

PALOMA SAYEGH ARREGUY SILVA

**PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) ASSOCIADO OU NÃO AO OSSO
ESPONJOSO AUTÓGENO NO REPARO DE FALHAS ÓSSEAS
EXPERIMENTAIS.**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007**

PALOMA SAYEGH ARREGUY SILVA

**PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) ASSOCIADO OU NÃO AO
OSSO ESPONJOSO AUTÓGENO NO REPARO DE FALHAS ÓSSEAS
EXPERIMENTAIS.**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 04 de maio de 2007.

Prof. Luiz Gonzaga Pompermayer
(Co-orientador)

Prof^a. Andréa Pacheco B. Borges

Prof^a. Paula Dias Bevilacqua

Prof^a. Rogéria Serakides

Prof. Ricardo Junqueira Del Carlo
(Orientador)

Dedico este trabalho:

A minha família que muito contribuiu
para minha formação profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha existência e por estar ao meu lado sempre!!!

Ao meu amado pai, exemplo de humildade, compreensão e amor, a quem devo todo o meu interesse pelos livros.

À minha querida mãe, tão sensível e ao mesmo tempo tão guerreira, a quem devo meu amor pelos animais.

À minha irmãzinha, que nunca me deixou só. Agradeço pelo privilégio de ser sua irmã.

À Luiza que trouxe alegria às nossas vidas quando mais precisávamos de um motivo para continuar a viver.

Aos meus irmãozinhos de coração Fábio Luís e Toshio, muito obrigada pela amizade, carinho e paciência, amo muito vocês.

Às “meninas” da república, minha segunda família, Claudinha, Val, Monikete, Lú e Manu, pela amizade incondicional, por enxugarem minhas lágrimas e comemorar comigo minhas vitórias.

Ao professor Ricardo, exemplo de profissional e ser humano, pela engrandecedora convivência, aprendizado e orientação. Tive muito prazer em trabalhar com você.

À professora Rogéria, pela disponibilidade e ajuda preciosa na leitura das lâminas de histopatologia. Te admiro muito como profissional!

A todos os professores do Departamento de Veterinária, em especial ao Gonzaga, Marlene, Zé Antônio e Paula pela amizade, ensinamentos e auxílio profissional;

A Universidade Federal de Viçosa pela excelente infra-estrutura fornecida.

À Betaniiiinha, Renato, Pauliiiiinha e Omar, pela ajuda importantíssima nas cirurgias, pela amizade, pelo exemplo de bondade e incentivo ao meu amadurecimento científico e pessoal;

À Jú e Jéssica pelo auxílio nas cirurgias;

À todos funcionários, principalmente à Lucinda, Maninha, Geraldinho, Rose, Cláudio e Paulo, exemplo de amor ao que fazem;

Ao Cláudio e ao Adão, pelo auxílio no preparo das lâminas de histologia;

Ao Luiz Márcio pela imensa ajuda e boa vontade na coleta de sangue dos animais;

Ao Aécio, por toda ajuda laboratorial;

À todos os animais que tanto me ensinaram durante todo este tempo. Não cresci apenas como profissional com vocês, mas também como ser humano.

BIOGRAFIA

PALOMA SAYEGH ARREGUY SILVA, filha de Alexandre Etienne Arreguy Silva (*in memoriam*) e Carmen Lúcia Sayegh Arreguy Silva, nasceu em 30 de maio de 1981, em Caratinga - MG.

Em janeiro de 2004, graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa –MG.

Em março de 2005, adquiriu o título de Especialista em Clínica e Cirurgia Veterinárias, nesta mesma Instituição, onde em seguida iniciou o curso de mestrado em Medicina Veterinária, concentrando seus estudos na área de cirurgia de pequenos animais.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	2
MATERIAL E MÉTODOS.....	4
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	10
CONCLUSÕES.....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Imagens das diversas etapas do protocolo laboratorial para confecção do PRP.	6
Figura 2 - Esquema demonstrando o osso parietal canino após acesso cirúrgico e demarcação das falhas ósseas I, II, III e IV.	8
Figura 3 - Aspecto radiográfico das falhas ósseas, aos 30, 60 e 90 dias, em animais diferentes.	13
Figura 4 - Aspectos microscópicos apresentados pelos diversos tipos de tratamento aos 30 dias	20
Figura 5 - Aspectos microscópicos apresentados pelos diversos tipos de tratamento aos 60 dias	21
Figura 6 - Aspectos microscópicos apresentados pelos diversos tipos de tratamento aos 90 dias	22
Figura 7 - Aspectos microscópicos apresentados pelo PRP aos 30 dias	23
Figura 8 - Aspectos microscópicos da reação tipo corpo-estranho apresentada aos 30 dias pelo grupo tratado com PRP.	23
Figura 9 - Aspectos microscópicos da reação granulomatosa apresentada aos 30 dias pelo E+PRP	24

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Contagem plaquetária e de leucócitos nas diversas etapas do protocolo laboratorial.	11
Tabela 2 - Resultados da avaliação do grau de preenchimento ósseo das falhas, por meio de análise da radiopacidade no interior das falhas.	16
Tabela 3 - Resultados da avaliação do grau de preenchimento ósseo das falhas, por meio de análise microscópica.	24
Tabela 4 - Resultados da avaliação da maturidade de preenchimento ósseo das falhas, por meio de análise microscópica.	26

RESUMO

SILVA, Paloma Sayegh Arreguy, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Maio de 2007. **Plasma rico em plaquetas (PRP) associado ou não ao osso esponjoso autógeno no reparo de falhas ósseas experimentais.** Orientador: Ricardo Junqueira Del Carlo. Co-orientadores: Marlene Isabel Vargas Vilorio e Luiz Gonzaga Pompermayer.

O plasma rico em plaquetas (PRP) é composto por um grupo de polipeptídios que formam mediadores biológicos responsáveis pela regulação de eventos celulares. O presente estudo avaliou a influência do PRP autógeno, associado ou não ao auto-enxerto ósseo esponjoso (EOE), na reparação de quatro falhas criadas no crânio de 18 coelhos, por meio de exames mesoscópicos, radiográficos e microscópicos. A falha I foi preenchida com o PRP; a II com 3mg de EOE; a III com 3mg de EOE associado ao PRP e a falha IV não foi preenchida, servindo como controle. Após as cirurgias, os animais foram separados aleatoriamente em três grupos experimentais, e eutanasiados aos 30, 60 e 90 dias. Na avaliação mesoscópica, independentemente do período de observação, o preenchimento ósseo na falha controle e naquelas tratadas com PRP, iniciou-se a partir das bordas para o centro e do fundo para a superfície das falhas. Já nas falhas tratadas com EOE e com enxerto associado ao PRP foi notado crescimento ósseo na porção central das falhas. Na análise radiográfica, foi observada maior radiopacidade no interior das falhas dos animais tratados com EOE e naquelas tratadas com enxerto associado ao PRP, em todos os tempos. Aos 90 dias, todas as falhas dos animais tratados com EOE e enxerto associado ao PRP manifestaram opacidade semelhante à do osso receptor. Microscopicamente, aos 30 dias, na falha tratada com EOE associado ao PRP, os fragmentos do enxerto estavam indistintos do tecido ósseo neoformado presente em toda borda do defeito,

associado à moderada quantidade de tecido conjuntivo fibroso muito vascularizado e celularizado. Este tecido apresentou material amorfo, eosinofílico e extracelular, junto a um processo inflamatório, constituído predominantemente por linfócitos e, em menor número, por macrófagos e células gigantes multinucleadas, e que podem ter influenciado negativamente na precocidade de formação óssea. Aos 60 e 90 dias, focos ocasionais de inflamação linfocitária foram observados em alguns animais, provavelmente pela absorção do gel. O comportamento dos dois tratamentos, PRP associado ou não ao EOE, em relação a preenchimento ósseo, foi semelhante ao final do período de observação; o enxerto, utilizado de forma isolada determinou precocidade de reparação óssea e a tromboplastina, utilizada para formação do gel de plaquetas, incitou uma reação semelhante a do tipo corpo-estranho, que atuou negativamente na fase inicial de reparação.

ABSTRACT

SILVA, Paloma Sayegh Arreguy, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2007. **Platelet rich plasma (PRP) associated or not to autogenous bone graft on the reparation of experimental bone defects in the rabbits cranium.** Adviser: Ricardo Junqueira Del Carlo. Co-advisers: Marlene Isabel Vargas Vilorio and Luiz Gonzaga Pompermayer.

Platelet rich plasma (PRP) is composed by polypeptides that forms biologic mediators responsible for the regulation of events influencing cell division, matrix synthesis and tissue differentiation. The present study evaluated autogenous PRP's influence on the reparation process of four bone defects made on eighteen rabbit's skull, associated or not to autogenous bone graft (EOE) by mesoscopic, radiographic and microscopic evaluations. Defect I received PRP only; defect II received 3mg of EOE only; defect III received EOE associated to PRP; defect IV was left to heal naturally, serving as control. After each surgery the animals were randomly divided into three groups of same number that were euthanized at 30, 60 and 90 days. In the mesoscopic evaluation bone ingrowth started from the defect's borders to the center and from the bottom to the surface for all observation times on the control (VI) and PRP only (I) groups. The groups treated with EOE only (II) and EOE associated to PRP (III) new bone was observed in the center of the defects. Radiographic analysis showed greater central radiopacity for groups treated with EOE only (II) and EOE associated to PRP (III) at all observation times. At 90 days all defects from groups II and III showed opacity similar to the host bone. Microscopically in the group treated with EOE associated to PRP (III) at 30 days the graft was indistinguishable from new bone present on the border of the defect, associated to a moderate quantity of a very vascularized and cellular fibrous connective tissue. This tissue showed an extracellular eosinophilic amorphous foamy material, associated to an inflammatory process constituted mainly by lymphocytes and in less number by macrophages and multinucleated

giant cells that may have negatively influenced early bone formation. At 60 and 90 days occasional spots of lymphocytic inflammation were observed in some animals, probably due to the gel absorption. Both treatments, PRP associated or not to EOE, were similar for the bone ingrowth at the final time of observation; the graft used alone determined early bone repair and thromboplastine used for the platelets' gel formation incited a foreign body-like reaction that acted negatively on the initial phase of repair.

PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) ASSOCIADO OU NÃO AO OSSO ESPONJOSO AUTÓGENO NO REPARO DE FALHAS ÓSSEAS EXPERIMENTAIS.

1. INTRODUÇÃO

O tecido ósseo exibe grande potencial regenerativo, sendo capaz de reparar fraturas e defeitos locais com semelhança estrutural, desde que estejam presentes alguns componentes fundamentais como células osteocompetentes, mediadores biológicos, matriz, vascularização e suporte sanguíneo eficiente (CANDINI, 2001).

Desde a década de 80 tem-se investigado a possibilidade da utilização dos fatores de crescimento (FCs) na modulação da reparação óssea. Muitos destes fatores foram identificados, isolados e testados quanto à capacidade de influenciar o início do crescimento ósseo.

Os FCs são proteínas solúveis que agem nas células osteoprogenitoras diferenciando-as e auxiliando o trabalho das células presentes no local. Regulam eventos importantes, incluindo proliferação, diferenciação, quimiotaxia e formação de matriz (LYNCH, 1991) favorecendo a formação precoce de tecido ósseo (GREEN et al., 1997).

Estudos *in vivo* e *in vitro* avaliaram os fatores de crescimento encontrados nos ossos e estabeleceram: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento e transformador β (TGF- β), fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF), fator de crescimento similar à insulina (IGF) e a proteína morfogênica óssea (BMP). Estes fatores são produzidos por diversas células, como plaquetas, fibroblastos, osteoblastos, condroblastos e àquelas de natureza mesenquimal (LYNCH, 1991).

O plasma rico em plaquetas (PRP) trata-se de uma fonte autógena de fatores de crescimento (LIEBERMAN et al., 2002). As plaquetas chegam rapidamente no local da ferida e liberam múltiplos FCs e citocinas, incluindo: TGF/ β 1 e β 2, fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento celular endotelial derivado das plaquetas (PDEGF), interleucina-1 (IL-1), bFGF e fator ativador de plaquetas-4 (PAF-4). Estes FCs contribuem para a reparação óssea e aumentam a vascularização local, característica vital para integração de enxertos ósseos (AGHALOO et al., 2002).

2. REVISÃO DE LITERATURA

O plasma rico em plaquetas (PRP) é composto por um grupo de polipeptídios, mediadores biológicos, responsáveis pela regulação de eventos celulares (BRANDÃO, 2005). Pode ser definido como um coágulo de fibrina, rico em plaquetas que liberam fatores de crescimento (FCs) em períodos cíclicos (ROSSI, 1999).

O PRP apresenta em sua constituição o plasma, os leucócitos e as plaquetas. No plasma estão contidos diversos fatores de coagulação (GOLDBERG, 1997), os leucócitos que conferem resistência natural aos agentes infecciosos e imunológicos, e as plaquetas, que sofrem degranulação nos sítios de lesão liberando os FGs (MARX et al., 1998; GARG, 1999).

Pelo menos três FCs são derivados dos grânulos plaquetários: fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento e transformação β (TGF- β) e fator de crescimento similar à insulina [IGF] (ROSSI, 1999 e LIEBERMAN et al., 2002), que atuam no receptor da célula alvo, ativando o sistema de sinais intracelulares que alcançam o núcleo e produzem resposta biológica. A ligação do FG ao receptor é específica e é conhecida como interação ligante-receptor, e envolve síntese de DNA, proliferação celular e alterações

bioquímicas que irão culminar na reparação óssea precoce (LIEBERMAN et al., 2002).

O PDGF é uma glicoproteína secretada precocemente pelas plaquetas, no foco da fratura, quando ocorre a agregação plaquetária e o início da cascata de coagulação. *In vitro*, pode ser mitogênico para osteoblastos (LIEBERMAN et al., 2002), para células de origem mesenquimal, fibroblastos, células gliais e musculares (DEUEL & HUANG, 1984). O aumento da sua concentração nos tecidos propicia maior atividade das células osteocompetentes quando comparado apenas ao enxerto e coágulo (ROSSI, 1999).

Através do PRP pode-se amplificar a influência do PDGF, aumentando a taxa de formação óssea e a quantidade de osso formado (ROSSI, 1999). A aplicação local de PRP influencia os estágios iniciais do processo de regeneração óssea e esta influência se extingue em 7 a 10 dias (GARG, 1999).

O TGF- β inclui cinco isoformas, TGF- β 1 a TGF- β 5, BMPs, GDFs e inibinas. Acredita-se que sejam liberados pelas plaquetas após a formação do coágulo, sendo que o TGF- β 1 está associado à proliferação de tecido periosteal no início da consolidação óssea, e que sua ação mais intensa se dá na formação óssea endocondral (LIEBERMAN et al., 2002). Quando atuam sobre os osteoclastos inibem a reabsorção óssea (ANITUA, 1999).

O IGF é mitogênico para as células da linhagem osteoblástica e estimulador da osteogênese (GIANNOBILE, 1999).

De acordo com GARG (1999), a acentuada quantidade de FCs no PRP inicia a atividade das células ósseas indiferenciadas de forma mais intensa do que ocorreria naturalmente no enxerto e na área de coagulação.

CANDINI (2001) analisou a reparação óssea após utilização do PRP isolado e/ou associado à terapia com laser de baixa potência (LBP). Observou a formação de trabeculado ósseo mais precoce nos animais irradiados com LBP e nos tratados com PRP e que a associação dos dois métodos retardou o processo.

O autoenxerto trabecular fresco apresenta como vantagens a histocompatibilidade, fornecimento de células osteogênicas, potencial osteoindutor e capacidade de adaptação à falha óssea (ELLIS & SINN, 1993; FONSECA et al., 1997). Também, promove osteogênese precoce (STEVENSON, 1998), estimula a formação óssea direta, a osteoindução e a vascularização precoce, sendo considerado um carreador ideal (ALLEGRIINI et al., 2004).

ROSSI (1999) propôs um protocolo de obtenção de PRP em sangue de cães adultos, considerando adequado o número mínimo de 1 milhão de plaquetas por mL. Para promoção do gel rico em plaquetas adicionaram, ao PRP obtido, 1mL de cloreto de cálcio a 10 % e 10.000UI de trombina bovina tópica.

CANDINI (2001) descreveu um protocolo para PRP após punção cardíaca em coelhos. Ao PRP foram adicionadas 3 a 6 gotas de gluconato de cálcio para reverter a ação do citrato. O tubo foi levado então ao banho-maria para acelerar a formação do gel plaquetário.

O presente estudo teve por objetivo avaliar a influência do PRP, associado ou não ao enxerto esponjoso autógeno, na reparação de falhas ósseas criadas no crânio de coelhos, por meio de exames mesoscópicos, radiográficos e microscópicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética na pesquisa com animais do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Protocolo: 21/2006.

Foram utilizadas 18 coelhas da raça Nova Zelândia, com peso médio de 3,5kg e 9 meses de idade, alojadas em gaiolas individuais e alimentadas com ração comercial, feno e água.

No pré-operatório, através da punção do plexo venoso retro orbital, foram obtidos 9mL de sangue de cada coelho que, posteriormente, foram armazenados

em dois tubos de ensaio com vácuo de 4,5mL contendo citrato de sódio. O conteúdo dos tubos foi homogeneizado e centrifugado¹ a 1300rpm por 12 minutos. Após a centrifugação, numa capela de fluxo laminar, o plasma foi separado das hemácias, passando a existir entre eles uma camada intermediária denominada zona de névoa, constituída de leucócitos, plaquetas e hemácias maiores. O plasma foi pipetado e colocado em um tubo que, posteriormente, foi centrifugado. Foram pipetados 25µL da zona de névoa por tubo, e reservados em um tubo devidamente identificado. O conteúdo foi utilizado, juntamente com o PRP para obtenção do coágulo, pois hemácias e plaquetas dão maior consistência ao gel e os leucócitos conferem imunidade.

Foi realizada uma nova centrifugação do plasma, a 1300rpm por 8 minutos. Ao retirar os tubos da centrífuga foi observado o botão de plaquetas que permaneceu no fundo de cada tubo e o plasma que ficou separado ocupando o restante do tubo (Figura 1, A). Foi retirado o plasma sobrenadante, permanecendo apenas 125µL formados pelo plasma e pelo botão plaquetário (Figura 1, B). Agitando-se o tubo, ocorreu a ressuspensão do botão e a coloração original do PRP. Foram adicionados 25µL da zona de névoa, obtendo o PRP final (Figura 1, C e D), que foi checado quanto ao número de plaquetas ao microscópio óptico, que deve ser superior a 1.000.000 de plaquetas em 1µL para ser considerado positivo. Posteriormente, foi separado, em um frasco, 75µL de soluplastin® (coagulante), seguindo a proporção 2:1 (150µL de PRP para 75µL de soluplastin®). No momento da cirurgia, o soluplastin® foi adicionado ao PRP para confecção do gel de plaquetas (Figura 1, E e F).

¹ Centrifuga® FANEN. São Paulo, SP, Brasil.

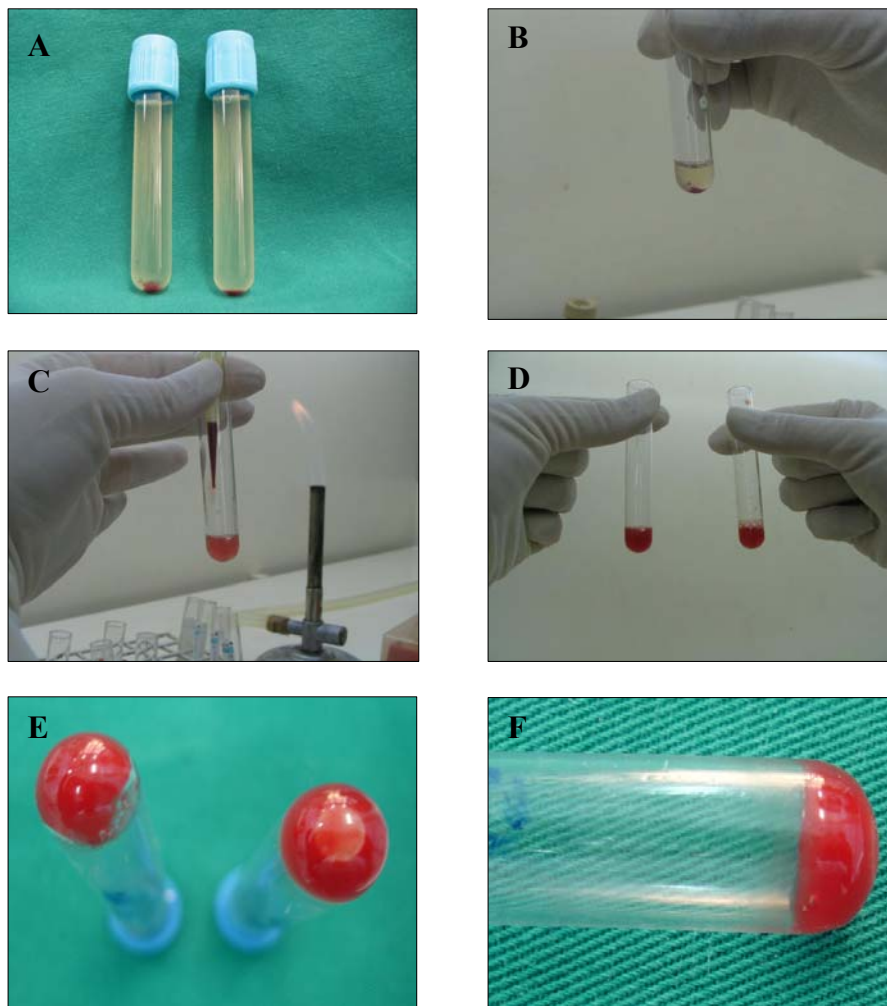


Figura 1. Protocolo Laboratorial para confecção do PRP. **A)** Botão de plaquetas no fundo do tubo e plasma sobrenadante, após a segunda centrifugação. **B)** Plasma sobrenadante foi retirado, após a segunda centrifugação, permanecendo apenas 125 μ L constituídos do botão plaquetário e plasma circundante. **C)** 25 μ L da zona de névoa sendo pipetados. **D)** Tubos contendo PRP, onde serão adicionados soluplastin® para confecção do gel de plaquetas. **E e F)** Gel de plaquetas.

Previamente ao procedimento cirúrgico, todos os animais foram pré-anestesiados com acepromazina² (0,1mg/kg/IV) e, em seguida submetidos à anestesia dissociativa com quetamina (15mg/kg/IM) e xilazina (0,1mg/kg/IM) na mesma seringa. Os animais receberam anestesia epidural com 0,9mL de lidocaína³ 2%, visando maior conforto ao animal durante a obtenção do auto-enxerto esponjoso de crista ilíaca.

A antibioticoterapia foi realizada com enrofloxacina⁴ (5mg/kg/IM), após a indução anestésica e nos seis dias subsequentes ao procedimento cirúrgico. A analgesia foi obtida com morfina⁵ (0,4mg/kg/VO), no período pré-operatório e a cada 8 horas após a cirurgia, durante três dias. Como medicação antiinflamatória foi utilizado cetoprofeno⁶ (1,1mg/kg/SC), no período pré-cirúrgico. Os animais foram então, preparados de maneira convencional.

Após a exposição do osso parietal (PIERMATTEI, 1993), com auxílio de uma trefina cirúrgica de 5,0mm de diâmetro conectada a uma perfuratriz elétrica⁷, foram realizadas quatro falhas ósseas na região fronto-parietal, sendo duas no antímero direito e duas no esquerdo, atingindo ambas as corticais, com exposição das meninges no fundo. Estas falhas, afastadas entre si por 3mm, foram numeradas de I a IV (Figura 2). A falha I foi preenchida com o PRP; a II foi completamente preenchida com enxerto esponjoso autógeno; a III com enxerto esponjoso autógeno associado ao PRP e a falha IV não foi preenchida, servindo como controle.

² Acepram® 1% - Univet. SP, Brasil.

³ Lidocaína® 2% - Anestésico Bravet. SP, Brasil

⁴ Enropet® 25mg/ml - Vetbrands. SP, Brasil

⁵ Dimorf® Solução Oral - Cristália Ltda. SP, Brasil.

⁶ Profenid® IV (100mg/2ml) - Aventis Pharma.SP, Brasil

⁷ Microrretífica Dremel - Bosch, RJ, Brasil

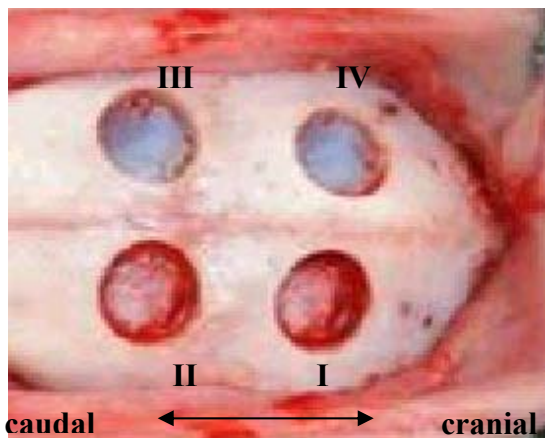


Figura 2. Foto demonstrando o osso parietal do coelho após acesso cirúrgico e demarcação das falhas ósseas I, II, III e IV.

Após a realização das quatro falhas, 6mg de osso esponjoso autógeno foram coletados da crista ilíaca direita, pesados e armazenados sobre uma gaze umedecida em solução fisiológica, até o momento do uso, e posteriormente depositado 3mg na falha II e 3mg na falha III. Ao término dos procedimentos cirúrgicos, as fâscias, músculos e pele foram suturados de maneira convencional.

Após as cirurgias, os animais foram separados aleatoriamente em três grupos experimentais (G1, G2 e G3) constituídos de seis animais, identificados pelas letras A até F, e eutanasiados aos 30, 60 e 90 dias, respectivamente por grupo, com sobredosagem anestésica, utilizando tiopental sódico⁸ por via intravenosa.

Ao exame mesoscópico, *post-mortem*, sem conhecimento dos grupos, foram observadas as características dos tecidos presentes na falha, com auxílio de uma lupa⁹, com aumento de até 50 vezes.

⁸ Thiopentax - Cristália, Itapira, SP, Brasil..

⁹ Stereoscopic Microscope, Stemi SV6 - Zeiss, SP, Brasil.

Os sítios cirúrgicos após a eutanásia e remoção da calota craniana foram radiografados, objetivando a avaliação do grau de preenchimento ósseo das falhas, determinado pela radiopacidade na área da falha, segundo os escores pré-estabelecidos: falhas com preenchimento ósseo entre $0 < x \leq 25\%$, escore 1; preenchimento ósseo entre $26 < x \leq 75\%$, 2 e, preenchimento ósseo $> 75\%$, 3. A técnica radiográfica foi a mesma para todos os animais (45 Kv e 0,05mAs).

Para avaliação microscópica, a região de cada falha foi coletada e fixada por 48 horas em formalina 10% tamponada. Posteriormente, foi descalcificada em ácido fórmico a 8% associado ao ácido clorídrico a 8%, durante 30 dias. A seguir foi desidratada em álcool 70, 80 e 95% por 1 hora em cada, e em álcool a 100% (dois banhos de 1 hora cada). O material foi então, diafanizado em 2 banhos de xilol puro, por 40 minutos cada. Os fragmentos foram imersos em parafina, e colocados em estufa a 56°C por um período de três horas, e incluídos em parafina a temperatura ambiente, permitindo, cortes de 5µm de espessura, em micrótomo, e posterior montagem em lâmina de vidro. Os fragmentos foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e examinados ao microscópio óptico e classificados segundo escores pré-estabelecidos para a intensidade de preenchimento ósseo: $0 < x \leq 25\%$, 1; $26 < x \leq 75\%$, 2 e $> 75\%$, 3; e para maturidade óssea: 0 para imaturo e 1 para maduro.

Após a organização das variáveis envolvidas, os resultados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, a 5% de significância, pelo programa BioEstat 2.0 (AYRES et al., 2000).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protocolo laboratorial proposto para confecção do PRP, mostrou-se de fácil execução e de baixo custo. Possibilitou a concentração de plaquetas, no PRP final, em todos os animais, entre 1.600.000 e 2.000.000/µL (Tabela 1), tratando-se

de número superior a 1.000.000/ μ L descrito como adequado por LEMOS et al. (2002).

Na contagem celular, não foram identificados leucócitos no PRP inicial (Tabela 1), que estavam presentes, em quantidade significativa, na zona de névoa. No PRP final, obtido após a adição da zona de névoa ao PRP, foi observado o aumento da concentração de leucócitos em relação ao sangue total, e isto é desejável.

Após a primeira centrifugação, foi possível separar o plasma sobrenadante em dois tubos para serem re-centrifugados e a zona de névoa em um terceiro. A zona de névoa é composta pelas hemácias e plaquetas maiores que, segundo ROSSI (1999), conferem maior consistência ao gel de plaquetas formado, e por leucócitos que acrescentam imunidade (MARX & GARG, 1999). A manutenção desta etapa do procedimento foi importante, pois estes elementos ao serem juntados, posteriormente, determinaram resistência natural aos processos infecciosos e alérgicos que, segundo MARX et al. (1998), é inerente a eles.

O resultado final do número de plaquetas no PRP foi dependente da contagem inicial no sangue total do animal, conforme também observado em cães por BARBOSA (2006). Quanto maior o número inicial mais rico em plaquetas foi o PRP final (Tabela 1). Portanto, pode-se inferir que, a ocorrência de trombocitopenia ou de número pequeno de plaquetas são fatores limitantes para realização do procedimento.

Tabela 1. Contagem plaquetária e de leucócitos em 1 μ L, nas diversas etapas do protocolo laboratorial, no animal que apresentou menor concentração de plaquetas (A) e no que apresentou a maior concentração (B), dentre os dezoito animais.

	<i>Plaquetas /μL</i>		<i>Leucócitos /μL</i>	
	Animal A	Animal B	Animal A	Animal B
<i>Sangue Total</i>	252.000	354.000	9.000	11.000
<i>PRP Inicial</i>	1.730.000	2.181.023	-	-
<i>Zona de Névoa</i>	358.000	357.000	71.400	109.600
<i>PRP Final</i>	1.615.045	2.057.145	71.400	109.600

No presente estudo, quando foram somados 125 μ L do plasma que envolvia o botão de plaquetas, aos 25 μ L da zona de névoa e aos 75 μ L de soluplastin® obteve-se o gel de plaquetas de tamanho semelhante ao da falha óssea. Além disso, a confecção do gel no fundo do tubo de ensaio de 5mL (Figura 1, E e F) determinou formato coincidente com o da falha, facilitando a deposição do gel no período transoperatório. Ou seja, foi possível definir o volume e o formato do gel previamente ao procedimento cirúrgico de forma coincidente ao tamanho da falha, o que é desejável.

Também, a adição do enxerto ósseo ao PRP, antes da deposição do soluplastin®, permitiu que o enxerto permanecesse misturado ao gel, ficando bem distribuído em toda a falha, não se perdendo durante a aplicação. Desta forma, o autoenxerto ósseo esponjoso se comportou como carreador adequado, conforme definição de ALLEGRINI et al. (2004).

Ao depositar o gel de plaquetas sobre as falhas foi verificada diminuição do sangramento local em relação à quantidade observada quando elas foram preenchidas somente com enxerto. De acordo com LIEBERMAN et al., (2002) este fato pode ser explicado pelo potencial hemostático plaquetário, à semelhança do observado no foco da fratura, quando ocorre a agregação plaquetária e o início da cascata de coagulação.

Para confecção do gel de plaquetas, no momento da cirurgia, ao PRP foi adicionado o soluplastin®, na proporção 2:1 (PRP/coagulante), formando um gel consistente, semelhante ao obtido por ROSSI (1999) e AGHALOO et al. (2002)

que utilizaram a trombina bovina tópica, que atualmente é dificilmente encontrada no comércio brasileiro.

Como o soluplastin® já contém em sua composição o cloreto de cálcio, não foi necessária a inclusão deste elemento ao PRP para reverter à ação do citrato usado durante a coleta do sangue, como fizeram ROSSI (1999) e CANDINI (2001). Este último autor, também, levou o tubo ao banho-maria para acelerar a formação do gel plaquetário o que é desnecessário, uma vez que a temperatura das mãos ao redor do tubo de ensaio foi suficiente para desencadear a reação.

Apesar da exposição das meninges na cirurgia, durante o período pós-operatório não foram observados sinais de infecção ou complicações neurológicas e todos os animais permaneceram alertas, conscientes e deambulando normalmente.

Na avaliação mesoscópica, independentemente do período de observação, o preenchimento ósseo na falha controle e naquelas tratadas com PRP, iniciou-se a partir das bordas para o centro e do fundo para superfície das falhas. Em alguns animais, da mesma forma que observado por MONTEIRO (2005), o tecido de preenchimento apresentou aspecto menos compacto que o tecido vizinho que, provavelmente, está relacionado à imaturidade do tecido ósseo formado e ao preenchimento de espaços vazios por tecido fibroso. Já nas falhas tratadas com enxerto e com enxerto associado ao PRP foi notado crescimento ósseo na porção central das falhas, diferentemente do preenchimento centrípeto dos grupos anteriores. Este achado pode estar relacionado à presença do enxerto depositado no centro da falha, que forneceu células osteogênicas, potencial osteoindutor, promoveu osteogênese precoce e estimulou a formação óssea direta (ELLIS & SINN, 1993; FONSECA et al., 1997; STEVENSON, 1998; ALLEGRINI et al., 2004).

Na análise radiográfica (Figura 3), foi observada maior radiopacidade no interior das falhas dos animais tratados com enxerto e naquelas tratadas com enxerto associado ao PRP, em todos os tempos. Aos 30 dias, foi notado que nas

falhas controle e nas tratadas com PRP a reparação se processou a partir das bordas da falha. No dia 60, em todas as falhas, foi possível visualizar que a radiopacidade foi menor quando comparada ao osso receptor. Já aos 90 dias, todas as falhas dos animais tratados com enxerto e enxerto associado ao PRP manifestaram opacidade semelhante à do osso receptor.

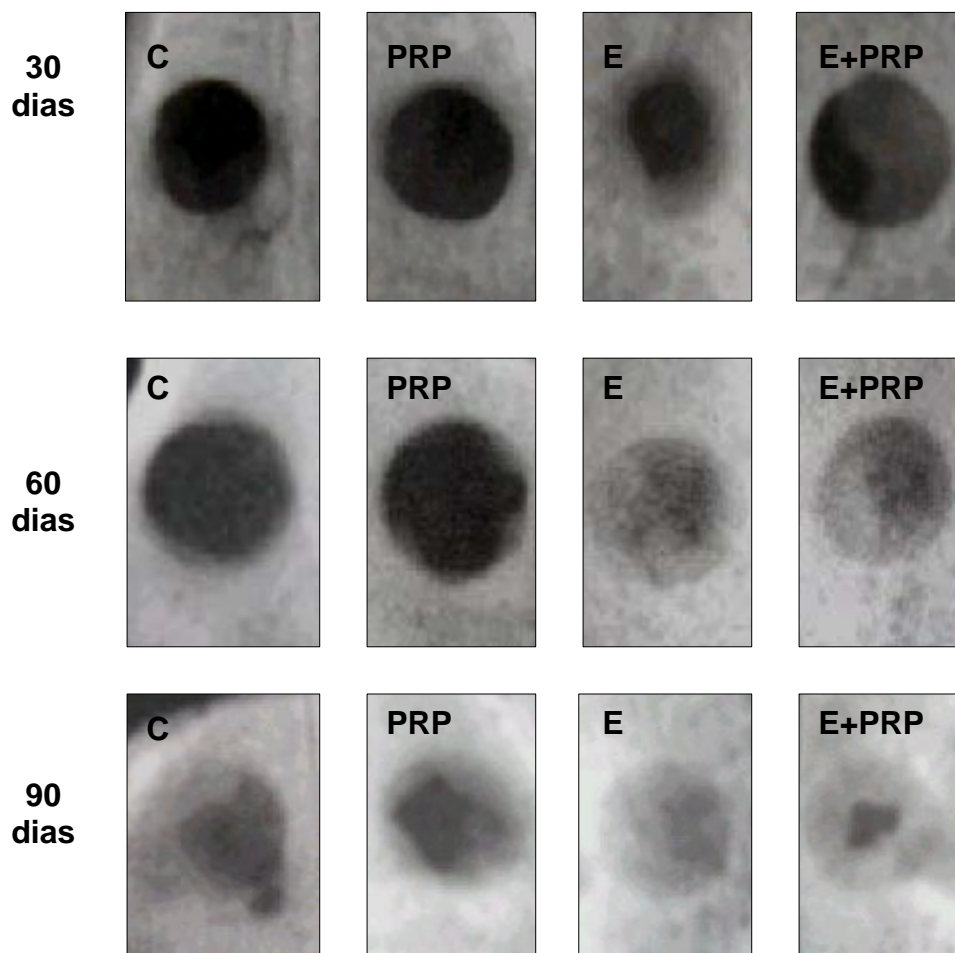


Figura 3. Aspecto radiográfico das falhas ósseas, aos 30, 60 e 90 dias, em animais diferentes. C: controle, PRP: falha tratada com PRP, E: falha tratada com enxerto e E+PRP: falha tratada com enxerto + PRP.

Com relação à análise estatística dos resultados da avaliação do grau de preenchimento ósseo das falhas, por meio de análise da radiopacidade (Tabela 2), aos 30 dias, houve diferença significativa entre a falha tratada com enxerto e a controle e, entre enxerto e a tratada com PRP. Neste período o enxerto se destacou em relação aos outros tratamentos, já que ele apresentou diferença significativa entre controle ($p=0,003$) e PRP ($p=0,003$). Também, SHANAMAN et al., (2001), apesar da identificação de formação óssea em defeitos alveolares em cirurgias odontológicas humanas, observaram que a adição de PRP ao osso autógeno não aumentou a qualidade nem a quantidade de osso formado.

Aos 60 dias, houve diferença entre a falha tratada com enxerto e a controle ($p=0,003$); e enxerto e PRP ($p=0,003$). Também foi observada, neste período, diferença entre a falha tratada com enxerto+PRP e a tratada com PRP ($p=0,01$) e a controle ($p=0,01$).

Aos 90 dias, foi constatada diferença entre o enxerto e a falha controle ($p=0,01$), e entre o enxerto associado ao PRP e as falhas tratadas apenas com PRP ($p=0,007$) e o controle ($p=0,001$).

Comparando todos os momentos, foi observada diferença significativa entre a falha controle e a tratada com enxerto ($p<0,001$), da mesma forma, foi constatada diferença entre a controle e àquela tratada com enxerto associado ao PRP ($p=0,0005$). Os tratamentos com enxerto e enxerto associado a PRP, quando comparados à falha controle, apresentaram maiores postos médios, e consequentemente melhor reparação óssea.

Quando comparados, falha tratada com PRP e aquela tratada com enxerto e enxerto associado ao PRP foram observadas diferenças significativas ($p= 0,0003$ e $p=0,0029$, respectivamente). Não houve diferença significativa entre a falha controle e a tratada com PRP isoladamente, concordando com os achados de AGHALOO et al. (2002), pois os fatores de crescimento, inerentes ao PRP, necessitam de substrato para manifestação de ação, e neste caso, o enxerto ósseo usado como carreador não estava presente.

Os FCs presentes no PRP possuem ação osteoindutora, agindo nas células osteoprogenitoras (LIND, 1996), diferenciando-as e auxiliando a osteogênese, indicando que as células presentes no enxerto têm receptores para estes fatores de crescimento. Entretanto, a ausência de diferença estatística entre a falha controle e a tratada com PRP isoladamente foi sugestiva de que os efeitos destes FCs não se manifestaram nos diversos períodos de observação, nestes tratamentos.

O comportamento semelhante das falhas controle e das tratadas com o PRP, por um lado, pode ser justificado pelos relatos de ROLDÁN et al. (2004) que afirmaram que o PRP isoladamente não forma osso novo por estimulação e diferenciação de células mesenquimais. Mas, a presença de FCs no PRP confere-lhe capacidade osteoindutora, que para se manifestar é dependente da presença de células presentes no enxerto. Por outro lado, deve ser considerada a reação inflamatória, observada à análise microscópica descrita a seguir, desencadeada pela presença do PRP ou de seus constituintes (Soluplastin®), que impediu a ação benéfica dos FCs do plasma rico em plaquetas.

Na falha tratada com enxerto e a tratada com enxerto+PRP observou-se um aumento de densidade óssea, porém sem diferenças significativas entre elas, discordando dos achados de MARX et al. (1998), que observaram o dobro de densidade radiográfica quando associaram o PRP ao enxerto autógeno.

Ainda, FENNIS et al. (2005) em estudos realizados com cabras e AGHALOO et al. (2002), com coelhos, demonstraram radiograficamente que o PRP associado a enxerto ósseo autógeno aumentou o grau de consolidação óssea. Contudo, ambos os autores se restringiram às análises radiográficas e quantificação de células ao microscópio óptico, não realizando um estudo morfológico, como o da presente pesquisa, conseqüentemente não tiveram acesso aos tipos e eventos celulares desencadeados ao longo do tempo.

Tabela 2. Resultados da avaliação do grau de preenchimento ósseo das falhas, por meio de análise da radiopacidade no interior das falhas, segundo escores pré-estabelecidos, por animal e em diferentes períodos de observação.

<i>Período</i>	<i>Animal</i>	<i>Análise Radiológica (da radiopacidade) ⁽¹⁾</i>			
		Controle	PRP	Enxerto	Enxerto + PRP
30 dias	A	1	1	2	2
	B	1	1	2	2
	C	1	1	2	2
	D	1	1	2	1
	E	1	1	2	1
	F	1	1	2	1
	Posto médio ⁽²⁾⁽³⁾	8,00 ^a	8,00 ^a	20,00 ^b	14,00 ^b
60 dias	A	1	1	2	2
	B	1	1	2	2
	C	1	1	2	2
	D	1	1	2	2
	E	1	1	2	2
	F	1	1	2	1
	Posto médio ⁽²⁾⁽³⁾	7,00 ^a	7,00 ^a	19,00 ^b	17,00 ^b
90 dias	A	2	2	3	3
	B	2	2	3	3
	C	2	2	3	3
	D	2	2	3	3
	E	1	2	2	3
	F	1	2	2	3
	Posto médio ⁽²⁾⁽³⁾	6,17 ^a	8,50 ^a	15,33 ^b	19,50 ^b

NOTAS: (1) escore 1 = radiopacidade entre $0 < x \leq 25\%$ da falha; escore 2 = radiopacidade entre $26 < x \leq 75\%$; escore 3 = radiopacidade $> 75\%$. (2) Posto médio é definido como a soma dos postos dividido pelo número de amostras e seus valores, fornecidos pelo programa estatístico. (3) Letras iguais na mesma linha indicam que não existem diferenças significativas entre os postos médios ao nível de significância de 5%.

Na análise microscópica, aos 30 dias (Figura 4, A), o defeito ósseo da falha controle apresentou cerca de 20% da área ocupada por neoformação óssea discreta, presente em alguns pontos da borda da lesão, e associada à moderada quantidade de tecido conjuntivo fibroso vascularizado. O osso neoformado cresceu das bordas

do defeito em direção ao centro e foi do tipo trabecular e imaturo (osteóide), contendo osteócitos de tamanhos variados e revestidos por uma camada de osteoblastos na maioria achatados ou cuboidais.

Aos 60 dias (Figura 5, A), o defeito ósseo apresentou-se menor em comparação aos 30 dias e preenchido por tecido ósseo neoformado e tecido conjuntivo fibroso vascularizado. O tecido ósseo neoformado foi do tipo trabecular, mais maduro em comparação ao período anterior, com pequenos focos de tecido ósseo osteônico. As bordas do defeito, às vezes, estavam indistintas do tecido ósseo neoformado.

Aos 90 dias (Figura 6, A), o defeito apresentou-se preenchido por tecido ósseo e conjuntivo, à semelhança dos 60 dias. Observou-se no conjuntivo fibroso intensa celularidade com fibroblastos e osteoblastos. Houve áreas de condensação do colágeno por sobre as quais foi produzido tecido ósseo imaturo (formação óssea intramembranosa). Mas, até os 90 dias, não houve em nenhum dos animais preenchimento total do defeito, restando cerca de 40-50% de área a ser preenchida. De maneira semelhante, OKAMOTO & RUSSO (1973) observaram na falha controle de seus experimentos que, a reparação óssea se processou a partir das bordas do osso receptor e grande parte dos espaços vazios foi preenchida por tecido conjuntivo fibroso.

Para todos os grupos avaliados, a morfologia e a extensão do preenchimento do defeito ósseo evidenciada na falha tratada com PRP foi semelhante à observada na falha controle, em todos os períodos estudados (Figuras 4, B, 5, B e 6, B). No entanto, de permeio ao tecido ósseo neoformado houve tecido conjuntivo fibroso mais proeminente em comparação à falha controle.

No tecido conjuntivo, observou-se, principalmente aos 30 e 60 dias, um material eosinofílico, espumoso, amorfo, extracelular, associado à processo inflamatório multifocal, discreto a moderado (Figura 7). CANDINI (2001) também relata ter encontrado processo inflamatório sem, contudo, detalhar a

presença de linfócitos, macrófagos e células gigantes multinucleadas como encontrado no presente estudo (Figura 8).

Já aos 90 dias, o processo inflamatório não foi mais evidenciado, provavelmente, pela absorção do gel nesta data, porém não houve diferença em comparação a falha controle no que concerne ao preenchimento ósseo, discordando dos achados de CANDINI (2001) e LEMOS et al. (2002), quando o PRP isoladamente determinou resultados melhores que a falha controle.

O soluplastin® contém, em sua composição, além de cloreto de cálcio e cloreto de sódio, a tromboplastina derivada do cérebro de coelho, que pode ter incitado uma reação semelhante à do tipo corpo estranho. Isto pode ter influenciado negativamente a resposta da associação do PRP ao enxerto, cuja principal diferença esperada, em relação ao enxerto usado de forma isolada, deveria ser a formação óssea precoce, que, infere-se, não foi observada de forma significativa enquanto o soluplastin® esteve presente no local.

Os autores compulsados (OBARRIO & ARAUZ, 2000; AGHALOO et al., 2002; MARX et al., 1998), que utilizaram metodologia semelhante de obtenção do PRP, realizaram seus experimentos em pacientes humanos da rotina clínica-cirúrgica em odontologia ou mesmo em animais, mas restringiram suas conclusões aos resultados radiográficos e de quantificação celular. Consequentemente, não puderam identificar a presença ou não de células gigantes na morfologia.

Também, associe-se, o curto período de vida das plaquetas no gel uma vez que, segundo MARX (1999), elas fragmentam-se em torno de 3 a 5 dias e a atividade de seus fatores de crescimento se extingue por volta de 7 a 10 dias. Como houve uma reação inflamatória, provavelmente, nesta época, os efeitos desejáveis iniciais dos FCs não se manifestaram.

Aos 30 dias, a falha tratada com enxerto esponjoso autógeno (Figura 4, C), apresentou a área do defeito totalmente preenchida por fragmentos do implante, tecido ósseo neoformado e por grande quantidade de tecido conjuntivo fibroso. O implante apresentou-se viável, caracterizado pela presença de osteoblastos e

osteócitos ativos e estava bem individualizado do tecido ósseo neoformado que, foi mais maduro em comparação à falha controle, neste mesmo período. Aos 60 dias, a falha apresentou-se maior e preenchida por menor quantidade de tecido conjuntivo fibroso, com implantes ósseos ausentes ou presentes em menores proporções, em comparação aos 30 dias (Figura 5, C). Aos 90 dias o tamanho da falha era semelhante a do grupo controle, bem como a quantidade de tecido conjuntivo (Figura 6, C). Segundo LEMOS et al. (2002), durante as 4 semanas iniciais a fase celular e bioquímica de regeneração óssea é intensa e, com o tempo, este osso sofre reabsorção e remodelação, ocorrendo uma fase menos celular, mais mineralizada e estruturalmente mais organizada.

Aos 30 dias, na falha tratada com enxerto esponjoso autógeno associado ao PRP, o defeito ósseo apresentou-se mais preenchido em comparação ao controle. Os fragmentos ósseos do enxerto estavam presentes em toda a borda do defeito, associado à moderada quantidade de tecido conjuntivo fibroso muito vascularizado e celularizado. O tecido ósseo neoformado foi do tipo trabecular, mais maduro em comparação ao controle e com focos de tecido osteônico. Houve ainda alguns focos de tecido ósseo imaturo (osteóide). As trabéculas apresentavam osteócitos, ora ativos, ora inativos e estavam revestidas por uma ou mais camadas de osteoblastos aumentados de volume (Figura 4, D).

O tecido conjuntivo fibroso que ocupava algumas áreas do defeito apresentou material amorfo, espumoso, eosinofílico (semelhante ao gel formado pelo soluplastin®) e extracelular, junto a um processo inflamatório, constituído predominantemente por linfócitos e, em menor número, por macrófagos e células gigantes multinucleadas que apresentavam citoplasma espumoso (Figura 9). Havia também áreas de condensação do colágeno por sobre as quais havia síntese de novo osso (formação óssea intramembranosa).

Aos 60 e 90 dias, a hiperplasia e hipertrofia osteoblástica eram menos expressivas, mas a área do defeito estava mais preenchida quando comparada ao período anterior e aos demais grupos estudados. Focos ocasionais de inflamação

linfocitária foram observados esporadicamente em alguns animais aos 90 dias, provavelmente pela resolução da resposta inflamatória e pela absorção do gel formado pela tromboplastina (Figura 5, D e 6, D).

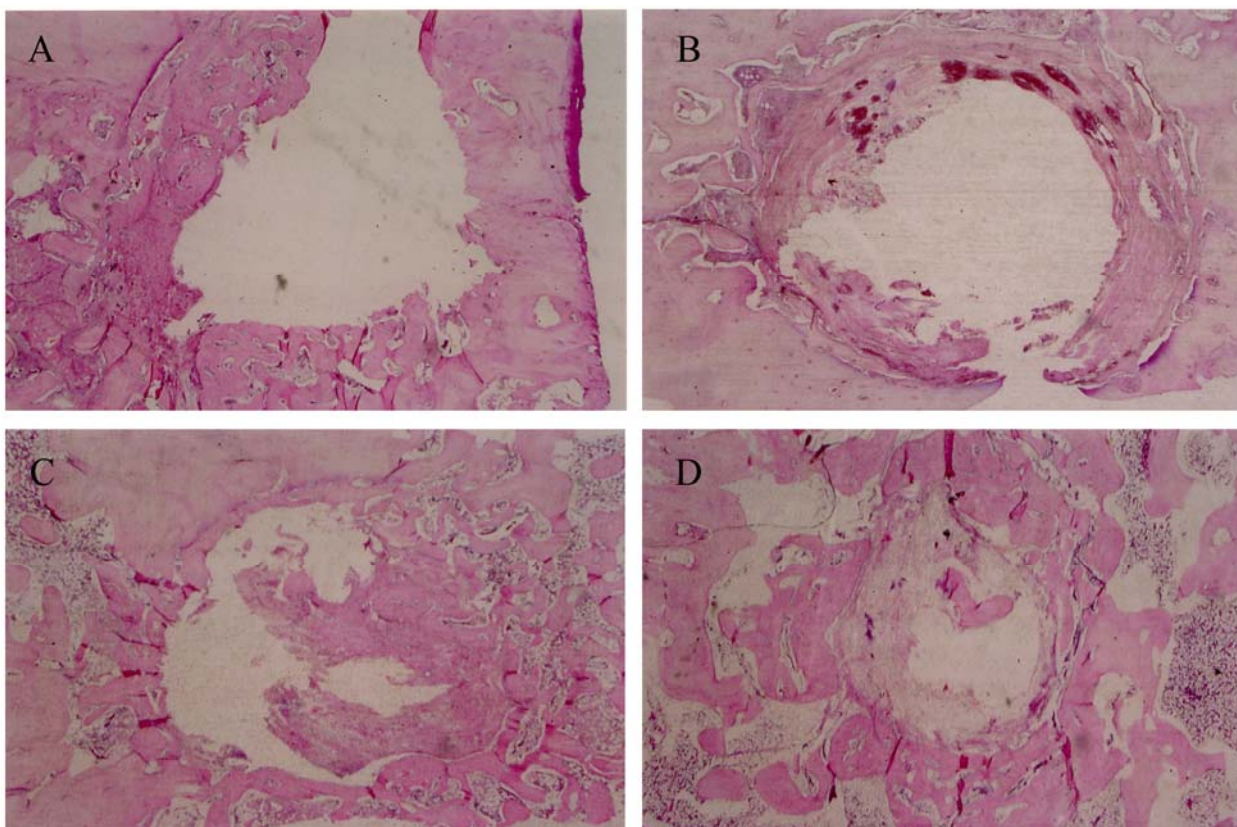


Figura 4. Fotomicroscopia do osso parietal. Aspectos microscópicos apresentados pelos diversos tipos de tratamento aos 30 dias. **A)** Falha Controle. Presença de osteoblastos e osteócitos de tamanhos variados. **B)** Falha PRP. Grande formação de tecido conjuntivo fibroso. **C)** Falha enxerto. Área do defeito preenchida por osso novo e pequena quantidade de tecido conjuntivo fibroso. **D)** Falha E+PRP. Presença de tecido conjuntivo fibroso, material amorfo e acelular, bem como de células gigantes.

Notar que no centro das figuras se encontra as falhas, sendo preenchidas por tecido ósseo e tecido conjuntivo, variando esta proporção de acordo com o tratamento realizado. (HE 4,68x).

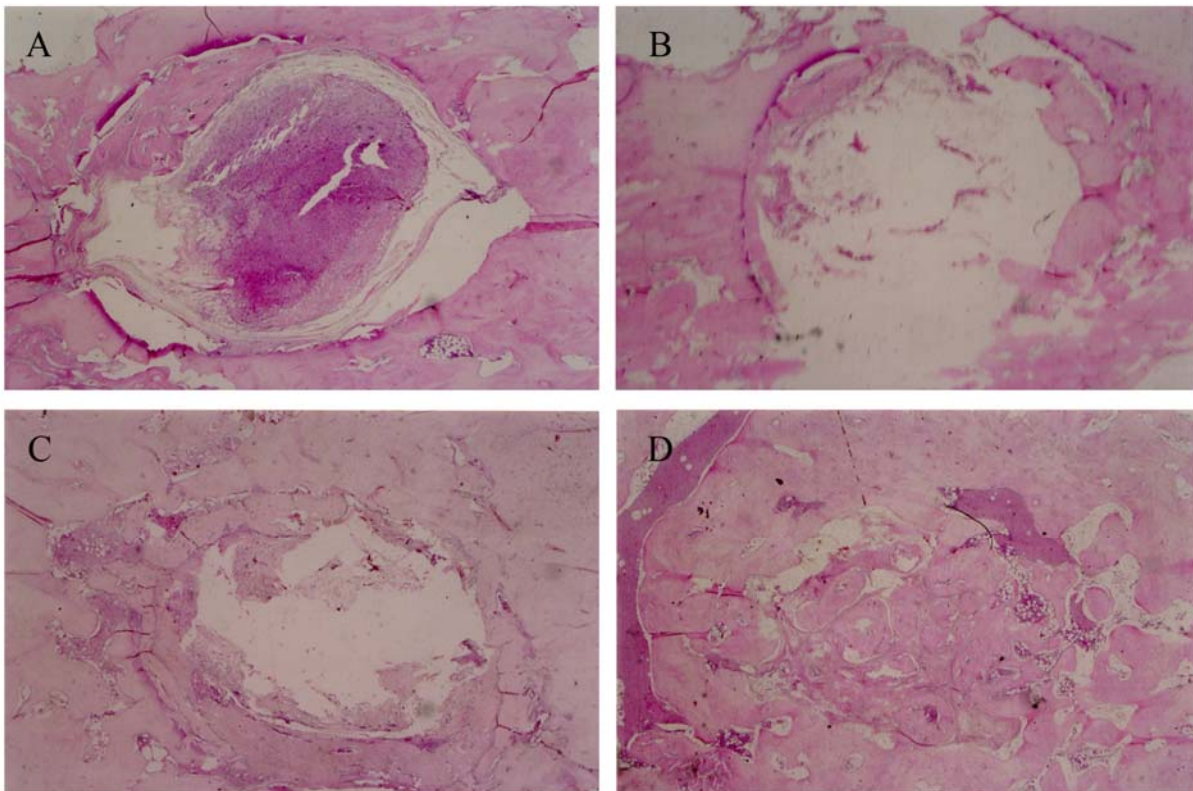


Figura 5. Fotomicroscopia do osso parietal. Aspectos microscópicos apresentados pelos diversos tipos de tratamento aos 60 dias. **A)** Falha Controle. Neste período já se observa integração e remodelação óssea. **B)** Falha PRP. Formação de tecido ósseo sobre molde fibroso. **C)** Falha Enxerto. Formação, incorporação e remodelação do osso novo. **D)** Falha E+PRP. Padrão de hiperplasia osteoblástica menor, com presença de medula óssea e tecido fibroso.

Notar que no centro das figuras se encontra as falhas, sendo preenchidas por tecido ósseo e tecido conjuntivo, variando esta proporção de acordo com o tratamento realizado (HE 4,68x).

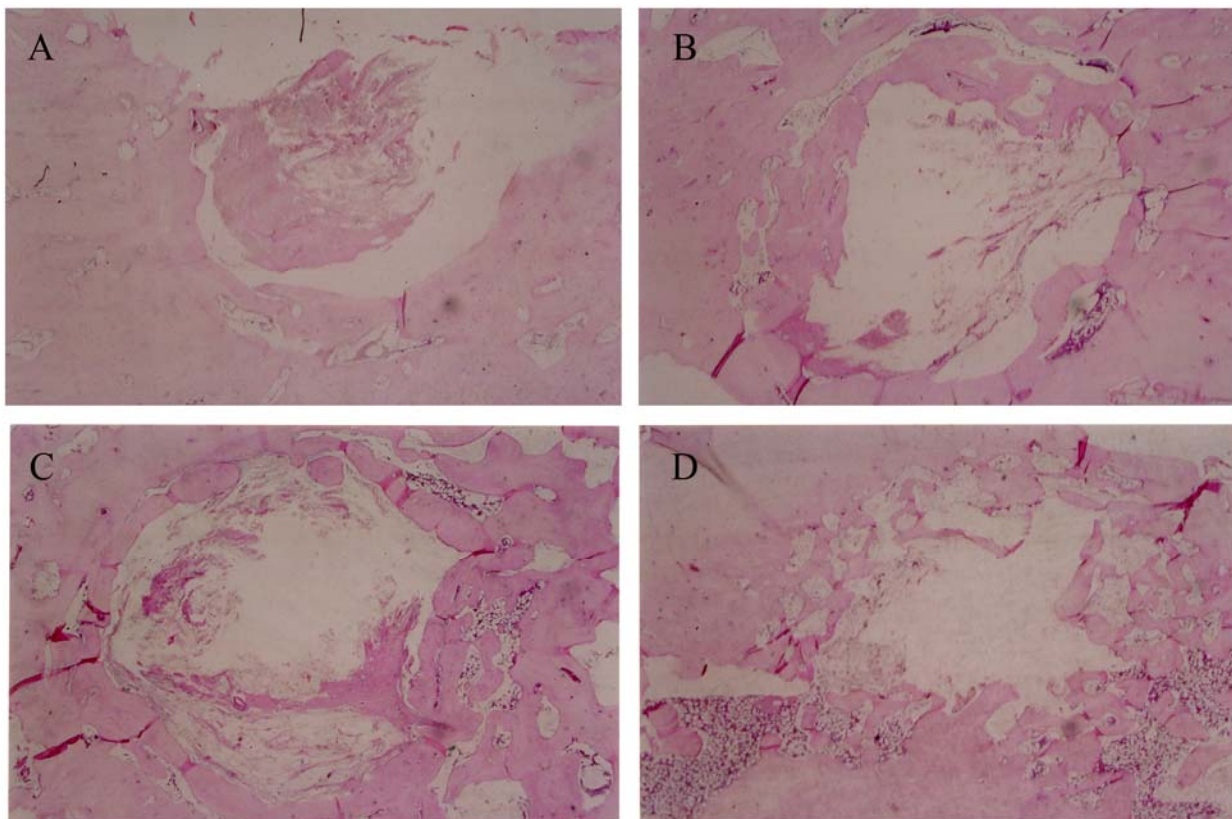


Figura 6. Fotomicroscopia do osso parietal. Aspectos microscópicos apresentados pelos diversos tipos de tratamento aos 90 dias. **A)** Falha Controle. **B)** Falha PRP. **C)** Falha Enxerto. **D)** Falha E+PRP.

Notar que no centro das figuras se encontra as falhas, sendo preenchidas por tecido ósseo e tecido conjuntivo, variando esta proporção de acordo com o tratamento realizado. (HE 4,68x).

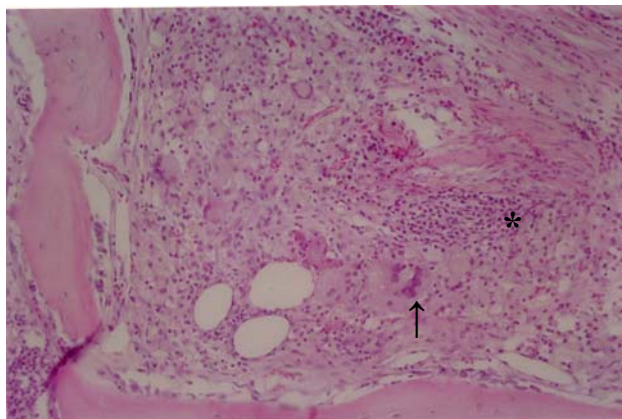


Figura 7. Aspectos microscópicos da reação granulomatosa apresentada aos 30 dias pelo grupo tratado com PRP. Presença de células gigantes (seta) e infiltrado inflamatório(*) predominantemente linfocitário (HE 37,5x).

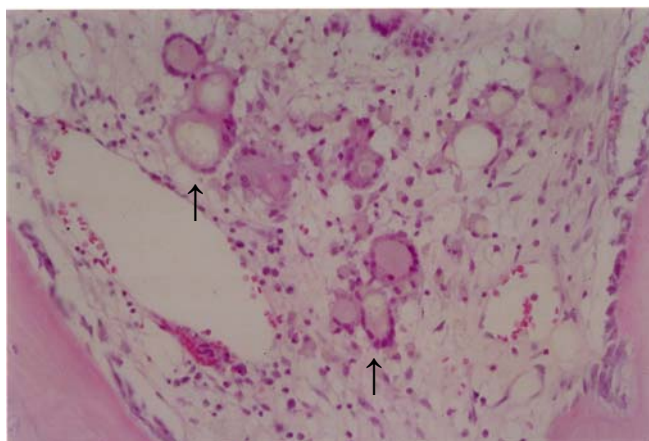


Figura 8. Aspectos microscópicos da reação tipo corpo-estranho e inflamatória apresentada aos 30 dias pelo grupo tratado com PRP. Presença de células gigantes (setas) fagocitando material amorfo acelular (HE 100x).

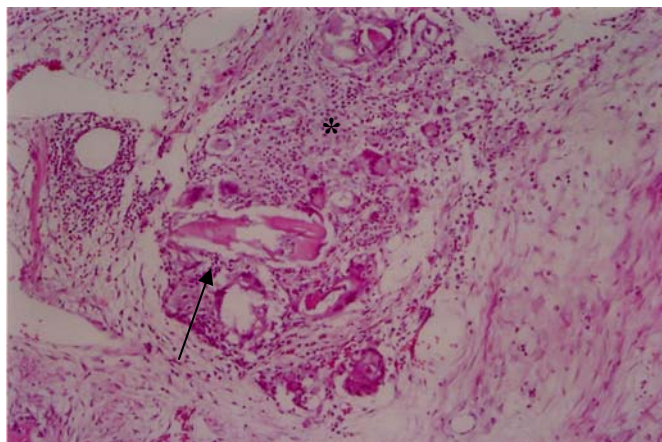


Figura 9. Aspectos microscópicos da reação granulomatosa apresentada aos 30 dias pelo grupo tratado com E+PRP. Notar a presença de fragmentos do enxerto (seta) e de infiltrado inflamatório predominantemente linfocitário (*) (HE 37,5x)

Na análise estatística dos resultados da avaliação do grau de preenchimento ósseo das falhas o PRP associado ao enxerto apresentou melhores resultados, nos diferentes tempos de observação, na análise histopatológica (Tabela 3). E segundo MARX, (2001) isso foi devido às células presentes no enxerto que possuem receptores para os fatores de crescimento, presente no PRP, produzindo assim, um melhor resultado quando comparado aos tratamentos separadamente.

Entretanto, quando são comparados, ao longo do tempo, enxerto e enxerto+PRP (Tabela 3) pode-se deduzir, que, o grupo enxerto regrediu (escore 2) enquanto o preenchimento desencadeado pela associação enxerto+PRP evoluiu (escore 3). Provavelmente, o que ocorreu foi que, aos 60 e 90 dias as falhas tratadas com enxerto já se encontravam em fase de remodelação e deposição mineral, menos celular conforme descrito por LEMOS et al. (2002). Já as falhas tratadas com a associação estavam, aos 30 dias, ainda na fase de deposição óssea (escore 2), portanto atrasadas em relação às tratadas com enxerto isoladamente (escore 3, nesta época), somente alcançando a remodelação nos períodos subsequentes, talvez acima de 90 dias.

Tabela 3. Resultados da avaliação do grau de preenchimento ósseo das falhas, por meio de análise microscópica, segundo escores pré-estabelecidos, por animal e em diferentes períodos de observação.

<i>Período</i>	<i>Animal</i>	<i>Tratamentos e escores (preenchimento ósseo) ⁽¹⁾</i>			
		Controle	PRP	Enxerto	Enxerto + PRP
30 dias	A	1	1	3	2
	B	1	1	3	2
	C	1	1	3	2
	D	1	1	3	2
	E	1	1	3	2
	F	1	1	3	2
	Posto médio ⁽²⁾⁽³⁾	6,50 ^a	6,50 ^a	21,50 ^b	15,50 ^b
60 dias	A	2	2	2	3
	B	2	2	2	3
	C	2	2	2	3
	D	2	2	2	3
	E	2	2	2	3
	F	2	2	2	3
	Posto médio ⁽²⁾⁽³⁾	9,50 ^a	9,50 ^a	9,50 ^a	21,50 ^b
90 dias	A	2	2	2	3
	B	2	2	2	3
	C	2	2	2	3
	D	2	2	2	3
	E	2	2	2	3
	F	2	2	2	3
	Posto médio ⁽²⁾⁽³⁾	9,50 ^a	9,50 ^a	9,50 ^a	21,50 ^b

NOTAS: (1) escore 1 = preenchimento ósseo entre $0 < x \leq 25\%$ da falha; escore 2 = preenchimento ósseo entre $26 < x \leq 75\%$; escore 3 = preenchimento ósseo $> 75\%$. (2) Posto médio é definido como a soma dos postos dividido pelo número de amostras e seus valores, fornecidos pelo programa estatístico. (3) Letras iguais na mesma linha indicam que não existem diferenças significativas entre os postos médios ao nível de significância de 5%.

Na análise microscópica do preenchimento ósseo das falhas (Tabela 3), aos 30 dias, foi notada diferença significativa entre a falha controle e àquelas tratadas com enxerto ($p=0,0002$) e enxerto associado ao PRP ($p=0,02$). Da mesma forma, foi notada diferença entre o PRP e enxerto ($p=0,0002$); e PRP em relação ao enxerto associado ao PRP ($p=0,02$). O maior posto médio apresentado foi do

enxerto, demonstrando um destaque deste em relação aos demais tratamentos, neste período de tempo.

Aos 60 dias houve diferença entre o enxerto associado ao PRP e os demais tratamentos. Sendo que esta associação apresentou o maior posto médio. Quando analisado o crescimento ósseo aos 90 dias, foi notada da mesma forma a diferença entre a associação do PRP ao enxerto e os demais tratamentos.

Analisando todos os momentos, foi observada diferença significativa entre a falha tratada com enxerto quando comparada a falha controle ($p=0,0065$) e àquela tratada apenas com PRP ($p=0,0065$). Também foi notada diferença significativa entre a falha com PRP associado ao enxerto e àquela tratada apenas com PRP ($p<0,001$) e a controle ($p<0,001$). Entre PRP e controle não foram constatadas diferenças significativas. Nem entre o enxerto e o enxerto associado ao PRP.

A análise estatística dos resultados da avaliação da maturidade de preenchimento ósseo das falhas, por meio de análise microscópica (Tabela 4), evidenciou diferença somente aos 30 dias, ocorreu entre o enxerto em relação ao PRP ($p=0,003$) e ao controle ($p=0,003$); e entre a associação dos tratamentos e o grupo tratado com PRP ($p=0,003$) e o controle ($p=0,003$). Já que aos 60 dias o $p=0,20$ e aos 90 dias o $p=0,26$.

Observando todos os períodos com relação à maturidade ocorreu diferença de resultados entre a falha com enxerto comparada a controle ($p=0,0041$) e ao PRP ($p=0,0099$) e entre o defeito tratado com PRP associado ao enxerto e àquela tratado com PRP ($p=0,0099$) e ao controle ($p=0,0041$). Sendo observada maior maturidade nos animais tratados com enxerto apenas ou com este associado ao PRP.

Tabela 4. Resultados da avaliação da maturidade de preenchimento ósseo das falhas, por meio de análise microscópica, segundo escores pré-estabelecidos, por animal e em diferentes períodos de observação.

<i>Período</i>	<i>Animal</i>	<i>Tratamentos e grau de maturidade óssea⁽¹⁾</i>			
		Controle	PRP	Enxerto	Enxerto + PRP
30 dias	A	0	0	1	1
	B	0	0	1	1
	C	0	0	1	1
	D	0	0	1	1
	E	0	0	1	1
	F	0	0	1	1
	Posto médio ⁽²⁾⁽³⁾	6,50 ^a	6,50 ^a	18,50 ^b	18,50 ^b
60 dias	A	1	1	1	1
	B	1	1	1	1
	C	1	1	1	1
	D	1	0	1	1
	E	0	0	1	1
	F	0	1	1	1
	Posto médio* ⁽²⁾⁽³⁾				
90 dias	A	1	1	1	1
	B	0	1	1	1
	C	1	1	1	1
	D	1	1	1	1
	E	1	1	1	1
	F	0	0	1	1
	Posto médio* ⁽²⁾⁽³⁾				

NOTAS: (1) escore 0 = imaturo; escore 1 = maduro (2) Posto médio é definido como a soma dos postos dividido pelo número de amostras e seus valores, fornecidos pelo programa estatístico. (3) Letras iguais na mesma linha indicam que não existem diferenças significativas entre os postos médios ao nível de significância de 5%.

* Aos 60 e 90 dias não há diferença entre os tratamentos

5. CONCLUSÃO

Após a utilização do PRP associado ou não ao enxerto esponjoso autógeno pode-se concluir com base nos exames macroscópicos, radiográficos e microscópicos que: 1) ao final do período de observação o comportamento dos dois tratamentos (PRP e PRP+ EOE), em relação a preenchimento ósseo é semelhante; 2) o enxerto, utilizado de forma isolada, determina precocidade de reparação óssea e que, 3) o soluplastin®, utilizado para formação do gel de plaquetas, pode ter incitado uma reação semelhante a do tipo corpo-estranho, que atua negativamente na fase inicial da reparação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGHALOO, T.I. et al. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: a pilot study. **Journal Oral Maxillofacial Surgery**, v.60, n.10, p.1176-1181, 2002.

ALLEGRI, S.J. et al. Bone regeneration in rabbit sinus lifting associated with bovine BMP. **Journal Biomedical Materials Research**, v.15, n.68B(2), p.127-131, 2004.

ANITUA E. Plasma rich in growth factors: Preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. **International Journal Oral Maxillofacial Implants**, v. 14, n.4, p.529-535, 1999.

AYRES, M.M.; AYRES Jr., D.L.; AYRES, A.A. **Bioestat 2.0**. USP. São Paulo, SP, Brasil, 2000.

BARBOSA, A.L.T. Desenvolvimento de um protocolo de plasma rico em plaquetas testado na reparação de falhas ósseas. 2006. 43f. **Monografia Curso Especialização em Clínica e Cirurgia Veterinárias**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

BRANDÃO, G.H.F. Estudo comparativo entre a eficácia clínica de enxertos ósseos com ou sem a utilização de Plasma rico em Plaquetas. **Internet Health Company do Brasil S/A. Medcenter Peridontia** (www.medcenter.com-2000). Acesso em 12/01/2005.

CANDINI, A.L. **Avaliação do efeito do Plasma Rico em Plaquetas fotoestimulado pelo laser de baixa potência no processo de regeneração óssea**.

2001. 108f. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2001.

DEUEL, T.F. & HUANG J.S. Platelet-derived growth factor. Structure, function and roles in normal and transformed cells. **Journal of Clinical Investigation**, v.74, n.3, p.669-676, 1984.

ELLIS, E. & SINN, D.P. Use of homologous bone in maxillofacial surgery. **Journal Oral Maxillofacial. Surgery**, v.51, n.11, p.1181-1193, 1993.

FENNIS, J.P. et al. Mandibular reconstruction: a clinical and radiografic animal study on the use os autogenous scaffolds and platelet rich plasma. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.11, n.7-8, p.1045-53, 2005.

FONSECA, R.J. & WALKER, R.V. In: **Oral and maxillofacial trauma**. 2ed., Philadelphia: Saunders, p.571-652, 1997.

GARG D.M. Emprego do plasma rico em plaquetas nos enxertos ósseos em implantes dentários e periodontia. In: **Prática da Implantodontia**. São PauloÇ Premier, p.81-87, 1999.

GIANNOBILE, W.V. Periodontal regeneration: Potencial role of bone morphogenetic proteins. **Journal of Dental Research**., v.19, p.235-275, 1996.

GOLDBERG, S. Descomplicando a fisiologia. In: **Tratado de Fisiologia Médica**, 8ed, Porto Alegre: Artes Médicas, p.61-65, 1997.

GREEN, R.J. et al. Immuno localization of platelet-derived growth factor A e B chains and PDGF- α e β receptors in human gengival nounds. **Journal Periodontal Research**., v.32, n.2, p.209-214, 1997.

LEMOS, J.J. et al. Utilização de plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos- proposta de um protocolo de obtenção simplificado. **Internet Health Company do Brasil S/A. Medcenter Periodontia**. Capturado em 12/01/2002. Disponível em: www.odontologia.com.br/artigos.asp?id=225.

LIEBERMAN, J.R. et al. The role of Growth Factors in Repair bone. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v.84(A), n.6, p.1032-1042, 2002.

LIND, M. Growth Factors: Possible New Clinical Tools. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v.67, n.4, p.407-417, 1996.

LYNCH, S.E.; et al. The effects of short-term application of combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. **Journal Periodontal**, v.62, n.7, p. 468-467, 1991.

MARX RE (1999) Platelet-rich Plasma: a source of multiple autologous growth factors for bone grafts. **Tissue Engineering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics**. Illinois: Quintessence. p.71-82, 1999.

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

MARX, R.E. et al. Platelet-rich plasma. Growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surgery, Oral medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v.85, n.6, p.638-646, 1998.

MARX, R.E & GARG A.K. Bone graft physiology with use of platelet-rich plasma and hiperbaric oxygen. **The Sinus Bone Graft**. Colorado: Quintessence. p. 183-189, 1999.

MONTEIRO, B.S. O efeito das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) associadas a osso esponjoso autógeno na reparação de falhas experimentais na calota craniana de coelho (*Oryctolagus cuniculus*). 2005. 39p. **Dissertação de Mestrado**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa,;

OBARRIO, J.J. & ARAUZ-DUTARI, J.L. The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology – case reports. **International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v.5, n.20, p. 486-497, 2000.

OKAMOTO, T. & RUSSO, M.C. Wound healing following tooth extraction. Histochemical study in rats. **Revista da Faculdade de Odontologia de Araçatuba**, v.2, n.2, p.153-156, 1973.

PIERMATTEI, D.L. In: **An atlas of surgical approaches to the bones and joints of the dog and cat**. 3ed., Philadelphia: Saunders. p.40-41, 1993.

ROLDÁN, J.C. et al. Bone formation in the presence os platelet-rich plasma vs. bone morphogenetic protein-7. **Bone**, v.34, n.1, p.80-90, 2004.

ROSSI, J.R. Modificação do Protocolo Simplificado para obtenção do PRP. **Internet Health Company do Brasil S/A. Medcenter Peridontia**. Acesso em: 15/02/1999.

SHANAMAN, R. et al. Localized ridge augmentation using GBR and platelet-rich plasma: Case report. **International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v.21, n.4, p. 345, 2001.

STEVENSON, S. Enxertos Ósseos. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 2ed. São Paulo: Manole. p.2006 -2017. 1998.