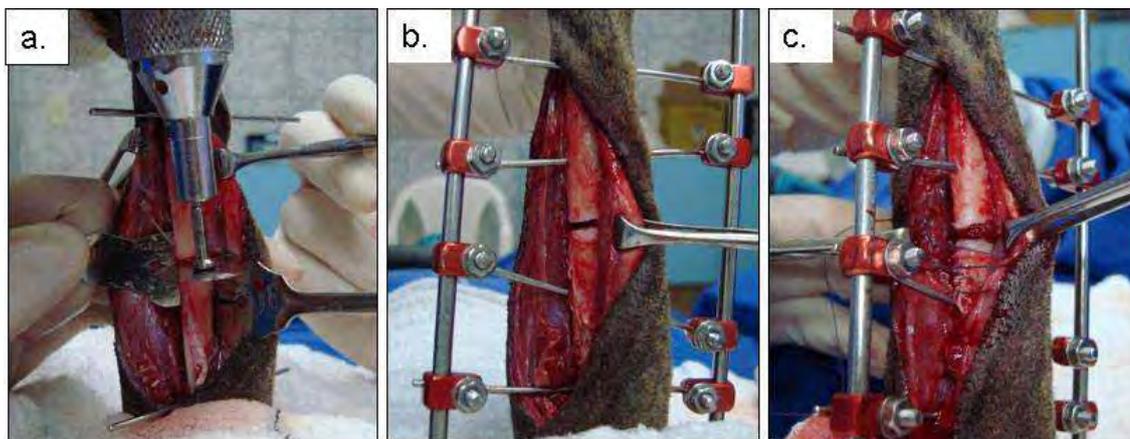


FIGURA 3- Procedimento cirúrgico de osteotomia do radio direito de cão pelo acesso medial. Em (a). osteotomia com disco diamantado após passagem dos dois primeiros pinos transfixados. Em (b). lacuna óssea de 2,0mm no terço médio da diáfise. Em (c). G-PRP com lacuna óssea preenchida. Legenda: PRP=Plasma Rico em Plaquetas.

Os animais operados foram mantidos em repouso relativo, acondicionados em canis de um metro quadrado, sendo soltos duas vezes ao dia para caminhadas controladas e banhos de sol. Os curativos foram realizados diariamente até os primeiros 15 dias de pós-operatório e em seguida a cada 48 horas até a retirada do implante. Era realizada limpeza da região de inserção dos pinos com iodo povidine tópico, em seguida uma gaze era envolvida ao redor dos quatro pinos próximo à pele embebida em iodo povidine. Ato contínuo toda a região e o fixador eram protegidos com atadura de crepe. Todos os cães foram mantidos com colar do tipo elisabetano a fim de se evitar automutilação.

Ao final do procedimento cirúrgico repetia-se o bloqueio do plexo braquial para complementação analgésica. Como medidas pós-operatórias utilizaram-se Cloridrato de Morfina (0,5mg/Kg, SC a cada quatro horas durante as primeiras 12 horas), seguido de Cloridrato de Tramadol²⁰ (4mg/Kg a cada oito horas, durante cinco dias), e Meloxicam²¹ (0,2mg/Kg a cada 24 horas, durante três dias) para promover analgesia. Ainda, antibioticoterapia com

²⁰ Cloridrato de Tramadol – Tramadon[®] 50mg/mL - Cristália

²¹ Meloxicam - Bioflac[®] 15mg/mL- Cristália

Cefalexina²² (30mg/Kg a cada 12 horas, durante dez dias) e curativos até a retirada dos implantes metálicos. O fixador externo não foi removido até que o defeito ósseo gerado pela biópsia estivesse cicatrizado.

Ao final de cada período previamente estabelecido (7 e 60 dias), foram realizadas as biópsias ósseas com os mesmos cuidados de tricotomia e antissepsia do membro torácico anteriormente operado. Com o animal devidamente posicionado, iniciou-se a abordagem cirúrgica por acesso cranial do rádio, colhendo-se, com o auxílio de tréfina²³ acoplada a caneta de baixa rotação, um fragmento ósseo de 4,0 mm de diâmetro (compreendendo-se 2,0 mm da área do “gap” de fratura e 2,0 mm da área íntegra). A Figura 4 ilustra o procedimento de biópsia pelo acesso cranial. O fragmento colhido foi depositado em recipiente contendo formol tamponado a 10% para posteriores análises histológica e imunoistoquímica. Após os procedimentos de biópsia, todos os animais receberam o PRP para preenchimento da falha óssea gerada a fim de acelerar o processo de cicatrização óssea e após total reabilitação clínica, todos os animais foram adotados.

²² Cefalexina – Genéricos Medley

²³ Tréfina® 4,0mm - Aragão

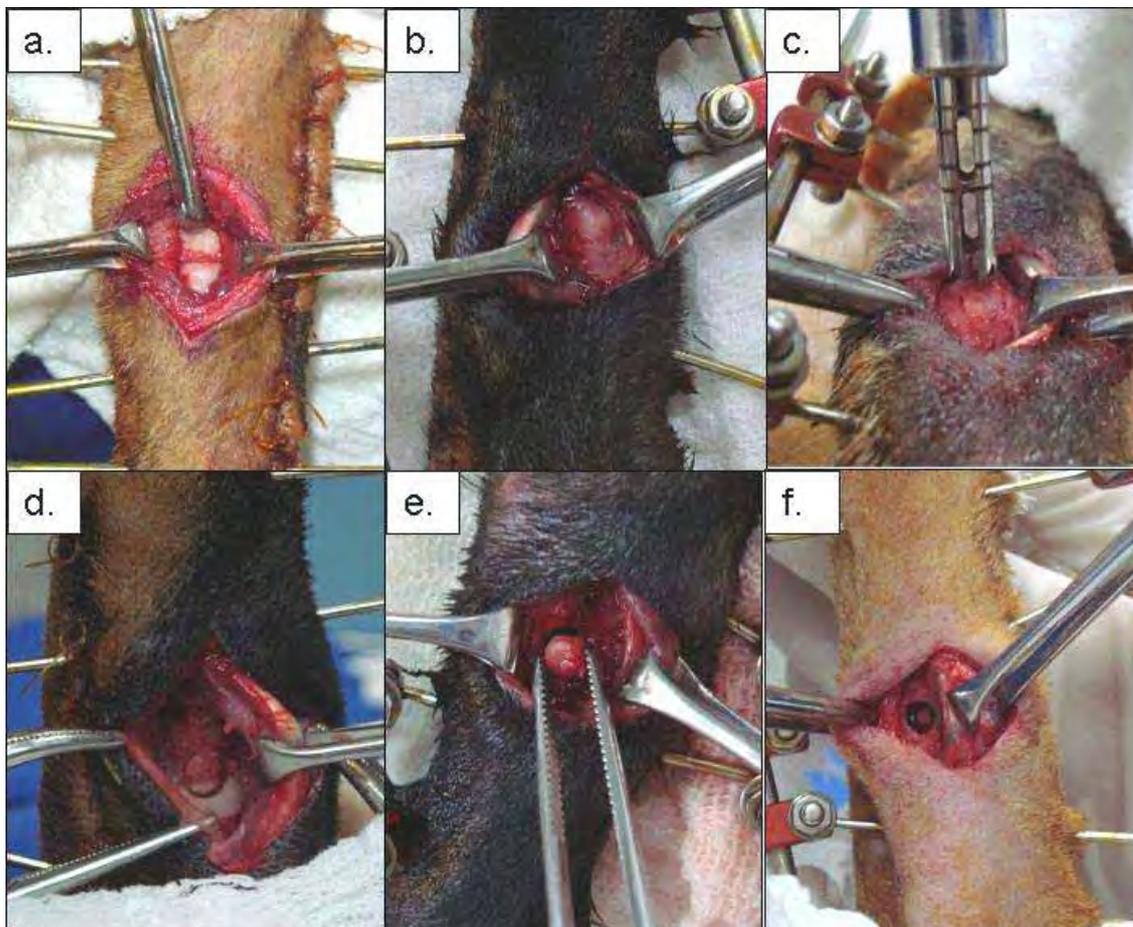


FIGURA 4- Imagens fotográficas da biópsia no foco de fratura pelo acesso cranial. Em (a). Aparência do foco de fratura aos sete dias de pós-operatório. Em (b). Aparência do foco de fratura aos 60 dias de pós-operatório. Em (c). Utilização da tréфина para obtenção do fragmento de biópsia. Em (d). Retirada do fragmento aos sete dias. Em (e). Retirada do fragmento aos 60 dias. Em (f). Aparência do foco de fratura após colheita do fragmento.

III.VI Avaliação clínica

O acompanhamento clínico foi realizado para avaliação da deambulação e apoio do membro. A estes parâmetros foi empregado um escore graduado de **0** a **3** sendo: **(0)** - impotência funcional; **(1)** - apoio do membro em estação, mas não sustenta o peso; **(2)** - apoio do membro com sustentação normal do peso,

mas apresenta claudicação leve; e **(3)** - deambulação normal. As avaliações foram realizadas diariamente, até o momento do retorno a função normal.

III.VII Avaliação radiográfica e densitométrica

Os exames radiográficos e densitométricos foram realizados no pós-operatório imediato, aos 14, 21, 28, 35, 45 e 60 dias de pós-operatório nos 11 animais que foram avaliados durante 60 dias para a realização de biópsia longa.

De forma subjetiva e duplo cego as radiografias foram examinadas adotando-se um **escore subjetivo** graduado de **0** a **6**, modificado segundo Wilson et al. (2006) onde: **(0)** - linha de fratura de 1,0 a 2,0 mm, sem proliferação óssea; **(1)** - linha de fratura de 1,0 a 2,0 mm, com proliferação óssea, sem calo em ponte; **(2)** - linha de fratura de 1,0 a 2,0 mm, com proliferação óssea, com calo em ponte; **(3)** - linha de fratura de < 1,0 mm, sem proliferação óssea; **(4)** - linha de fratura < 1,0 mm, com proliferação óssea, sem calo em ponte; **(5)** - linha de fratura < 1,0 mm, com proliferação óssea, com calo em ponte (união clínica) e **(6)** - ausência de linha de fratura.

Para realização da densitometria, as radiografias simples foram realizadas com a colocação de uma escada de alumínio paralela ao radio sobre o chassi radiográfico (Figura 5), e depois de reveladas foram escaneadas e analisadas com o auxílio de um programa computacional (Imaje J[®]). Cada um dos 11 degraus da escada, bem como o foco de fratura foram mensurados e em seguida submetidos a cálculos para obtenção dos valores da densitometria óssea em milímetros de alumínio (mmAl) (LOUZADA et al., 2001).

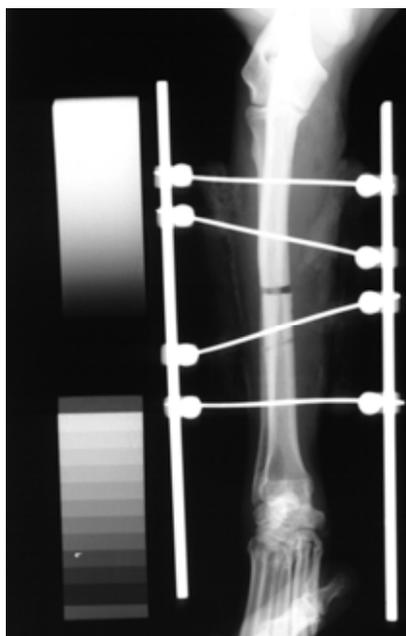


FIGURA 5- Imagem radiográfica do rádio de cão no pós-operatório imediato, ilustrando a colocação da escada de alumínio (abaixo) paralela ao osso, para realização da densitometria óssea.

III.VIII Avaliação histológica

As biopsias ósseas originaram um fragmento de 4,0 mm de diâmetro, contemplando 2,0 mm da área do foco de fratura e 2,0 mm da área íntegra com profundidade suficiente para atingir o canal medular conforme descrito anteriormente. Foram dez animais do GBC (sete dias) (G-controle n=5; G-PRP n=5) e 11 do GBL (aos 60 dias) (G-controle n=6; G-PRP n=5).

Os fragmentos foram fixados em formol tamponado 10% durante 72 horas e em seguida, iniciava-se o processo de descalcificação com solução 1:1 de ácido fórmico 40% e citrato de sódio 20%. O tempo de descalcificação foi variável de 60 a 150 dias, sendo concluído quando a amostra mostrava-se macia à palpação e sem resistência ao corte com navalha. Os fragmentos foram seccionados ao meio em direção longitudinal de modo a possibilitar a visualização do foco de fratura e suas interfaces com o tecido ósseo das extremidades do foco.

Com a finalização do processo de descalcificação os fragmentos passaram 24 horas em uma solução de sulfato de sódio 5% para tamponar os sais do descalcificador, e em seguida, foram lavados em água corrente durante 24 horas para retirada de todo o resquício do sulfato de sódio.

O tecido ósseo passou então por um processo de desidratação em concentrações crescentes de álcool e xilol até a finalização, quando foram incluídos em parafina. Seguiram-se os cortes histológicos em micrótomo automático (4,0 μ m) e o processamento rotineiro para coloração de Hematoxilina e Eosina (H.E.).

A avaliação histológica foi feita de maneira subjetiva e em duplo cego observando-se: hemorragia, presença de coágulo, neovascularização, fibroblastos, células cartilaginosas, osteoblastos, osteócitos, osteoclastos, infiltrado inflamatório e possíveis áreas de necrose.

III.IX Avaliação Imunoistoquímica dos fatores de crescimento (TGF- β e PDGF- β)

A partir dos fragmentos de biopsia incluídos em parafina foram realizados cortes próprios para avaliação imunoistoquímica. Após ensaios pilotos para diluição dos anticorpos, observou-se que a ideal era de 1:200.

Foi realizada desparafinização em xilol, seguida de hidratação em soluções decrescentes de álcool até a água. Ato contínuo, foi promovida recuperação antigênica com calor a partir da colocação de tampão citrato (pH 6,0). A inibição da peroxidase endógena foi conseguida com o uso de solução de peróxido de hidrogênio e álcool metílico (250mL H₂O₂ 20V/ 475mL álcool metílico). A inibição das ligações inespecíficas foi realizada utilizando-se leite em pó desnatado (6g/100mL de água destilada) seguida da incubação com anticorpo primário (TGF- β ²⁴ e PDGF-B²⁵) durante 12 horas (“over-night”).

²⁴ Fator de Crescimento Transformador Beta TGF- β 1 (V) sc-146[®] - Santa Cruz Biotechnology[®]

²⁵ Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas TGGF-B (N-30) sc-127[®] - Santa Cruz Biotechnology[®]

Após a incubação com o anticorpo primário, procedeu-se a lavagem das lâminas com PBS (pH=7,2) e seguida, procedeu-se a incubação com anticorpo de ligação²⁶, seguido de sucessivas lavagens (mínimo três de 15 minutos cada) com PBS e incubação com anticorpo secundário²⁷ por 30 minutos. Em seguida realizaram-se três lavagens sucessivas com PBS, para então efetuar a revelação com o substrato cromógeno DAB²⁸. Por fim, realizou-se a contra coloração com Hematoxilina Harris. A montagem das lâminas deu-se de forma rotineira. A observação da imunomarcação foi conduzida em microscópio de luz.

III.X Avaliação estatística

A análise estatística foi realizada Análise de Variância (ANOVA) com medidas repetidas e teste de Tukey para comparação de médias; o teste de Friedman seguido do teste de Dunn foi empregado para comparar os momentos para cada grupo e o teste de Mann-whitney para comparar os grupos em cada momento. O nível de significância adotado foi de 5% ($P < 0,05$), empregando-se o programa SAS (Statistical Analysis System).

²⁶ Anticorpo de Ligação - Biotinilado - DakoCytomation®

²⁷ Anticorpo secundário - Streptoavidina-peroxidase - DakoCytomation®

²⁸ Diaminobenzidina - DAB - DakoCytomation®)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os animais tratados atingiram o incremento mínimo necessário para que o PRP seja efetivo (Tabela 1), conforme recomendado por Marx (1998), demonstrando que a metodologia utilizada foi eficaz na concentração plaquetária corroborando com Dias et al. (2002) e Oyama et al. (2004) que utilizaram protocolos com rotação e tempo de centrifugação idênticos. Diferentemente de Obarrio et al. (2000) e Marx (2004) que utilizaram equipamentos de alto custo, neste trabalho foi utilizado centrífuga laboratorial comum de maneira simples e barata comprovando ser uma técnica de fácil aplicação na rotina clínica. Entretanto há a necessidade de uma contagem plaquetária basal normal contra-indicando a técnica em cães trombocitopênicos (BARBOSA et al., 2008). A Tabela 1 mostra os valores da contagem de plaquetas basal e do Plasma Rico em Plaquetas dos cães que o receberam.

Tabela 1 - Valores da contagem de plaquetas basal e do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) dos cães do grupo tratado, com seu respectivo percentual de concentração. Araçatuba, 2010

Contagem de plaquetas/ μ L no grupo tratado (G-PRP)			
Grupo tratado			
Animal	Basal	PRP	Concentração
1	202.500	875.000	432%
2	275.000	1.445.000	525%
3	172.500	1.082.500	628%
4	187.500	1.540.000	821%
5	310.000	1.047.500	338%
6	162.500	1.310.000	806%
7	360.000	1.512.500	420%
8	190.000	1.067.500	562%
9	175.000	1.125.000	643%
10	202.500	1.392.500	688%

A gelificação e ativação do PRP foram obtidas adequadamente com o uso isolado de cloreto de cálcio a 10% semelhante ao realizado por Wilson et al. (2006). Entretanto Sanchez et al. (2003) utilizaram trombina bovina e relataram desenvolvimento de anticorpos contra fatores de coagulação, ao passo que Silva et al. (2009) usaram cloreto de cálcio e tromboplastina (soluplastin[®]) observando reação do tipo corpo estranho que pode ter influenciado negativamente na ação do PRP. Barbosa et al. (2008) utilizaram soluplastin[®] sem descrição de reações adversas.

A preparação do PRP ocorreu simultaneamente ao procedimento cirúrgico para assegurar que pudesse ser utilizado logo após sua obtenção, uma vez que passadas três horas da centrifugação apenas o PDGF mantém sua concentração. O TGF-beta decresce consideravelmente (RUTKOWSKI et al., 2008).

Referente à avaliação clínica, todos os pacientes, independente do grupo, apresentaram no primeiro dia de pós-operatório escore 2 (apoio do membro com sustentação normal do peso, mas com claudicação leve); evoluindo para 3 (deambulação normal) no terceiro dia. O apoio precoce do membro está relacionado à escolha do método de fixação (PIERMATTEI; FLO, 1999), bem como a integridade da ulna e analgesia adequada, e não ao uso do PRP. Ressalta-se, ainda, que o apoio do membro no período pós-operatório favorece o processo de cicatrização óssea e desta forma, esta característica do implante foi favorável aos resultados. Durante todo o período pós-operatório não houve infecção nos pinos, nem tão pouco afrouxamento dos mesmos mantendo estabilidade do foco de fratura.

No que tange a avaliação radiográfica houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos a partir do 28º dia de pós-operatório (M28) (Tabela 2), corroborando com Wilson et al. (2006) que observaram diferença entre grupos em falhas ósseas de coelhos tratados com PRP. Em contrapartida, Marx et al. (1998) em estudos de reconstrução mandibular e Silva et al. (2007) que avaliaram o uso do PRP associado a hidroxiapatita em falhas ósseas de

radio de cães fixados com placas e parafusos, não observaram diferença entre os grupos.

Tabela 2 - Mediana, valores mínimo e máximo do escore radiográfico do radio de cães, segundo os grupos em cada momento de avaliação. Araçatuba, 2010

Momento (dias)	G-controle		G- PRP	
	Md	Min – Máx	Md	Min – Máx
M0	0b	0 – 0	0 b	0 – 0
M14	1,5	0 – 3	3 b	0 – 3
M21	3a	1 – 4	3	1 – 4
M28	1 B	1 – 3	4 A	1 – 4
M35	1 B	1 – 3	4 A	4 – 4
M45	1 B	1 – 4	4 A	4 – 4
M60	1 B	1 – 5	5 aA	4 – 5

Medianas seguidas de letra distinta minúscula na coluna e maiúscula na linha diferem entre si ($P < 0,05$).

O método de fixação externa utilizado permite maior formação de calo ósseo periosteal e maior quantidade de micro movimentos quando comparado às placas e parafusos (PIERMATTEI; FLO, 1999), o que justifica a aparência radiográfica dos raios do G-controle que apresentaram aumento da espessura da linha de fratura ao longo do tempo de pós-operatório. Provavelmente os vasos sanguíneos não estavam em número e organização suficientes para promover um ambiente oxigenado a permitir, desta forma, a diferenciação de osteoblastos para cicatrização. Observou-se reabsorção nas extremidades do foco de fratura caracterizando uma união óssea tardia. Entretanto, o G-PRP apresentou uma redução contínua da linha de fratura com organização e união do calo ósseo, indicando que o PRP aumentou a vascularização e celularidade permitindo deposição de matriz mineral de maneira mais precoce (Figura 6).

No que se refere à avaliação subjetiva da imagem radiográfica, 80% (4/5) dos cães tratados atingiram união clínica com maior radiopacidade (Figura 6) discordando de Silva et al. (2009) que apontaram semelhança entre grupo PRP e grupo controle no tratamento de falhas ósseas em crânios de coelhos. A discordância de resultados deve-se provavelmente ao tipo de osso estudado nos dois trabalhos, uma vez que os ossos do crânio não possuem perióstio e tem um processo cicatricial mais lento e sem formação de calo, além de não sofrerem impacto durante a consolidação.

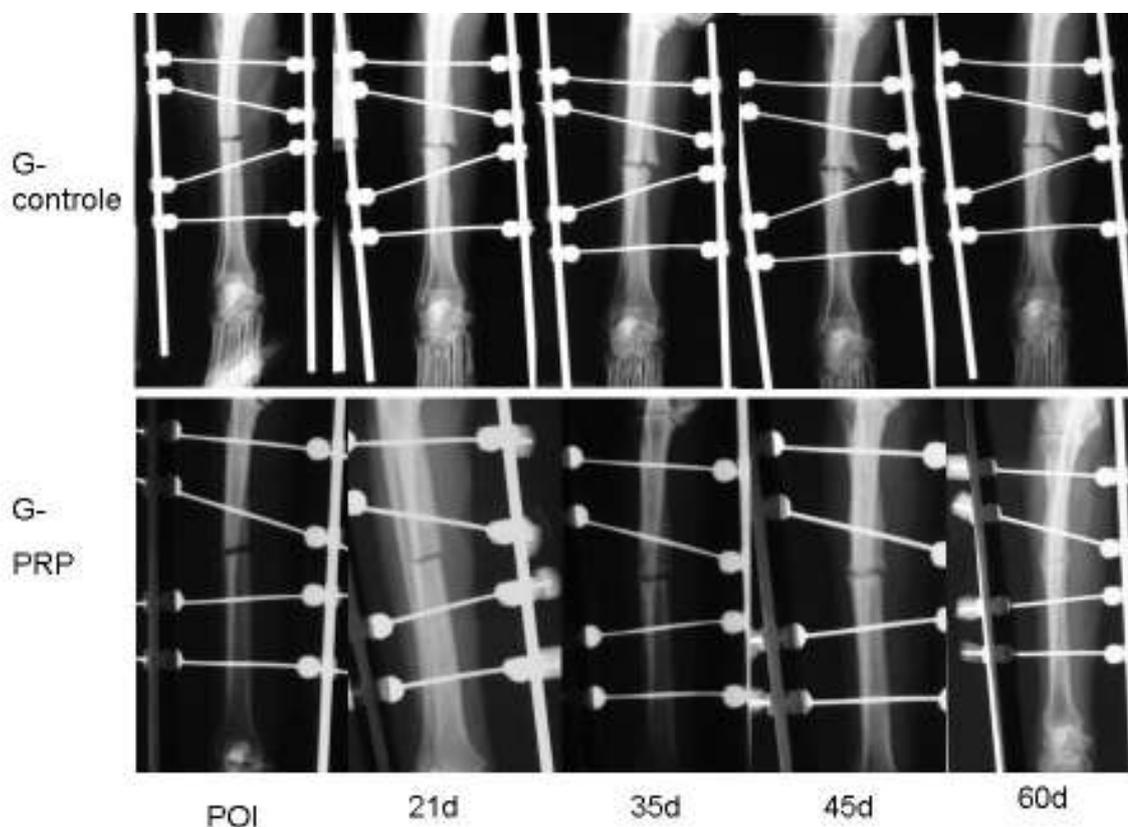


FIGURA 6- Imagens radiográficas da evolução de um animal do G-Control (acima na figura) e de um do G-PRP (abaixo na figura) desde o pós-operatório imediato até os 60 dias de pós-operatório. Observa-se uma contínua redução da linha de fratura apenas no G-PRP.

A avaliação densitométrica demonstrou diferença estatística significativa entre os grupos nos momentos M45 e M60 (Tabela 3). Silva et al. (2007) não encontraram diferença entre os grupos mesmo aos 60 dias de pós-operatório, entretanto, o método de fixação utilizado (placa e parafusos) induz ao aumento no tempo de consolidação e ausência de calo periosteal exuberante. Deste modo, o método de fixação aqui empregado pode ter influenciado na diferença dos resultados encontrados.

Tabela 3 - Média (\bar{x}) e erro padrão da média (EPM) dos valores densitométricos, em mmAl, do radio dos cães segundo os grupos em cada momento de avaliação. Araçatuba, 2010

Momento (dias)	Valores densitométricos ($\bar{x} \pm \text{EPM}$)	
	G-controle	G-PRP
M0	5,04 \pm 0,42	5,18 \pm 0,21 b
M14	5,69 \pm 0,23	5,54 \pm 0,15 b
M21	5,27 \pm 0,24	5,54 \pm 0,22 b
M28	5,44 \pm 0,19	5,56 \pm 0,14 b
M35	5,16 \pm 0,25	5,80 \pm 0,34
M45	5,28 \pm 0,13 B	5,84 \pm 0,09 A
M60	5,19 \pm 0,19 B	6,41 \pm 0,18 aA

Médias seguidas de letra distintas minúscula na coluna e maiúscula na linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Da mesma forma ao observado na avaliação radiográfica, os valores densitométricos não apresentaram diferença entre os momentos do G-controle, no entanto, tais valores foram significativamente diferentes entre M0 e M60 no G-PRP, atestando que o PRP aumentou a deposição óssea no foco de fratura, elevando os valores de densidade mineral óssea. O mesmo fora observado por Silva et al. (2007) que obtiveram maior média de densidade óssea no grupo tratado aos 45 dias, porém, sem significância estatística.

O PRP no foco de fratura possibilitou maior estímulo a angiogênese e mitogênese devido à ação dos seus fatores de crescimento, que possibilitaram

um processo de cicatrização superior no G-PRP em comparação ao G-Controle em que observamos união óssea tardia, com intensa proliferação de calo periosteal sem união das extremidades (Figura 7).



FIGURA 7- Imagens radiográficas de 60 dias de pós-operatório sendo: (a). animal do G-PRP com união clínica e (b). animal do G-Controle com visível linha de fratura, proliferação periosteal, sem união de calo em ponte.

A superioridade do G-PRP em relação ao G-controle deveu-se provavelmente a uma precoce e maior vascularização, que estimularam a proliferação celular no foco de fratura e facilitaram a deposição de matriz óssea, com consequente união clínica em 80% (4/5) dos animais do G-PRP aos 60 dias mesmo em fraturas com lacunas ósseas.

Sob o ponto de vista histológico, aos 60 dias (GBL) do G-PRP foi observado osso recém formado, sistemas de Harvers organizados e em formação, áreas de remodelação óssea e escassa quantidade de tecido cartilaginoso, (Figura 8). O mesmo fora descrito por Wilson et al. (2006) que observaram em fraturas de coelhos, intensa formação óssea no grupo que recebeu o PRP, caracterizada por formação de trabéculas ósseas aos 30 dias, mesmo sem a utilização de enxertos associados. Gerard et al. (2007) também observaram histologicamente diferença significativa no número de osteoblastos

e osteoclastos no grupo PRP, entretanto, o utilizaram em associação com enxerto ósseo esponjosos.

Nos animais do G-Controle houve união óssea tardia, o que já era esperado devido à lacuna de fratura provocada durante a osteotomia (PIERMATTEI; FLO, 1999; JACKSON; MILLIS, 2007). Foi observado tecido cartilaginoso, poucos vasos sanguíneos na área da linha das fraturas, pequenas áreas de tecido ósseo imaturo e ausência do sistema de Harvers (Figura 8). Isto pode ter ocorrido provavelmente pela ausência do PRP na lacuna óssea.

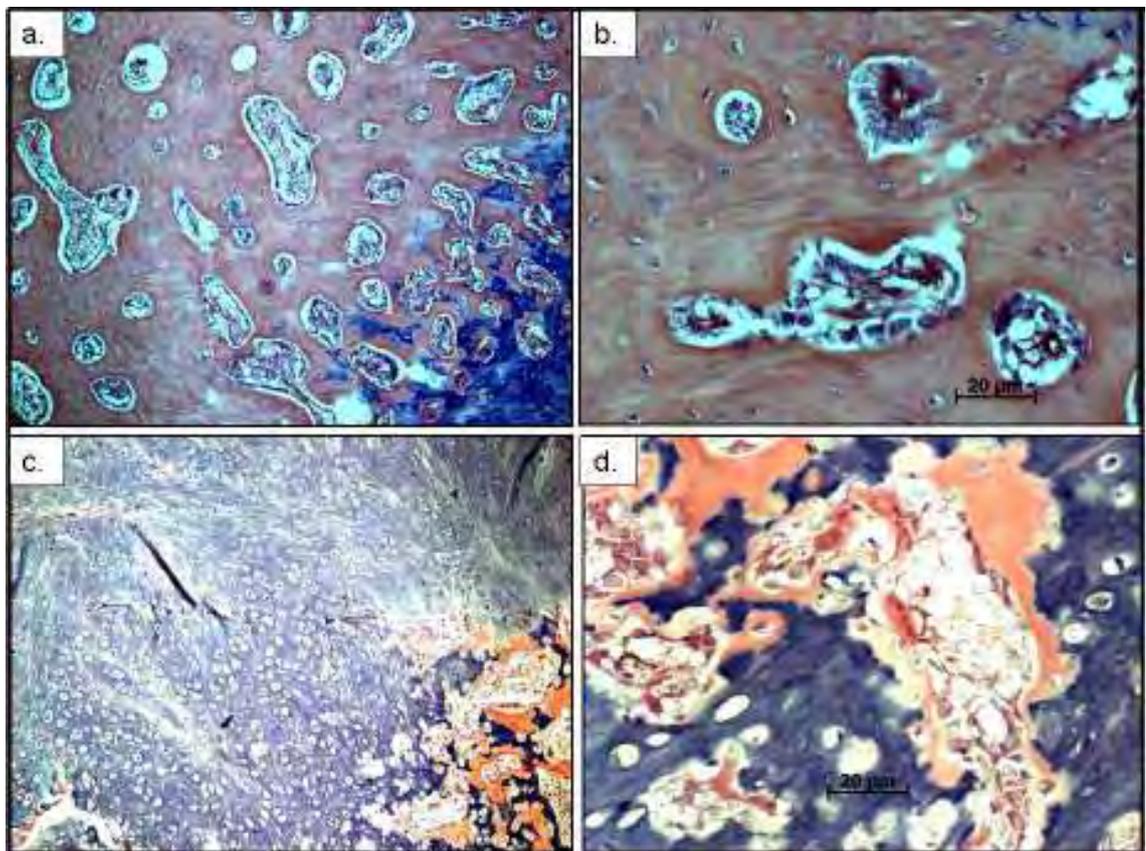


FIGURA 8- Fotomicrografia. Corte histológico do foco de fratura do radio de cão aos 60 dias de pós-operatório. Em (a) e (b). G-PRP com maior formação e organização do tecido ósseo, comparado a (c) e (d). G-Controle, evidenciando tecido cartilaginoso em reabsorção e início de formação óssea. Coloração hematoxilina-eosina. Em a e c. (10X). Legenda: PRP=Plasma Rico em Plaquetas.

Em ambos os grupos promoveu-se a mesma intensidade de lesão aos tecidos moles para que não houvesse interferência na formação da vascularização extra-óssea, que é reconhecida como um evento importante para o suprimento sanguíneo no processo inicial de cicatrização da fratura (HULSE; JOHNSON, 2002).

Na avaliação histológica de sete dias (GBC) observou-se no G-PRP uma maior proliferação celular com vasos sanguíneos recém formados, enquanto no G-Controle foram observados tecido de granulação e fibroso e alguns vasos (Figura 9). A intensa vascularização inicial no G-PRP ocorreu provavelmente da ação dos fatores de crescimento na angiogênese, quimiotaxia e proliferação celular (MARX et al., 1998; GARG, 1999).

O PRP no foco de fratura promoveu suporte mecânico para vascularização, uma vez que facilitou a passagem dos vasos sanguíneos entre as extremidades ósseas, caracterizando um evento conhecido como osteocondução (HULSE; HYMAN, 2007). O mesmo fora reportado por Marx et al. (1998), os quais relataram a presença de capilares de permeio ao enxerto a partir do terceiro dia após a injúria. Desta forma, a ação inicial do PRP foi fundamental para a continuidade do processo de consolidação óssea, pois promoveu a formação de um microambiente favorável à proliferação de tecido ósseo, mesmo com uma lacuna de fratura de 2,0mm.

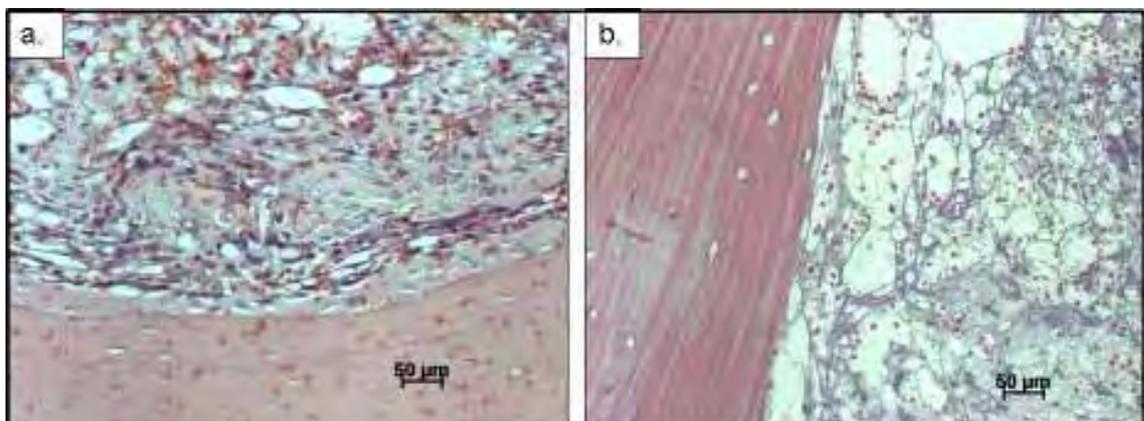


FIGURA 9- Fotomicrografia. Corte histológico do foco de fratura do radio de cão aos sete dias de pós-operatório. **(a).** G-PRP com maior proliferação celular e vascular, comparado a **(b).** G-Controle. Coloração hematoxilina-eosina. Legenda: PRP=Plasma Rico em Plaquetas.

O estudo imunoistoquímico revelou que aos sete dias de fratura (GBC), houve a expressão de ambos os fatores de crescimento estudados (PDGF-B e TGF- β) nos dois grupos. Os mesmos também podem ser encontrados em processos naturais de cicatrização de fratura sem adição de enxertos (ANDREW et al., 1995). Entretanto, nas amostras do G-PRP a expressão de ambos os fatores foi mais intensa do que a encontrada no G-Controle (MARX et al., 1998) (Figuras 10 e 11).

Houve marcação em osteoblastos, células mesenquimais indiferenciadas e células endoteliais dos vasos sanguíneos neoformados, como também observado por Andrew et al. (1995) e Marx et al. (1998).

Aos sete dias de fratura pode-se observar que a marcação foi mais intensa no G-PRP, principalmente quando se tratava do Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF- β) (Figura 10). Este fator de crescimento tem sua expressão estimulada pelo PDGF-B, e é importante na proliferação de fibroblastos (MILLIS, 1999), fato este que pode ter destacado sua marcação em uma análise comparativa, pois nesta fase observava-se maior quantidade de tecido fibroso.

A marcação do PDGF-B no G-Controle foi discreta, porém a mesma foi evidente no G-PRP (Figura 11). Este fator de crescimento é o primeiro a ser liberado dentre os demais no foco de fratura (GARG, 1999), o que justifica o seu declínio aos sete dias sem a adição do PRP.

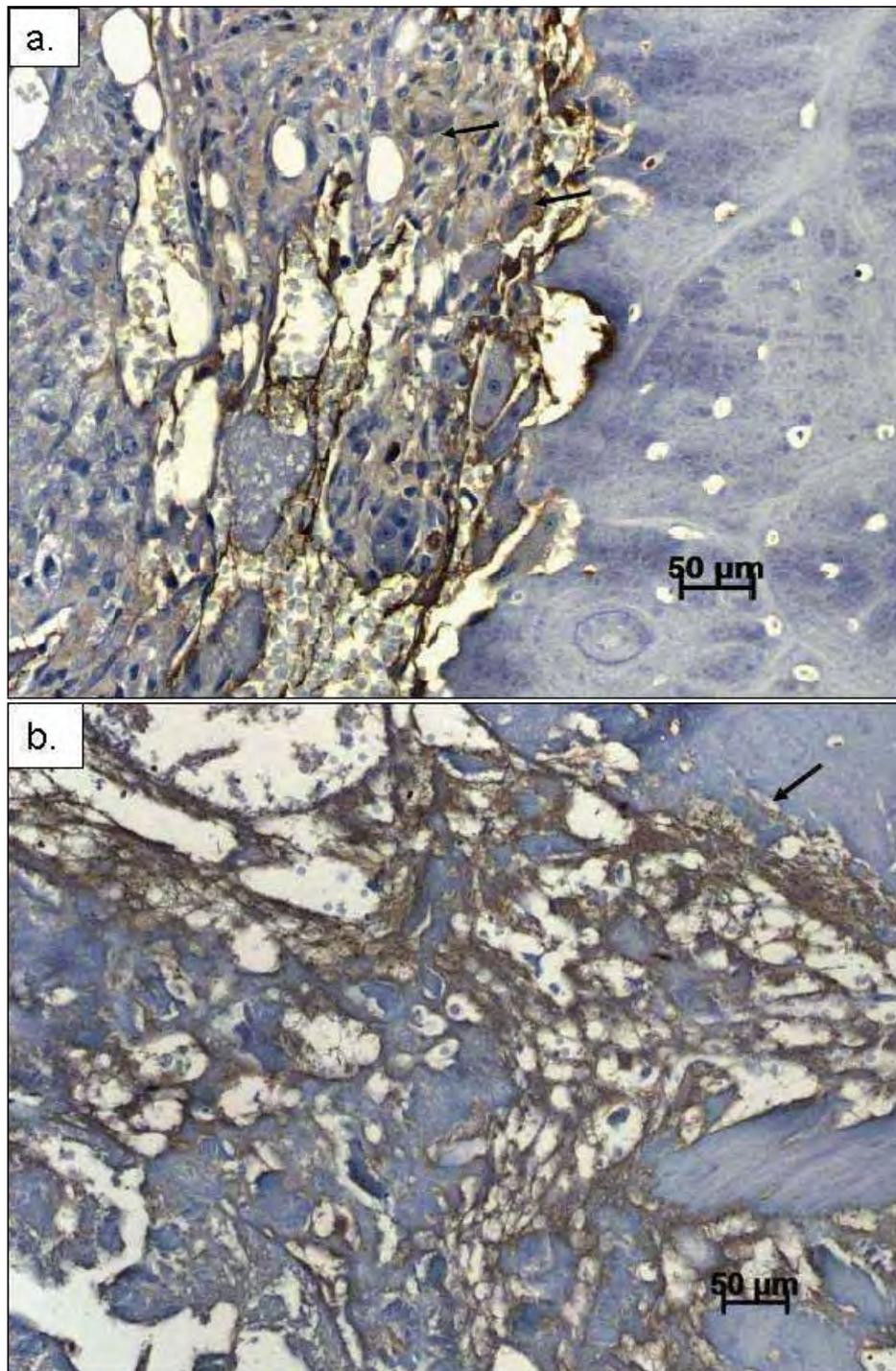


FIGURA 10- Fotomicrografia. Corte histológico do foco de fratura do radio de cão aos sete dias de pós-operatório. **(a).** G-PRP mostrando imunorreatividade do TGF- β no citoplasma de osteoblastos, células mesenquimais e endoteliais (setas) **(b).** G-Controlé exibe marcação difusa no coágulo em organização (seta). Kit LSAB[®]/Diaminobenzidina contracoloração hematoxilina de Harris. Legenda: PRP=Plasma Rico em Plaquetas.

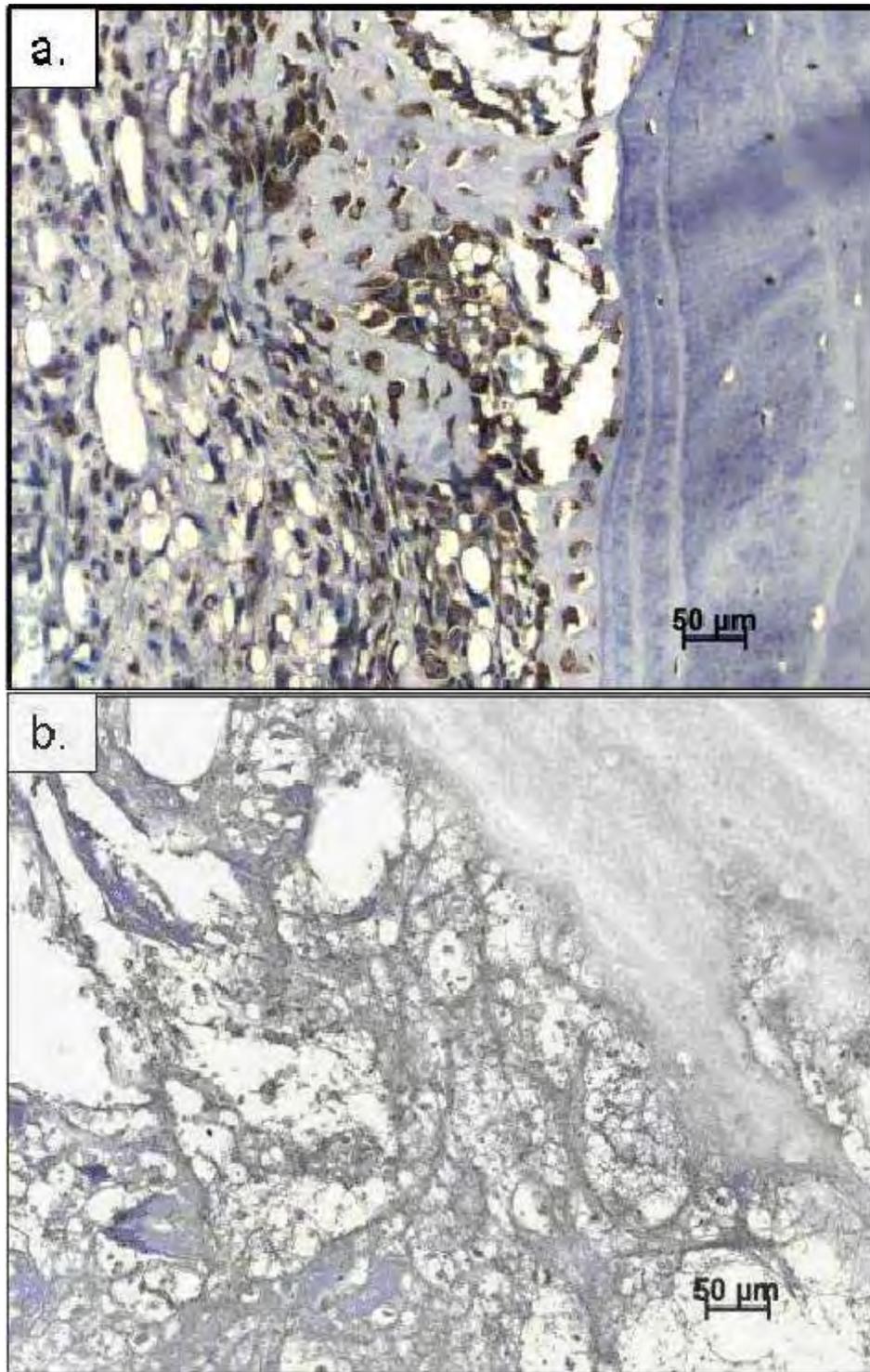


FIGURA 11- Fotomicrografia. Corte histológico do foco de fratura do radio de cão aos sete dias de pós-operatório. **(a)**. G-PRP mostrando imunorreatividade do PDGF- β no citoplasma de osteoblastos, células mesenquimais e endoteliais **(b)**. G-Control quase não exibe marcação. Kit LSAB[®]/diaminobenzidina contracoloração hematoxilina de Harris. Legenda: PRP=Plasma Rico em Plaquetas.

Aos 60 dias de fratura (GBL) houve positividade de ambos os anticorpos, discordando de Marx et al. (1998) que relataram apenas a presença de TGF- β em no máximo aos 45 dias após fratura. Entretanto, vale ressaltar que em nosso estudo houve a formação de uma lacuna óssea com o intuito de retardar o processo cicatricial, e por este motivo, mesmo ao 60º dia pós-fratura ainda foi possível observar áreas de atividade osteoblástica, justificando a marcação dos fatores de crescimento estudados (Figura 12 e 13).

Da mesma forma que aos sete dias de fratura, aos 60 dias a expressão do PDGF-B e TGF- β mais intensa no G-PRP, que estavam presentes sempre próximos às áreas de atividade osteoblástica e perivasculares. No entanto, o PDGF-B encontrava-se discretamente marcado, atestando conforme Marx et al. (1998), que o mesmo age nas fases mais iniciais da cicatrização, enquanto, o TGF- β exerce maior ação na fase de atividade osteoblástica na ossificação endocondral, justificando a sua presença aos 60 dias de fratura deste estudo (Figura 12 e 13).

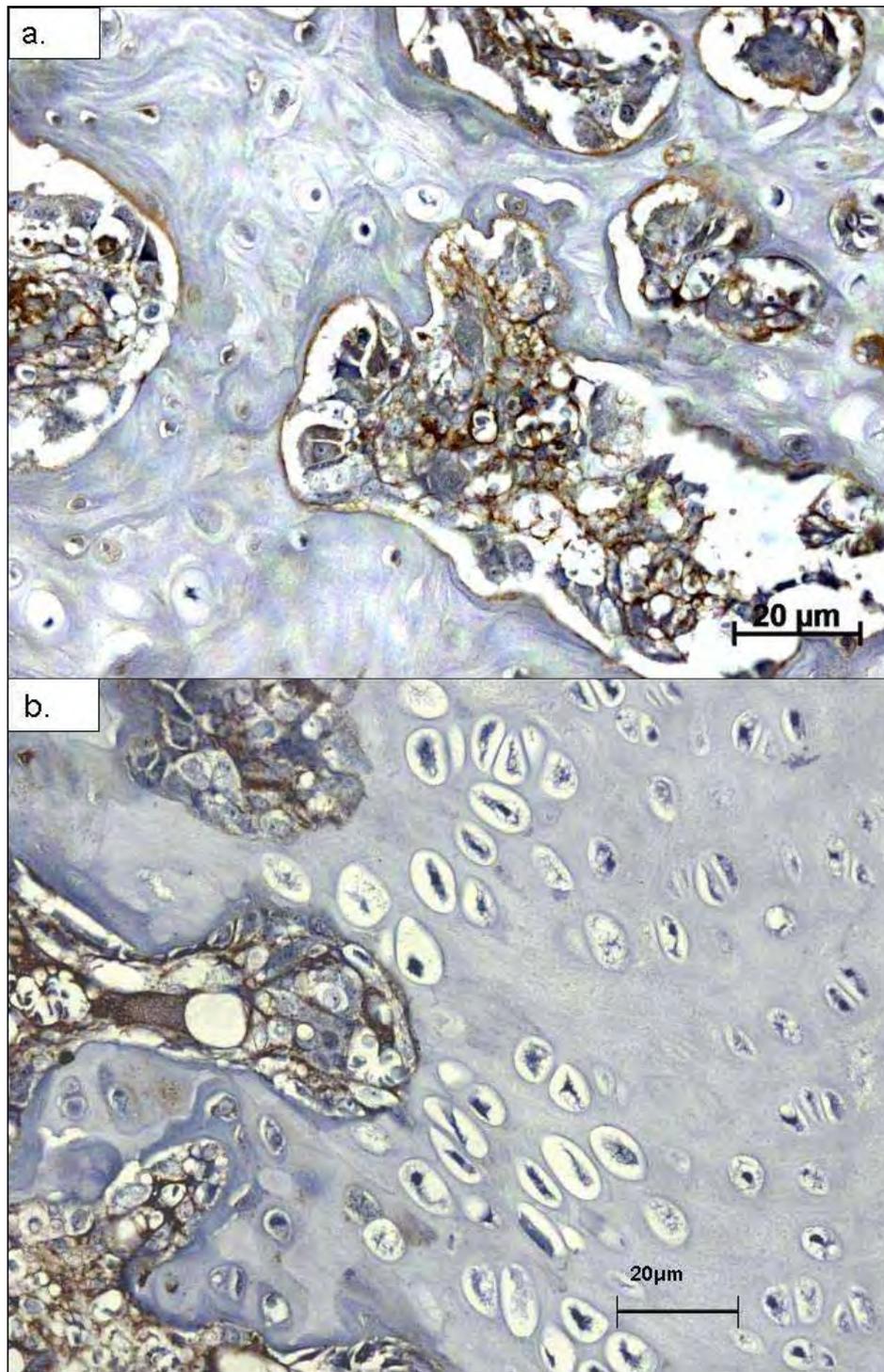


FIGURA 12- Fotomicrografia. Corte histológico do foco de fratura do rádio de cão aos 60 dias de pós-operatório mostrando imunoreatividade do TGF- β no citoplasma de osteoblastos e células endoteliais, de maneira mais intensa em (a). G-PRP, do que em (b). G-Control. Kit LSAB[®]/diaminobenzidina contracoloração hematoxilina de Harris. Legenda: PRP=Plasma Rico em Plaquetas.

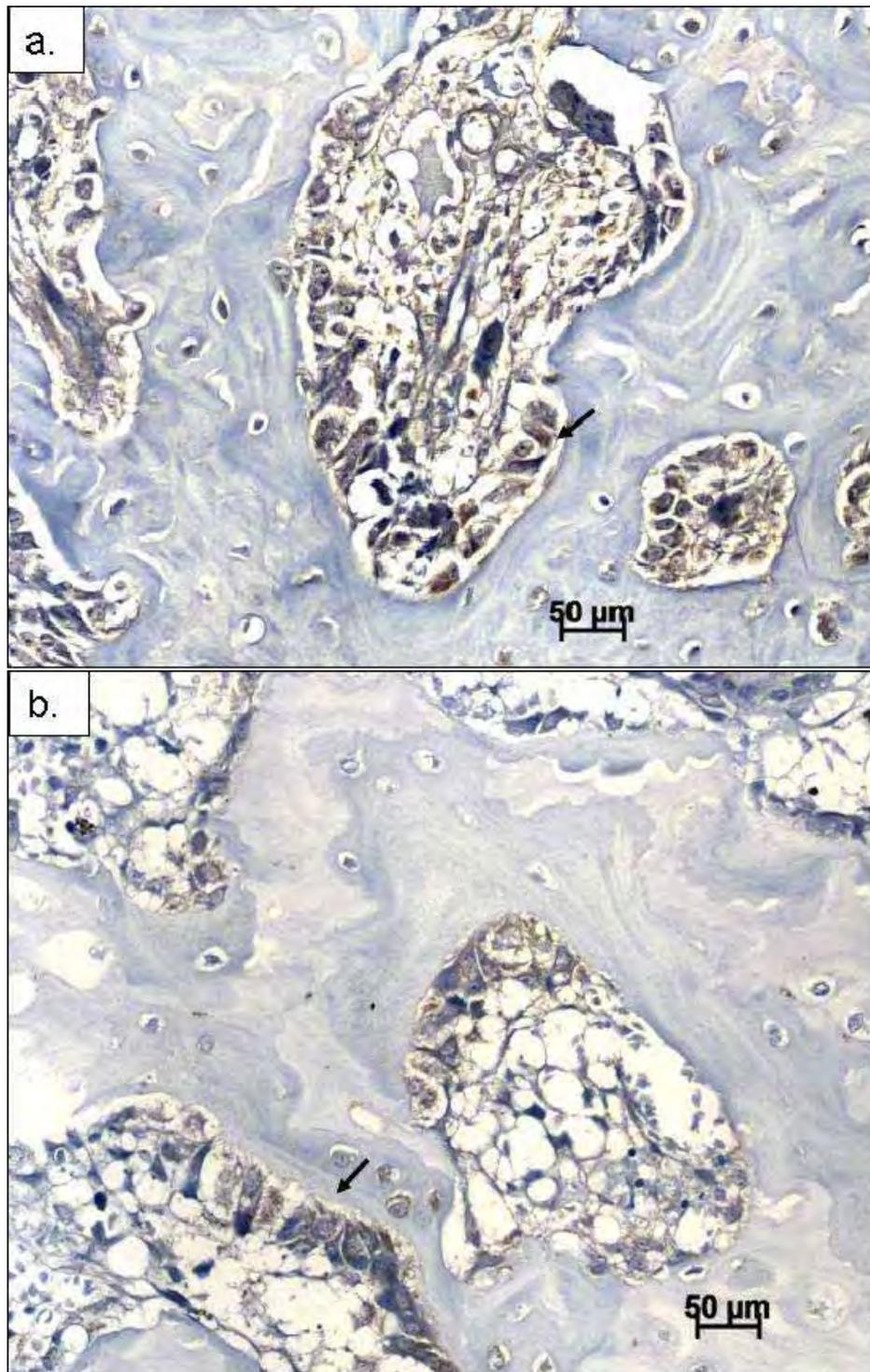


FIGURA 13- Fotomicrografia. Corte histológico do foco de fratura do radio de cão aos 60 dias de pós-operatório mostrando imunorreatividade do PDGF-B no citoplasma de osteoblastos e células endoteliais, de maneira mais intensa em (a). G-PRP, do que em (b). G-Control. Kit LSAB[®]/diaminobenzidina contracoloração hematoxilina de Harris. Legenda: PRP=Plasma Rico em Plaquetas.

CONCLUSÕES

V CONCLUSÕES

Com base nos resultados e nas condições de uma fratura com lacuna de 2,0mm e tratada com fixador esquelético externo, conclui-se que:

1. O PRP pode ser utilizado como terapia adjuvante ao tratamento, pois os dados radiográficos, densitométricos e histológicos sustentam esta afirmação;
2. Os fatores de crescimento contidos no PRP (PDGF-B e TGF- β) exercem um efeito benéfico ao foco de fratura, pois os mesmos, embora expressos em ambos os grupos (com e sem PRP) foram mais evidentes no G-PRP, pois geraram intensa angiogênese, que favoreceu o processo de consolidação óssea.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. ANDREW, J. G.; HOYLAND, J. A.; FREEMONT, A. J.; MARSH, D. R. Platelet-Derived Growth factor expression in normally healing human fractures. **Bone**, v.16, n.4, p.455-460, 1995.
2. BARBOSA, A. L. T.; DEL CARLO, R. J.; GOMES, H. C.; OLIVEIRA, A. C.; MONTEIRO, B. S. & DEL CARLO, B. N. Plasma rico em plaquetas para reparação de falhas ósseas em cães. **Ciência Rural**, v.38, n.5, p.1335-1340, 2008.
3. BOUDRIEAU, R. J. Fraturas do rádio e da ulna. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 3.ed. São Paulo: Manole, 2007. v.2, cap. 139, p. 1953-1973.
4. BRAGA-SILVA, J.; GEHLE, D.; ROMAN, J. A.; MENTA, C.; ATKINSON, E. A.; MACHADO, D. C.; VIEZZER, C.; BARBOSA, G. L.; BAES, V. W.; SILVA, V. D.; COSTA, J. C. Efeitos das células tronco adultas de medula óssea e do plasma rico em plaquetas na regeneração e recuperação funcional nervosa em um modelo de defeito agudo em nervo periférico em rato. **Acta ortopédica brasileira**, v.14, n.5, p.237-275, 2006.
5. CAMARGO, P. M.; LEKOVIC, V.; WEINLAENDER, M.; VASILIC, N.; MADZAREVIC, M.; KENNEY, E. B. Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. **Journal of Periodontal Research**, v.37, n. 4, p.300-306, 2002.
6. CANALIS, E.; McCARTHY, T. L.; CENTRELLA, M. Growth factors and cytokines in bone cell metabolism. **Annual Review of Medicine**, v. 42, p. 17-24, 1991.
7. DIAS, E. C. L. C. M.; BARROS, M. A. A.; ANDRADE, R. Plasma Rico em Plaquetas. **RBP: Revista Brasileira de Implantodontia Prótese Sobre Implante**. v.8, n.3, p.36-38, 2002.

8. FERREIRA, C. F.; GOMES, M. C. C.; SCARSO-FILHO, J.; GRANJEIRO, J. M.; SIMÕES C. M. O.; MAGINI, R. S. Platelet-rich plasma influence on human osteoblasts growth. **Clinical Oral Implants Research**, v. 16, n.4, p.456-460, 2005.
9. GARG, A. K. The future role of growth factors in bone grafting. **Dental Implantology Update**, v. 10, n.1, p.5-7, Jan. 1999.
10. GERARD, D.; CARLSON, E. R.; GOTCHER, J. E.; JACOBS, M. Effects of platelet-rich plasma on the healing of autologous bone grafted mandibular defects in dog. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.64, n.3, p.443-451, 2006.
11. GERARD, D.; CARLSON, E. R.; GOTCHER, J. E.; JACOBS, M. Effects of platelet-rich plasma at the cellular level on healing of autologous bone-grafted mandibular defects in dogs. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.65, n.4, p.721-727, 2007.
12. HENDERSON J. L.; CUPP C. L.; ROSS E. V.; SHICK P. C.; KEEFE M. A.; WESTER D. C.; HANNON T.; MCCONNELL D. The effects of autologous platelet gel on wound healing. **Ear, Nose and Throat Journal**, v.82, n.8, p.598-602, 2003.
13. HULSE, D.; HYMAN, B. Biomecânica e biologia das fraturas. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 3.ed, São Paulo: Manole, 2007. v.2, cap.126, p. 1785-1792.
14. HULSE, D. A.; JOHNSON, A. L. Fundamentos da cirurgia ortopédica e tratamento de fraturas. In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2002. cap. 28, p. 787-853.
15. JACKSON A.M.; MILLIS D.L. Uniões tardias, não-uniões e má-uniões. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 3.ed, São Paulo: Manole, 2007. v.2, cap.131, p. 1849-1861.

16. JACKSON, L. C.; PACCHIANA, P. D. Common complications of fracture repair. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 19, n.3, p. 168-79, 2004.
17. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10.ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.136-153.
18. LOUZADA, M. J. Q.; NOGUEIRA, G. P.; GARCIA JUNIOR, I. R.; CARVALHO, C. A.; PAULA, G. A. Densitometria óptica radiográfica em análise de densidade óssea de mandíbulas de coelhos castrados. **FOL Faculdade de Odontologia de Lins/UNIMEP**, v.13, n.1, p.33-38, 2001.
19. MACHADO, P. R. M.; PUERTAS, E. B.; TAGA, E.; NONOSE, N. Utilização da densitometria óssea como método de avaliação dos resultados da utilização de BMP bovina em artrodese de coluna em coelhos. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 13, n.1, p. 42-45, 2005.
20. MARCELLIN-LITTLE, D. J. Fixação esquelética externa. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 3^oed, São Paulo: Manole, 2007. v.2, cap.129, p. 1818-11834.
21. MARCHESANO, Luiz Henrique. **Comportamento de marcadores séricos de formação e reabsorção óssea após enxerto autógeno em fissura alveolar congênita: sem e com plasma rico em plaquetas**. Tese (Doutor em Análises Clínicas Área de Análises Clínicas) /Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2005.
22. MARKOPOULOU, C. E.; MARKOPOULOS, P.; DEREKA, X. E.; PEPELASSI, E.; VROTSOS, I.A. Effect of homologous PRP on proliferation of human periodontally affected osteoblasts. In vitro preliminary study. Report of a case. **Journal Musculoskeletal Neuronal Interactions**, v.9, n.3, p.167-172, 2009.

23. MARTINEZ, S. A.; WALKER, T. Bone grafts. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v.29, n.5, p.1207-1219, 1999.
24. MARX, R. E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. **Journal Oral Maxillofacial Surgery**, v.62, n.4, p.489-496, 2004.
25. MARX, R. E. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? **Implant Dentistry**, v.10, n.4, p.225-228, 2001.
26. MARX, R. E.; CARLSON, E. R.; EICHSTAEDT, R. M.; SCHIMMELE, S. R.; STRAUSS, J. E.; GEORGEFF K. R. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics**, v.85, n.6, p.638-646, 1998.
27. MASTROCINQUE, S.; TATARUNAS, A. C.; ZERWES, M. B. C.; QUEIROZ, G. F.; SCHMAEDECKE, A.; ACETO, M.; FERRIGNO, C. R. A. Proteínas ósseas morfogenéticas e outros fatores de crescimento ósseo. **Ciências Agrárias**, Londrina. v.25, n.2, p.139-150, 2004.
28. MEDEIROS JUNIOR, L. C.; AJZEN, S. A.; FERNANDES, A. L. Fratura de membros em cães e gatos: sinais clínicos e acompanhamento radiográfico. **Nosso Clínico**, v.7, n.40, p.28-34, 2004.
29. MILLIS, D. L. Bone end non-bone-derived growth factors and effects on bone healing. **The Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice**, v.29, n.5, p.1221-1245, 1999.
30. NORDSLETTEN, L. Recent developments in the use of bone morphogenetic protein in orthopedic trauma surgery. **Current Medical Research and Opinion**, v.22, suppl1, p.13-17, 2006.
31. OBARRIO, J. J.; ARAÚZ-DUTARI, J. I.; CHAMBERLAIN, T. D.; CROSTON, A. The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology: case reports. **International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v.20, n.5, p.487-497, 2000.

32. OSIPENKOVA, T. K. Histomorphology of healing of fractures, splits, and defects in the cranial bones. **Sudebno Meditsinskaia Ekspertiza**, v. 47, n. 2, p. 3-4, 2004.
33. OYAMA, T.; NISHOMOTO, S. TSUGAWA, T.; SHIMIZU, F. Efficacy of platelet-rich plasma in alveolar bone grafting. **American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**. v.62, p.555-558, 2004.
34. PAGLIOSA, G. M.; ALVES, G. E. S. Considerações sobre a obtenção e o uso do plasma rico em plaquetas e das células mesenquimais indiferenciadas em enxertos ósseos. **Ciência Rural**, v.37, n.4, p.1202-1205, 2007.
35. PARALKAR, V. M.; BOROVECKI, F.; KE, H. Z.; CAMERON, K. O.; LEFKER, B.; GRASSER, W. A.; OWEN, T. A.; LI, M.; DASILVA-JARDINE, P.; ZHOU, M.; DUNN, R. L.; DUMONT, F.; KORSMEYER, F.; KRASNEY, P.; BROWN, T. A.; PLOWCHALK, D.; VUKICEVIC, S.; THOMPSON, D. D. An EP2 receptor-selective prostaglandin E₂ agonist induces bone healing. **The National Academy of Sciences Medical Sciences**, v.100, n.11, p.6736–6740, 2003.
36. PIERMATTEI, D. L.; FLO G. L. **Manual de ortopedia e tratamento das fraturas dos pequenos animais**. 3.ed. São Paulo: Manole, 1999. 694p.
37. REMEDIOS, A. Bone and bone healing. **The veterinary clinics of north américa: small animal practice**, v.29, n.5, p.1029-1044, 1999.
38. ROBSON, G. F.; BALIEIRO, J. C. C.; STERMAN, F. A.; PINTO, A. C. B. C. F.; MIGLINO, M. A.; ZATZ, M.; AUADA, C. R. F. Estudo longitudinal da densidade mineral óssea em cães jovens da raça Golden Retriever: Correlações com idade e peso corpóreo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.43, n.5, p.681-687, 2006.
39. RUTKOWSKI, J. L.; FENNELL, J. W.; KERN, J. C.; MADISON, D. E.; JOHNSON, D. A. Inhibition of alveolar osteitis in mandibular tooth

- extraction sites using platelet-rich plasma. **Journal of Oral Implantology**, v.33, n.3, p.116-121, 2007.
40. RUTKOWSKI, J. L.; THOMAS, J. M.; BERING, C. L.; SPEICHER, J. L.; RADIO, N. M.; SMITH, D. M.; JOHNSON, D. A. An Analysis of a rapid, simple, and inexpensive technique used to obtain platelet-rich plasma for use in clinical practice. **Journal of Oral Implantology**, v.34, n.1, p.25-33, 2008.
41. SANCHEZ, A. R.; SHERIDAN, P. J.; KUPP, L. I. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? Current Review. **The international journal of oral and maxillofacial implants**, v.18, n.1, p.93-103, 2003.
42. SCARSO FILHO, J.; BARRETO, M. A.; MENDONÇA, R. G.; DINATO, J. C. Plasma rico em plaquetas. In: DINATO, J. C.; POLIDO, W. D. ed. **Implantes osteointegrados: cirurgia e prótese**. São Paulo: Artes Médicas, 2001. p. 315-342.
43. SCHMAEDECKE, A.; ACETO, M. L.; QUEIRÔZ, G. F.; TATARUNAS, A. C.; ZERWES, M. B. C.; MASTROCINQUE, S.; FERRIGNO, C. R. A. Tratamento cirúrgico de união retardada e não-união de fraturas em cães: revisão de literatura. **Revista de educação continuada CRMV-SP**, São Paulo, v. 6, n. 1/3, p. 74-82, 2003.
44. SCHWARTZ-ARAD, D.; LEVIN, L.; ALBA, M. The use of platelets rich plasma (PRP) and platelets rich fibrin (PRP) extracts in dental implantology and oral surgery. **Refuat Hapeh Vehashinayim**, v.24, n.84, p.51-55, 2007.
45. SILVA, P. S. A.; DEL CARLO, R. J.; SERAKIDES, R.; MONTEIRO, B. S.; BALBINOT, P. Z.; ELEOTÉRIO, R. B.; PAEZ, O. L. A.; VILORIA, M. I. V. Plasma rico em plaquetas associado ou não ao osso esponjoso autógeno no reparo de falhas ósseas experimentais. **Ciência Rural**, v.39, n.1, p.129-134, 2009.

46. SILVA, S., B.; FEERIGNO, C. R. A.; ATERMAN, F. A.; BACCARIN, D. C. B. B.; YASBEK, K. V.; MURAMOTO, C.; AMAKU, M. Plasma rico em plaquetas combinado a hidroxiapatita na formação de calo ósseo em fraturas induzidas experimentalmente no radio de cães. **Ciência Rural**, Santa Maria. v.37 , n.4 , p.1045-1051 ,2007.
47. THORN, J. J.; SORENSEN, H.; WEIS-FOGH, U.; ANDERSEN, M. Autologous fibrin glue with growth factors in reconstructive maxillofacial surgery. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.33, n.1, p.95-100, 2004.
48. TRANQUILLI, W. J.; THURMON, J. C.; GRIMM, K. A. **Lumb & Jones' veterinary anesthesia and analgesia**. 4.ed. Australia: Blackwell. 2007. 1096p.
49. VASCONCELOS GURGEL, B. C.; GONÇALVES, P. F.; PIMENTEL, S. P.; AMBROSANO, G. M. B.; NOCITI JÚNIOR, F. H.; SALLUM, E. A.; CASATI, M. Z. Platelet-rich plasma may not provide any additional effect when associated with guided bone regeneration around dental implants in dogs. **Clinical Oral Implants Research**, v.18, n.5, p.649-654, 2007.
50. VENDRAMIN, F. S.; FRANCO, D.; NOGUEIRA, C. M.; PEREIRA, M. S.; FRANCO, T. R. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de preparo e utilização em cirurgia plástica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgia**, v.33, n.1, p.208-212, 2006.
51. WILSON, L. M. T.; BARBIERI, C. H.; MAZZER, N. Estimulação da cicatrização óssea pelo plasma autógeno rico em plaquetas. Estudo experimental em coelhos. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.14, n.4, p.208-212 , 2006.
52. WILTFANG, J.; KLOSS, F. R.; KESSLER, P.; NKENKE, E.; SCHULTZEMOSGAU, S.; ZIMMERMANN, R.; SCHLEGEL, K. A. Effects of platelet-rich plasma no bone healing in combination with autogenous bone and

bone substitutes in critical-size defects. **Clinical Oral Implants Research**, v.15, n.2, p.187-193, 2004.

53. WROTNIAK, M.; BIELECKI, T.; GAZDZIK, T.S. Current opinion about using the platelet-rich gel in orthopaedics and trauma surgery. **Ortopedia Traumatologia Rehabilitacja**, v.9, n.3, p.227-238, 2007.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Certificado Comissão de Ética em Experimentação Animal



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “**EXPRESSÃO DOS FATORES DE CRESCIMENTO OBTIDOS DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO TRATAMENTO DE FRATURAS EXPERIMENTAIS DE OSSOS LONGOS EM CÃES**” sob responsabilidade do Prof. Dr. **ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE** e colaboração de **MARIA GISELA LARANJEIRAS, SUELY REGINA MOGAMI BOMFIM, MARIA CECÍLIA RUI LUZIVOTTO e TALITA FLOERING BRÊDA SOUZA**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado **AD REFERENDUM** pela CEEA em 25 de fevereiro de 2008, de acordo com o protocolo no. 2007- 008690.

Araçatuba, 25 de fevereiro de 2008.

Profª Drª **CRISTINA ANTONIALI SILVA**
Presidente da CEEA - FOA/UNESP

APÊNDICE B

Tabela 1B- Valores individuais da avaliação radiográfica subjetiva durante a cicatrização do radio dos animais do G-PRP, nos diferentes momentos, em dias.

Animais	M1	M14	M21	M28	M35	M45	M60
Amarula	0	0	1	1	4	4	5
Cocada	0	3	4	4	4	4	5
Trufa	0	3	3	4	4	4	4
Trakinas	0	3	4	4	4	4	5
Nara	0	0	3	4	4	4	5

Tabela 2B- Valores individuais da avaliação radiográfica subjetiva durante a cicatrização do radio dos animais do G-Controle, nos diferentes momentos, em dias

Animais	M1	M14	M21	M28	M35	M45	M60
Nutella	0	0	3	3	1	1	1
Avelã	0	3	3	3	3	1	1
Caramelo	0	3	4	1	1	1	1
Toddy	0	3	3	1	1	4	5
Rosquinha	0	0	3	1	1	1	1
Opereta	0	0	1	1	1	1	1

Legenda

- (0)** - linha de fratura de 1,0 a 2,0 mm, sem proliferação óssea;
- (1)** - linha de fratura de 1,0 a 2,0 mm, com proliferação óssea, sem calo em ponte;
- (2)** - linha de fratura de 1,0 a 2,0 mm, com proliferação óssea, com calo em ponte;
- (3)** - linha de fratura de < 1,0 mm, sem proliferação óssea;
- (4)** - linha de fratura < 1,0 mm, com proliferação óssea, sem calo em ponte;
- (5)** - linha de fratura < 1,0 mm, com proliferação óssea, com calo em ponte (união clínica),
- (6)** - ausência de linha de fratura.

APÊNDICE C

Tabela 1C- Valores individuais da densidade mineral óssea durante a cicatrização do radio dos animais do G-PRP, nos diferentes momentos, em dias.

Animais	MI	M14	M21	M28	M35	M45	M60
Amarula	5,86	5,97	4,93	5,78	6,44	6,04	6,31
Cocada	5,27	5,38	5,37	5,28	5,20	5,65	6,46
Trufa	4,84	5,62	5,77	5,49	5,60	5,78	6,02
Trakinas	5,33	5,69	6,24	5,97	6,74	6,04	7,05
Nara	4,62	5,05	5,42	5,26	5,04	5,67	6,18

Tabela 2C- Valores individuais da densidade mineral óssea durante a cicatrização do radio dos animais do G-Controle, nos diferentes momentos, em dias

Animais	MI	M14	M21	M28	M35	M45	M60
Nutella	5,35	6,11	6,15	5,98	5,99	5,16	5,38
Avelã	3,03	4,65	4,34	5,48	4,39	5,41	4,55
Caramelo	5,73	6,23	5,52	5,73	5,56	5,49	5,61
Toddy	5,00	5,58	5,02	4,60	4,70	5,03	5,75
Rosquinha	5,33	5,60	5,38	5,46	5,47	5,74	4,97
Opereta	5,79	5,96	5,23	5,35	4,87	4,87	4,87