

ADRIANA DO SOCORRO FERREIRA MONTEIRO

**EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS ASSOCIADO AO
ENXERTO AUTÓGENO NA TÍBIA DE COELHOS:
estudo histomorfométrico, radiográfico e biomecânico**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área de Biopatologia Bucal

ADRIANA DO SOCORRO FERREIRA MONTEIRO

**EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS ASSOCIADO AO
ENXERTO AUTÓGENO NA TÍBIA DE COELHOS:
estudo histomorfométrico, radiográfico e biomecânico**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área de Biopatologia Bucal.

Orientadora: Prof. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha

São José dos Campos
2007

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:

Bellini AB. Manual para elaboração de monografias: estrutura do trabalho científico. São José dos Campos: FOSJC/UNESP; 2006.

Monteiro, Adriana do Socorro Ferreira

Efeito do plasma rico em plaquetas associado ao enxerto autógeno na tíbia de coelhos: estudo histomorfométrico e biomecânico / Adriana do Socorro Ferreira Monteiro; orientador Rosilene Fernandes da Rocha. São José dos Campos, 2007.
122p. ; IL.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal, Área Biopatologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2007.

1. Plasma rico em plaquetas – 2. Enxerto ósseo – 3. Reparação óssea.

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 02 de julho de 2007.

Assinatura:

E-mail: dri_fmonteiro@yahoo.com.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

Monteiro ASF. Efeito do plasma rico em plaquetas associado ao enxerto autógeno na tíbia de coelhos: estudo histomorfométrico, radiográfico e biomecânico [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2007.

São José dos Campos, 02 de julho de 2007.

Banca examinadora:

1 Profa. Adj. ROSILENE FERNANDES DA ROCHA

Docente da Disciplina de Farmacologia do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos da UNESP.

2 Prof. Adj. WILSON ROBERTO SENDIK

Docente das Disciplinas de Periodontia e Implantodontia do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de Santo Amaro.

3 Profa.Dra. MARIANNE SPALDING

Docente da Disciplina de Diagnóstico Bucal da Faculdade de Pindamonhangaba.

4 Prof. Dr. FERNANDO RENÓ DE LIMA

Docente da Disciplina de Periodontia do Departamento Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos da UNESP.

5 Prof. Dr. LAFAYETTE NOGUEIRA JUNIOR

Docente da Disciplina de Prótese Parcial Removível do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos da UNESP.

DEDICATÓRIA

À minha querida e eternamente amada mãe Rosalina (in memoriam) presença forte e constante em todos os momentos da minha vida;

Ao meu amado pai Carlos, pela dedicação, carinho e incentivo em todos os momentos, e por me ensinar a enfrentar os grandes desafios da vida;

Aos meus amados irmãos, Áurea, Ana, Adonis, Vítor e Carolina pela alegria, carinho, apoio, incentivo, compreensão e colaboração incondicional.

À Bete, a quem amo pela compreensão, apoio, incentivo e dedicação a todos nós.

DEDICATÓRIA

À minha amada filha Beatriz, amor incondicional, pelo grande carinho, alegria e enorme afeto,

Dedico este trabalho com muito amor.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus avós e tios, pela dedicação e amor, pela educação e ensinamentos, pela perseverança, pelas alegrias, sempre me incentivando em todos os momentos da minha vida.

À Raquel, recém-chegada à família, pela colaboração e apoio, tanto profissional quanto pessoal.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora Prof. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha, da Disciplina de Farmacologia da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos, UNESP, pela disposição de auxílio, apoio, confiança, liberdade concedida e pelos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Nelson Luiz de Macedo, da Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos, UNESP, exemplo de dedicação e competência, pela inestimável ajuda e apoio na realização deste estudo, pela orientação e ensinamentos, fico eternamente grata.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos, UNESP, na pessoa do Diretor, Prof. Adj. Paulo Vilella Santos Júnior, e seu Vice-Diretor, Prof. Dr. José Roberto Rodrigues por ter disponibilizado toda a estrutura necessária ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Adj. Aécio Zangrandi e ao Prof. Dr. Ângelo Caporalli Filho da Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, UNESP, pelo inestimável auxílio e ensinamentos na parte experimental dos testes biomecânicos.

À Clínica Diagnovet de São José dos Campos, na pessoa do Médico Veterinário Dr. Fábio Henrique Miguel Jardim pelo auxílio imprescindível nas análises laboratoriais do sangue dos animais.

À Profa. Adj. Yasmin Rodarte Carvalho da Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos, UNESP, pela colaboração e auxílio durante o Programa de Pós-Graduação.

Ao Centro de Biociências Aplicado à Pacientes com Necessidades Especiais, pelo inestimável auxílio e estrutura para a análise histomorfométrica, especialmente a Vivian Neves Valva pelo apoio e amizade.

À Profa. Dra. Adriana Aighotti Haberbeck Brandão e ao Prof. Adj. Luiz Eduardo Blumer Rosa da Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos, UNESP, agradeço a colaboração e auxílio durante o Programa de Pós-Graduação.

Ao Prof. Tit. Luiz César de Moraes da Disciplina de Radiologia da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos, UNESP, e aos alunos da pós-graduação, em especial ao Milton Gonçalves Soares, pelo auxílio na obtenção das imagens radiográficas.

Ao Prof. Ivan Balducci, da Disciplina de Bioestatística da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos, UNESP, pelo enorme auxílio com a análise estatística.

À Profa. Adj. Márcia Carneiro Valera da Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos, UNESP, pelo auxílio e colaboração, sempre prestativa.

Ao Prof. Dr. Fernando Renó de Lima e ao Prof. Dr. Warley David Kerbauy do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos, UNESP, pelo convívio profissional e ensinamentos transmitidos ao longo de todos esses anos.

Ao Sr. Oscar Kazuyuki Kogiso, Diretor Administrativo da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos, UNESP, pela colaboração prestada e suporte na parte experimental deste trabalho.

À secretária do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Sandra Mara de Souza Ruivo e às funcionárias Maria Stella de Mendonça Maldonado Campoy Francisco, Márcia Cristina Lopes Garcia e Sr. João Benedito Ribeiro, meus sinceros agradecimentos pelos serviços prestados, pela dedicação e apoio dispensados em todos esses anos.

Às técnicas Ana Lourdes da Silva Machado, Maria Salete Faria e especialmente ao Sérgio Alves e Walter Cruz, pelo auxílio e dedicação no preparo do material histológico.

Às secretárias do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, Ivoneide Leandro e em especial à Silvia Scarpel pelo auxílio, atenção e disponibilidade durante o Programa de Pós-Graduação.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação, Rosemary de Fátima Salgado, Erena Michie Hasegawa, Maria Aparecida Consiglio de Souza e Lilian Faria das Graças, meu reconhecimento pelo desenvolvimento de seus trabalhos e pela preocupação em todas as nossas atividades.

A todas as funcionárias da Biblioteca pela pronta colaboração em todos os momentos, em especial às bibliotecárias Ângela de Brito Belinni e Silvana Alvarez pela orientação e atenção dispensada para revisão das normas de apresentação deste trabalho.

Aos funcionários do Biotério desta Faculdade, Lourival Jacobs e Antônio Domingos Sávio Barbosa Maia Vasconcelos, pelos serviços prestados durante a realização da fase experimental deste trabalho.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação Ana Cristina Posch Machado, Ângela Bolanho, Cristina Werkman, Fernando Augusto C. Garcia de Sousa, Fernando Augusto Perrella, Pietro Mainenti, Rodrigo Dias do Nascimento, Samira Esteves A. Camargo, Thaís Cachuté Paradella, e especialmente à Andressa Costa Pereira, Elaine Dias do Carmo, Susana Ungaro Amadei, Vanessa Ávila Sarmiento Silveira e Renata Falchete do Prado pelo convívio amigável, auxílio mútuo e por compartilhar dos momentos de anseios e projetos.

Aos monitores do Curso Implantodontia do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos, UNESP, Luciano Inácio Reis, Ana Maria Preto Magalhães e especialmente à Karla Cassiano Machado e Cynthia Alves dos Santos, pelo aprendizado, pela amizade e pela colaboração direta ou indireta para a conclusão desse trabalho.

Aos alunos da Graduação, do Curso de Implantodontia e aos estagiários da Disciplina de Periodontia, pelo incentivo, pela alegre convivência, pelos ensinamentos, pela paciência e pelo apoio.

Muito obrigada a todos!!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
LISTA DE FIGURAS	14
LISTA DE TABELAS	17
RESUMO	19
1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
3 PROPOSIÇÃO	48
4 MATERIAL E MÉTODO	49
4.1 Animais e grupos experimentais.....	49
4.2 Obtenção do plasma rico em plaquetas	49
4.3 Contagem de plaquetas	50
4.4 Procedimentos cirúrgicos	52
4.5 Períodos de sacrifício	53
4.6 Análise da densidade óptica.....	55
4.7 Análise histológica e histomorfométrica	55
4.8 Propriedades biomecânicas	57
4.9 Análise estatística.....	58
5 RESULTADOS	59
5.1 Contagem de plaquetas	59
5.2 Análise da densidade óptica.....	60
5.2.1 Quinze dias.....	60
5.2.2 Trinta dias	60
5.2.3 Sessenta dias	61
5.2.4 Análise estatística da densidade óptica	63
5.3 Análise histológica e histomorfométrica	66
5.3.1 Quinze dias.....	66

5.3.2	Trinta dias	73
5.3.3	Sessenta dias	77
5.3.4	Análise estatística da histomorfometria	79
5.4	Propriedades biomecânicas	84
6	DISCUSSÃO	87
7	CONCLUSÃO	97
8	REFERÊNCIAS.....	98
	APÊNDICES	108
	ANEXO	121
	<i>ABSTRACT</i>	122

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BMP	= Proteína morfogenética óssea
CaCl ₂	= Cloreto de cálcio
dff	= Distância foco-filme
FDBA	= Osso alógeno liofilizado
HA	= Hidroxiapatita
KVp	= Quilovolts de potência
mA	= Miliampéres
MSC	= Célula mesenquimal indiferenciada
PCBM	= Osso esponjoso particulado autógeno
PCCS	= Sistema de coleção do concentrado de plaqueta
PDGF	= Fator de crescimento derivado de plaqueta
PPP	= Plasma pobre em plaquetas
PRP	= Plasma rico em plaquetas
PTFE	= Politetrafluoretileno
rhBMP	= Proteína morfogenética óssea recombinante humana
ROG	= Regeneração óssea guiada
RTG	= Regeneração tecidual guiada
σ	= Desvio padrão
σ_c	= Força de compressão
TGF	= Fator de crescimento transformador
TCP	= Fosfato tricálcico

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Preparação do PRP: a) punção intracardíaca do sangue; b) colocação dos tubos em centrífuga; c) separação dos constituintes do sangue em plasma (porção superior) e células vermelhas (porção inferior); d) retirada do plasma separado após a centrifugação; e) separação do PRP (porção inferior) e PPP (porção superior); f) colocação do PRP em cubeta metálica esterilizada 51
- FIGURA 2 - Procedimentos cirúrgicos: a) confecção de defeito ósseo unicortical; b) defeitos ósseos, distanciados 5 mm na tíbia; c) preenchimento do defeito superior apenas por coágulo sangüíneo e do inferior por enxerto autógeno na tíbia direita; d) defeitos na tíbia esquerda preenchido por PRP (superior) e por PRP associado ao osso autógeno (inferior); e) barreira de PTFE recobrando os defeitos; f) sutura da pele..... 54
- FIGURA 3 - Análise das propriedades biomecânicas do osso neoformado: a) célula de carga com um dispositivo cilíndrico para ensaio de compressão; b) dispositivo cilíndrico para aplicação da carga compressiva dentro do perímetro do defeito..... 58
- FIGURA 4 - Representação gráfica da média da contagem de plaquetas no sangue total e no PRP..... 59
- FIGURA 5 - Imagens radiográficas digitais dos defeitos ósseos cirúrgicos na tíbia de coelho no período de 15 dias: a) grupo C; b) grupo A; c) grupo PRP; d) grupo PRPA 62
- FIGURA 6 - Imagens radiográficas digitais dos defeitos ósseos cirúrgicos na tíbia de coelho no período de 30 dias: a) grupo C; b) grupo A; c) grupo PRP; d) grupo PRPA 62
- FIGURA 7 - Imagens radiográficas digitais dos defeitos ósseos cirúrgicos na tíbia de coelho no período de 60 dias: a) grupo C; b) grupo A; c) grupo PRP; d) grupo PRPA 62

FIGURA 8 - Representação gráfica da evolução das médias de densidade óptica dos grupos C, A, PRP e PRPA aos 15, 30 e 60 dias	65
FIGURA 9 - Fotomicrografias das regiões dos defeitos ósseos aos 15 dias (setas): a) grupo C; b) grupo PRP; c) grupo C com trabéculas ósseas menos celularizadas; d) grupo PRP com trabéculas ósseas mostrando grande celularidade. HE e Tricrômio de Mallory, aumento original 50x e 200x.	68
FIGURA 10 - Fotomicrografia exibindo tecido conjuntivo osteogênico: a) aspecto delicado e bem vascularizado no grupo PRP; b) aspecto denso no grupo C; c) intensa atividade osteoblástica e formação de trabéculas ósseas no grupo C. Tricrômio de Mallory, aumento original 100x e 200x.....	69
FIGURA 11 - Fotomicrografias das regiões dos defeitos ósseos aos 15 dias (setas): a) grupo A; b) grupo PRPA. Tricrômio de Mallory, aumento original 50x.	70
FIGURA 12 - Fotomicrografias mostrando região do defeito do grupo A aos 15 dias: a) partícula de enxerto circundada por tecido conjuntivo osteogênico () e por trabéculas ósseas imaturas (setas); b), c) e d) partículas de enxerto em processo de reabsorção (setas brancas); e) tecido conjuntivo osteogênico e matriz óssea neoformada. HE e Tricrômio de Mallory, aumento original 100x e 200x.	71
FIGURA 13 - Fotomicrografia mostrando região do defeito do grupo PRPA aos 15 dias: a), b) e c) intensa atividade osteoclástica (setas) e, conseqüentemente, reabsorção da partícula de enxerto; d) trabéculas ósseas imaturas e delicadas; e) tecido conjuntivo osteogênico bem vascularizado. Tricrômio de Mallory e HE, aumento original 100x e 200x.	72
FIGURA 14 - Fotomicrografias das regiões dos defeitos ósseos aos 30 dias (setas): a) grupo C; b) grupo PRP; c) tecido conjuntivo bem vascularizado e de aspecto delicado; d) medula óssea em formação exibindo células hematopoiéticas, localizadas nas adjacências do limite interno do defeito. HE, aumento original 50x e 100x.....	75

FIGURA 15 -Fotomicrografias das regiões dos defeitos ósseos aos 30 dias (setas): a) grupo A; b) grupo PRPA; c e d) tecido ósseo em processo de remodelação nos grupos A e PRPA, respectivamente. HE e Tricrômio de Mallory, aumento original 50x e 200x.	76
FIGURA 16 -Fotomicrografias das regiões dos defeitos ósseos aos 60 dias: a) grupo C; b) grupo PRP; c) grupo A; d) grupo PRPA. HE e Tricrômio de Mallory, aumento original 50x.	78
FIGURA 17 -Representação gráfica da evolução das médias de densidade de volume de matriz óssea neoformada nos grupos C, A, PRP e PRPA aos 15, 30 e 60 dias	81
FIGURA 18 -Representação gráfica das médias de osteócitos por área ($/10^3\mu\text{m}^2$) de matriz óssea neoformada nos grupos C, A, PRP e PRPA aos 15, 30 e 60 dias.....	84
FIGURA 19 -Representação gráfica das médias das forças de compressão aplicada para a falha do espécime nos grupos C, A, PRP e PRPA aos 30 e 60 dias.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Médias das densidades ópticas dos grupos C, A, PRP e PRPA nos períodos de 15, 30 e 60 dias.....	63
Tabela 2 -	Resultado da análise de variância (ANOVA) para os dados das densidades ópticas.....	64
Tabela 3 -	Resultado do teste de Tukey para os dados da densidade óptica nos diferentes períodos	64
Tabela 4 -	Resultado do Teste de Tukey para os dados da densidade óptica nos diferentes grupos	65
Tabela 5 -	Médias das densidades de volume de matriz óssea neoformada nos defeitos ósseos dos grupos estudados nos diferentes períodos.....	79
Tabela 6 -	Resultado da análise de variância (ANOVA) para os dados da densidade de volume de matriz óssea neoformada.....	80
Tabela 7 -	Resultado do teste de Tukey para os dados da densidade de volume de matriz óssea neoformada nos diferentes grupos	80
Tabela 8 -	Resultado do teste de Tukey para os dados da densidade de volume de matriz óssea neoformada nos diferentes períodos	81
Tabela 9 -	Médias de osteócitos por área ($/10^3\mu\text{m}^2$) quantificadas nos defeitos ósseos dos grupos estudados nos diferentes períodos.....	82
Tabela 10 -	Resultado da análise de variância (ANOVA) para os valores de osteócitos quantificados nos defeitos ósseos	83
Tabela 11 -	Resultado do teste de Tukey para os valores de osteócitos quantificados nos defeitos ósseos nos diferentes grupos	83
Tabela 12 -	Resultado do teste de Tukey para os valores de osteócitos quantificados nos defeitos ósseos nos diferentes grupos	83
Tabela 13 -	Médias da força de compressão aplicada para a falha do espécime nos defeitos ósseos dos grupos estudados nos diferentes períodos.....	85

Tabela 14 - Resultado da análise de variância (ANOVA) para os dados da força de compressão aplicada para a falha do espécime nos defeitos ósseos	85
Tabela 15 - Resultado do teste de Tukey para os dados da força de compressão aplicada para a falha do espécime nos defeitos ósseos para os diferentes grupos.....	86
Tabela 16 - Médias da densidade óptica aos 15, 30 e 60 dias nos grupos C, A, PRP e PRPA nos diferentes defeitos (continua)	108
Tabela 17 - Densidades de volume de matriz óssea, expressa em valor de área (μm^2), quantificadas durante o processo de reparação óssea nos campos microscópicos dos grupos C, A, PRP e PRPA em cada período avaliado (continua).....	113
Tabela 18 - Contagem de osteócitos, área e relação de osteócitos por área quantificada durante o processo de reparação óssea nos campos microscópicos dos grupos C, A, PRP e PRPA em cada período avaliado (continua).....	116
Tabela 19 - Força de compressão (σ) aplicada para a falha do espécime quantificada durante os testes das propriedades biomecânicas nos grupos C, A, PRP e PRPA, em cada período avaliado (continua)	119

Monteiro ASF. Efeito do plasma rico em plaquetas associado ao enxerto autógeno na tíbia de coelhos: estudo histomorfométrico, radiográfico e biomecânico [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2007.

RESUMO

O propósito deste trabalho foi avaliar o efeito do plasma rico em plaquetas associados ou não ao enxerto ósseo autógeno no processo de reparação óssea em defeitos cirúrgicos confeccionados na tíbia de coelhos. Nesta pesquisa foram utilizados 25 coelhos adultos, nos quais foram realizados 2 defeitos em cada tíbia, divididos nos seguintes grupos de acordo com o tratamento: controle (C - defeito preenchido somente por coágulo sanguíneo), autógeno (A - defeito + enxerto), PRP (PRP = defeito + PRP) e autógeno + PRP (PRPA - defeito + enxerto + PRP). Todos os defeitos foram recobertos com uma barreira de PTFE e decorridos 15, 30 e 60 dias, 5 animais foram sacrificados por período, sendo as peças contendo os defeitos processadas para análises histológica e histomorfométrica. Outros 5 animais foram sacrificados aos 30 e 60 dias e submetidos à análise das propriedades biomecânicas e todos os espécimes foram submetidos ao exame radiográfico para análise da densidade óptica. Os resultados biomecânicos, radiográficos e histomorfométricos mostraram maior resistência, densidade óptica e maior formação óssea nos grupos A e PRPA quando comparados com os grupos C e PRP. Os resultados obtidos possibilitaram concluir que não houve uma melhora nos parâmetros radiográficos, mecânicos e na neoformação óssea quando o PRP foi usado isoladamente ou associado ao enxerto ósseo autógeno.

PALAVRAS-CHAVE: Plasma rico em plaquetas, regeneração óssea, enxerto ósseo, membranas, politetrafluoretileno.

1 INTRODUÇÃO

Técnicas cirúrgicas reconstrutivas são pré-requisitos essenciais para a reabilitação funcional e estética, especialmente na correção de perda óssea decorrente de traumatismos, lesões císticas, infecção, neoplasias ou reabsorções no processo alveolar dos ossos maxilares. Enxertos de osso autógeno de fonte intra ou extra-oral, considerados como padrão ouro, são utilizados para regenerar defeitos ósseos na região craniofacial. Pesquisas buscam melhorar quantitativa e qualitativamente o resultado dos enxertos ósseos e a regeneração óssea guiada (ROG) é uma descoberta benéfica nesse aspecto^{20,34,41}.

O processo de reparação de tais enxertos depende de vários fatores, como a qualidade do tecido doador, vascularização da área receptora, imobilização do enxerto e eficiência dos mecanismos de reparo. Este último, por ser um processo natural, independe da técnica cirúrgica ou das condições cirúrgicas locais sendo inteiramente depende do paciente^{5,33,41}.

Recentemente, a atenção tem sido voltada para a possibilidade de aplicação de fatores de crescimento que regulam uma série de eventos celulares como a quimiotaxia, mitogênese e diferenciação, para aumentar e acelerar a regeneração óssea, além de proporcionar maior densidade do novo tecido formado. Muitos desses fatores, produzidos por diversas células como os fibroblastos, osteoblastos, condroblastos e outras de natureza mesenquimal, foram identificados, isolados e testados quanto a sua capacidade de iniciar o crescimento ósseo^{12,57}.

As plaquetas contêm alguns desses fatores de crescimento e são também ricas em moléculas de adesão celular¹. Valendo-se dessas informações, a estratégia seria aplicar o plasma rico em plaquetas (PRP) nos locais de enxerto, sugerido por aumentar a deposição óssea e a qualidade do osso regenerado, dando início ao processo seqüencial de proliferação, migração e diferenciação celular, seguido pela deposição de osteóide e posterior mineralização da matriz^{3,18,37,38,49,53}.

Na osteointegração de implantes endósseos, a migração e diferenciação celular e a formação e remodelação óssea ao longo de sua superfície é dependente de plaquetas e do coágulo sangüíneo. Dessa maneira, o PRP pode ser usado para aumentar a osteointegração em pacientes nos quais esse processo pode ser menos previsível, como em idosos e indivíduos com osteoporose, diabetes ou outras situações nas quais a regeneração óssea possa estar comprometida e em osso menos denso, como na maxila posterior^{3,11}.

A razão para utilizar o PRP em levantamento de seio maxilar, local com baixa tensão de oxigênio, inclui vascularização acelerada do enxerto, melhora do reparo do tecido mole, menor morbidez pós-operatória e regeneração óssea aumentada, além de apresentar a vantagem de ser um produto autógeno, sem, portanto, risco de reação cruzada ou imune e transmissão de doença. O uso do PRP melhora a manipulação do material de enxerto particulado e sua inserção na cavidade cirúrgica, possibilitando a colocação de um enxerto mais denso, sendo eficaz na manutenção do espaço e conseqüente regeneração óssea^{4,18,26}.

Apesar da evidência científica existente que as plaquetas e o PRP atuam na primeira fase bioquímica e precoce da regeneração óssea, não há ainda um consenso sobre os benefícios do seu uso associados aos enxertos quando se pretende o aumento ósseo. Isso tem

gerado opiniões contraditórias sobre o assunto, justificando a realização desse estudo para procurar trazer subsídios na avaliação de sua eficácia.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A biologia e fisiologia de indivíduos jovens e mais velhos são distintas, de forma que estruturas capazes de regenerar naturalmente em pacientes jovens não regeneram em adultos. A reprodução de processos biológicos básicos, ou biomimética, tem sido usada para a regeneração de tecidos esqueléticos funcionais e é referida como engenharia tecidual⁸. As células, com meia-vida finita, são substituídas por outras recém-diferenciadas, formando a base da remodelação tecidual, dessa forma, cada tecido tem suas próprias células progenitoras que dão origem àquelas diferenciadas em uma sucessão controlada. A regeneração e a reparação dos tecidos mesenquimais são processos fundamentalmente diferentes, sendo a regeneração um processo relativamente lento que restabelece a dinâmica da renovação e, em contraste, a reparação é rápida e envolve inicialmente uma resposta inflamatória aguda para prover o preenchimento rápido com tecido fibroso. Posteriormente, processos de renovação mais lentos tentam remodelar seus limites naturais. A partir de uma seqüência rápida de reparo um tecido cicatricial não-integrado é formado e freqüentemente torna-se o local do fracasso futuro sob uma carga mecânica total⁶.

Caplan e Goldberg⁸ sugeriram que o material ideal para a regeneração consiste de células e/ou agentes bioativos e de um veículo de liberação preenchedor de espaço. Estes devem inibir a reparação natural, prover espaço para o tecido diferenciado recém-sintetizado, estimular e ser condutivo para a neoformação tecidual, provendo uma estrutura porosa e absorvível e, finalmente, o arcabouço tem que facilitar a integração completa dos tecidos.

Embora a seqüência de eventos embrionários possa servir como um guia conceitual para a bioengenharia, é difícil esperar que todas as moléculas sinalizadoras presentes no embrião também estejam no adulto. O conhecimento do papel das células, sua interação com a matriz circunvizinha e veículos de liberação, o efeito de moléculas bioativas e a influência do ambiente mecânico guiando estes mecanismos proverão modelos para construir estratégias biológicas para regenerar um tecido funcional⁸.

Em uma revisão sobre o papel das células mesenquimais indiferenciadas (MSC) no desenvolvimento, reparação e regeneração óssea, Bruder et al.⁷ relataram que a formação óssea no embrião, e durante a reparação e remodelação em adultos, envolve a progênie dessas células que se reproduzem continuamente, enquanto uma porção é comprometida a linhagens mesenquimais como do osso, cartilagem, tendão, ligamento e músculo. A diferenciação das MSC, dentro de cada linhagem, é um caminho complexo multifásico, envolvendo transições discretas, muitas ocorrendo durante a hematopoiese. A progressão de uma fase para a próxima depende da presença de fatores bioativos específicos e condições ambientais, cujas contribuições perfeitamente controladas coordenam o fenômeno inteiro de diferenciação. O isolamento e a expansão mitótica *in vitro* de MSC humanas autógenas apoiaram o desenvolvimento de protocolos modernos para o tratamento de muitas condições clinicamente desafiadoras, levando os autores a concluir que opções terapêuticas que não estavam disponíveis anteriormente possam ser exploradas.

Citocinas produtoras de mudanças fenotípicas celulares descobertas na última década são principalmente de 2 tipos, como descrito por Boyne⁵: mitogênicos e morfogênicos, com algumas apresentando uma capacidade para produzir ambas as atividades. De acordo com este estudo, as citocinas mitogênicas, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), têm aplicação limitada para

proliferação osteoblástica na regeneração óssea. Porém, é útil na reparação de tecido mole e também pode ser usada juntamente com algumas das proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), porque uma combinação de mitogênicos e morfogênicos pode ser efetiva de uma maneira sinérgica, aumentando a mitose das MSC locais e o recrutamento dessas nas áreas marginais da ferida. Uma vez recrutadas, elas podem ser fenotipicamente transformadas em osteoblastos para iniciar o processo de formação da matriz óssea.

Classificados de acordo com a fonte e resposta imune os enxertos podem ser autógenos quando o doador é o próprio indivíduo, alógeno se retirado de outro indivíduo, porém, da mesma espécie, xenógeno quando de outra espécie e aloplástico se é um material sintético³³. Enxertos e substitutos ósseos foram revisados por Perry⁴⁶ ressaltando ainda que o objetivo do manejo de fraturas e defeitos ósseos segmentares é o retorno da função tão rápido e completamente quanto possível, e que técnicas e estratégias de manipulação estão constantemente evoluindo para alcançar esta meta.

Revisando sobre técnicas e materiais para ROG na reabilitação oral com a utilização de implantes osteointegrados, Hämmerle e Jung²⁰ descreveram o conceito da ROG, fundamentado na descoberta que as células colonizadoras iniciais de um dado espaço determinam o tipo de tecido que irá regenerá-lo. A colocação de barreiras físicas exclui as células indesejadas e forma um espaço no qual é permitida a migração celular pretendida na área da ferida. Os autores chamaram a atenção que muitos desenvolvimentos na medicina têm sido baseados no melhor entendimento das doenças em níveis celular e molecular, com objetivo de propor técnicas mais efetivas que promovessem a habilidade natural do corpo para regenerar o tecido perdido. Destacaram a investigação de polipeptídeos e proteínas naturais com o avanço de tecnologias para isolar, seqüenciar e produzir essas moléculas, citando ainda estudos experimentais e clínicos que têm esclarecido os mecanismos biológicos

de vários fatores de crescimento e diferenciação na regeneração de diferentes tecidos. O uso da associação carreador-fatores bioativos foi ressaltado como a chave para a reparação de defeitos ósseos maiores, tratados freqüentemente com enxertos autógenos e membranas, o que resultaria em morbidade e risco cirúrgico menores, representando um passo importante na simplificação de técnicas de regeneração óssea.

Estudos iniciais e experimentos mais recentes utilizando a técnica de ROG, citados por Monteiro⁴¹ e Macedo et al.^{32,34,35}, descreveram a neoformação óssea com o uso de diferentes tipos de barreiras físicas, com a finalidade de excluir os tecidos moles não-osteogênicos, criar e manter um espaço apropriado onde o potencial biológico natural possa ser expandido para auxiliar a regeneração. De acordo com os resultados, os autores concluíram que o periósteo não é necessário para a formação óssea na ROG e confirmaram a biocompatibilidade da barreira física não-porosa de politetrafluoretileno (PTFE).

Avaliando a importância da permeabilidade da membrana para permitir a passagem de fluidos e nutrientes, criando um ambiente favorável para a osteogênese, Macedo et al.³⁵ utilizaram barreira não-porosa de PTFE e mostraram que este não é um pré-requisito para a neoformação óssea. A barreira foi capaz de manter espaço adequado e resistir à pressão dos tecidos adjacentes. Macedo et al.³² discutiram a possibilidade da exposição desse material ao meio externo sem prejudicar sua ação na ROG, por não apresentar porosidade, diminuindo a adesão e retenção bacteriana e conseqüente infecção local.

Dentre os métodos e substâncias para favorecer a osteogênese, Marx^{37,38} utilizou o PRP, obtido por um processo de centrifugação diferencial através de gradiente de densidade para a separação do plasma das células vermelhas do sangue. Desse modo, o PRP vem a ser uma concentração autógena de plaquetas humanas em

um pequeno volume de plasma, sendo, portanto uma concentração dos fatores de crescimento secretados de plaquetas.

As plaquetas são células pequenas, cujo diâmetro varia de 2 a 4 μm e espessura menor que 1 μm , com referência normal no sangue periférico de 130 a 400 mil/ mm^3 , resultado da fragmentação do megacariócito da medula. São anucleadas e têm citoplasma complexo, cujas organelas são indispensáveis para suas funções. A superfície plaquetária tem limites externos mal definidos e é muito rica em mucopolissacarídeos, material glicoprotéico e fosfolipídeos, substâncias essenciais nas funções de adesividade e agregabilidade plaquetárias. Exibem ainda grânulos- α e β , sendo os grânulos- α responsáveis pela liberação de PDGF, fator de crescimento transformador $\beta 1$ e $\beta 2$ (TGF- $\beta 1$ e TGF- $\beta 2$), entre outras substâncias^{1,49}.

Embora tenha sido descrito inicialmente nos grânulos- α de plaquetas, o PDGF também é sintetizado e segregado por outras células, como macrófagos e células endoteliais. Parece ser o primeiro fator de crescimento presente na reparação e inicia o reparo de tecido conjuntivo, inclusive regeneração e reparação óssea. As atividades específicas mais importantes do PDGF incluem mitogênese (aumento nas populações celulares reparadoras), angiogênese (mitose de células endoteliais em capilares funcionais) e ativação macrofágica (debridamento local e uma segunda fonte de fatores de crescimento para o reparo continuado e regeneração óssea)³⁸.

Como PDGF, o TGF- $\beta 1$ e TGF- $\beta 2$ são sintetizados e encontrados em plaquetas e macrófagos, como também em alguns outros tipos de células. Quando liberados através da degranulação de plaquetas ou ativamente secretada por macrófagos, têm ação parácrina, agindo principalmente sobre fibroblastos, MSC e pré-osteoblastos. Porém, cada uma destas células alvo tem a habilidade para sintetizar e segregar suas próprias proteínas TGF- β para agir em células adjacentes em um modo parácrino ou agindo em si mesmo como um fator de crescimento

autócrino. Suas funções mais importantes descritas são a quimiotaxia e a mitogênese de precursores de osteoblastos e eles também têm a habilidade para estimular a deposição da matriz de colágeno por osteoblastos da ferida e do osso. Além disso, os TGF- β inibem a formação de osteoclastos e reabsorção óssea, favorecendo a formação óssea através desses 2 mecanismos³⁸.

Outra citocina encontrada nos grânulos- α das plaquetas é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) com efeitos limitados às células endoteliais, estimulação da síntese da lâmina basal e o recrutamento de pericitos para suportar o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos. O fator de crescimento epitelial (EGF) age sobre as células basais da pele e mucosas, induzindo sua multiplicação e migração sobre uma superfície biológica e estimulando tais células na elaboração de componentes específicos da membrana basal³⁷.

O PRP contém também fibrina, fibronectina e vitronectina que agem como moléculas de adesão celular para a osteocondução e como matriz para o osso, tecido conjuntivo e migração epitelial. A secreção dos fatores de crescimento é iniciada pelo processo de coagulação e mais de 95% deles são secretados em 1 ou 2 horas. No estado anti-coagulado, foi mostrada a viabilidade do PRP por até 8 horas. Como a maioria dos fatores de crescimento, os contidos no interior dos grânulos- α das plaquetas são biologicamente inativos. A ativação do processo de coagulação está associada com uma mudança estrutural na membrana das plaquetas e resulta em secreção ativa dos fatores de crescimento a partir dos grânulos- α ³⁷.

Foi delineado que MSC, osteoblastos, fibroblastos, células endoteliais e epiteliais expressam receptores de membrana celular aos fatores de crescimento no PRP. Esses receptores trans-membrana por sua vez induzem a ativação de uma proteína sinalizadora endógena, a qual causa a expressão de uma seqüência genética normal da célula como proliferação celular, formação de matriz, produção de osteóide,

síntese de colágeno, entre outros. Após a liberação inicial de fatores de crescimento relacionados ao PRP, as plaquetas sintetizam e secretam fatores de crescimento adicionais pelos 7 a 10 dias remanescentes de seu período de vida. Uma vez as plaquetas esgotadas, os macrófagos, que chegaram à região pelo crescimento vascular estimulado pelas plaquetas, assumem a função de regulação da reparação tecidual segregando alguns dos mesmos fatores de crescimento assim como outros. Então, o número de plaquetas no sangue coagulado determina a taxa de reparação da ferida³⁷.

Marx³⁷ citou ainda trabalhos que sugeriram que o valor do PRP está relacionado principalmente a melhora de reparação do tecido mole devido à ausência de BMP nas plaquetas. Porém, todo processo de osteocondução e reparação de enxerto e substitutos ósseos surgem de MSC e sua linhagem, que se diferenciam em osteoblastos, todos sendo relatados a responder ao PRP.

Sanchez et al.⁵³ afirmaram que embora a ROG seja um método cirúrgico empregado na implantodontia para aumentar a quantidade e qualidade óssea em áreas de defeitos alveolares localizados, a falta de previsibilidade em procedimentos regenerativos utilizando vários materiais de enxerto sugeriram que a melhora nas propriedades osteoindutivas destes materiais seria altamente desejável e que o PRP poderia liberar fatores de crescimento em altas concentrações nesses locais, que sinalizariam as MSC para migrar, dividir, e aumentar a síntese de colágeno e de matriz extracelular. Descreveram que somente 6 estudos em humanos utilizando PRP foram encontrados na literatura de implante endósseo, e 5 eram relatos de caso. Assim, concluíram que há uma falta de embasamento científico para apoiar o uso de PRP em combinação com enxertos ósseos e que esta nova técnica potencialmente promissora requer estudos controlados e bem projetados para fornecer evidência de seu efeito.

A eficácia do PRP após a utilização de diferentes materiais de enxerto ósseo foi avaliada por Grageda¹⁸, revisando metodologias, estudos experimentais e clínicos. O autor sugeriu um protocolo de pesquisa que consiste em testes laboratoriais para a quantificação de plaquetas no sangue e nos plasmas rico e pobre em plaquetas (PRP e PPP) e de fatores de crescimento; análise histomorfométrica dos espécimes; necessidade de um controle contralateral e a correlação da análise histomorfométrica e o número de plaquetas e de fatores de crescimento. De acordo com os resultados conflitantes da literatura sobre PRP, o autor concluiu que existe uma necessidade urgente por pesquisas padronizadas para aplicação clínica de uma odontologia baseada em evidência e acredita que sem a normatização dos protocolos, não será possível determinar se o PRP é de fato um acelerador da reparação óssea.

O uso terapêutico do PRP na estimulação e aceleração da reparação de tecidos mole e ósseo foi destacado por Anitua et al.³, sendo a liberação local e contínua de uma gama extensiva de fatores de crescimento e proteínas a base da eficiência deste processo, imitando o processo fisiológico de reparação tecidual. A aplicação do PRP tem sido estendida a muitas áreas, incluindo ortopedia, medicina esportiva e odontologia, porém alguns obstáculos e desafios ainda precisam ser superados para manter o progresso neste campo.

O objetivo do tratamento periodontal de proteger e manter a dentição natural do paciente e, mais especificamente, após cirurgia regenerativa, de alcançar a regeneração da unidade periodontal foi ressaltado por Tozum e Demiralp⁵⁷ que ainda descreveram a utilização do PRP como um veículo de armazenamento para fatores de crescimento, delineando seus efeitos específicos *in vitro* e *in vivo*. Concluíram que embora os fatores de crescimento e os mecanismos envolvidos ainda estejam pobremente entendidos, a facilidade de aplicação do PRP na clínica odontológica e seus resultados benéficos, inclusive redução de

sangramento e reparação rápida, dão suporte a procedimentos adicionais. Além do mais, este produto autógeno elimina a preocupação de reações imunogênicas e transmissão de doenças, porém, ressaltaram que mais estudos são necessários para prover evidência sólida do papel do PRP na reparação tecidual, reconstrução de tecidos mole e ósseo combinados ou não com enxertos.

Man et al.³⁶ avaliaram a efetividade do PRP para a hemostasia nos retalhos cirúrgicos em pacientes submetidos à cirurgia estética. PPP e PRP foram preparados durante o procedimento a partir do sangue combinado com uma solução de trombina e cloreto de cálcio para produzir uma cola de fibrina e um gel de plaquetas, respectivamente. Os autores concluíram que as vantagens do PRP, como diminuição da hemorragia, reparação acelerada da ferida, facilidade de uso, custo moderado e segurança do paciente, deveriam estimular o interesse de cirurgiões e ajudar a difundir esta técnica para ser aplicada em vários procedimentos cirúrgicos plásticos.

Apesar da disponibilidade clínica e do uso indiscriminado, a efetividade terapêutica do PRP ainda não está comprovada e a maioria das informações traz resultados conflitantes. Para caracterizar o conteúdo do PRP, Eppley et al.¹⁰ quantificaram o número de plaquetas e fatores de crescimento liberados de preparados de sangue retirados de 10 pacientes saudáveis que se submeteriam a cirurgia estética. Resultados desse estudo mostraram que as plaquetas podem ser isoladas e concentradas em até 8 vezes sem que ocorra ativação antes do desejado e a concentração de fatores de crescimento também aumentou em decorrência do maior número de plaquetas, porém, variou entre pacientes.

A correlação entre os níveis de fatores de crescimento e a contagem de plaquetas, idade e sexo do paciente foi realizada por Weibrich et al.⁶¹ após isolar o PRP através da separação celular descontínua. Os resultados mostraram que a contagem de plaquetas foi 5

vezes maior comparado ao sangue doador; que a quantidade de fator de crescimento não foi bem correlacionada com a de plaquetas e que não houve influência do sexo ou idade. Os autores concluíram que as condições que influenciaram a variação significativa no conteúdo de fator de crescimento ainda são merecedoras de investigação adicional e ressaltaram a necessidade de uma técnica simplificada pela qual a quantidade de fator de crescimento pudesse ser avaliada no PRP.

Além da separação celular descontínua, 2 métodos para preparação de PRP foram avaliados por Weibrich e Kleis⁶⁰ pela contagem de plaquetas e dos níveis de fatores de crescimento após a retirada de sangue de 47 doadores saudáveis. Para cada doador, os métodos de PCCS (3i Implant Innovations, Palm Beach Gardens, FL, USA) e de Curasan (Curasan, Kleinostheim, Germany) foram utilizados. Os autores concluíram que o PCCS representa um método de preparação mais rápido, manipulação mais fácil e também mais eficiente para concentração de fatores de crescimento resultando em contagens significativamente maiores comparados ao Curasan.

Para esclarecer a inconsistência de resultados contraditórios obtidos após a combinação de PRP e enxerto ósseo autógeno no aumento da taxa de osteogênese e na qualidade de formação óssea, Choi et al.⁹ examinaram a influência das concentrações de PRP na viabilidade e proliferação celular *in vitro*. Culturas de células ósseas obtidas de fragmentos de alvéolos expostas ao PRP mostraram uma inibição por altas concentrações e estimulação em mais baixas, concluindo que tais variações poderiam influenciar a formação óssea.

A comparação de 2 métodos de preparo do gel de PRP e seus níveis de fator de crescimento utilizando o agente de geleificação ITA (Natrex Technologies Inc, Greenville, NC) ou a adição de trombina e cloreto de cálcio foi realizada por Landesberg et al.³⁰. Os resultados mostraram que ambos os métodos de preparação formaram o gel de PRP em menos de 30 minutos e seus níveis de PDGF e TGF- β foram

semelhantes, levando os autores a concluir que o uso do agente de geleificação é equivalente ao do cloreto de cálcio e trombina, sem a necessidade de equipamento especial, nem o risco de coagulopatias.

Os efeitos do cálcio e da trombina na liberação de fatores de crescimento do PRP, e o seu potencial mitogênico osteoblástico e endotelial *in vitro* foram avaliados por Frechette et al.¹². Testes indicaram variações nas concentrações de fatores de crescimento e que o cálcio e a trombina regularam sua liberação, síntese e/ou degradação em padrões estereotípicos. Grandes divisões de células osteoblásticas e endoteliais foram promovidas pelo PRP, apoiando o conceito do seu benefício na reparação tecidual.

Landesberg et al.²⁹ compararam o uso do TRAP (*thrombin receptor agonist peptide-6*) e trombina bovina como agentes de geleificação na preparação do PRP. O tempo de coagulação e a retração do coágulo *in vitro* foram mensurados em função da concentração de TRAP e a liberação de fatores de crescimento relacionados ao PRP em função de sua preparação também foi determinada. De acordo com os resultados, os autores observaram uma polimerização mais rápida com a adição de trombina que, entretanto, causou uma considerável retração do coágulo (43%), enquanto o TRAP isolado resultou em apenas 15% de retração. Concluíram que o uso de TRAP para ativar a formação do coágulo pode ser uma alternativa segura à trombina bovina, apresentando um bom tempo de trabalho e significativamente menos retração de coágulo que os métodos atualmente disponíveis de produção do PRP.

Em estudo recente, Weibrich et al.⁶² compararam os níveis de fator de crescimento no PRP preparado pelo banco de sangue (BB) que usa o método de separação celular descontínuo ou pelo método denominado *buffy coat* (Curasan). Este estudo observou que nem a contagem de plaquetas no sangue inteiro nem no PRP é útil para prever os níveis finais de fator de crescimento em qualquer preparação de PRP. Concluíram que as proporções diferentes de fatores de crescimento

corresponderam a diferenças nas proporções celulares nas preparações de PRP analisadas, sugerindo que haja fontes principais diferentes destes fatores de crescimento no PRP, por exemplo, plaquetas, leucócitos e plasma.

Jahn et al.²³ avaliaram um protocolo de dupla centrifugação, realizando contagem de plaquetas de amostras de sangue de 33 indivíduos, de ambos os sexos, de 22 a 80 anos de idade. Na primeira centrifugação utilizou 200 g por 10 minutos e na segunda, 200 g por 10 ou 15 minutos em centrífuga (CELM mod. SIN 1200). Os resultados mostraram que a técnica de dupla centrifugação foi eficiente para a separação de plaquetas no plasma, levando a uma concentração média de 370,2% no terço inferior do tubo, após a segunda centrifugação por 15 minutos.

Para estabelecer um método barato e eficiente de preparação do PRP para utilização em cirurgia plástica Vendramin et al.⁵⁸ realizaram 20 testes nos quais variaram a força e o tempo de centrifugação para determinar qual deles proporcionava maior concentração plaquetária e mais 10 outros testes para comprovar a sua reprodutibilidade. A utilização de uma força de centrifugação de 300 g por 10 minutos na primeira centrifugação e de 640 g por 10 minutos na segunda centrifugação obtiveram as maiores concentrações de plaquetas, 4,5 vezes superiores a concentração na amostra, mostrando que os testes foram reprodutíveis. Uma alta concentração plaquetária pode ser obtida por este protocolo com a formação de gel sendo possível pelo uso de trombina autóloga, o que tem facilitado sua aplicação em cirurgia plástica, com bons resultados na cicatrização de feridas e na integração de enxertos ósseos e cutâneos.

Em um trabalho clínico para tratamento de extensas perdas ósseas decorrentes de neoplasias, Marx et al.³⁸, utilizaram o PRP obtendo uma concentração de plaquetas de 338% e identificaram o PDGF e o TGF- β no seu interior. A avaliação de anticorpo monoclonal de

enxertos de medula óssea mostrou células que eram capazes de responder aos fatores de crescimento, pela ligação aos receptores da membrana celular. As quantias adicionais destes fatores de crescimento obtidas acrescentando PRP a enxertos comprovaram uma taxa de maturação radiográfica de 1,62 a 2,16 vezes comparadas a enxertos sem PRP. Os resultados histomorfométricos mostraram que houve maior densidade óssea nos enxertos quando o PRP foi adicionado ao contrário daqueles sem PRP.

O efeito do PRP sobre o enxerto de osso autógeno foi avaliado por Gerard et al.¹⁶ em defeitos bilaterais de 2 cm x 1 cm na borda inferior da mandíbula de cães. Osso fragmentado córtico-medular do ilíaco foi utilizado para preencher ambos os defeitos, porém, o do lado direito recebeu também PRP. A análise radiográfica indicou que em um e 2 meses os enxertos sem PRP eram mais densos, e a 3 e 6 meses não havia nenhuma diferença. Histomorfometricamente, em um e 2 meses havia menos osso enxertado e mais osso 3 e 6 meses. Concluíram que o PRP pareceu aumentar o reparo inicial em enxertos autógenos, entretanto, depois de 2 meses este efeito não foi mais significativo.

Utilizando o mesmo modelo experimental Gerard et al.¹⁷ realizaram uma análise em nível celular para determinar o número de osteoblastos e osteoclastos presentes nos grupos tratados com e sem PRP. Os autores concluíram que o número aumentado dessas células nos locais enxertados devido à adição do PRP estava limitado aos períodos iniciais, e que os enxertos ósseos autógenos sem PRP tinham números semelhantes de células ósseas ativas após um mês nesse modelo animal.

Avaliando o PRP combinado com osso bovino inorgânico Aghaloo et al.² realizaram 4 defeitos cranianos em coelhos e enxertaram com osso autógeno, xenógeno, xenógeno com PRP e um controle sem enxerto. Após 1, 2 e 4 meses 5 animais foram sacrificados por período. Com base nos resultados radiográficos, concluíram que apesar de maior

densidade óssea ter sido observada nos defeitos enxertados comparados ao controle, o significado clínico é difícil determinar, desde que todos os materiais pareceram densos na radiografia. De acordo com a histomorfometria, o enxerto autógeno mostrou um aumento ósseo substancialmente maior comparado com outros materiais de enxerto ou ao grupo controle.

Para estudar os efeitos dos fatores de crescimento liberados de plaquetas (PRGF) e do colágeno tipo I na reparação óssea, Fuerst et al.¹³ realizaram defeitos nas mandíbulas de miniporcocos e preencheram com colágeno+PRGF ou somente com colágeno, enquanto defeitos controle foram deixados sem tratamento. Os resultados mostraram maior formação óssea no grupo colágeno e que as diferenças entre os grupos colágeno e colágeno+PRGF, e entre o colágeno e os controles foram estatisticamente significantes. Na análise histológica, defeitos preenchidos com colágeno+PRGF mostraram reações inflamatórias até 4 semanas e a neoformação óssea perto dos remanescentes do colágeno foi reduzida. Os dados sugeriram que o grupo colágeno pode auxiliar as fases iniciais da reparação do osso cortical.

Fundamentado no conhecimento da invasão vascular prematura ser um fator chave na incorporação de osso alógeno, reduzindo as complicações relacionadas à integração óssea mais lenta e incompleta, e que as MSC associadas ao PRP são potentes indutores angiogênicos, capazes de liberar VEGF, Lucarelli et al.³¹ avaliaram se esta combinação poderia aumentar a integração alógena em ovelhas. Um defeito tamanho crítico foi realizado na porção mediana da diáfise do osso metatarsal, sendo preenchido, no grupo experimental, por enxerto alógeno mais MSC, PRP e colágeno (6 animais) e no grupo controle apenas por enxerto alógeno (4 animais). As análises foram feitas mediante radiografia, teste mecânico e histomorfometria, mostrando neoformação óssea significativa no grupo experimental, relacionada com

melhor invasão vascular e remodelação do enxerto. Concluíram que estes resultados confirmaram o papel fundamental desempenhado pelas MSC e PRP na reparação óssea e que estudos adicionais são necessários para melhor definir o papel que essas células desempenham quando utilizadas isoladamente.

Com o objetivo de avaliar o efeito de PRP associado a um material osteocondutivo na regeneração óssea, Plachokova et al.⁴⁸ realizaram defeitos no crânio de ratos, os quais foram preenchidos com partículas de HA/ β -TCP (hidroxiapatita / fosfato tricálcico- β), partículas de HA/ β -TCP combinadas com PRP líquido, partículas de HA/ β -TCP combinadas com gel de PRP, enquanto alguns defeitos foram deixados sem tratamento, servindo como controle. Depois de 4 semanas de implantação, análises histológica, histomorfométrica e de tomografia micro-computadorizadas não revelaram diferenças na neoformação óssea entre os grupos. Além do mais, nenhum efeito adicional do gel de PRP comparado com líquido de PRP foi descoberto, com exceção da capacidade de manipulação aumentada do enxerto. Estes resultados sugeriram que PRP não teve nenhum efeito positivo na formação óssea associado a um material osteocondutor após o período de implantação.

Defeitos segmentados de 2,5 cm foram realizados na tíbia de ovelhas e preenchidos com PRP autógeno em um carreador de colágeno por Sarkar et al.⁵⁴ para estudar o efeito do PRP na neoformação óssea. Após 12 semanas, os espécimes ósseos removidos foram avaliados quantitativamente por radiografia, tomografia computadorizada, teste biomecânico e avaliação histológica. Volume ósseo, densidade mineral, rigidez mecânica e histologia do osso recém-formado no defeito não diferiram significativamente entre os grupos PRP e controle, e nenhum efeito do PRP sobre a formação óssea foi observado. Foi sugerido que o PRP não aumenta a neoformação óssea em defeito de tamanho crítico com um baixo potencial regenerativo e que tais defeitos poderiam requerer estímulos mais potentes, por exemplo, combinações

de biomateriais funcionais ou enxertos autógenos, precursores celulares ou fatores de crescimento osteoindutivos.

Pela avaliação de proteínas da matriz óssea, Thorwarth et al.⁵⁶ examinaram a formação óssea após o preenchimento de defeitos experimentais com osso autógeno ou com um colágeno liofilizado, combinados ao PRP em um estudo em porco doméstico. Seis grupos, com ambos os materiais, com e sem PRP em duas concentrações foram comparados com osso não tratado em 2, 4, 12 e 26 semanas. Os resultados indicaram a participação de BMP-2 em todas as fases de formação óssea. Efeitos do PRP na expressão de proteínas da matriz óssea foram identificados particularmente na fase inicial, indicando que o PRP tem um efeito osteopromotor devido suas propriedades mitogênicas se colocado juntamente com osso.

Para investigar a influência do PRP na regeneração de defeitos ósseos, Wiltfang et al.⁶⁴ realizaram enxertos de osso autógeno, grânulos de TCP (CeraSorb[®]), osso mineral poroso bovino deproteinizado (BioOss[®]) e um osso bovino semelhante a esponja de colágeno (Colloss[®]) com e sem PRP em duas preparações, distribuídos aleatoriamente em defeitos na calota de miniporcos. Em duas semanas, o PRP pôde significativamente aumentar a reparação óssea somente quando aplicado em combinação com osso autógeno. Quatro semanas depois da cirurgia, ambas as preparações de PRP já não aumentaram a regeneração óssea nos grupos autógenos e em 12 semanas, o nível de neoformação foi semelhante em todos os grupos. Os autores concluíram que o PRP não acrescentou nenhum benefício quando substitutos ósseos xenógenos foram usados, em contraste ao efeito inicial significante na regeneração óssea quando foi associado ao enxerto autógeno.

A extração de terceiros molares mesioangulados impactados pode causar múltiplos defeitos periodontais na raiz distal do segundo molar. Sammartino et al.⁵² analisaram os efeitos do PRP na reparação e prevenção de complicações periodontais adjacentes a esses

dentos e observaram 12 semanas após a cirurgia uma redução notável na profundidade de sondagem e uma melhora no nível de inserção nos casos tratados com PRP comparados aos controles, assim como, neoformação óssea no defeito. Concluíram que o PRP é efetivo na indução e estimulação da regeneração óssea para o tratamento dos tipos de defeitos avaliados.

A instalação de implantes na maxila posterior pode ser problemática devido ao volume ósseo insuficiente e a proximidade do seio maxilar, além da qualidade óssea ser freqüentemente desfavorável, pois a porção medular muitas vezes é de baixa densidade. O levantamento do seio maxilar foi desenvolvido em meados da década de 70 para aumentar a altura óssea vertical permitindo a estabilidade primária de implantes, sendo um procedimento seguro e previsível, utilizando enxerto autógeno combinado ou não a substitutos ósseos com resultados favoráveis. Klongnoi et al.²⁸ avaliaram os efeitos do PRP no levantamento de seio maxilar utilizando osso autógeno ou fluorohidroxiapatita (Algipore® - Friadent, Mannheim, Germany) e instalação simultânea de implantes endósseos, em miniporcós. Os resultados mostraram que os materiais de enxerto apresentaram níveis crescentes de contato osso-implante (BIC) e de osso recém-formado em todos os períodos observados, levando os autores a concluir que a aplicação de PRP não acrescentou efeitos benéficos significantes no BIC, na porcentagem de neoformação óssea e na quantidade de osso substituto remanescente.

A membrana de Schneider de seios de miniporcós foi bilateralmente elevada por Furst et al.¹⁴ e o espaço entre a membrana e a parede do seio foi preenchido com PRP e HA (grupo PRP) ou somente HA (grupo controle), simultaneamente à instalação de implantes pela parede facial do seio. A análise histológica, em 3 e 6 semanas, mostrou menor contato osso-implante no grupo PRP e após 12 semanas, os resultados foram semelhantes em ambos. No osso enxertado, contatos no grupo PRP foram mais extensos que no controle em 3 semanas, inferiores

ao controle em 6 semanas e ultrapassado estes em 12 semanas. Este estudo mostrou que o PRP tem um efeito diferencial na osteointegração em osso enxertado e osso local, entretanto, combinado com HA não foi superior a HA somente.

Roldan et al.⁵¹ analisaram o possível benefício do PRP no enxerto de seio maxilar comparado com rhBMP-7 associados ao osso bovino inorgânico e inserção simultânea de implante em miniporcos. Os autores concluíram, com base nos resultados que o uso da rhBMP-7 conduziu a resultados superiores com respeito a osteointegração de implantes endósseos e a altura de novo osso, quando comparado com o PRP.

Utilizando a engenharia tecidual Ohya et al.⁴⁴ avaliaram MSC e PCBM associados ao PRP para elevação do assoalho do seio maxilar em coelhos. As MSC foram isoladas da medula da crista ilíaca e o PRP foi obtido do sangue periférico. PCBM foram coletados da crista ilíaca e misturados ao PRP. De acordo com as observações histológicas, osso recém-formado e neovascularização estavam presentes em 2 e 4 semanas, porém, em 8 semanas, medula gordurosa ocupou grandes áreas do osso lamelar em ambos os locais. Não houve diferença significativa no volume e na altura óssea aumentada entre os grupos em cada semana, mas havia diferenças significantes entre 2 e 8 semanas e em volume de osso entre 4 e 8 semanas no grupo PCBM / PRP. Estes resultados sugeriram que o complexo MSC / PRP possa ser usado para regeneração óssea em elevação do assoalho do seio, comparada com o complexo PCBM / PRP.

A capacidade do PRP associado ao osso medular da crista ilíaca foi estudada por Jakse et al.²⁴ em procedimentos de levantamento de seio maxilar de ovelhas. A análise estatística da proporção média de novo osso e da área de contato entre o enxerto e o osso neoformado não revelou diferenças significantes entre os grupos. Os resultados mostraram uma capacidade regenerativa baixa do PRP

levando os autores a concluir que pesquisas básicas são necessárias para investigar mais profundamente seus efeitos na regeneração óssea.

Em maxilas severamente reabsorvidas e com pneumatização do seio, Raghoobar et al.⁵⁰ realizaram enxertos para avaliar o efeito do PRP na remodelação óssea de material autógeno da crista ilíaca. Três meses depois da reconstrução, biópsias foram realizadas com uma trefina e 3 implantes foram instalados na maxila posterior esquerda e direita. A reparação da ferida ocorreu sem transtornos, não sendo observada nenhuma diferença entre o lado tratado ou não com PRP, concordando com os achados histológicos e as sobredentaduras retidas nos implantes, confeccionadas 6 meses após a implantação, mostraram bom desempenho quando submetidas às cargas funcionais. Neste estudo, nenhum efeito benéfico do PRP na reparação da ferida e na remodelação óssea foi observado, não apresentando valor adicional na promoção de reparo de defeitos de tamanho não crítico enxertados.

A associação do osso alógeno liofilizado (FDBA) com PRP ou membrana absorvível foi comparada por Kassolis e Reynolds²⁶ para o enxerto bilateral do seio maxilar em 10 pacientes. A análise histomorfométrica revelou uma porcentagem significativamente mais alta de tecido vital e menor de partículas de enxerto residual em seios tratados com FDBA e PRP, entretanto, a porcentagem de formação óssea com tal combinação não foi significativamente mais alta que em seios enxertados com FDBA/membrana. Os resultados sugeriram que a combinação de FDBA/PRP aumentou a taxa de formação óssea quando comparada com FDBA/membrana.

O uso de hidrogéis para a liberação controlada de fatores de crescimento plaquetários e o conseqüente aumento da regeneração óssea induzida por PRP foram avaliados em defeitos produzidos no osso parietal de coelhos por Hokugo et al.²¹. Hidrogéis incorporados por PRP, PRP ativado por trombina, ou somente hidrogel foram aplicados no defeito

e um controle foi deixado sem tratamento. Regeneração óssea bem sucedida foi observada no defeito ósseo tratado com hidrogel associado ao PRP, apresentando diferença bastante acentuada quando comparado aos outros grupos. Os autores concluíram que o hidrogel é um material promissor para a liberação controlada de fatores de crescimento plaquetários para aumentar a regeneração óssea.

A altura da crista óssea remanescente inferior a 5 mm na maxila posterior indicou a necessidade de levantamento de seio em 105 pacientes para instalação simultânea de implantes endósseos. Mazor et al.³⁹ realizaram enxertos ósseos compostos que consistiu de 30-40% de osso autógeno e de 60-70% de enxerto xenógeno, associadas ou não ao PRP. No pós-operatório de 6 meses, os implantes foram expostos e nenhuma evidência clínica ou radiográfica de perda na crista óssea foi observada e todos estavam clinicamente integrados. O uso do PRP no aumento da maxila posterior severamente reabsorvida apresentou, segundo os autores, benefícios clínicos óbvios, reduzindo o período de maturação óssea, melhorando a manipulação do enxerto e acelerando o reparo do tecido mole.

Embora o levantamento da parede lateral do seio maxilar seja um procedimento clínico previsível para aumentar a altura óssea resultando em taxas de sucesso dos implantes comparáveis àquelas de osso nativo, o período de reparação permanece controverso. Vários métodos foram pesquisados, inclusive adição de fatores de crescimento e peptídeos, para reduzir este tempo de reparação e aumentar a formação óssea. A incorporação de PRP foi proposta como um método para acelerar e melhorar a reparação da ferida, além de aumentar a qualidade óssea. Boyapati e Wang⁴ revisaram a literatura pertinente e verificaram dados conflitantes com respeito ao seu uso em enxertos de seio. Fatores que podem contribuir a esta variabilidade incluem modelo de estudo impróprio, estudos pouco significativos, concentrações de plaquetas discrepantes, e diferentes materiais de enxerto utilizados. Além disso, os

métodos para quantificar a regeneração óssea e reparação da ferida diferem entre os estudos. Os autores concluíram que devido à limitada evidência científica, o uso de PRP em levantamento de seio não pode ser recomendado.

A incorporação de procedimentos restauradores durante a instalação de implantes, procurando um melhor perfil de emergência, a disponibilidade do uso de restaurações cerâmicas que simulam muito bem os dentes naturais, tem trazido um avanço na abreviação do tempo de tratamento dos pacientes. Publicações de pesquisas mais recentes forneceram diretrizes e protocolos cirúrgico e protético para a aplicação da prótese imediata funcional. A melhora na fase de reparação pela liberação local de fatores de crescimento para o sítio cirúrgico, assim como pelos avanços biotecnológicos dos materiais de enxerto ósseo, permitiu a realização de procedimentos múltiplos em fase única. Petrungaro⁴⁷ apresentou os resultados de mais de 400 implantes com restaurações imediatas instalados em locais edêntulos, alvéolos de extração recente e regiões de seio enxertado, bem como realçou as diretrizes para o sucesso cirúrgico.

Para avaliar o efeito do PRP alógeno em um modelo experimental de osteogênese ao redor de implantes laminares em ratos, Fontana et al.¹¹ retiraram 1 mililitro de sangue de cada animal e prepararam o PRP para inserção juntamente com um implante na tíbia direita, enquanto a tíbia esquerda recebeu só o implante. Após 30 dias o volume de osso perimplantar foi avaliado histomorfometricamente e submetido à análise estatística e, de acordo com os resultados, concluíram que um maior volume ósseo esteve presente quando o PRP foi usado.

O aumento da osteointegração de implantes foi estudado por Kim et al.²⁷ comparando o osso desmineralizado em grânulos (DBP) isolado ou combinado com PRP em um modelo experimental em cachorro. Trinta defeitos ósseos foram criados cirurgicamente e em cada

um deles um implante foi inserido e o espaço entre a parede óssea e a superfície do implante foi enxertado com DBP, DBP e PRP e um grupo sem tratamento. A análise histomorfométrica após 6 e 12 semanas mostrou uma porcentagem mais alta de contato de osso com DBP e PRP comparado com controle e DBP e os autores concluíram que defeitos ósseos ao redor de implantes podem ser tratados com sucesso com DBP e que o PRP pode melhorar a formação óssea.

A relação da contagem de plaquetas no PRP sobre a regeneração óssea ao redor de implantes *in vivo* foi avaliada por Weibrich et al.⁵⁹ em um estudo em coelhos, utilizando o PCCS para preparação do PRP. Um implante foi inserido na distal de cada fêmur, os quais foram aleatoriamente tratados com ou sem PRP. Os animais foram sacrificados em 28 dias e, de acordo com os resultados, observaram que a concentração de plaquetas requerida para um efeito positivo do PRP em regeneração óssea parece abranger uma gama muito limitada. Efeitos biológicos vantajosos aconteceram com uma concentração de plaquetas de aproximadamente 1.000.000/ μ l. Em mais baixas, o efeito é inferior, enquanto mais altas poderiam ter um efeito inibitório paradoxal. Por outro lado, o benefício deste tipo de concentrado de plaquetas não foi favorável para acelerar a osteointegração de implantes endósseos.

Jensen et al.²⁵ compararam ossos alógenos processado em grânulo e fresco congelado e a influência do PRP combinado a esses materiais ao redor de implantes inseridos bilateralmente no côndilo femoral de 8 cães. Cada implante foi rodeado por um espaço concêntrico de 2,5 mm, preenchido aleatoriamente com osso alógeno fresco-congelado, osso alógeno em grânulos, osso alógeno fresco-congelado + PRP ou osso alógeno em grânulos + PRP. Embora o nível de plaquetas no PRP fosse 7,7 vezes maior que o nível sangüíneo, nenhuma melhora na formação óssea ou fixação do implante foi observada pela adição do PRP.

Usando um protocolo cirúrgico de fase única, Monov et al.⁴⁰ inseriram um total de 34 implantes na mandíbula edêntula de 10 pacientes. No quadrante III o PRP foi instilado localmente antes da colocação do implante, enquanto nenhum PRP foi utilizado no quadrante IV. Todos os implantes foram acompanhados com repetidas medidas de estabilidade por meio da análise da frequência de ressonância em diferentes intervalos de tempo e os resultados não mostraram diferença estatisticamente significativa entre os 2 grupos levando os autores a concluir que o uso de PRP durante a instalação de implante na mandíbula anterior não trouxe benefício adicional.

As propriedades biomecânicas de enxertos ósseos são fatores importantes a serem considerados na prática clínica, embora haja poucas descrições relevantes sobre o assunto. Alterações dessas propriedades no local do enxerto estão na dependência da taxa de reabsorção e formação óssea. Por essa razão, o tipo adequado de material deve ser cuidadosamente selecionado de acordo com o propósito para o qual o enxerto será realizado^{22,33,45,55}.

Devido os dados contraditórios com relação aos efeitos da irradiação gama nas propriedades do osso cortical alógeno, Hamer et al.¹⁹ investigaram um método para a medida comparativa da força do osso para avaliar amostras de osso padrão e de cadáveres irradiadas com doses variadas combinadas ou não com congelamento. Nenhum dos tratamentos teve qualquer efeito no comportamento elástico das amostras, mas houve uma redução da força em 64% dos valores controle após irradiação com 28 kGy. Também houve uma redução dose-dependente na força e na habilidade das amostras para absorver trabalho antes do fracasso. Os autores sugeriram que a irradiação possa causar uma alteração na matriz óssea do osso alógeno, mas contanto que seja usado em situações na qual a carga esteja dentro de sua região elástica, então não deverá acontecer fracasso.

Nather et al.⁴² estudaram a reparação e a força de torção de secções de diáfises de tíbias não-vascularizadas e vascularizadas em gatos. Ambos os tipos de enxertos consolidaram a fratura no mesmo período de tempo, e em 12 e 16 semanas os enxertos não-vascularizados eram tão fortes quanto os enxertos vascularizados. Os autores ressaltam que, ainda que ambos os enxertos tenham incorporado prontamente nos animais estudados, em pacientes a incorporação leva um tempo mais longo.

Em 2004, Nather, et al.⁴³ compararam a força biomecânica do enxerto cortical alógeno congelado com o liofilizado em transplante *in vivo* executados na tíbia de gatos. Após 8, 12, 16 e 24 semanas, analisando torque máximo, dureza de torção e energia de absorção, observaram que os enxertos alógenos congelados alcançaram 64% da força em 6 meses. Com marcante contraste, enxertos alógenos liofilizados foram significativamente mais fracos, alcançando somente 12% da força de torque máximo. Os autores concluíram que para a reconstrução de defeitos ósseos corticais volumosos, somente enxertos alógenos corticais congelados deveriam ser usados, em detrimento dos alógenos liofilizados por apresentarem resultados insatisfatórios.

A manutenção da redução anatômica em um modelo experimental de fratura na tíbia de cabras foi avaliada por Welch et al.⁶³ comparando o efeito de um cimento de fosfato de cálcio e do enxerto autógeno esponjoso fragmentado. Os animais foram sacrificados em períodos que variaram de 24 horas a 18 meses e os espécimes submetidos às análises histológica e biomecânica. Não foi observada diferença significativa na dureza da fratura entre os 2 grupos de tratamento em quaisquer dos tempos examinados. O cimento de fosfato de cálcio foi reabsorvido rapidamente e o volume de osso trabecular nos defeitos foi restabelecido ao do controle sem tratamento aos 6 meses em ambos os grupos. Os autores concluíram que enxertos autógenos não mantiveram uma redução anatômica de fraturas em tíbia neste modelo.

Em contraste, o aumento com cimento de fosfato de cálcio preveniu o colapso do fragmento da fratura e manteve a congruência articular como a fratura reparada.

Gauthier et al.¹⁵ investigaram a eficiência de um substituto ósseo de fosfato de cálcio injetável (IBS) para procedimentos regenerativos através de imagens micro-tomográficas (μ CT), teste biomecânico e análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV). O material injetável foi implantado durante 6 semanas em defeitos de tamanho crítico na extremidade distal de fêmures de coelho. Extensa justaposição de novo osso foi notada com ambas as técnicas. O ganho de força pareceu bem relacionado com a quantidade de tecido ósseo neoformado, observada com μ CT. Este estudo mostrou a habilidade de técnicas não-destrutivas para investigar aspectos biológicos e mecânicos de substituição de osso com biomateriais injetáveis.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência do PRP, associado ou não ao enxerto autógeno, utilizando a técnica da ROG, na reparação de defeitos ósseos cirúrgicos criados na tíbia de coelhos mediante análises radiográfica, microscópica e das propriedades biomecânicas.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Animais e grupos experimentais

Para a realização do presente estudo foram utilizados 25 coelhos adultos, machos, *New Zealand*, com peso médio de 3,5 kg, os quais foram mantidos em gaiolas individuais com ração balanceada (Probiotério Moinho Primor S.A.) e água *ad libitum*. Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos - UNESP. Este estudo foi realizado com base nos Princípios Éticos para a Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos – UNESP (protocolo nº 026/2005-PA/CEP).

Quatro defeitos foram realizados em cada animal e divididos em grupos: controle (C = defeito ósseo), autógeno (A = defeito ósseo + enxerto autógeno), PRP (PRP = defeito ósseo + PRP) e PRP + autógeno (PRPA = defeito ósseo + PRP + enxerto autógeno).

4.2 Obtenção do plasma rico em plaquetas

Mediante punção do coração do animal com seringa tipo luer descartável (Figura 1a), 18 ml de sangue foram removidos e

colocados em 4 tubos de 4,5 ml para coleta de sangue a vácuo (Vacutainer - Becton-Dickinson - Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK), contendo 0,5 ml de citrato de sódio tamponado como anticoagulante. A amostra sangüínea contida nos tubos foi colocada numa centrífuga (SIN - Sistema Nacional de Implantes, São Paulo, Brasil) a 200 g por 10 minutos (Figura 1b), para a separação dos constituintes do sangue em plasma e células vermelhas (Figura 1c). Após a pipetagem do plasma com uma seringa tipo insulina (Figura 1d) o mesmo foi colocado em tubos estéreis. Uma segunda centrifugação foi realizada a 200 g por 10 minutos para a separação do PRP (porção inferior) e PPP (porção superior) (Figura 1e). O PRP foi removido do tubo, colocado em cubeta metálica esterilizada (Figura 1f) ao qual foi adicionado o cloreto de cálcio 10% (Terapêutica – Farmácia de manipulação – São José dos Campos, SP) na proporção de 8:1, com o objetivo de promover a reversão do processo de quelação do citrato de sódio, permitindo a aplicação do PRP na forma de gel.

4.3 Contagem de plaquetas

A contagem da quantidade de plaquetas foi feita no sangue total e no PRP por mm^3 , diluindo-se 20 μl de sangue total ou PRP em 2 ml de oxalato de amônio 1%. A solução foi homogeneizada durante 10 minutos, colocada em câmara de Neubauer não espelhada, aguardando mais 10 minutos para sedimentação das plaquetas. A contagem foi feita utilizando-se os 25 campos centrais da câmara sob microscopia óptica (400x). Levando-se em conta os fatores de diluição e da câmara, o resultado obtido da contagem de plaquetas foi multiplicado por 10^3 , obtendo-se assim o valor final $/\text{mm}^3$.



FIGURA 1 - Preparação do PRP: a) punção intracardiaca do sangue; b) colocação dos tubos em centrífuga; c) separação dos constituintes do sangue em plasma (porção superior) e células vermelhas (porção inferior); d) retirada do plasma separado após a centrifugação; e) separação do PRP (porção inferior) e PPP (porção superior); f) colocação do PRP em cubeta metálica esterilizada

4.4 Procedimentos cirúrgicos

Os animais foram anestesiados por via intramuscular, sendo o sedativo analgésico e relaxante muscular (solução aquosa a 2% de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3 tiazina - Rompum - Bayer do Brasil) aplicado 5 minutos antes da administração do anestésico geral (cloridrato de ketamina - Dopalen, AgribRANDS do Brasil Ltda.) na proporção de 1 ml/kg e 0,5 ml/kg de peso corpóreo, respectivamente.

Após a depilação e assepsia com solução de clorexidina a 0,2% (Terapêutica – Farmácia de manipulação – São José dos Campos, SP) na pata, uma incisão com uma lâmina intercambiável nº 15, montada em bisturi tipo Bard-Parker nº 3 foi realizada na porção lateral, seguida de divulsão muscular e incisão dos planos profundos. Subseqüentemente, o descolamento do tecido foi realizado, seguido da confecção de 2 defeitos ósseos unicorticais (Figura 2a), distanciados 5 mm entre si (Figura 2b), em cada tíbia, com o auxílio de um motor cirúrgico elétrico Asseptico (AEU-707-MGF Asseptico Inc., USA) usando redução 1/16, ponta reta, uma broca tipo trefina de 5 mm, velocidade de 1500 rpm e irrigação constante com cloreto de sódio a 0,9% estéril.

Os fragmentos ósseos obtidos a partir da confecção dos defeitos foram particulados com um osteótomo biarticulado e utilizados como material de enxerto. Nas tíbias direitas de cada animal, um defeito foi preenchido apenas por coágulo sangüíneo e o outro por enxerto autógeno (Figura 2c), sendo denominados, respectivamente, grupo controle (C) e grupo autógeno (A). Os defeitos nas tíbias esquerdas foram preenchidos por PRP e por PRP associado ao osso autógeno (Figura 2d) e denominados, respectivamente, grupo PRP (PRP) e grupo PRP + autógeno (PRPA). Todos os defeitos foram recobertos com uma barreira de PTFE (Figura 2e) para evitar a interferência de tecido não-osteogênico

no seu interior. A película não-porosa de PTFE (Tecnoflon-Brasflon, Ind. & Com. Plásticos, São Paulo, S.P.), com espessura de 0,13mm apresenta características e biocompatibilidade adequadas para o uso em cirurgias com a técnica da regeneração óssea guiada. A barreira de PTFE foi colocada em embalagens individuais, seladas e esterilizadas em autoclave. Em seguida, as estruturas dos planos profundo e superficial foram suturadas com fio absorvível Vycril (ETHICON / Johnson & Johnson 6-0) e de seda (ETHICON / Johnson & Johnson 4-0) (Figura 2f), respectivamente. Os cuidados pré e pós-operatórios foram realizados para cada animal, administrando-se, por via intramuscular, o antibiótico Pentabiótico veterinário pequeno porte (Fort Dodge Saúde Animal Ltda.) e antiinflamatório Voltaren 75mg solução injetável (Parker-Davis, São Paulo, Brasil) nas dosagens de 0,1 ml/kg e 0,6 ml/kg do peso corporal, respectivamente. O antibiótico e o antiinflamatório foram administrados uma hora antes dos procedimentos cirúrgicos, prolongando o uso do antiinflamatório por mais 1 dia.

4.5 Períodos de sacrifício

Decorridos 15, 30 e 60 dias do procedimento cirúrgico, 5 animais foram sacrificados em cada período por superdosagem de anestésico. As peças contendo os defeitos ósseos foram removidas em bloco, fixadas em formol a 10% (Merck S.A. Indústrias Químicas) por 72h, radiografadas, processadas no laboratório e, em seguida, submetidas às análises microscópica e histomorfométrica. Para análise das propriedades biomecânicas, foram sacrificados 5 animais em cada período após 30 e 60 dias do procedimento cirúrgico. As peças contendo os defeitos ósseos foram removidas em bloco, colocadas em solução de Ringer e congeladas até serem radiografadas e submetidas aos testes biomecânicos.

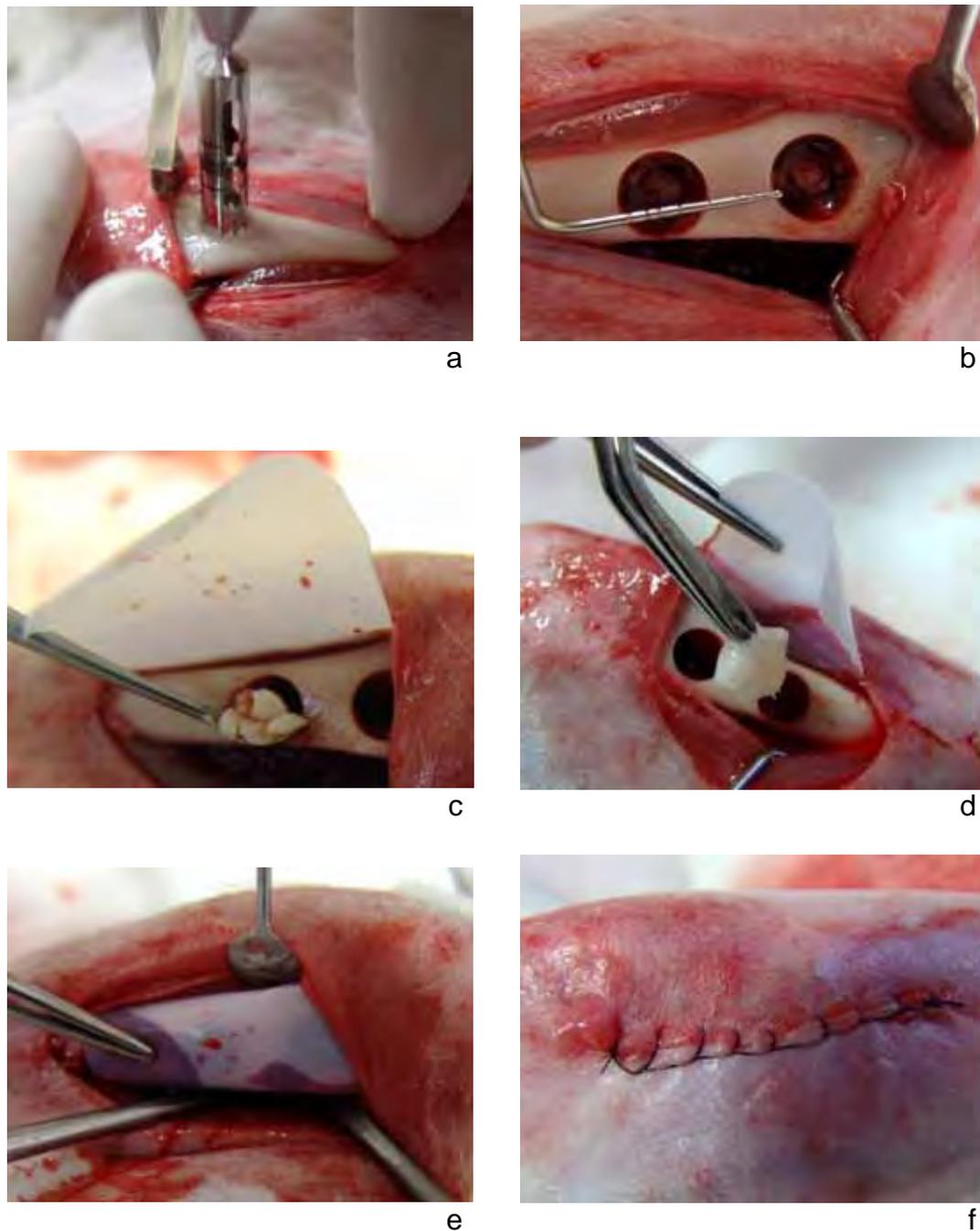


FIGURA 2 - Procedimentos cirúrgicos: a) confecção de defeito ósseo unicortical; b) defeitos ósseos, distanciados 5 mm na tíbia; c) preenchimento do defeito superior apenas por coágulo sangüíneo e do inferior por enxerto autógeno na tíbia direita; d) defeitos na tíbia esquerda preenchido por PRP (superior) e por PRP associado ao osso autógeno (inferior); e) barreira de PTFE recobrendo os defeitos; f) sutura da pele

4.6 Análise da densidade óptica

Para a obtenção das imagens radiográficas, foi utilizado o sistema Visualix Gx-S-HDI (Gendex Dental System, Dentisplay International, Chicago, IL, USA). Este sistema consiste de um software VixWin 1.9 (Gendex Dental System, Dentisplay International, Chicago, IL, USA) que capta a imagem radiográfica digital por meio de um sensor CCD (Charge-Coupled Device), com área ativa de 20 mm de largura por 30 mm de comprimento. O aparelho de raios X utilizado foi o Gendex 765 DC (Gendex Dental X-Ray Division, Dentistry International Inc., IL, USA), regulado para 65 KVp e 7 mA. As peças cirúrgicas foram colocadas sobre o referido sensor, posicionado paralelamente ao solo, e o feixe central de raios X foi direcionado perpendicularmente a esse dispositivo. A distância foco-filme e o tempo de exposição aos raios-X foi de 40 cm e 0,02 s, respectivamente.

Um estudo cego foi realizado para obter medidas da densidade da área em cada região correspondente ao defeito utilizando o sistema de análise de imagem (*Image Tool* - v.3.0; URHSCSA). Essas mensurações foram repetidas após 15 dias para a calibração intra-examinador.

4.7 Análise histológica e histomorfométrica

As peças contendo os defeitos foram desmineralizadas em solução de EDTA a 10% (ácido etilendinetriilo tetracético, sal dissódico dihidratado – Titriplex III[®] p.a. – Merck-KgaA, Darmstadt, Alemanha) e posteriormente processadas e incluídas em parafina. Os cortes

microscópicos foram feitos com 6 μm de espessura e as lâminas histológicas preparadas pelas técnicas histológicas rotineiras para coloração com hematoxilina-eosina e tricrômio de Mallory. Em seguida, essas lâminas foram analisadas pela microscopia de luz convencional para a análise histomorfológica dos aspectos gerais da neoformação óssea.

Para a realização da análise histomorfométrica, foi utilizado o método estereológico, que consiste em determinar parâmetros quantitativos tridimensionais de estruturas anatômicas a partir de cortes histológicos através da geometria e estatística. Os métodos estereológicos se baseiam em princípio geométrico-estatísticos, derivados da probabilidade das imagens dos perfis da estrutura na secção histológica coincidirem com um sistema-teste apropriado. Deste modo, a característica principal nesses métodos está na casualização das amostras, eliminando a ocorrência de vício na amostragem, realizado por meio da aplicação de procedimentos de escolha aleatória em todos os estágios do experimento, tais como: seleção dos animais, dos blocos histológicos, das lâminas histológicas, dos cortes e campos microscópicos.

Cortes histológicos semi-seriados foram realizados nos espécimes para obter 10 lâminas histológicas por animal em cada grupo. Dentre essas lâminas, 3 foram separadas aleatoriamente, obtidas longitudinalmente na região central do defeito, e avaliadas pelo programa Axiovision 4.5 (Carl Zeiss Vision Imaging Systems, Carl Zeiss, Alemanha). Para a mensuração da densidade da matriz óssea foi utilizada objetiva 20 x 0,45 (A-PLAN, Carl Zeiss) e ocular 10x (W-PI, Carl Zeiss) de um microscópio de luz (Axioskop 40, Carl Zeiss, Alemanha). As imagens de 5 campos histológicos por lâmina foram captadas por uma câmera digital (AxioCam MRc5, Carl Zeiss, Alemanha), correspondendo a uma área de 439,28 x 329,12 μm^2 . Imagens de 2 campos histológicos por lâmina foram obtidas próximas as bordas do defeito, utilizando objetiva 40 x 0,65 e

ocular 10x para a contagem do número de osteócitos na matriz neoformada.

4.8 Propriedades biomecânicas

Para avaliar a resistência mecânica em compressão do osso neoformado foi utilizada uma máquina universal EMIC (Figura 3a), modelo MEM 10.000, com capacidade máxima para aplicação de carga de 10^4 kg_f (9,81 kN).

A velocidade de aplicação da carga durante os ensaios de compressão (*push out*) foi constante e igual a 1 mm/seg, até a falha do espécime. Foi utilizada uma célula de carga de 20 kg_f com um dispositivo cilíndrico para ensaio de compressão, que permitiu a aplicação da carga na região do defeito do espécime. Os testes foram realizados à temperatura ambiente, e os espécimes mantidos úmidos com solução salina.

O dispositivo cilíndrico com diâmetro igual 3,1 mm assegurou que a carga compressiva fosse aplicada dentro do perímetro do defeito, somente em tecido ósseo neoformado (Figura 3b). Durante cada ensaio foi anotada a carga máxima atingida, no exato momento da falha do espécime. A resistência à compressão do tecido ósseo neoformado foi calculada por meio da expressão (1).

$$\sigma_c = 9.81 \times 4 \cdot F_{\text{máx}} / \pi D^2 = 12,5 F_{\text{máx}} / D^2 \dots\dots\dots (1)$$

Em que:

σ_c = resistência à compressão ou tensão de compressão do tecido neoformado [MPa]

$F_{\text{máx}}$ = carga máxima de compressão registrada durante o ensaio [kg_f]

D = 3,1 mm, diâmetro do dispositivo de compressão

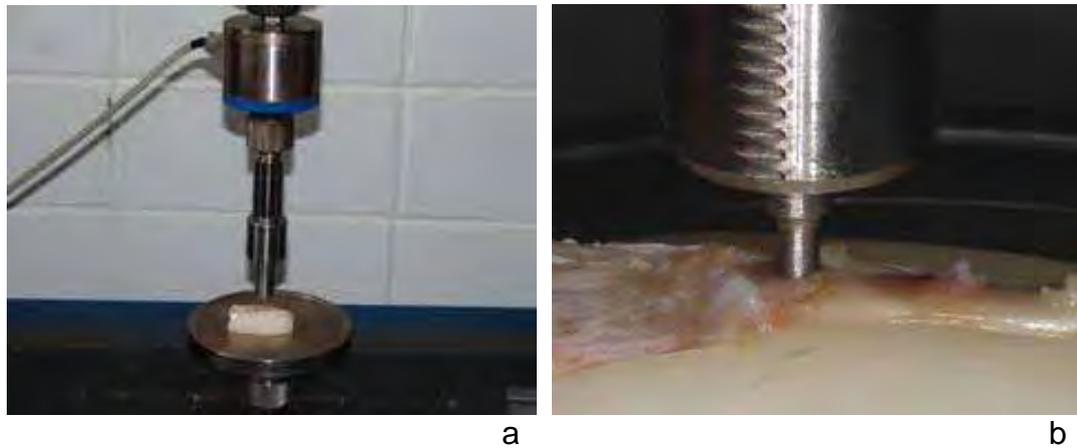


FIGURA 3 - Análise das propriedades biomecânicas do osso neoformado: a) célula de carga com um dispositivo cilíndrico para ensaio de compressão; b) dispositivo cilíndrico para aplicação da carga compressiva dentro do perímetro do defeito

4.9 Análise estatística

Os resultados obtidos da densitometria óptica, histomorfometria e propriedades biomecânicas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de 2 fatores de medidas repetidas. Foi avaliado um fator entre grupos, que é o tempo de tratamento e um fator dentro do grupo, que é o tipo de tratamento realizado. O nível de significância adotado foi de $\alpha = 0,05$. Os resultados obtidos foram submetidos ainda ao teste de comparação múltipla de Tukey.

5 RESULTADOS

5.1 Contagem de plaquetas

A contagem de plaquetas realizada confirmou que a técnica de preparação do PRP utilizada no presente estudo gerou uma fonte de plaquetas altamente concentrada. A média da contagem de plaquetas no sangue periférico foi de $280 \times 10^3/\text{mm}^3$ variando de $230 \times 10^3/\text{mm}^3$ a $315 \times 10^3/\text{mm}^3$. A média da contagem de plaquetas no PRP foi de $1052 \times 10^3/\text{mm}^3$ variando de $848 \times 10^3/\text{mm}^3$ a $1260 \times 10^3/\text{mm}^3$ (Figura 4).

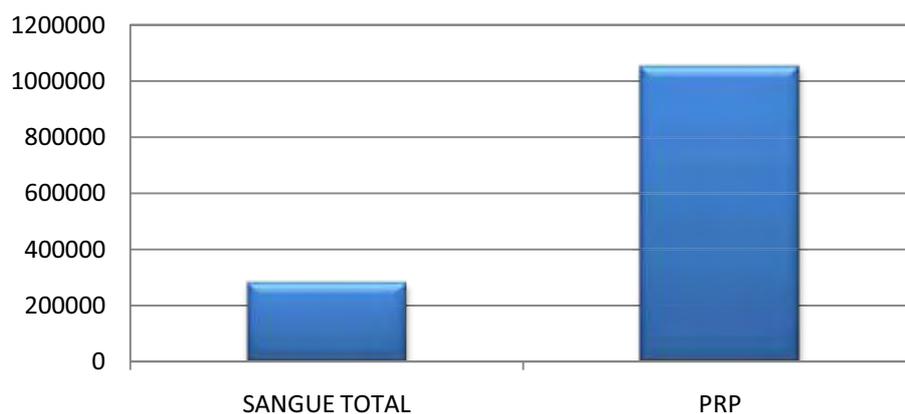


FIGURA 4 - Representação gráfica da média da contagem de plaquetas no sangue total e no PRP

5.2 Análise da densidade óptica

Os achados radiográficos mais freqüentes observados nos espécimes dos grupos controle e experimentais foram analisados em conjunto dentro de cada período considerado no experimento.

5.2.1 Quinze dias

De um modo geral, os aspectos radiográficos foram muito semelhantes dentro dos períodos entre os grupos C e PRP e A e PRPA. Nos grupos C (Figura 5a) e PRP (Figura 5c), notou-se imagem radiolúcida sugestiva da área do defeito ósseo exibindo limites precisos e definidos. Nos grupos A (Figura 5b) e PRPA (Figura 5d) notava-se área radiolúcida, sugestiva de defeito ósseo, com limites precisos e discretamente indefinidos em algumas regiões. Imagens mais radiopacas foram observadas no interior do defeito, correspondentes às partículas de enxerto ósseo.

5.2.2 Trinta dias

A topografia do defeito nos grupos C (Figura 6a) e PRP (Figura 6c) podia ser visualizada, porém, em alguns defeitos, os limites de suas paredes eram precisos e discretamente indefinidos. Nos grupos A (Figura 6b) e PRPA (Figura 6d), os limites do defeito eram indefinidos e irregulares, apresentando perda de nitidez em algumas regiões, entretanto, a sua topografia ainda podia ser visualizada. A densidade radiográfica diminuía das paredes do defeito para a porção central e as

imagens mais radiopacas no interior do defeito, correspondentes às partículas de enxerto ósseo, apresentavam-se mais homogêneas.

5.2.3 Sessenta dias

Nos grupos C (Figura 7a) e PRP (Figura 7c) a imagem radiográfica do defeito e os limites das suas paredes ainda eram visualizados, embora houvesse evidências de aumento de densidade no contorno da loja cirúrgica. Nos grupos A (Figura 7b) e PRPA (Figura 7d), a topografia do defeito era pouco visualizada com perda de nitidez nos contornos das paredes. Em algumas regiões foi notado que a densidade radiográfica da porção periférica do defeito mostrava-se semelhante à densidade do tecido ósseo normal. Algumas imagens dos defeitos revelavam áreas menos radiopacas quando comparadas com outras regiões da mesma loja cirúrgica. As imagens correspondentes às partículas de enxerto ósseo apresentavam-se ainda mais homogêneas, comparadas as dos períodos anteriores. Além disso, foi observado, devido às variações de densidade radiográfica entre as porções periférica e central, crescimento ósseo centrípeto.

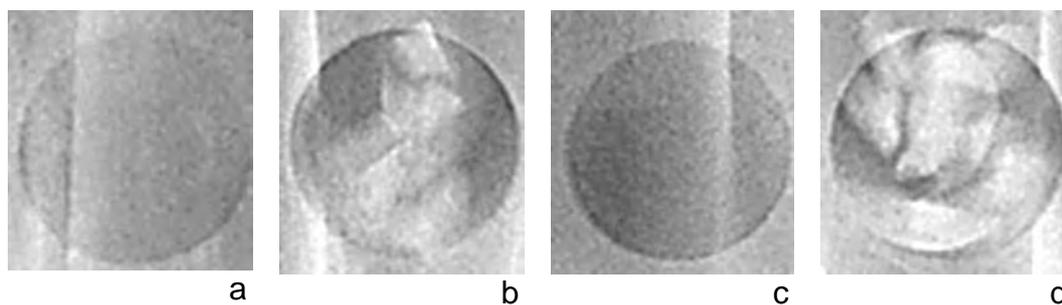


FIGURA 5 - Imagens radiográficas digitais dos defeitos ósseos cirúrgicos na tíbia de coelho no período de 15 dias: a) grupo C; b) grupo A; c) grupo PRP; d) grupo PRPA

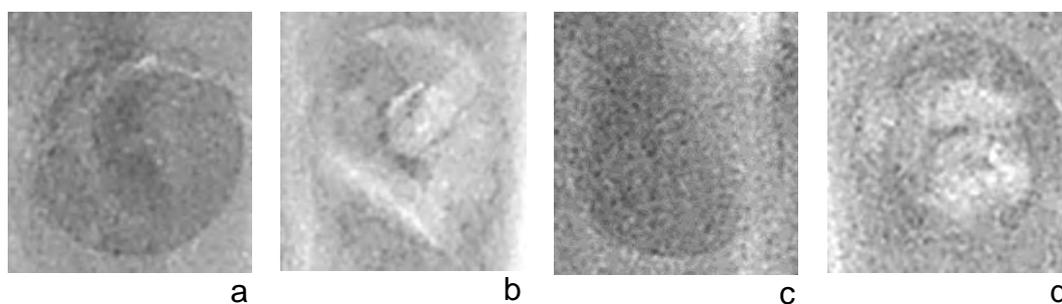


FIGURA 6 - Imagens radiográficas digitais dos defeitos ósseos cirúrgicos na tíbia de coelho no período de 30 dias: a) grupo C; b) grupo A; c) grupo PRP; d) grupo PRPA

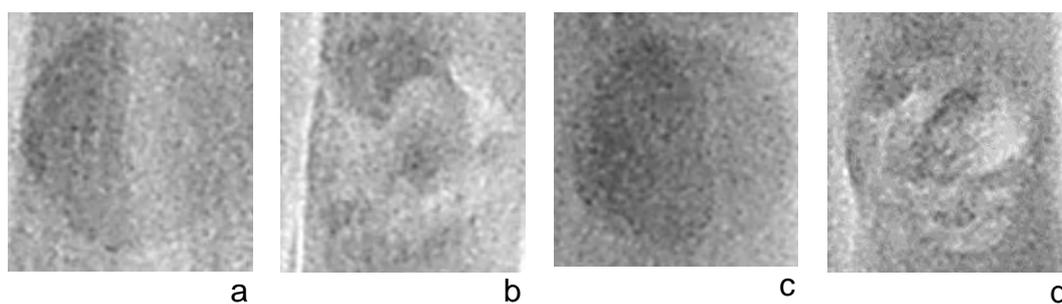


FIGURA 7 - Imagens radiográficas digitais dos defeitos ósseos cirúrgicos na tíbia de coelho no período de 60 dias: a) grupo C; b) grupo A; c) grupo PRP; d) grupo PRPA

5.2.4 Análise estatística da densidade óptica

Os valores das médias da densidade óptica nos defeitos ósseos dos diferentes grupos encontram-se expressos na Tabela 17 (Apêndice A).

As médias da densidade óptica da região dos defeitos ósseos (Tabela 1) nos grupos estudados demonstraram que os grupos A e PRPA apresentaram maior densidade óptica quando comparado com os grupos C e PRP e que houve diminuição da densidade óptica em todos os grupos ao longo do tempo.

Tabela 1 - Médias das densidades ópticas dos grupos C, A, PRP e PRPA nos períodos de 15, 30 e 60 dias

PERÍODO	GRUPO	DENSIDADE	Σ
15	C	165	13,31
	A	191	18,20
	PRP	161	5,63
	PRPA	194	5,63
30	C	164	10,28
	A	191	13,14
	PRP	156	12,82
	PRPA	191	9,58
60	C	157	15,09
	A	184	10,28
	PRP	149	14,49
	PRPA	182	9,28

De acordo com os dados, referentes à análise de variância (ANOVA), apresentados na Tabela 2, houve diferença estatística significativa entre as densidades ópticas dos diferentes grupos estudados e nos diferentes períodos, determinada pelos valores de p encontrados, inferiores a 0,05 (nível de significância).

Tabela 2 - Resultado da análise de variância (ANOVA) para os dados das densidades ópticas

FONTE DE VARIAÇÃO	P
Grupo	0,0001
Período	0,0031
Grupo*período	0,9961

O teste de comparação múltipla de Tukey revelou diferença estatisticamente significativa somente para o período de 60 dias (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultado do teste de Tukey para os dados da densidade óptica nos diferentes períodos

PERÍODO	DENSIDADE	GRUPOS HOMOGÊNEOS
15	178	A
30	176	A
60	168	B

O teste de comparação múltipla de Tukey revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos A e PRPA e C e PRP nos diferentes períodos (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultado do Teste de Tukey para os dados da densidade óptica nos diferentes grupos

GRUPO	DENSIDADE	GRUPOS HOMOGÊNEOS
PRPA	189	A
A	189	A
C	162	B
PRP	155	B

A Figura 8 mostra a evolução das médias da densidade óptica nos diferentes períodos de observação dentro de cada grupo analisado.

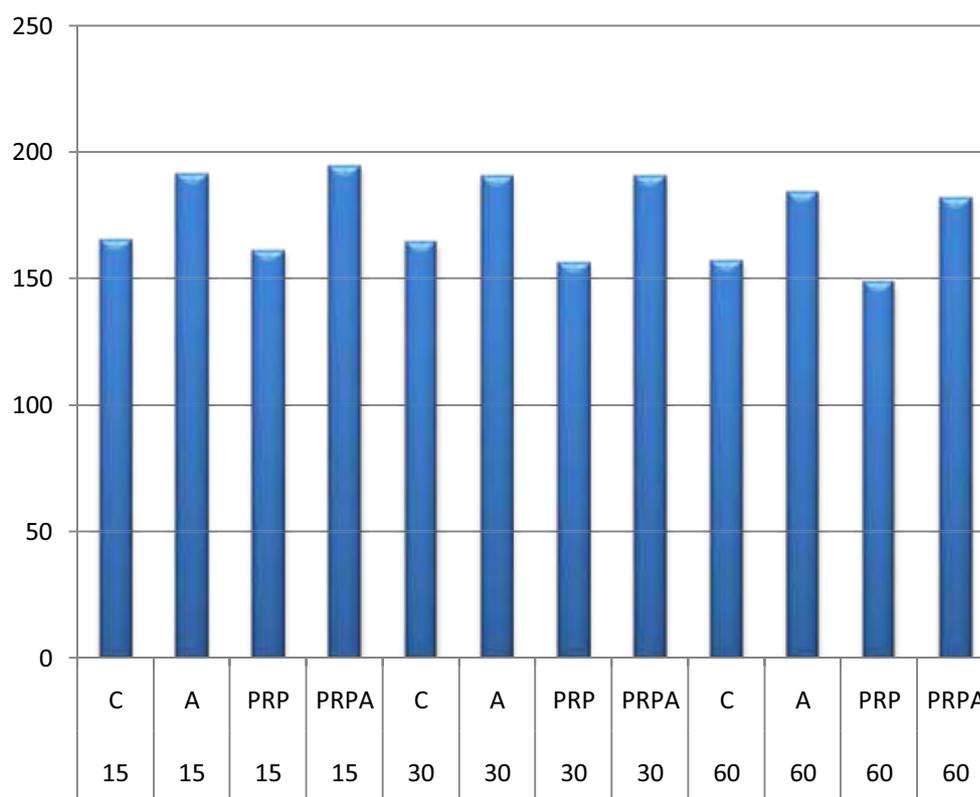


FIGURA 8 - Representação gráfica da evolução das médias de densidade óptica dos grupos C, A, PRP e PRPA aos 15, 30 e 60 dias

5.3 Análise histológica e histomorfométrica

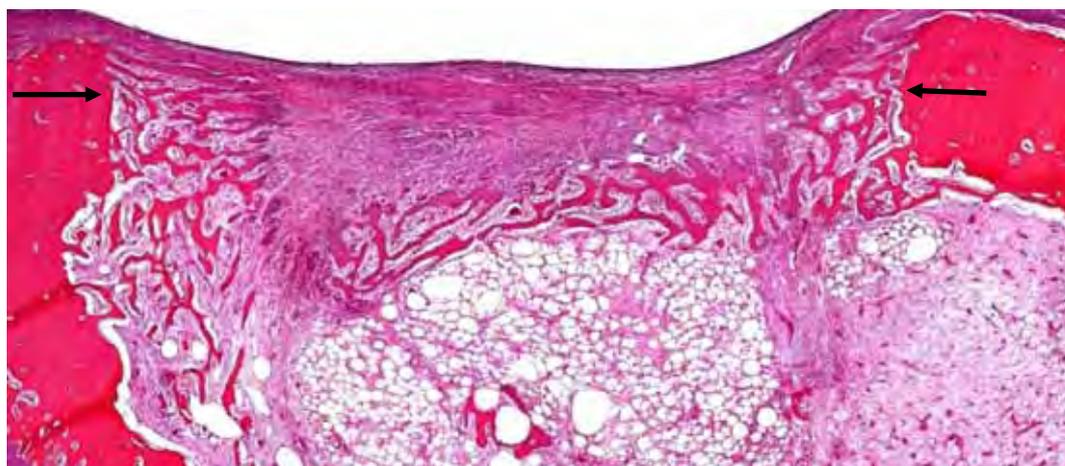
De um modo geral, os grupos C e PRP e os grupos A e PRPA apresentavam grande semelhança entre si. Os achados histológicos mais freqüentes observados nos espécimes foram analisados em conjunto dentro de cada período considerado no experimento.

5.3.1 Quinze dias

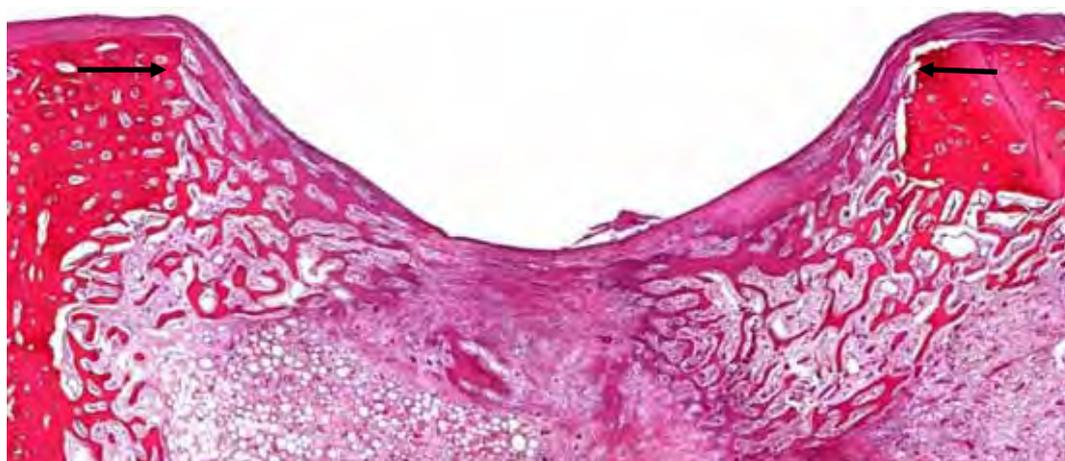
Na região dos defeitos dos grupos C (Figura 9a) e PRP (Figura 9b), os limites exibiam trabéculas ósseas neoformadas e a porção central estava preenchida por tecido conjuntivo osteogênico. Além disso, notava-se que os limites do defeito apresentavam áreas de remodelação óssea, exibindo atividade osteoclástica e deposição de matriz óssea pelos osteoblastos, e áreas de tecido ósseo necrótico e basofílico com osteoplastos vazios. As trabéculas ósseas eram imaturas, delgadas, ramificadas e com arranjo linear (Figura 9c), estendendo-se para porção central, apresentando osteócitos volumosos e grande número de osteoblastos na periferia (Figura 9d). O tecido conjuntivo osteogênico era bem celularizado, vascularizado e composto por células osteoprogenitoras e por fibras colágenas, dispostas paralelamente entre si. Na superfície do defeito, podia ser observado tecido conjuntivo fibroso em íntimo contato com a região previamente ocupada pela barreira. Formação de tecido ósseo, em alguns cortes histológicos, no interior do canal medular da tíbia, áreas de hemorragia intersticial e infiltrado de células inflamatórias mononucleadas completavam o quadro. Havia maior quantidade de vasos neoformados, por vezes congestos, e edema no grupo PRP quando comparado com o grupo C. As fibras colágenas do tecido conjuntivo

osteogênico eram mais delicadas no grupo do PRP do que no grupo C (Figura 10).

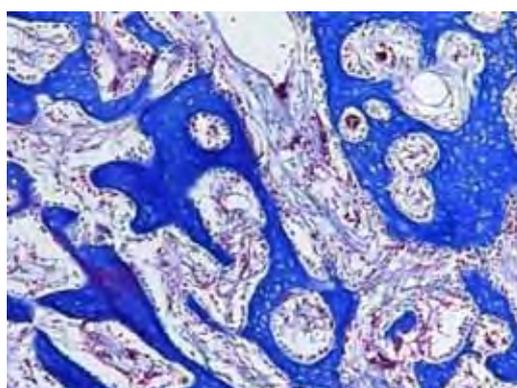
Nos grupos A (Figura 11a) e PRPA (Figura 11b), os defeitos eram preenchidos por trabéculas ósseas imaturas, delgadas e bem celularizadas, e por tecido conjuntivo osteogênico, bem celularizado e vascularizado. Estas trabéculas apresentavam arranjo linear e estendiam-se para a porção central. Partículas de enxerto eram encontradas na porção central do defeito e estavam em íntimo contato, ora com tecido conjuntivo osteogênico ora com trabéculas ósseas neoformadas. Algumas partículas encontravam-se desvitalizadas, exibindo osteoplastos vazios e, em algumas regiões, havia lacunas de reabsorção exibindo osteoclastos em seu interior (Figura 12). A atividade osteoclástica era mais intensa no grupo PRPA (Figura 13) do que no grupo A, durante o processo de reabsorção das partículas de enxerto. Os limites dos defeitos apresentavam áreas de remodelação e necróticas. Em alguns cortes histológicos, havia intensa formação de tecido ósseo no interior do canal medular da tíbia. Além disso, observava-se maior vascularização e, por vezes, notava-se rede de fibrina e áreas de hemorragia na superfície no grupo PRPA quando comparado com o grupo A.



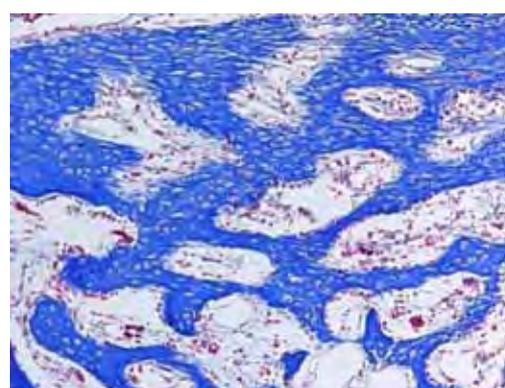
a



b

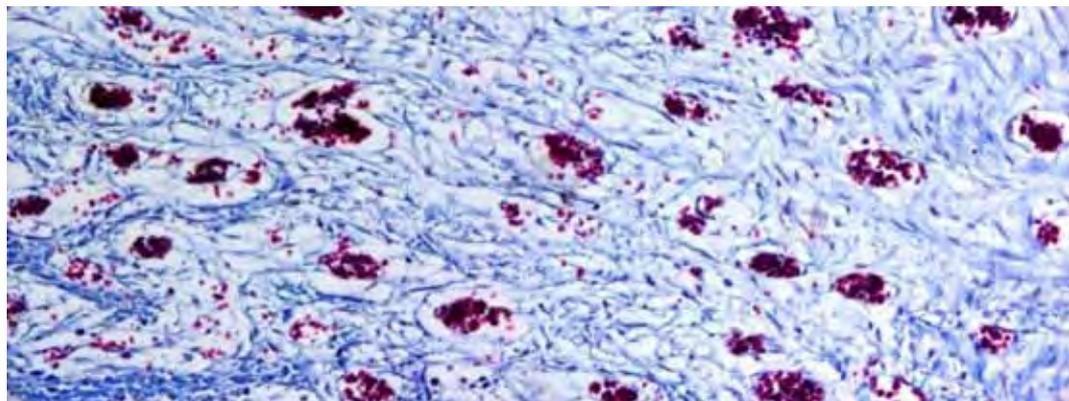


c

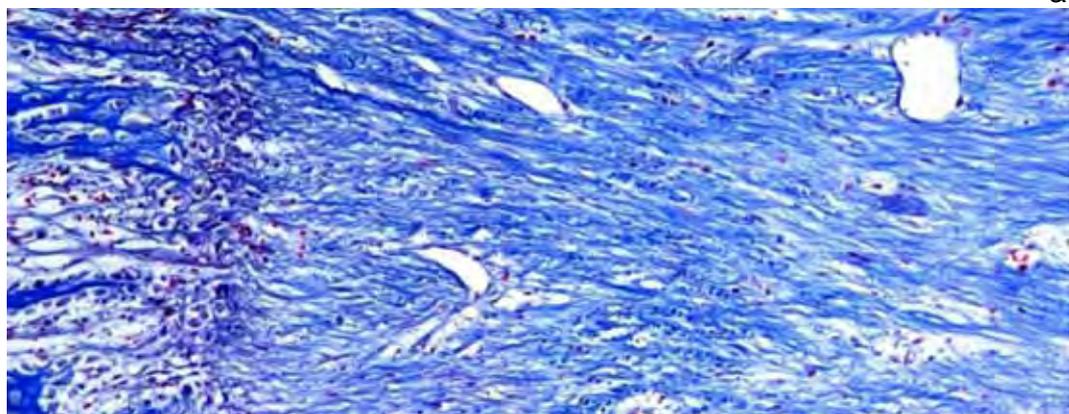


d

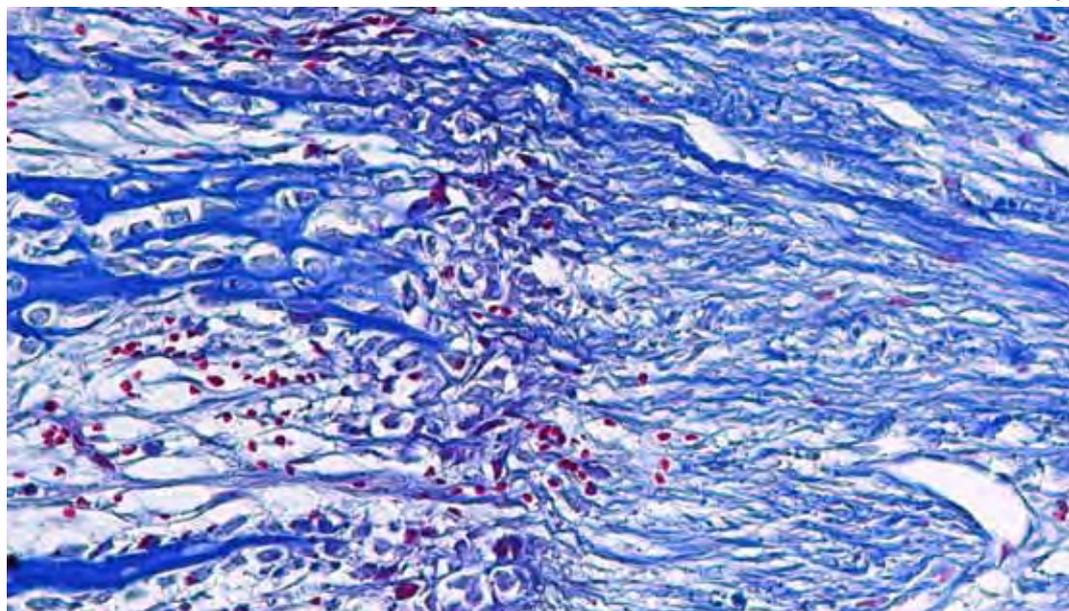
FIGURA 9 - Fotomicrografias das regiões dos defeitos ósseos aos 15 dias (setas): a) grupo C; b) grupo PRP; c) grupo C com trabéculas ósseas menos celularizadas; d) grupo PRP com trabéculas ósseas mostrando grande celularidade. HE e Tricrômio de Mallory, aumento original 50x e 200x.



a

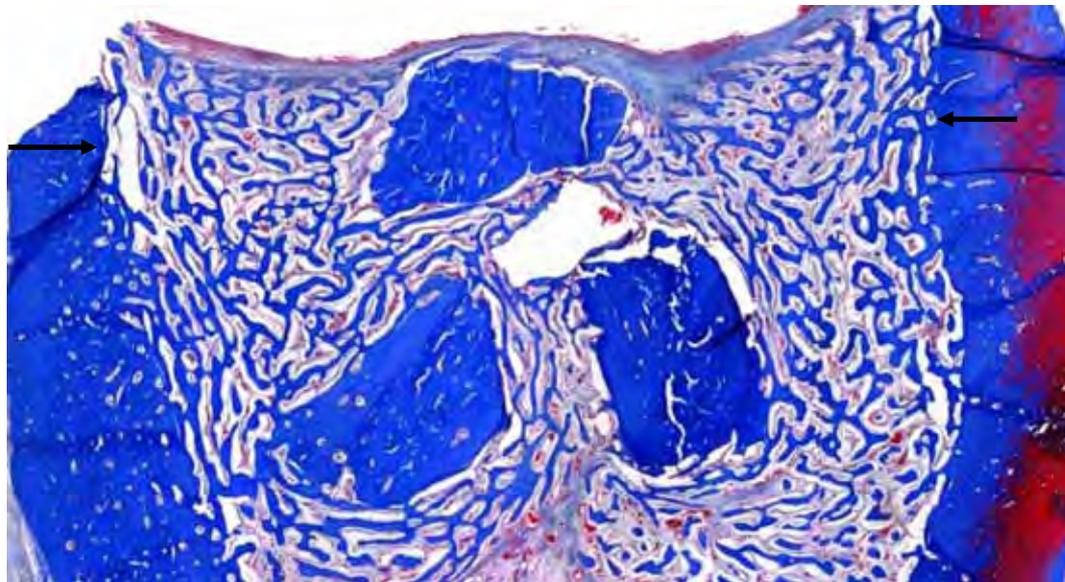


b

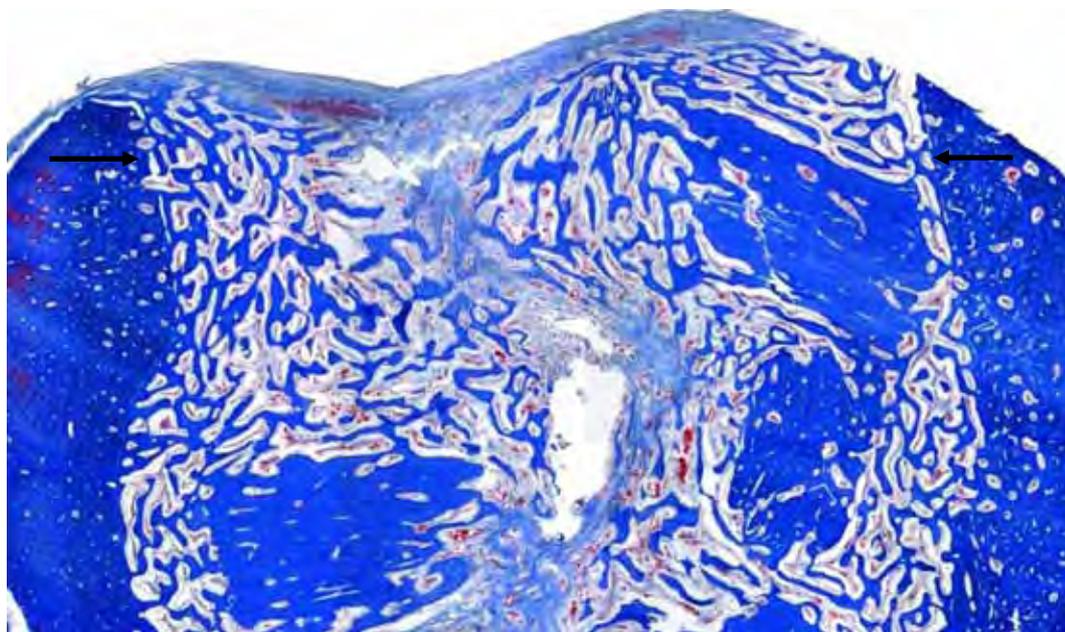


c

FIGURA 10 - Fotomicrografia exibindo tecido conjuntivo osteogênico: a) aspecto delicado e bem vascularizado no grupo PRP; b) aspecto denso no grupo C; c) intensa atividade osteoblástica e formação de trabéculas ósseas no grupo C. Tricrômio de Mallory, aumento original 100x e 200x.



a



b

FIGURA 11 - Fotomicrografias das regiões dos defeitos ósseos aos 15 dias (setas): a) grupo A; b) grupo PRPA. Tricrômio de Mallory, aumento original 50x.

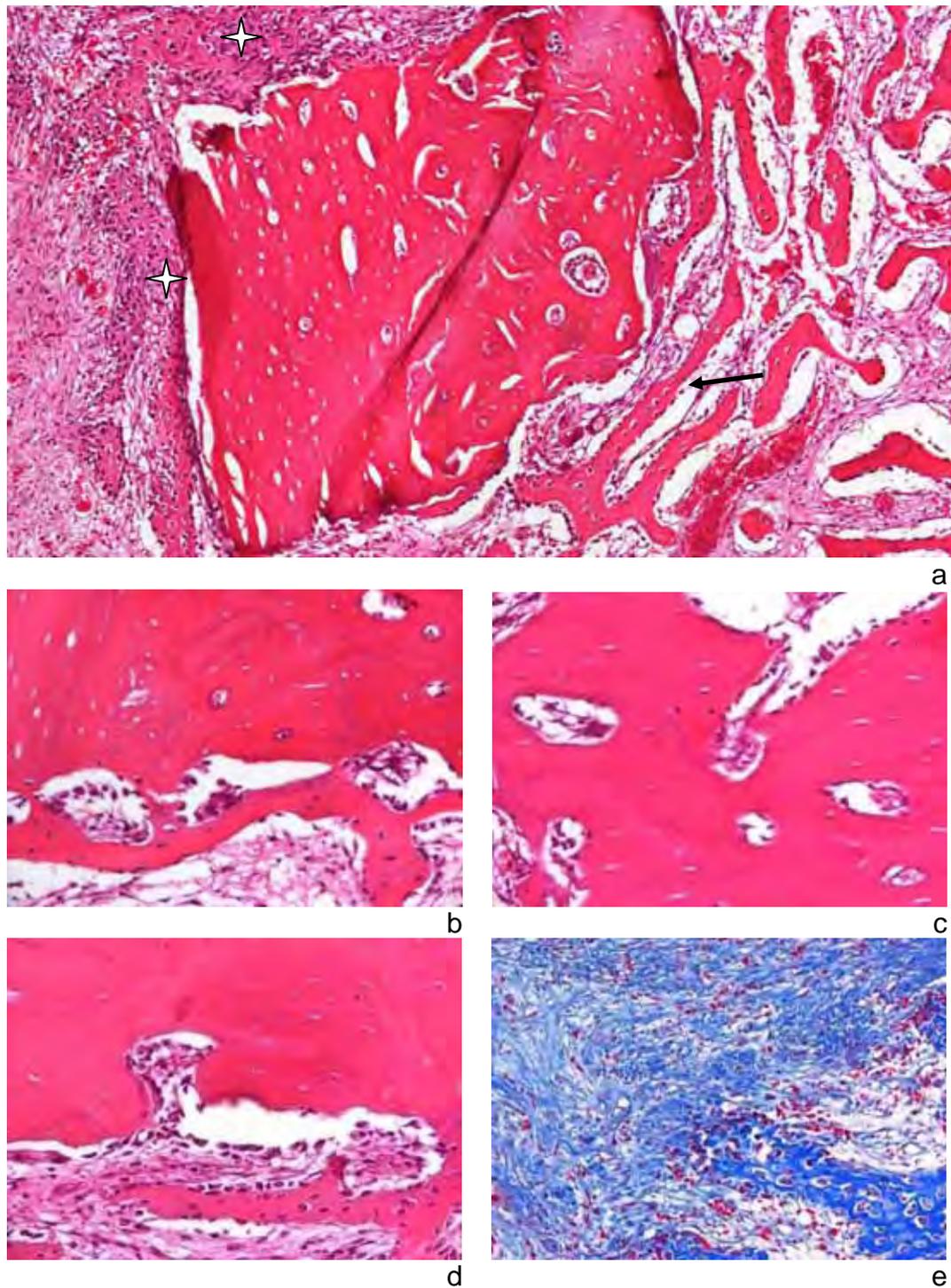
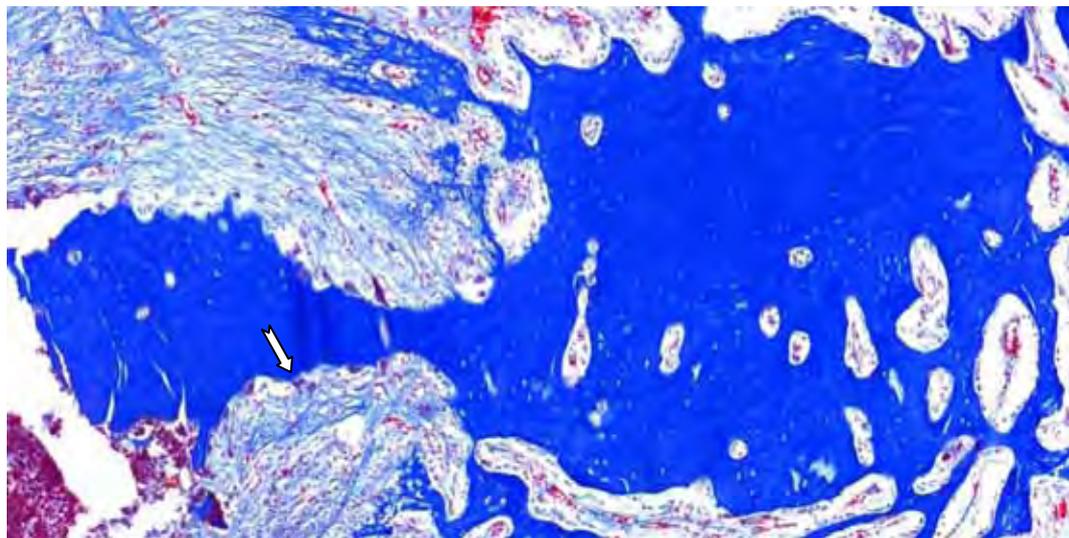
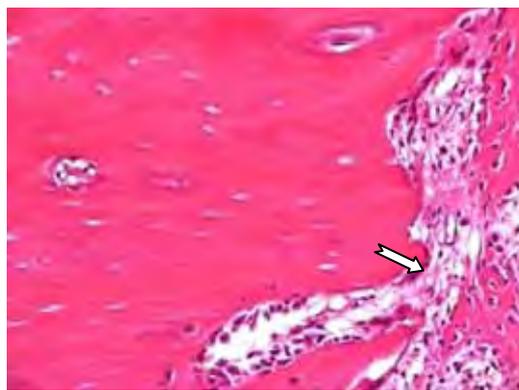


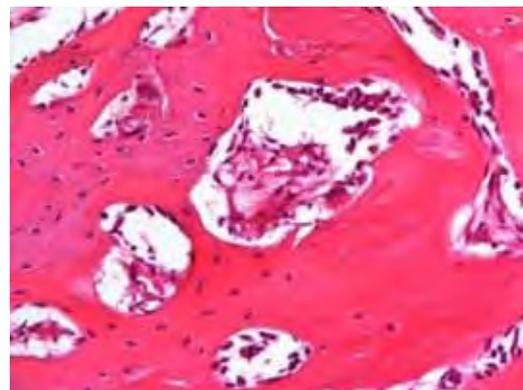
FIGURA 12 - Fotomicrografias mostrando região do defeito do grupo A aos 15 dias: a) partícula de enxerto circundada por tecido conjuntivo osteogênico (☆) e por trabéculas ósseas imaturas (setas); b), c) e d) partículas de enxerto em processo de reabsorção (setas brancas); e) tecido conjuntivo osteogênico e matriz óssea neoformada. HE e Tricrômio de Mallory, aumento original 100x e 200x.



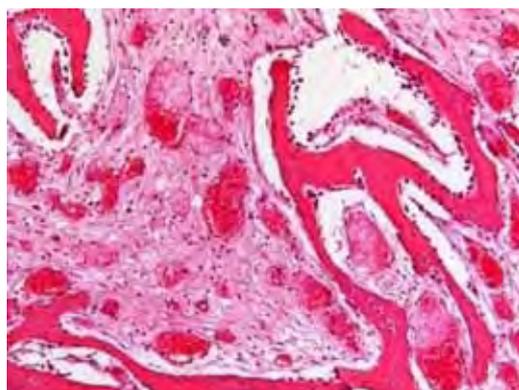
a



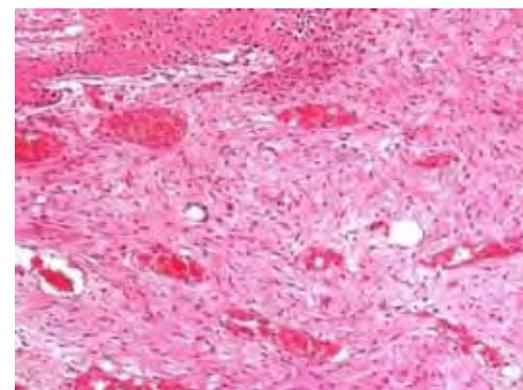
b



c



d



e

FIGURA 13 - Fotomicrografia mostrando região do defeito do grupo PRPA aos 15 dias: a), b) e c) intensa atividade osteoclástica (setas) e, conseqüentemente, reabsorção da partícula de enxerto; d) trabéculas ósseas imaturas e delicadas; e) tecido conjuntivo osteogênico bem vascularizado. Tricrômio de Mallory e HE, aumento original 100x e 200x.

5.3.2 Trinta dias

Nos grupos C (Figura 14a) e PRP (Figura 14b), a região do defeito estava preenchida por tecido ósseo e tecido conjuntivo osteogênico. Notava-se aumento da quantidade de trabéculas ósseas quando comparado com o período anterior, sendo lamelar na periferia e imaturas e delgadas na porção mais central. Nessas áreas mais maduras podiam-se notar osteoblastos menos volumosos e achatados, áreas de remodelação, presença de osteoclastos e linhas reversas. Na maioria dos cortes histológicos, notou-se a presença de uma lâmina óssea recobrendo a superfície do defeito, entretanto não foi observada a união de suas bordas. Abaixo desta lâmina óssea, na porção mais profunda e central do defeito, verificou-se tecido conjuntivo osteogênico em grande quantidade e permeado por esparsas trabéculas ósseas imaturas. O tecido conjuntivo osteogênico mostrava-se bem organizado e suas fibras colágenas estavam dispostas paralelamente entre si. Além disso, havia discreto e difuso infiltrado de células inflamatórias mononucleares. Medula óssea neoformada era evidenciada principalmente nas extremidades do defeito. Nas porções mais centrais, no interior dos espaços medulares neoformados, podia ser observado tecido conjuntivo frouxo. A faixa de tecido ósseo neoformado, próxima aos limites do defeito, apresentava espessura semelhante às corticais ósseas originais e, em alguns cortes, próximo às bordas e externamente ao defeito havia a presença de cartilagem. A margem de corte apresentava-se ora visível, com áreas necróticas e com lacunas e canais de Havers vazios, ora com áreas de remodelação, dificultando sua identificação. A formação óssea dentro do canal medular era bem menor, quando comparada ao período anterior e podia ser observado maior número de osteoclastos na periferia das trabéculas. No grupo PRP (Figura 14c), a vascularização era maior e a medula óssea no interior do canal era menos desenvolvida em relação ao grupo C (Figura 14d).

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos A (Figura 15a) e PRPA (Figura 15b) que apresentaram semelhanças com relação aos aspectos do tecido ósseo neoformado e do tecido conjuntivo osteogênico. Células adiposas e hematopoiéticas eram esparsamente observadas nos espaços medulares da região do defeito ósseo. Em algumas regiões ao redor das partículas enxertadas, alto grau de reabsorção foi notado, enquanto em outras, formação óssea ativa, com revestimento osteoblástico, dificultava a identificação de seus limites. Por vezes tais partículas apresentavam-se contínuas com as margens do defeito. O tecido ósseo neoformado, com característica de osso trabecular, exibia arranjo linear e numerosos osteoblastos e osteócitos. Os primeiros sinais de remodelação e formação dos primeiros ósteons podiam ser vistos rodeados por osso medular imaturo (Figuras 15c e 15d). No canal medular, era observada discreta formação de tecido ósseo, bem como alguns fragmentos ósseos na intimidade do tecido medular. Esses fragmentos apresentavam áreas de reabsorção e remodelação na superfície e, algumas vezes, circundados por tecido conjuntivo fibroso. Notavam-se interconexões de trabéculas ósseas espessas junto às margens, estendendo-se para porção central de forma linear. Nesta região, havia ainda a presença de tecido conjuntivo osteogênico exibindo células osteogênicas mais volumosas e feixes paralelos de fibras colágenas com fibroblastos delgados. Foco de infiltrado inflamatório e maior vascularização na área mais profunda eram notados. As trabéculas ósseas, na porção mais central, eram imaturas, delgadas, com amplos espaços medulares, apresentando tecido conjuntivo frouxo entre elas. Algumas vezes não era possível definir a margem, uma vez que áreas de remodelação estavam presentes nesta região.

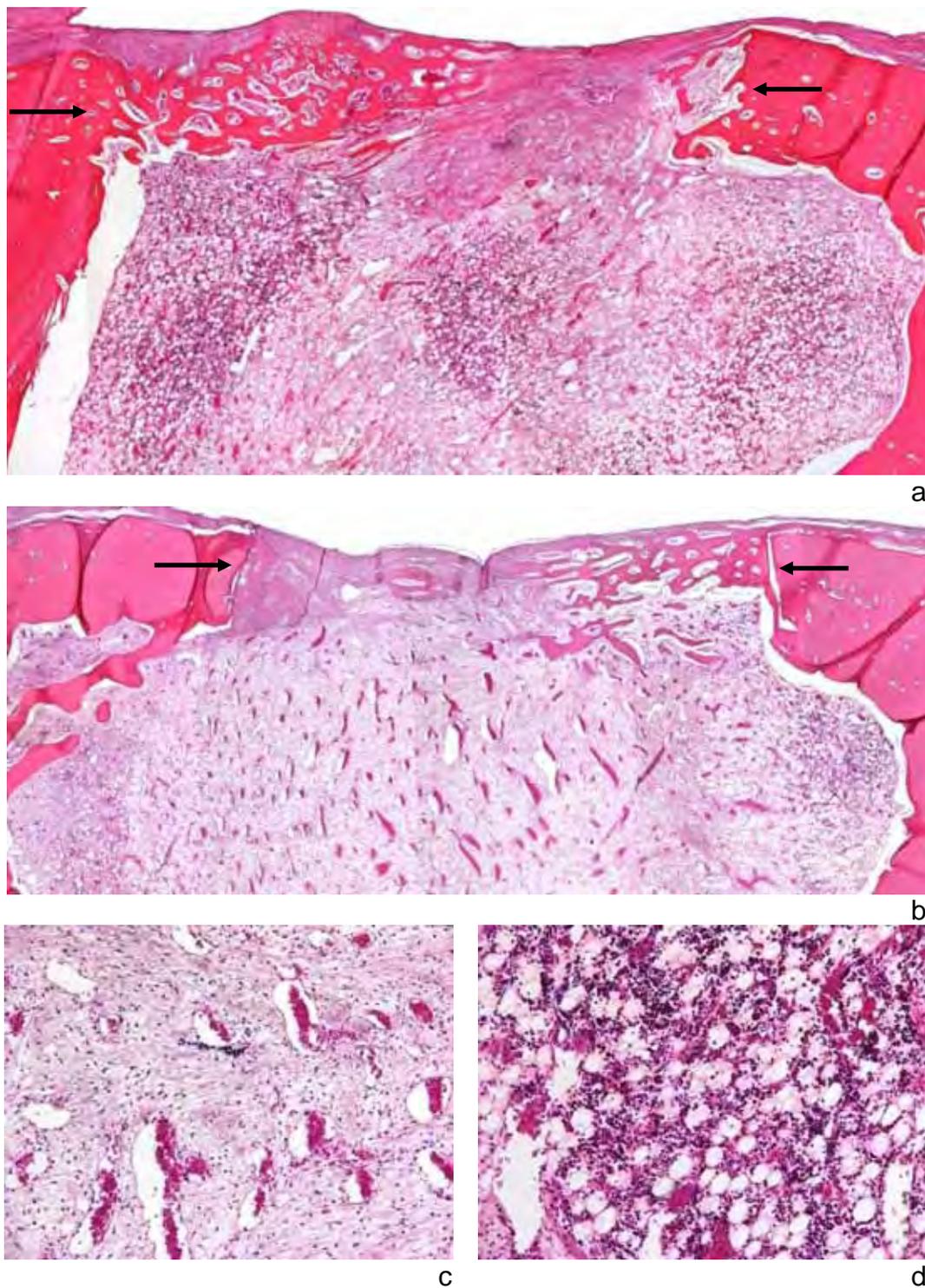


FIGURA 14 - Fotomicrografias das regiões dos defeitos ósseos aos 30 dias (setas): a) grupo C; b) grupo PRP; c) tecido conjuntivo bem vascularizado e de aspecto delicado; d) medula óssea em formação exibindo células hematopoiéticas, localizadas nas adjacências do limite interno do defeito. HE, aumento original 50x e 100x.

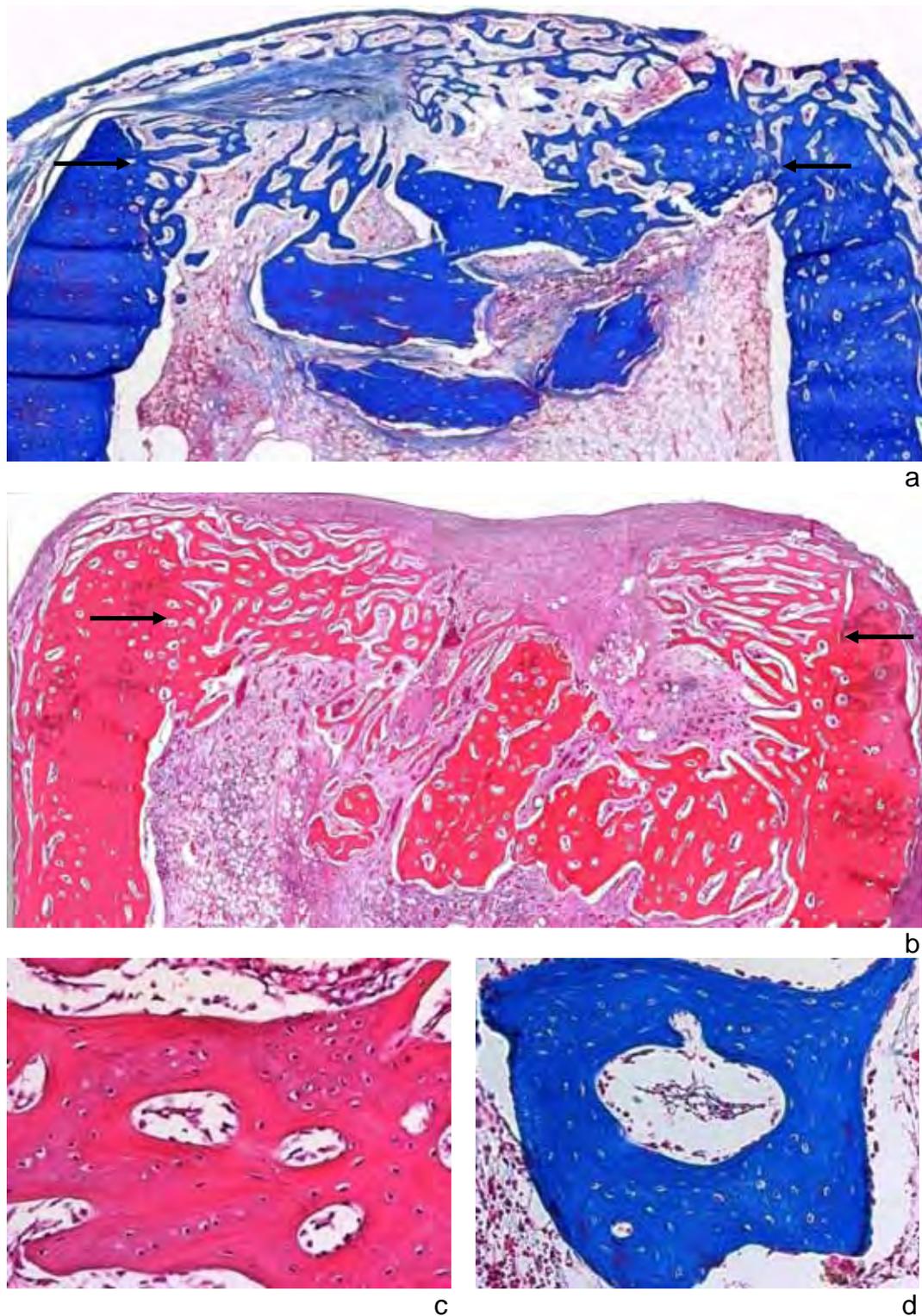
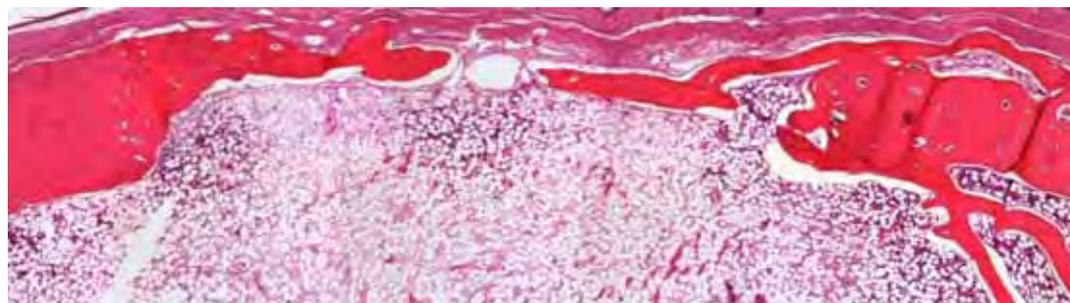


FIGURA 15 - Fotomicrografias das regiões dos defeitos ósseos aos 30 dias (setas): a) grupo A; b) grupo PRPA; c e d) tecido ósseo em processo de remodelação nos grupos A e PRPA, respectivamente. HE e Tricrômio de Mallory, aumento original 50x e 200x.

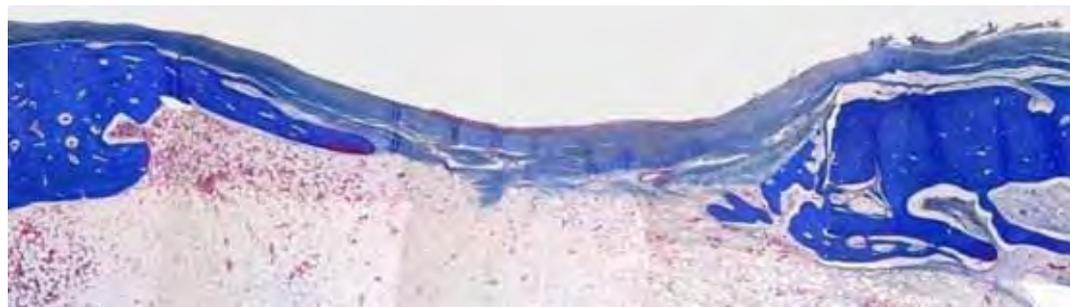
5.3.3 Sessenta dias

Nos grupos C (Figura 16a) e PRP (Figura 16b), observou-se que a região do defeito estava preenchida, tanto por tecido ósseo maduro quanto por imaturo, e por tecido conjuntivo osteogênico. Os limites do defeito mostravam-se indefinidos e a espessura da área do defeito encontrava-se semelhante e, por vezes, menor que a espessura das corticais ósseas originais. A superfície do defeito mostrava-se recoberta por tecido conjuntivo fibroso, delimitando o espaço previamente ocupado pela barreira. Os espaços medulares do osso, localizado mais na periferia do defeito, eram amplos e apresentavam-se preenchidos por tecido medular, com as mesmas características do interior do canal. Nas porções mais centrais, esses espaços ainda eram preenchidos por tecido frouxo. Áreas de remodelação e a formação de canais de Havers podiam ser observadas em toda espessura do tecido ósseo.

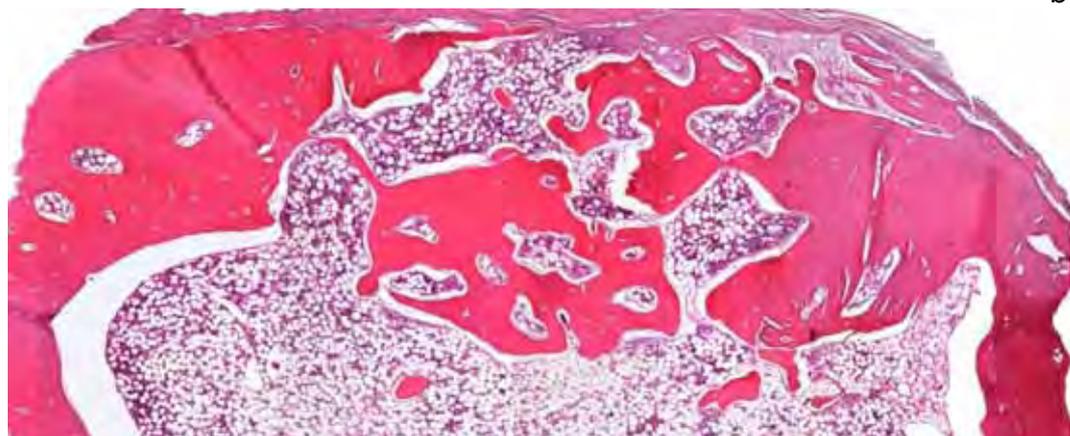
Os grupos A (Figura 16c) e PRPA (Figura 16d) mostraram tecido ósseo neoformado e fechamento quase completo dos defeitos. O tecido ósseo era predominantemente vital, com poucos remanescentes de partículas não-vitais, as quais se apresentavam envoltas por tecido ósseo neoformado e raros osteoclastos. Nas bordas do defeito, o tecido ósseo neoformado apresentava trabéculas ósseas maduras com a presença de medula óssea e sinais de remodelação. Na maioria dos cortes, osso compacto estava presente sob a barreira, levando a formação de um novo córtex, o qual estava recoberto por uma nova camada periosteal. Formação óssea mais para o interior do canal medular, possivelmente a partir da partícula, também era observada. As partículas ósseas apresentavam-se remodeladas e incorporadas ao tecido ósseo e, muitas vezes, não era possível delimitá-las. No interior do canal medular da tíbia, por vezes, eram notadas partículas menores circundadas por tecido conjuntivo fibroso.



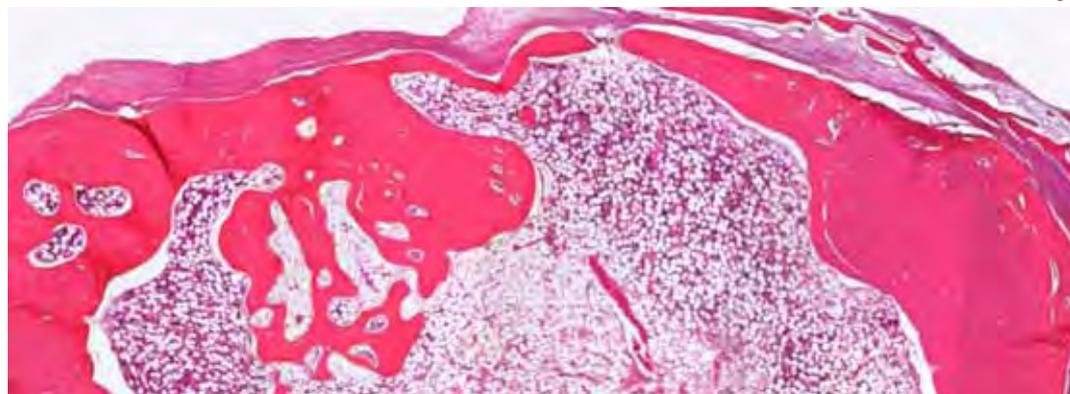
a



b



c



d

FIGURA 16 - Fotomicrografias das regiões dos defeitos ósseos aos 60 dias: a) grupo C; b) grupo PRP; c) grupo A; d) grupo PRPA. HE e Tricrômio de Mallory, aumento original 50x.

5.3.4 Análise estatística da histomorfometria

A finalidade do estudo histomorfométrico foi estabelecer a densidade de volume de matriz óssea neoformada e de células ósseas dos defeitos nos diferentes grupos estudados.

As densidades de volume de matriz óssea, quantificadas durante o processo de reparação óssea nos campos microscópicos de cada período avaliado, encontram-se expressas em valor absoluto na Tabela 17 (Apêndice B). As médias das densidades de volume de matriz óssea estão apresentadas na Tabela 5 e demonstraram que os grupos A e PRPA exibiam maior formação de tecido ósseo quando comparados com os grupos C e PRP.

Tabela 5 - Médias das densidades de volume de matriz óssea neoformada nos defeitos ósseos dos grupos estudados nos diferentes períodos

PERÍODO	GRUPO	MÉDIA (%)	Σ
15	C	22,98	15,21
	A	38,14	22,54
	PRP	19,34	16,17
	PRPA	59,43	30,83
30	C	37,61	20,69
	A	59,62	19,04
	PRP	42,53	29,28
	PRPA	50,14	26,51
60	C	53,58	28,81
	A	82,55	23,81
	PRP	50,36	34,85
	PRPA	76,40	26,05

De acordo com os dados, referentes à análise de variância (ANOVA), apresentados na Tabela 6, houve diferença estatisticamente significativa entre as densidades de volume de matriz óssea dos diferentes grupos e períodos estudados, determinada pelos valores de p encontrados, inferiores a 0,05 (nível de significância).

Tabela 6 - Resultado da análise de variância (ANOVA) para os dados da densidade de volume de matriz óssea neoformada

FONTE DE VARIAÇÃO	p
Grupo	0,0001
Período	0,0001
Grupo*período	0,1370

O teste de comparação múltipla de Tukey revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos A e PRPA e C e PRP (Tabela 7).

Tabela 7 - Resultado do teste de Tukey para os dados da densidade de volume de matriz óssea neoformada nos diferentes grupos

GRUPO	DENSIDADE	GRUPOS HOMOGÊNEOS
PRPA	61,99	A
A	60,10	A
C	38,06	B
PRP	37,41	B

O teste de comparação múltipla de Tukey para os diferentes períodos revelou diferença estatisticamente significativa entre todos os períodos (Tabela 8).

Tabela 8 - Resultado do teste de Tukey para os dados da densidade de volume de matriz óssea neoformada nos diferentes períodos

PERÍODO	DENSIDADE	GRUPOS HOMOGÊNEOS
60	65,72	A
30	47,47	B
15	34,97	C

A Figura 17 representa a evolução das médias da densidade de volume de matriz óssea dentro de cada grupo analisado, ao longo dos períodos. De acordo com o gráfico, pode-se constatar que houve uniformidade na progressão das médias da qualidade de matriz óssea neoformada no decorrer dos períodos analisados.

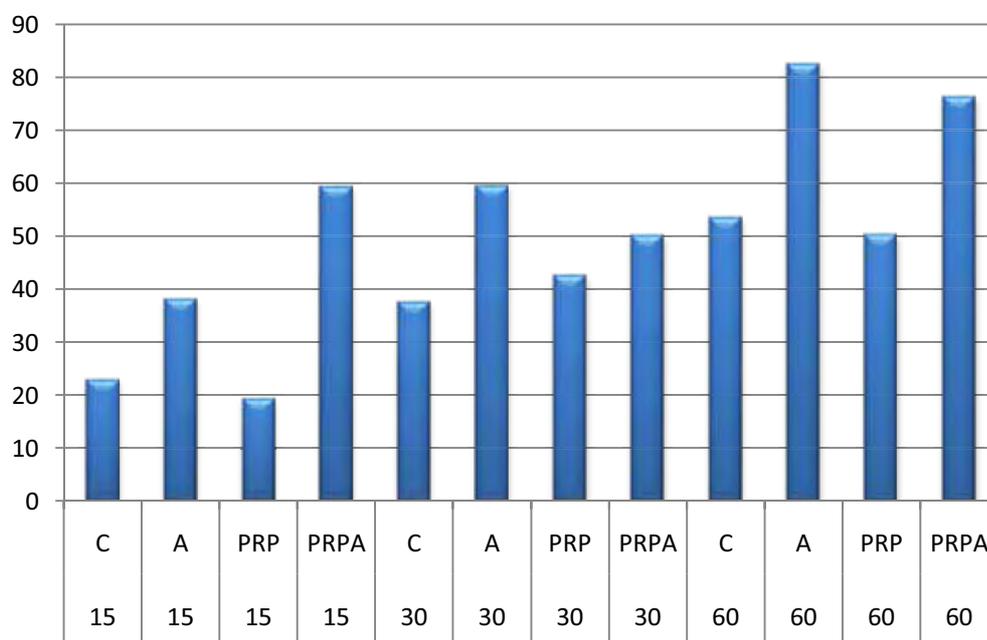


FIGURA 17 - Representação gráfica da evolução das médias de densidade de volume de matriz óssea neoformada nos grupos C, A, PRP e PRPA aos 15, 30 e 60 dias

O número de osteócitos e sua relação com a área de matriz óssea neoformada quantificados durante o processo de reparação óssea nos campos microscópicos de cada período avaliado, encontram-se expressas em valor absoluto na Tabela 18 (Apêndice C). As médias de osteócitos quantificadas de cada período avaliado estão expressas na Tabela 9.

Tabela 9 - Médias de osteócitos por área ($/10^3\mu\text{m}^2$) quantificadas nos defeitos ósseos dos grupos estudados nos diferentes períodos

PERÍODO	GRUPO	MÉDIA (%)	σ
15	C	1,36	0,27
	A	1,58	0,58
	PRP	2,16	0,87
	PRPA	1,74	0,58
30	C	1,20	0,28
	A	1,10	0,16
	PRP	1,16	0,58
	PRPA	0,99	0,21
60	C	1,27	0,27
	A	0,93	0,26
	PRP	1,36	0,30
	PRPA	0,96	0,16

De acordo com os dados, referentes à análise de variância (ANOVA), apresentados na Tabela 10 houve diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos e períodos estudados, determinada pelos valores de p encontrados, inferiores a 0,05 (nível de significância).

Tabela 10 - Resultado da análise de variância (ANOVA) para os valores de osteócitos quantificados nos defeitos ósseos

FONTE DE VARIAÇÃO	P
Grupo	0,0236
Período	0,0001
Grupo*Período	0,2627

O teste de comparação múltipla de Tukey para os diferentes grupos revelou diferença estatisticamente significativa somente para o grupo PRP (Tabela 11).

Tabela 11 - Resultado do teste de Tukey para os valores de osteócitos quantificados nos defeitos ósseos nos diferentes grupos

GRUPO	MÉDIA	GRUPOS HOMOGÊNEOS
PRP	1,6117	A
C	1,2878	A B
A	1,2183	B
PRPA	1,2172	B

O teste de comparação múltipla de Tukey para os diferentes períodos revelou diferença estatisticamente significativa somente para os 15 dias (Tabela 12).

Tabela 12 - Resultado do teste de Tukey para os valores de osteócitos quantificados nos defeitos ósseos nos diferentes grupos

PERÍODO	MÉDIA	GRUPOS HOMOGÊNEOS
15	1,7246	A
60	1,1412	B
30	1,1354	B

A Figura 18 representa a evolução das médias de osteócitos por área dentro de cada grupo analisado, ao longo dos períodos. De acordo com o gráfico, pode-se constatar que houve maior quantidade de osteócitos por área no período de 15 dias, sendo mais significativo no grupo PRP.

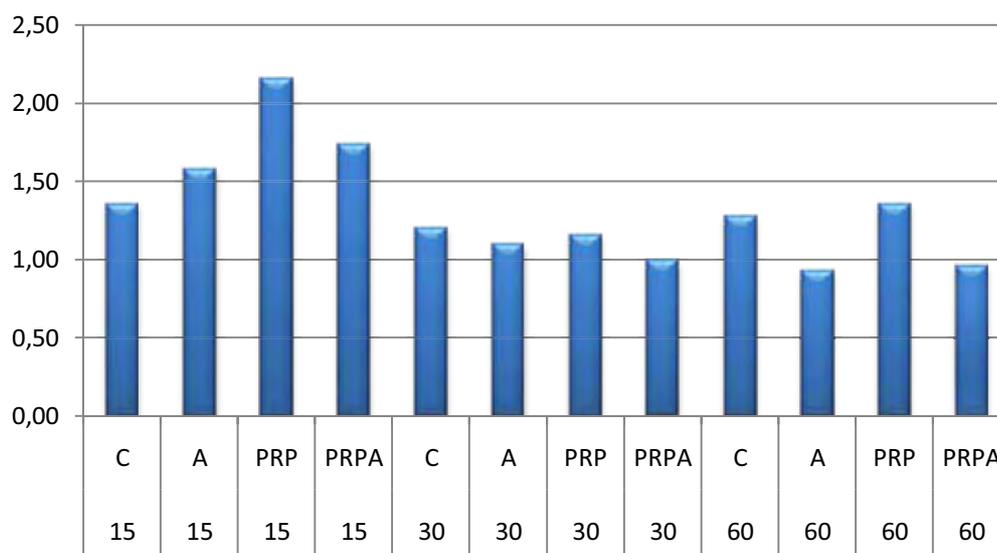


FIGURA 18 - Representação gráfica das médias de osteócitos por área ($/10^3 \mu\text{m}^2$) de matriz óssea neoformada nos grupos C, A, PRP e PRPA aos 15, 30 e 60 dias

5.4 Propriedades biomecânicas

A força de compressão aplicada para a falha do espécime quantificada durante os testes das propriedades biomecânicas, em cada período avaliado, foi expressa em valor absoluto na Tabela 19 (Apêndice D). As médias das medidas de força estão apresentadas na Tabela 13.

Tabela 13 - Médias da força de compressão aplicada para a falha do espécime nos defeitos ósseos dos grupos estudados nos diferentes períodos

PERÍODO	GRUPO	σ_c	σ
30	C	4,06	1,45
	A	18,07	6,54
	PRP	1,40	0,74
	PRPA	15,92	4,50
60	C	4,43	0,74
	A	14,90	3,44
	PRP	3,07	0,99
	PRPA	12,29	3,82

De acordo com os dados, referentes à análise de variância (ANOVA), apresentados na Tabela 14 houve diferença estatisticamente significativa entre as forças de compressão dos diferentes grupos estudados determinada pelos valores de p encontrados, inferiores a 0,05 (nível de significância) e que não houve variação significativa nos diferentes períodos.

Tabela 14 - Resultado da análise de variância (ANOVA) para os dados da força de compressão aplicada para a falha do espécime nos defeitos ósseos

FONTE DE VARIAÇÃO	p
Grupo	0,0001
Período	0,2800
Grupo*período	0,2438

O teste de comparação múltipla de Tukey revelou que somente houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos C e PRP e os grupos A e PRPA (Tabela 15).

Tabela 15 - Resultado do teste de Tukey para os dados da força de compressão aplicada para a falha do espécime nos defeitos ósseos para os diferentes grupos

GRUPO	DENSIDADE	GRUPOS HOMOGÊNEOS
A	16,49	A
PRPA	14,11	A
C	4,25	B
PRP	2,24	B

As análises desses resultados, expressados na Figura 19, demonstraram que os grupos A e PRPA exibiam maior resistência a compressão quando comparados com o grupo C e PRP.

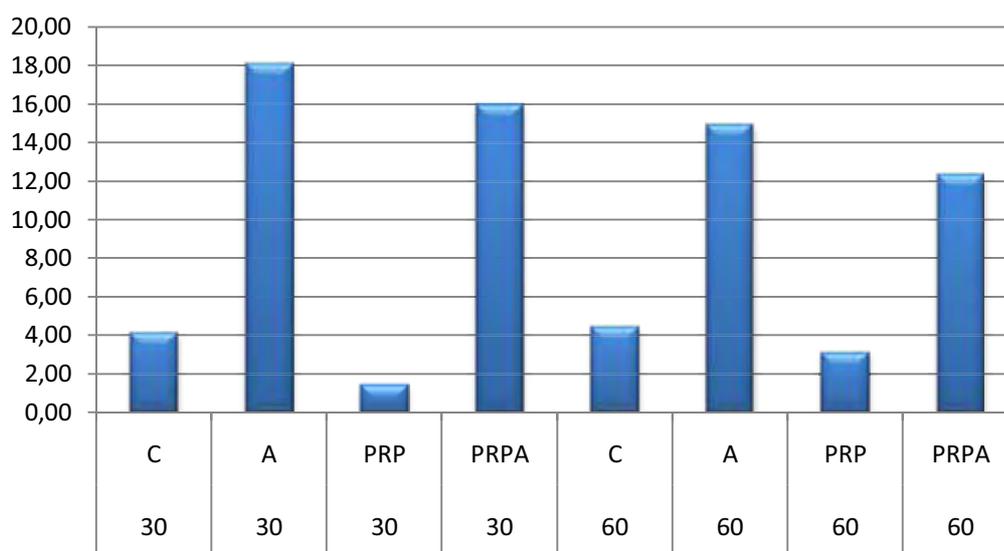


FIGURA 19 - Representação gráfica das médias das forças de compressão aplicada para a falha do espécime nos grupos C, A, PRP e PRPA aos 30 e 60 dias

6 DISCUSSÃO

O evento central para a regeneração óssea é a conversão de células progenitoras com sua matriz extracelular (MEC) relativamente modesta em tecidos esqueléticos funcionais caracterizados por uma MEC volumosa e especializada^{7,8}. Devido à ausência da cascata complexa de sinalização, característica dos eventos iniciais embrionários, é improvável que estratégias de reconstrução do tecido adulto possam recapitular morfologias distintas enquanto forma um novo tecido ósseo. Assim, protocolos de regeneração de engenharia tecidual descrevem a necessidade de um arcabouço que deve restabelecer os contornos e integrar molecular e funcionalmente os tecidos. Tais arcabouços precisam fornecer células reparadoras ou seus progenitores, devem prover locais de ligação para células reparadoras endógenas, bem como estimular tais células no processo de reparação, além de garantir o espaço para a integração da MEC especializada ao osso natural.

Na implantodontia, têm-se buscado modificações de técnicas atuais de enxertos ósseos para prover uma regeneração mais rápida com osso mais denso. Um material de enxerto ósseo ideal deveria ser capaz de produzir osso por osteogênese, osteoindução e osteocondução, remodelar o material de enxerto inicial a osso lamelar maduro, manter o volume ósseo em função, ser biocompatível, de fácil obtenção e manutenção, sem perda da viabilidade, e apresentar baixa antigenicidade^{2,33}.

O principal impedimento para o sucesso da regeneração óssea é, em contraste com a osteogênese, a rápida formação de tecido conjuntivo. Assim, a invasão dos tecidos moles, localizados nas

adjacências, pode prejudicar ou impedir completamente a formação de tecido ósseo na região desejada^{20,41}. Para evitar essa situação, lançamos mão da utilização da técnica de ROG, utilizando uma barreira não porosa de PTFE para recobrir os defeitos ósseos e, dessa forma criar um espaço no qual o coágulo sangüíneo possa permanecer estabilizado, proporcionando um ambiente favorável para que a osteogênese possa ocorrer. O sucesso do uso de barreiras físicas no tratamento de diversos tipos de defeitos ósseos e a sua biocompatibilidade e efetividade comprovada cientificamente têm possibilitado a sua aplicação clínica^{32,34,35,41}.

O enxerto ósseo autógeno é considerado o melhor material, quando se avalia os resultados alcançados, por apresentar potencial osteoindutivo e osteocondutivo, sendo também uma fonte de células osteoprogenitoras, além de não oferecer risco de rejeição imunológica ou possibilidade de transmissão de doenças^{18,28,33,50}. Grande quantidade de material de enxerto muitas vezes é necessária e somente fontes extra-orais poderiam fornecer o volume adequado. Entretanto, a hospitalização, anestesia geral e a morbidade do local doador são alguns inconvenientes associados com a obtenção de osso autógeno⁴⁴. Essas desvantagens implicam na necessidade de materiais alternativos e vários substitutos ósseos têm sido pesquisados^{46,63}, utilizados isoladamente, servindo como arcabouço osteocondutivo, ou associados ao enxerto autógeno para melhorar a qualidade óssea da região tratada.

Recentes avanços na reconstrução de defeitos ósseos de diversas naturezas e na osteointegração de implantes endósseos têm sido dirigidos para aumentar e melhorar os mecanismos intrínsecos da resposta celular e a aplicação de substâncias tópicas tem chamado a atenção. Baseado no sangue autógeno e seus componentes, o PRP contém fatores de crescimento com ações múltiplas, que agem na ativação, proliferação, diferenciação e quimiotaxia de diversas células,

acelerando a reparação tecidual e influenciando a densidade óssea^{1,5,12,21,62}.

Seu uso é baseado na idéia que grande número de plaquetas libera quantidades significantes de fatores de crescimento que promovem a quimiotaxia de células precursoras, induzem a diferenciação e proliferação celular, a produção de colágeno e o início de crescimento vascular^{3,31,37,38,53,56,57}. Em nossos estudos, foi notória a presença de maior crescimento vascular nos grupos tratados com o PRP, comparados aos grupos sem tratamento que exibiam angiogênese mais discreta e tecido conjuntivo osteogênico mais denso.

Por ser uma preparação autógena, o PRP é inerentemente seguro e dessa maneira livre de cogitações sobre a transmissão de doenças³⁶, o que torna seu uso bem aceito pelos pacientes. Sua preparação envolve o isolamento do plasma a partir do sangue total, após a qual a formação de gel é obtida utilizando cloreto de cálcio e trombina bovina tópica. Entretanto, tem sido relatado que o uso de trombina bovina está associado com o desenvolvimento de uma reação autoimune, levando a risco de coagulopatias²⁹. Porém, as reações adversas informadas dependem da quantidade e fonte de trombina usada, sendo documentadas diferenças de pureza em vários produtos⁵³. Assim, têm sido sugerido que métodos alternativos de ativação do PRP precisam ser estudados e estar disponíveis^{29,30,58}. Baseado nessas informações, para a obtenção da geleificação, que ocorria em um tempo médio de 15 minutos, utilizamos somente o cloreto de cálcio.

Uma desvantagem do uso do PRP relacionado a enxertos ósseos é a ausência de BMPs, as mais potentes proteínas osteoindutivas, as quais promovem a diferenciação de células mesenquimais na linhagem osteoblástica e são os únicos fatores de crescimento conhecidos por induzir a formação óssea ectópica⁵⁴. Alguns trabalhos discutem que a falta de efeito do PRP possa ser resultado de uma insuficiente concentração plaquetária, sendo os fatores de crescimento presentes no

PRP dependentes da técnica utilizada para a sua obtenção. Como o tamanho das plaquetas e sua densidade diferem entre coelhos e humanos, a verificação de sua concentração foi realizada, apesar da evidência científica quando utilizado o presente protocolo para obtenção do PRP^{23,49}.

A concentração plaquetária teve um aumento médio de 3,8 vezes comparado ao sangue total, o que é equivalente a estudos que relataram um efeito positivo com o PRP^{37,38}. O método também se mostra reprodutível, de fácil aplicação e sua preparação demora cerca de 45 minutos, após a coleta do sangue. Esta concentração é maior que a observada em outros protocolos^{3,30} que não conseguiram chegar a um aumento de 2 vezes a concentração plaquetária no sangue e semelhante às concentrações obtidas pelos métodos automatizados⁵⁹⁻⁶², que variaram em até 6 vezes superiores. Outros trabalhos descreveram aumentos maiores em algumas contagens^{10,25,54}, mas não encontraram uma correlação entre a concentração no PRP e nova formação óssea^{2,27}, enquanto outros relataram efeitos positivos ou ainda uma reação inibitória paradoxal em maiores concentrações^{9,59}.

A utilização e os benefícios do PRP têm sido descritos em diversos procedimentos de enxertos ósseos em rebordos reabsorvidos^{47,53}, técnicas de levantamento do assoalho do seio maxilar^{26,39,44,47} ou concomitantes à instalação imediata de implantes^{11,27,40,47}. Entretanto, seu uso tem gerado controvérsias e estudos anteriormente realizados mostraram que a associação do PRP ao enxerto autógeno ou aos substitutos ósseos aumentou a porcentagem de osteogênese e a formação óssea^{39,52}, enquanto outros encontraram efeitos benéficos somente nas fases iniciais da reparação^{16,17}. Por outro lado, resultados de algumas pesquisas não revelaram diferenças significantes^{2,14,24,25,51,54} ou mostraram um menor nível de formação óssea e um atraso na remodelação de enxertos ósseos quando o PRP foi adicionado^{9,51}. No presente trabalho não foi observada diferença

quantitativa ou qualitativa na neoformação óssea quando o PRP foi utilizado.

No exame dos dados radiográficos foi questionável que a densidade óssea mais elevada foi observada no período inicial. Após a análise histomorfométrica foi notado que esses locais tinham significativamente mais osso devido à formação de calo ósseo. Nos grupos que receberam enxerto, a maior densidade se deveu também a presença de partículas que ainda não tinham sido reabsorvidas. Entretanto, houve perda do limite da região do defeito observada radiograficamente nos períodos mais tardios e as imagens nos grupos enxertados eram mais homogêneas, confirmadas pelos achados histológicos que mostraram o processo de reabsorção e integração das partículas.

O processo de remodelação fisiológica do osso de humanos e de coelhos é similar, mas, diferenças na arquitetura total do córtex existem⁴⁵. O osso cortical é lamelar, como o osso humano, mas inclui menor quantidade de canais haversianos e ósteons característicos de corticais ósseas mais espessas de primatas. Coelhos são comumente utilizados como modelo experimental para a avaliação da incorporação de enxertos ósseos e imunogenicidade. Dessa forma, uma definição de mudanças nas propriedades mecânicas permite uma correlação de parâmetros biológicos, imunológicos e biomecânicos da função do enxerto no mesmo animal.

Além do volume ósseo, outro fator de grande importância para o correto planejamento terapêutico e prognóstico para a reabilitação implantossuportada é a qualidade óssea⁶. O tecido ósseo compacto homogêneo pode dificultar a preparação da loja cirúrgica provocando sobreaquecimento do tecido ósseo, podendo ocorrer áreas de necrose, aumento da atividade osteoclástica, vascularização local reduzida e conseqüente diminuição dos mecanismos de reparo em torno dos implantes. Uma camada cortical e a densidade do osso esponjoso

suficiente garantem boa vascularização, permitindo ótimas possibilidades de reparo do tecido ósseo e a estabilidade primária dos implantes. Em condições de densidade diminuída do componente esponjoso e cortical muito delgada tem-se sugerido a associação do PRP para acelerar a reparação inicial e aumentar a densidade óssea local, melhorando o resultado do tratamento com implante.

A resistência do osso está relacionada ao conteúdo mineral, colágeno e sua inter-relação, e a do enxerto ósseo depende ainda do processo reparativo que está ocorrendo, variando de acordo a reabsorção e neoformação óssea^{19,22,42,43,45,55}. Nos grupos A e PRPA havia maior resistência decorrente da presença de partículas de enxerto autógeno e de seu efeito osteogênico, osteoindutor e osteocondutor, e da formação de calo ósseo, associado ao trauma mecânico da confecção do defeito. O PRP influenciou o desenvolvimento de tecido conjuntivo com característica mais delicada o que pode também ter influenciado os resultados inferiores observados nos grupos onde a associação foi realizada.

Por outro lado, quando a região do enxerto for submetida a cargas, colapso ou fratura provavelmente não irão ocorrer desde que elas estejam dentro de seu limiar de resistência^{15,42,43}. Entretanto, no presente trabalho, traumas externos prematuros, como inserções musculares, movimentações, áreas de impacto ou falta de imobilização, influenciaram negativamente a evolução do processo de reparo, diminuindo a resistência biomecânica e impedindo o fechamento completo dos defeitos nos períodos avaliados. Além disso, o processo fisiopatológico da reparação do defeito ósseo estimula a reconstrução do canal medular, como foi observado histologicamente pela maior reabsorção das partículas enxertadas nesse local.

Como mencionado anteriormente, fatores de crescimento liberados a partir do PRP agem sobre células locais, como osteoblastos e fibroblastos⁴ e seu uso tem mostrado propriedades angiogênicas e

osteogênicas em modelos animais³¹, além de outras propriedades osteoindutivas⁵⁶. O único aumento significativo da neoformação óssea foi nos grupos que receberam enxerto, porém, a adição do PRP não influenciou positivamente sua quantidade ou qualidade, apesar da presença de maior número de células osteogênicas.

A necessidade de células vitais combinadas ao PRP ainda é questionável, e, quando associado a materiais osteocondutores tem sido relatado resultados semelhantes com relação à taxa de formação óssea^{28,48} ou mesmo um aumento da sua natureza osteocondutiva^{26,31}, comparados aos locais onde esses biomateriais foram utilizados isoladamente. Para avaliar efetivamente o efeito do PRP sobre a formação óssea o ideal seria um modelo experimental de enxertos bilaterais, sendo a única variável controlada a adição de PRP. No grupo PRPA, uma camada de tecido conjuntivo fibroso foi notada adjacente às partículas não-vitais no interior do canal medular, o que poderia ser explicada pela ação quimiotática de TGF- β sobre fibroblastos. Dessa forma, persiste a indagação que a aplicação do PRP somente irá resultar em neoformação óssea acelerada se células específicas, como osteoblastos e osteócitos, estiverem presentes.

Para que ocorra a vascularização das partículas do enxerto é necessário um processo de reabsorção do osso compacto pelos osteoclastos, para permitir às estruturas vasculares que invadam canais de Havers e de Volkman. A neoangiogênese nesses enxertos está, portanto, bastante diminuída e como consequência, muitas células tornam-se necróticas. Uma vez completada a angiogênese, inicia-se a etapa de reconstituição segundo o denominado *creeping substitution* na qual os osteoblastos depositam matriz osteóide ao redor das células necróticas as quais, por sua vez, vão sendo gradualmente reabsorvidas pelos osteoclastos^{7,8}.

A atividade de osteoclastos não pode ser medida por meios histomorfométricos¹⁶, mas a taxa aumentada de remoção de osso

sugere que maior quantidade de osteoclastos, com maior número de núcleos, estava agindo nos locais enxertados associados ao PRP. Apesar da maior vascularização observada nos períodos iniciais nos grupos tratados com PRP, não houve diferença no resultado final da formação óssea nesse modelo experimental, utilizando osso de origem endocondral. Entretanto, quando associado ao enxerto de origem intramembranosa, resultados semelhantes foram encontrados^{2,13,14,24,48} demonstrando que a capacidade regenerativa do PRP é de baixa potência, não tendo efeito significativo na regeneração óssea.

Em contraste com os relatos anteriores, a adição do PRP a enxertos ósseos resultou no aumento da densidade óssea na reconstrução de defeitos ósseos maiores^{37,38,64}. Em discordância, nosso estudo e outros^{2,24,50} não confirmaram a reparação em defeitos de menor magnitude. Dessa forma, devido à ação reguladora local do PRP na regeneração óssea, pode ocorrer um efeito benéfico em defeitos de tamanho crítico ou com a vascularização comprometida, enquanto não tem efeito adjuvante em defeitos menores como os do presente modelo. Um defeito de tamanho crítico num modelo em coelhos é de 15 mm o que não poderia ser criado no osso parietal ou tíbia, em decorrência do pequeno tamanho desses ossos. Além do mais, havia a necessidade de controle sem enxerto e sem PRP para evitar a interferência de ação de outros materiais ou variações nas concentrações plaquetárias entre diferentes animais.

A identificação de diferentes constituintes teciduais e tipos celulares pode ser melhor realizada mediante o uso de técnicas de imunohistoquímica⁵⁶. Para evitar a ocorrência de erro e contagens incorretas de osteoblastos e osteoclastos, realizamos a contagem de osteócitos que podem ser identificados com mais precisão devido sua localização no interior da matriz óssea. O resultado da quantificação dessas células e sua relação com a área de matriz neoformada demonstraram maior número de osteócitos por área no grupo PRP,

seguido pelos grupos PRPA, A e C, todos no período inicial. Como não foi observada maior quantidade óssea nesse grupo, sugere-se que a maior quantidade de células esteja relacionada às trabéculas mais imaturas.

Da mesma forma, o maior número de osteoblastos não significa que esteja ocorrendo um aumento da taxa de aposição óssea por essas células. Histologicamente, essa mensuração somente pode ser realizada avaliando a distância entre as faixas de fluorocromos dados em intervalos específicos. Utilizando essa metodologia, estudos prévios não observaram um aumento nessa taxa, apesar do aumento na concentração de fatores de crescimento produzido pelo PRP, porém, notaram um volume aumentado de novo osso e atribuíram ao maior número de osteoblastos trabalhando nos locais enxertados¹⁷.

A osteogênese no período inicial foi semelhante, enquanto aos 60 dias os defeitos mostraram sinais comparáveis de remodelação. A maior celularidade no grupo PRP revelou um osso mais imaturo e a qualidade do tecido conjuntivo osteogênico representou um arcabouço mais delicado para guiar o crescimento celular estimulado. Isso não exclui a possibilidade de efeito benéfico do PRP nas fases iniciais de reparação óssea, favorecendo esse processo quando existe alguma deficiência nesses mecanismos.

As correlações clínicas desse estudo extrapoladas para o modelo humano são que a associação do PRP não cria um enxerto de maior densidade trabecular e que o produto final não é diferente do padrão de volume ósseo e densidade mineral entre os enxertos, levando ao questionamento das vantagens teóricas da adição do PRP a enxertos ósseos para reconstruções do esqueleto facial. O PRP age como um adesivo biológico mantendo as partículas juntas, tornando a manipulação do material muito mais fácil, que resiste a movimentação durante o fechamento do retalho e durante o período pós-operatório.

A necessidade de decisões baseadas em evidência, relativo às recomendações e alternativas terapêuticas, são bastante

aparentes e a revisão da literatura não demonstra um consenso da utilidade clínica do PRP, combinado ou não a enxertos no tratamento de defeitos ósseos para a reabilitação estética e funcional do paciente. O PRP pode ter potencial clínico forte associado com os fatores de crescimento que contém, mas há uma necessidade por estudos clínicos bem-controlados para avaliar a concentração ideal dos diferentes fatores de crescimento e determinar se a aplicação de PRP associada a diferentes substitutos ósseos e diversas barreiras provêem um efeito benéfico para a osteogênese.

7 CONCLUSÃO

A metodologia empregada e os resultados obtidos neste estudo nos permitem concluir que:

- a) O PRP, associado ou não ao enxerto ósseo autógeno, não influenciou na quantidade de matriz óssea e qualidade estrutural do tecido ósseo formado;
- b) A celularidade da matriz óssea neoformada foi maior no grupo PRP do que nos demais grupos no período de 15 dias;
- c) O processo de reabsorção das partículas de enxerto foi mais expressivo no grupo PRPA do que no grupo A, no período de 15 e 30 dias;
- d) O tecido conjuntivo osteogênico nos grupos tratados com o PRP era do tipo frouxo, enquanto nos não tratados era do tipo fibroso;
- e) O PRP promoveu maior vascularização nos períodos de 15 e 30 dias;
- f) O PRP, associado ou não ao enxerto ósseo autógeno, não influenciou a resistência biomecânica e a densidade óptica do tecido ósseo formado, sendo maiores nos grupos A e PRPA quando comparados aos grupos C e PRP.

8 REFERÊNCIAS*

- 1 Abrams CS. Platelet biology. Up To Date [serial on line]. 2006 [cited 2006 mar 13]. Disponível em: <http://www.uptodateonline.com/utd/content>.
- 2 Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Evaluation of platelet-rich plasma in combination with anorganic bovine bone in the rabbit cranium: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004 Jan./Feb.; 19(1): 59-65.
- 3 Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, Nurden P, Orive G, Andia I. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol*. 2006 May; 24(5): 227-34.
- 4 Boyapati L, Wang HL. The role of platelet-rich plasma in sinus augmentation: a critical review. *Implant Dent*. 2006 June; 15(2): 160-70.
- 5 Boyne PJ. Maxillofacial surgical application of bone inductor materials. *Implant Dent*. 2001; 10(1): 2-4.

* Baseado em:

Internacional Comité of Medical Journal Editors. Bibliographic Services Division. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: simple referents [homepage na Internet]. Bethesda: US Nacional Library; c2003 [disponibilidade em 2006 fev; citado em 20 mar.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

- 6 Brånemark PI, Zarb GA, Albrektsson T. Tissue-integrated prostheses : osseointegration in clinical dentistry. Chicago: Quintessence; 1985. 350p.
- 7 Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem.* 1994 Nov.; 56(3): 283-94.
- 8 Caplan AI, Goldberg VM. Principles of tissue engineered regeneration of skeletal tissues. *Clin Orthop Relat Res.* 1999 Oct.; (367 Suppl): S12-6.
- 9 Choi BH, Zhu SJ, Kim BY, Huh JY, Lee SH, Jung JH. Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: an in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005 June; 34(4): 420-4.
- 10 Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2004 Nov.; 114(6): 1502-8.
- 11 Fontana S, Olmedo DG, Linares JA, Guglielmotti MB, Crosa ME. Effect of platelet-rich plasma on the peri-implant bone response: an experimental study. *Implant Dent.* 2004 Mar.; 13(1): 73-8.
- 12 Frechette JP, Martineau I, Gagnon G. Platelet-rich plasmas: growth factor content and roles in wound healing. *J Dent Res.* 2005 May; 84(5): 434-9.

- 13 Fuerst G, Reinhard G, Tangl S, Mittlbock M, Sanroman F, Watzek G. Effect of platelet-released growth factors and collagen type I on osseous regeneration of mandibular defects. A pilot study in minipigs. *J Clin Periodontol*. 2004 Sept.; 31(9): 784-90.
- 14 Furst G, Gruber R, Tangl S, Zechner W, Haas R, Mailath G, et al. Sinus grafting with autogenous platelet-rich plasma and bovine hydroxyapatite. A histomorphometric study in minipigs. *Clin Oral Implants Res*. 2003 Aug.; 14(4): 500-8.
- 15 Gauthier O, Muller R, von Stechow D, Lamy B, Weiss P, Bouler JM, et al. In vivo bone regeneration with injectable calcium phosphate biomaterial: a three-dimensional micro-computed tomographic, biomechanical and SEM study. *Biomaterials*. 2005 Sept.; 26(27): 5444-53.
- 16 Gerard D, Carlson ER, Gotcher JE, Jacobs M. Effects of platelet-rich plasma on the healing of autologous bone grafted mandibular defects in dogs. *J Oral Maxillofac Surg*. 2006 Mar.; 64(3): 443-51.
- 17 Gerard D, Carlson ER, Gotcher JE, Jacobs M. Effects of platelet-rich plasma at the cellular level on healing of autologous bone-grafted mandibular defects in dogs. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007 Apr.; 65(4): 721-7.
- 18 Grageda E. Platelet-rich plasma and bone graft materials: a review and a standardized research protocol. *Implant Dent*. 2004 Dec.; 13(4): 301-9.

- 19 Hamer AJ, Strachan JR, Black MM, Ibbotson CJ, Stockley I, Elson RA. Biochemical properties of cortical allograft bone using a new method of bone strength measurement. A comparison of fresh, fresh-frozen and irradiated bone. *J Bone Joint Surg Br.* 1996 May; 78(3): 363-8.
- 20 Hämmerle CH, Jung RE. Bone augmentation by means of barrier membranes. *Periodontol 2000.* 2003; 33: 36-53.
- 21 Hokugo A, Sawada Y, Hokugo R, Iwamura H, Kobuchi M, Kambara T, et al. Controlled release of platelet growth factors enhances bone regeneration at rabbit calvaria. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007 July; 104(1): 44-8.
- 22 Itoman M, Nakamura S. Experimental study on allogenic bone grafts. *Int Orthop.* 1991; 15(2): 161-5.
- 23 Jahn RS, Sendyk WR, Cardoso MR, Novo NF, Gromatzky A, Lorenzo JL, et al. Proposta de nova metodologia para obtenção de plasma rico em plaquetas. *Braz Oral Res.* 2004; 18: 152.
- 24 Jakse N, Tangl S, Gilli R, Berghold A, Lorenzoni M, Eskici A, et al. Influence of PRP on autogenous sinus grafts. An experimental study on sheep. *Clin Oral Implants Res.* 2003 Oct.; 14(5): 578-83.
- 25 Jensen TB, Rahbek O, Overgaard S, Soballe K. No effect of platelet-rich plasma with frozen or processed bone allograft around noncemented implants. *Int Orthop.* 2005 Apr.; 29(2): 67-72.
- 26 Kassolis JD, Reynolds MA. Evaluation of the adjunctive benefits of platelet-rich plasma in subantral sinus augmentation. *J Craniofac Surg.* 2005 Mar.; 16(2): 280-7.

- 27 Kim SG, Kim WK, Park JC, Kim HJ. A comparative study of osseointegration of Avana implants in a demineralized freeze-dried bone alone or with platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002 Sept.; 60(9): 1018-25.
- 28 Klongnoi B, Rupprecht S, Kessler P, Zimmermann R, Thorwarth M, Pongsiri S, et al. Lack of beneficial effects of platelet-rich plasma on sinus augmentation using a fluorohydroxyapatite or autogenous bone: an explorative study. *J Clin Periodontol.* 2006 July; 33(7): 500-9.
- 29 Landesberg R, Burke A, Pinsky D, Katz R, Vo J, Eisig SB, et al. Activation of platelet-rich plasma using thrombin receptor agonist peptide. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005 Apr.; 63(4): 529-35.
- 30 Landesberg R, Roy M, Glickman RS. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000 Mar.; 58(3): 297-300; discussion.
- 31 Lucarelli E, Fini M, Beccheroni A, Giavaresi G, Di Bella C, Aldini NN, et al. Stromal stem cells and platelet-rich plasma improve bone allograft integration. *Clin Orthop Relat Res.* 2005 June; (435): 62-8.
- 32 Macedo LGS, Macedo NL, Matuda FS, Monteiro ASF. Carga imediata em implante unitário em região posterior de maxila. Relato de Caso Clínico. *Implant News.* 2006 set./out.; 3(5): 493-8.
- 33 Macedo LGS, Monteiro ASF, Macedo NL. Osso humano fresco congelado em reconstruções ósseas: estudo retrospectivo e relato de casos. *Implant Dent.* 2007 jan./fev.; 4(1): 49-55.

- 34 Macedo NL, Macedo LGS, Matuda FS, Ouchi SM, Monteiro ASF, Carvalho YR. Guided bone regeneration with subperiosteal implants of PTFE and hydroxyapatite physical barriers in rats. *Braz Dent J.* 2003; 14(2): 119-24.
- 35 Macedo NL, Matuda FS, Macedo LGS, Monteiro ASF, Valera MC, Carvalho YR. Evaluation of two membranes in guided bone tissue regeneration: histological study in rabbits. *Braz J Oral Sci.* 2004 Jan./Mar.;3(8): 395-400.
- 36 Man D, Plosker H, Winland-Brown J. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2001 Jan.; 107(1): 229-37; discussion 38-9.
- 37 Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Apr.; 62(4): 489-96.
- 38 Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998 June; 85(6): 638-46.
- 39 Mazor Z, Peleg M, Garg AK, Luboshitz J. Platelet-rich plasma for bone graft enhancement in sinus floor augmentation with simultaneous implant placement: patient series study. *Implant Dent.* 2004 Mar.; 13(1): 65-72.
- 40 Monov G, Fuerst G, Tepper G, Watzak G, Zechner W, Watzek G. The effect of platelet-rich plasma upon implant stability measured by resonance frequency analysis in the lower anterior mandibles. *Clin Oral Implants Res.* 2005 Aug.; 16(4): 461-5.

- 41 Monteiro ASF. Efeitos da barreira de poliuretana na técnica de regeneração óssea guiada em defeitos cirúrgicos no osso parietal de coelhos [Dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2004.
- 42 Nather A, Goh JC, Lee JJ. Biomechanical strength of non-vascularised and vascularised diaphyseal bone transplants. An experimental study. *J Bone Joint Surg Br.* 1990 Nov.; 72(6): 1031-5.
- 43 Nather A, Thambyah A, Goh JC. Biomechanical strength of deep-frozen versus lyophilized large cortical allografts. *Clin Biomech (Bristol, Avon).* 2004 June; 19(5): 526-33.
- 44 Ohya M, Yamada Y, Ozawa R, Ito K, Takahashi M, Ueda M. Sinus floor elevation applied tissue-engineered bone. Comparative study between mesenchymal stem cells/platelet-rich plasma (PRP) and autogenous bone with PRP complexes in rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2005 Oct.; 16(5): 622-9.
- 45 Pelker RR, Friedlaender GE, Markham TC, Panjabi MM, Moen CJ. Effects of freezing and freeze-drying on the biomechanical properties of rat bone. *J Orthop Res.* 1984; 1(4): 405-11.
- 46 Perry CR. Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes. *Clin Orthop Relat Res.* 1999 Mar.; (360): 71-86.
- 47 Petrungraro PS. Immediate implant placement and provisionalization in edentulous, extraction, and sinus grafted sites. *Compend Contin Educ Dent.* 2003 Feb.; 24(2): 95-100, 103-4, 106 passim; quiz 113.

- 48 Plachokova AS, van den Dolder J, Stoelinga PJ, Jansen JA. The bone regenerative effect of platelet-rich plasma in combination with an osteoconductive material in rat cranial defects. *Clin Oral Implants Res.* 2006 June; 17(3): 305-11.
- 49 Pontual MAB, Magini RS. Plasma rico em plaquetas (PRP) e fatores de crescimento - das pesquisas científicas à clínica odontológica. São Paulo: Livraria Santos; 2004. 308p.
- 50 Raghoobar GM, Schortinghuis J, Liem RS, Ruben JL, van der Wal JE, Vissink A. Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? *Clin Oral Implants Res.* 2005 June; 16(3): 349-56.
- 51 Roldan JC, Jepsen S, Schmidt C, Knuppel H, Rueger DC, Acil Y, et al. Sinus floor augmentation with simultaneous placement of dental implants in the presence of platelet-rich plasma or recombinant human bone morphogenetic protein-7. *Clin Oral Implants Res.* 2004 Dec.; 15(6): 716-23.
- 52 Sammartino G, Tia M, Marenzi G, di Lauro AE, D'Agostino E, Claudio PP. Use of autologous platelet-rich plasma (PRP) in periodontal defect treatment after extraction of impacted mandibular third molars. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005 June; 63(6): 766-70.
- 53 Sanchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003 Jan./Feb.; 18(1): 93-103.

- 54 Sarkar MR, Augat P, Shefelbine SJ, Schorlemmer S, Huber-Lang M, Claes L, et al. Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold. *Biomaterials*. 2006 Mar.; 27(9): 1817-23.
- 55 Thoren K, Aspenberg P, Thorngren KG. Lipid extracted bank bone. Bone conductive and mechanical properties. *Clin Orthop Relat Res*. 1995 Feb.; (311): 232-46.
- 56 Thorwarth M, Rupprecht S, Falk S, Felszeghy E, Wiltfang J, Schlegel KA. Expression of bone matrix proteins during de novo bone formation using a bovine collagen and platelet-rich plasma (prp) - an immunohistochemical analysis. *Biomaterials*. 2005 May; 26(15): 2575-84.
- 57 Tozum TF, Demiralp B. Platelet-rich plasma: a promising innovation in dentistry. *J Can Dent Assoc*. 2003 Nov.; 69(10): 664.
- 58 Vendramin F, Franco D, Nogueira C, Pereira M, Franco T. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de preparo e utilização em cirurgia plástica. *Rev Col Bras Cir*. 2006; 33(1): 24-8.
- 59 Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone*. 2004 Apr.; 34(4): 665-71.
- 60 Weibrich G, Kleis WK. Curasan PRP kit vs. PCCS PRP system. Collection efficiency and platelet counts of two different methods for the preparation of platelet-rich plasma. *Clin Oral Implants Res*. 2002 Aug.; 13(4): 437-43.

- 61 Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Craniomaxillofac Surg.* 2002 Apr.; 30(2): 97-102.
- 62 Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE, Wagner W. Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. *Clin Oral Implants Res.* 2003 June; 14(3): 357-62.
- 63 Welch RD, Zhang H, Bronson DG. Experimental tibial plateau fractures augmented with calcium phosphate cement or autologous bone graft. *J Bone Joint Surg Am.* 2003 Feb.; 85-A(2): 222-31.
- 64 Wiltfang J, Kloss FR, Kessler P, Nkenke E, Schultze-Mosgau S, Zimmermann R, et al. Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. An animal experiment. *Clin Oral Implants Res.* 2004 Apr.; 15(2): 187-93.

Apêndice A - Dados referentes às imagens radiográficas digitais das regiões dos defeitos ósseos

Tabela 16 - Médias da densidade óptica aos 15, 30 e 60 dias nos grupos C, A, PRP e PRPA nos diferentes defeitos (continua)

PERÍODO	GRUPO	MÉDIA	σ
15	C	153	24,47
		179	15,63
		163	22,81
		152	17,32
		179	15,12
	A	190	21,7
		208	14,07
		185	27,63
		165	30,6
		209	14,35
	PRP	160	22,34
		168	19,99
		155	15,52
		157	19,85
		166	21,58
		208	27,47
	PRPA	190	30,09
		192	30,51
191		29,44	
191		30,02	

Tabela 19 - Médias da densidade óptica aos 15, 30 e 60 dias nos grupos C, A, PRP e PRPA nos diferentes defeitos (continua)

PERÍODO	GRUPO	MÉDIA	σ
30	C	174	15,67
		161	29,88
		183	14
		154	11,43
		150	23
		157	19,28
		168	20,87
		166	18,77
		173	23,04
	158	22,43	
	A	192	15,62
		173	19,57
		211	13,16
		202	17,96
		173	23,22
		181	18,27
		186	18,47
		185	18,24
		203	16,03
200		20,53	

Tabela 19 - Médias da densidade óptica aos 15, 30 e 60 dias nos grupos C, A, PRP e PRPA nos diferentes defeitos (continua)

PERÍODO	GRUPO	MÉDIA	σ
30	PRP	144	20,88
		143	20,33
		150	12,19
		150	12,27
		150	12,47
		179	15,47
		179	15,01
		157	18,97
		156	16,37
		155	26,24
	PRPA	170	20,02
		190	25,7
		190	24,94
		192	23,37
		202	17,61
		201	17,31
		194	20,89
		198	22,11
		189	15,73
		181	26,78

Tabela 19 - Médias da densidade óptica aos 15, 30 e 60 dias nos grupos C, A, PRP e PRPA nos diferentes defeitos (continua)

PERÍODO	GRUPO	MÉDIA	σ
60	C	132	11,3
		165	27,28
		145	15,9
		148	28,67
		159	31,23
		139	31,64
		163	19,6
		174	26,81
		172	27,1
	173	17,96	
	A	183	21,39
		177	23,45
		187	22,15
		173	24,33
		209	16,65
		174	21,93
		187	23,86
		181	29,05
		182	17,9
189		20	

Tabela 19 - Médias da densidade óptica aos 15, 30 e 60 dias nos grupos C, A, PRP e PRPA nos diferentes defeitos (conclusão)

PERÍODO	GRUPO	MÉDIA	σ
60	PRP	130	14,18
		182	17,15
		151	30,61
		134	24,7
		158	29,13
		153	27,88
		144	20,42
		144	18,69
		141	21,87
	148	20,23	
	PRPA	186	28,33
		204	20,6
		185	29,39
		172	20,47
		178	23,54
		180	28,15
		182	21,12
		183	26,83
171		22,42	
177	18,74		

Apêndice B - Dados referentes aos achados microscópicos referentes aos fenômenos morfológicamente detectados no estudo do reparo ósseo

Tabela 17 - Densidades de volume de matriz óssea, expressa em valor de área (μm^2), quantificadas durante o processo de reparação óssea nos campos microscópicos dos grupos C, A, PRP e PRPA em cada período avaliado (continua)

PERÍODO	CAMPO	C	A	PRP	PRPA
15 dias	T1C1	70439,26	48590,28	39586,70	30595,72
	T1C2	45335,23	40702,66	11229,27	94672,30
	T1C3	28964,75	50489,89	21063,82	76464,17
	T1C4	794,87	0,00	2367,70	141050,08
	T1C5	39152,91	48505,25	10723,76	137278,97
	T2C1	36927,90	41578,11	40287,16	49294,27
	T2C2	6788,07	137147,25	0,00	143461,45
	T2C3	0,00	33416,41	0,00	142960,10
	T2C4	54149,76	70883,57	21114,15	109563,70
	T2C5	51065,18	44549,96	49580,38	0,00
	T3C1	46878,09	31090,01	54375,37	88202,83
	T3C2	0,00	88182,13	49302,94	102174,13
	T3C3	37821,81	98510,39	0,00	50325,38
	T3C4	31211,09	40410,71	55183,83	48482,57
	T3C5	48769,14	53166,84	64500,36	74366,89

Tabela 20 - Densidades de volume de matriz óssea, expressa em valor de área (μm^2) quantificadas durante o processo de reparação óssea nos campos microscópicos dos grupos C, A, PRP e PRPA em cada período avaliado (continua)

PERÍODO	CAMPO	C	A	PRP	PRPA
30 dias	T1C1	14461,61	91201,07	96206,09	98566,33
	T1C2	51841,06	123563,00	73886,43	49764,79
	T1C3	0,00	96664,81	45549,30	27248,97
	T1C4	14461,61	97281,56	63953,83	27286,10
	T1C5	80007,47	79529,78	111704,99	84723,97
	T2C1	107769,43	73286,15	111010,26	74683,19
	T2C2	61678,97	63653,20	50455,65	121285,36
	T2C3	63105,62	110642,25	13389,02	40229,42
	T2C4	76844,96	56556,92	1450,72	135602,18
	T2C5	62549,50	116810,15	125181,19	71563,26
	T3C1	89357,27	107928,21	56222,05	140189,67
	T3C2	50029,95	58032,00	13609,53	68029,50
	T3C3	25857,42	24672,96	29904,17	26327,36
	T3C4	64628,71	79767,81	14605,94	41897,25
	T3C5	52993,71	113275,17	115177,21	79866,21

Tabela 20 - Densidades de volume de matriz óssea, expressa em valor de área (μm^2) quantificadas durante o processo de reparação óssea nos campos microscópicos dos grupos C, A, PRP e PRPA em cada período avaliado (conclusão)

PERÍODO	CAMPO	C	A	PRP	PRPA
60 dias	T1C1	106666,07	133181,72	124208,85	143368,20
	T1C2	116898,48	143688,21	9533,34	136668,98
	T1C3	126230,75	143765,61	0,00	142930,02
	T1C4	129739,29	126798,91	0,00	133218,57
	T1C5	79356,82	140632,83	70697,07	22292,77
	T2C1	122836,62	142807,33	131556,13	124205,44
	T2C2	70632,34	132078,13	111168,24	109031,98
	T2C3	9783,47	92833,42	124091,08	118673,78
	T2C4	41386,93	77059,05	134703,02	99637,75
	T2C5	73015,72	137083,50	77863,75	128254,96
	T3C1	109682,80	130501,82	118782,88	130889,97
	T3C2	88295,04	20687,77	33249,82	126820,90
	T3C3	23378,25	143386,71	22130,28	81021,35
	T3C4	15278,63	130898,70	50267,07	31786,95
	T3C5	48853,14	94719,21	83852,92	128135,85

Apêndice C -Dados referentes à contagem de osteócitos por área detectados no estudo do reparo ósseo

Tabela 18 - Contagem de osteócitos, área e relação de osteócitos por área quantificada durante o processo de reparação óssea nos campos microscópicos dos grupos C, A, PRP e PRPA em cada período avaliado (continua)

PERÍODO	GRUPO	OSTEÓCITOS	ÁREA ($\times 10^3 \mu\text{m}^2$)	OSTEÓCITO/ÁREA
15 dias	C	28	25,76	1,09
		23	14,78	1,56
		21	13,10	1,60
		39	28,02	1,39
		28	17,34	1,62
		14	13,88	1,01
		16	17,01	0,94
		22	19,61	1,12
	A	40	15,53	2,58
		27	14,47	1,87
		25	15,68	1,59
		26	16,59	1,57
	PRP	20	11,06	1,81
		21	25,72	0,82
		42	15,95	2,63
		47	23,46	2,00
		56	17,80	3,15
		59	19,69	3,00
		20	11,56	1,73
		24	21,03	1,14
PRPA	27	19,06	1,42	
	28	26,51	1,06	
	59	27,23	2,17	
	81	32,19	2,52	

Tabela 21 - Contagem de osteócitos, área e relação de osteócitos por área quantificada durante o processo de reparação óssea nos campos microscópicos dos grupos C, A, PRP e PRPA em cada período avaliado (continua)

PERÍODO	GRUPO	OSTEÓCITOS	ÁREA ($\times 10^3 \mu\text{m}^2$)	OSTEÓCITO/ÁREA
30 dias	C	16	15,82	1,01
		26	24,00	1,08
		20	18,59	1,08
		27	22,66	1,19
		28	26,81	1,04
		40	22,74	1,76
		24	28,36	0,85
	A	30	29,46	1,02
		32	27,72	1,15
		34	32,71	1,04
		35	27,22	1,29
		36	28,95	1,24
		26	29,65	0,88
		28	29,41	0,95
	PRP	29	28,37	1,02
		39	32,83	1,19
		44	18,33	2,40
		30	30,41	0,99
		25	31,82	0,79
		29	30,12	0,96
PRPA		29	35,89	0,81
	30	25,73	1,17	
	33	32,65	1,01	
	36	27,04	1,33	

Tabela 21 - Contagem de osteócitos, área e relação de osteócitos por área quantificada durante o processo de reparação óssea nos campos microscópicos dos grupos C, A, PRP e PRPA em cada período avaliado (conclusão)

PERÍODO	GRUPO	OSTEÓCITOS	ÁREA ($\times 10^3 \mu\text{m}^2$)	OSTEÓCITO/ÁREA
60 dias	C	37	35,02	1,06
		34	32,89	1,03
		44	31,40	1,40
		49	35,86	1,37
		33	28,84	1,14
		44	25,08	1,75
	A	20	35,28	0,57
		30	35,90	0,84
		31	35,65	0,87
		34	36,02	0,94
		37	28,63	1,29
		39	33,76	1,16
	PRP	33	23,24	1,42
		36	35,60	1,01
		39	26,46	1,47
		40	34,72	1,15
		45	35,89	1,25
		67	35,83	1,87
	PRPA	26	35,19	0,74
		29	35,23	0,82
32		31,90	1,00	
35		35,92	0,97	
36		32,17	1,12	
		39	34,04	1,15

Apêndice D - Dados referentes aos testes biomecânicos realizados no estudo do reparo ósseo

Tabela 19 - Força de compressão (σ) aplicada para a falha do espécime quantificada durante os testes das propriedades biomecânicas nos grupos C, A, PRP e PRPA, em cada período avaliado (continua)

PERÍODO	GRUPO	$F_{m\acute{a}x}$	σ
30 dias	C	3,72	4,84
		4,27	5,55
		1,86	2,42
		3,77	4,90
		2,00	2,60
	A	9,53	12,39
		19,38	25,19
		10,18	13,23
		19,39	25,20
		11,05	14,36
	PRP	0,71	0,92
		1,37	1,78
		0,26	0,34
		1,37	1,78
		1,66	2,16
PRPA	10,79	14,02	
	17,85	23,20	
	13,18	17,13	
	9,10	11,83	
	10,32	13,41	

Tabela 22 - Força de compressão (σ) aplicada para a falha do espécime quantificada durante os testes das propriedades biomecânicas nos grupos C, A, PRP e PRPA, em cada período avaliado (conclusão)

PERÍODO	GRUPO	$F_{\text{máx}}$	σ
60 dias	C	3,99	5,19
		3,02	3,93
		3,27	4,25
		2,75	3,57
		4,00	5,20
	A	10,20	13,26
		7,92	10,29
		12,66	16,45
		11,54	15,00
		15,00	19,50
	PRP	1,83	2,38
		3,70	4,81
		2,13	2,77
		2,19	2,85
		1,97	2,56
PRPA	12,66	16,45	
	6,90	8,97	
	7,81	10,15	
	12,66	16,45	
	7,26	9,44	

ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP



CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 026/2005-PA/CEP, sobre “Efeito do plasma rico em plaquetas associado ao enxerto autógeno na tíbia de coelhos: Estudo histomorfométrico e biomecânico”, sob a responsabilidade de **ADRIANA DO SOCORRO FERREIRA MONTEIRO**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 13 de setembro de 2005.



Prof. Dra. Suely Carvalho Mutti Naresse
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-Local

Monteiro ASF. Platelet rich plasma effects associated to autogenous graft in rabbit tibias: a histomorfometric, radiographic and biomechanical study [thesis]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2007.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of platelet rich plasma associated or not to autogenous bone graft in bone repair process of tibia rabbits surgical defects. In this research 25 adult rabbits were used, 2 defects were accomplished in each tibia, divided into groups: control (C = bone defect only filled out by blood coagulum), autogenous (A = bone defect + autogenous graft), PRP (PRP = bone defect + PRP) and autogenous + PRP (PRPA = bone defect + autogenous graft + PRP). All of the defects were covered with a PTFE barrier and after 15, 30 and 60 days there were elapsed. Five animals were sacrificed by period, being the pieces containing the defects processed for histological and histomorphometric analysis. Other 5 animals were sacrificed to the 30 and 60 days and submitted to biomechanics analysis and all of the specimens were submitted to the radiographic examination of the optical density. The biomechanic, radiographic and histomorphometric results showed larger resistance, optical density and better bone formation in the groups A and PRPA when compared with the groups C and PRP. This study demonstrated that there was not an improvement in the radiographic, mechanics, and bone formation parameters when PRP was used separately or associated to the autogenous bone graft.

KEYWORDS: *Platelet rich plasma, bone graft, guided bone regeneration, membranes, polytetrafluorethylene.*