

SILMARA BONOMI DA SILVA

**Efeitos do plasma rico em plaquetas combinado a hidroxiapatita
em fraturas induzidas experimentalmente em rádio de cães:
avaliação radiográfica simples e por meio da densitometria óptica
radiográfica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Cassio Ricardo Auada Ferrigno

São Paulo
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SILVA, Silmara Bonomi da

Título: Efeitos do plasma rico em plaquetas combinado a hidroxiapatita em fraturas induzidas experimentalmente em rádio de cães: avaliação radiográfica simples e por meio da densitometria óptica radiográfica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **João Francisco** e **Cecília** e ao meu irmão **Silmo**, por todo o amor, confiança e companheirismo.*

AGRADECIMENTOS

A Deus que abençoa e guia meu caminho.

Ao Prof. Cassio Ricardo Auada Ferrigno pela amizade, ensinamentos e incentivo desde a graduação. Obrigada pela confiança e oportunidade de ser sua orientada.

A todos os docentes do Departamento de Cirurgia da FMVZ-USP pelos ensinamentos, apoio e demonstrações de amizade.

Ao Prof. Dr. Franklin de Almeida Sterman pelos ensinamentos radiológicos e por permitir a realização das análises radiográficas e densitométricas.

A Profa. Dra. Júlia Maria Matera e Prof. Dr. Angelo João Stopiglia por permitirem a utilização dos centro cirúrgicos.

A Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni que permitiu a utilização de sala para a realização de parte do projeto.

Ao Professor Marcus Amaku pela realização das análises estatísticas.

Aos meus pais e irmão que estiveram presentes em todos os momentos, me apoiando, estimulando e compartilhando minhas conquistas que são tão importantes para minha carreira profissional e realização pessoal.

Ao Karpov Landgraf que faz parte da minha vida há pouco tempo e teve imensa paciência para dividir comigo nos momentos finais e tensos da tese. Obrigada pelo carinho, companhia e dedicação.

A Karina Yazbek, minha amiga, obrigada pela companhia, amizade, orientação e por sua dedicação ao projeto.

Ao Daniel Castelo Branco Baccarin pela amizade, disposição e grande colaboração nos procedimentos cirúrgico.

Ao Lucas De Angelis pela amizade, disposição para anestésiar os cães e por toda a ajuda com os animais do projeto.

A Caterina Muramoto por me ensinar a técnica de densitometria óptica, pela colaboração na realização das leituras radiográficas e agradeço principalmente sua atenção e amizade.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Ortopedia e Traumatologia Comparada, Alexandre Schmaedecke, Leandro Romano, Leonardo Pereira Lima, Robson Fortes Giglio e Thais Machado, pelo convívio, amizade, companheirismo, apoio e grande colaboração no projeto.

A pós-graduanda Simone Gonçalves por toda a atenção e ensinamentos referentes as plaquetas.

Ao funcionário José Miron Oliveira da Silva, por sua grande colaboração, amizade e cuidados com os cães.

Ao secretário Belarmino Ney Pereira pela amizade, esclarecimento de dúvidas e colaboração no decorrer da pós-graduação.

Aos funcionários Cledson Lelis dos Santos, Jesus dos Anjos Vieira, Otávio Rodrigues dos Santos e Maurício Pavão de Oliveira por todo auxílio na realização do projeto e no atendimento dos pacientes do HOVET-USP, pela paciência, atenção e amizade.

Aos médicos veterinários contratados Andressa Gianotti Campos, João Luiz Krumenerl, Patricia Ferreira de Castro, Sandra Aparecida Rosner, Tatiana Soares da Silva, Viviane Sanchez Galeazzi, funcionários, pós-graduandos e estagiários do Departamento de Cirurgia, por toda a atenção, amizade, ensinamentos e colaboração.

A Silvana Maria Unruh, médica veterinária contratada do Serviço de Radiologia, pelos ensinamentos e colaboração na realização das radiografias.

Aos funcionários do Serviço de Radiologia Benjamin Ribeiro de Sousa, Hugo Idalgo, Kátia Margareth Massonetto e Reginaldo Barboza da Silva, pela amizade, disposição e realização dos exames radiográficos.

A Maria Luisa Franchini, Maria Helena da Silva Pelissari do laboratório Clínico do HOVET-USP, pela realização dos exames, e a Edna Santana dos Santos pelo auxílio com as pipetas e ponteiras utilizadas na contagem das plaquetas.

A todos os amigos e colegas pós-graduandos, pelo convívio e demonstrações de amizade.

As bibliotecárias Elza Maria Rosa B. Fanquim, Solange Alves Santana pela atenção, correções da tese, e a Elena Aparecida Tanganini e Maria Inês Charelli de Camargo pelo auxílio na obtenção de referências bibliográficas.

A Merial pela doação de vacinas e preventivos de ectoparasitas.

A Labyes pela doação de medicações.

Agradeço especialmente aos proprietários que adotaram os cães do projeto, animais que colaboraram de forma excelente e que são extremamente merecedores de amor e um novo lar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

A todos os amigos e familiares que estiveram presentes na minha vida e colaboraram de diversas maneiras na execução deste trabalho, muito obrigada.

RESUMO

SILVA, S. B. da **Efeitos do plasma rico em plaquetas combinado a hidroxiapatita em fraturas induzidas experimentalmente em rádio de cães:** avaliação radiográfica simples e por meio da densitometria óptica radiográfica. [Effects of platelet-rich plasma in combination with hydroxyapatite in canine radius defects: radiographic and radiographic optical densitometry evaluations]. 2006. 79 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

O plasma rico em plaquetas é fonte autógena de fatores de crescimento obtido pela concentração plaquetária a partir da centrifugação do sangue total. Por conter grande quantidade de fatores de crescimento, a associação do plasma rico em plaquetas com enxertos autógenos, alógenos, xenógenos ou substitutos ósseos, no homem, melhora a incorporação dos enxertos ao leito receptor, facilita a osteointegração, aumenta a velocidade de formação do osso novo e com melhor qualidade. Entretanto, os resultados do plasma rico em plaquetas no modelo animal são controversos. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do plasma rico em plaquetas autógeno combinado a hidroxiapatita não absorvível na formação do calo ósseo em fraturas induzidas em terço médio de rádio de cães, fixadas com placas e parafusos. Foram utilizados 8 cães adultos sem raça definida, machos ou fêmeas e pesos compreendidos entre 5 e 15 kg. Induziu-se na diáfise de ambos os rádios defeito ósseo correspondente a 25% do diâmetro do mesmo. No rádio direito (grupo HA/PRP) implantou-se plasma rico em plaquetas combinado a hidroxiapatita. No rádio esquerdo (grupo HA) implantou-se somente a hidroxiapatita. Para a obtenção do plasma rico em plaquetas, empregou-se protocolo simplificado, utilizando centrífuga laboratorial comum. Comparou-se a evolução clínica dos animais, o tempo de formação e a densidade do calo ósseo por exames radiográficos simples e pela técnica de densitometria óptica aos 15, 30, 45 e 60 dias de pós-operatório. No exame radiográfico e densitométrico observou-se aumento da densidade nos defeitos ósseos no período pós-operatório devido à radiopacidade dos grânulos de hidroxiapatita. Em ambos os tratamentos, na avaliação radiográfica simples, observou-se evolução progressiva do calo ósseo, entretanto, a densitometria óptica demonstrou aumento da densidade mineral óssea progressiva somente no grupo HA. Tanto na avaliação radiográfica como na densitométrica não se obteve diferenças significantes entre os grupos ($p>0,05$). No presente estudo, o PRP combinado a hidroxiapatita não absorvível não acelerou o processo de formação do calo ósseo.

Palavras-chave: Plasma rico em plaquetas. Hidroxiapatita. Cães. Calo ósseo. Densitometria óptica.

ABSTRACT

SILVA, S. B. da **Effects of platelet-rich plasma in combination with hydroxyapatite in canine radius defects: radiographic and radiographic optical densitometry evaluations.** [Efeitos do plasma rico em plaquetas combinado a hidroxiapatita em fraturas induzidas experimentalmente em rádio de cães: avaliação radiográfica simples e por meio da densitometria óptica radiográfica]. 2006. 79 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Platelet-rich plasma (PRP) is an autologous source of growth factors derived from centrifugation of whole blood. Human studies demonstrated that the growth factors contained and released from PRP, in combination with autografts, allografts, xenografts or bone substitutes, enhance the rate of bone formation and its quality, facilitating graft placement and osseointegration. However, the results of PRP in animal model are controversial. The aim of the present study was to study the effects of PRP in combination with unabsorbable hydroxyapatite on new bone formation in an experimental canine diaphyseal radius defects stabilized with bone plate. Eight mature, male and female mongrel dogs were selected weighed 5 to 15 Kg. Bone defects were created, bilateral, with oscillating saw in both radii diaphysis, corresponding to 25% of bone diameter. In the right radius (group HA/PRP), the defect was filled with PRP and hydroxyapatite. In the left radius (group HA), was placed hydroxyapatite alone. Autologous PRP was obtain by a simplified technique using a laboratory centrifuge. Clinical evaluations, bone formation and bone density by use of radiographic and optical densitometry, were compared between group HA/PRP and group HA after 15, 30, 45 and 60 days post surgery. Radiographic and densitometric evaluations demonstrated density increase at defect sites immediately after surgery due to hydroxyapatite radiopacity. The radiographic images show a progressive enhance of callus formation in both treatment, however the optical densitometry demonstrated a progressive density increase only at group HA. The radiographic and densitometric study did not indicate a significant difference ($p>0,05$) in the bone formation between group HA/PRP and group HA. The present study demonstrated that the technique which was used to obtain autologous PRP in combination with unabsorbable hydroxyapatite could not accelerate the bone regeneration in comparisons with hydroxyapatite alone.

Key words: Platelet-rich plasma. Hydroxyapatite. Dogs. Bone callus. Optic densitometry.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Centrifuga laboratorial comum Fanen Excelsa Baby® utilizada para obtenção do plasma rico em plaquetas 36
- Figura 2- Tubos após a primeira centrifugação do sangue total. Visualiza-se o plasma na porção superior e as hemácias na porção inferior 36
- Figura 3 - Tubos estéreis após a segunda centrifugação. Visualiza-se o plasma e o botão plaquetário no fundo dos tubos..... 37
- Figura 4 - Tromboplastina cálcica utilizada para a coagulação do plasma rico em plaquetas 37
- Figura 5 - Adição da tromboplastina cálcica ao plasma rico em plaquetas e hidroxapatita para a coagulação 38
- Figura 6 - Obtenção do gel plaquetário após a coagulação com tromboplastina cálcica..... 38
- Figura 7 - Visualização do programa ImageLab demonstrando antebraço em projeção médio-lateral e penetrômetro com 25 graus demarcados..... 43
- Figura 8 - Visualização do programa ImageLab demonstrando a seleção da área para o cálculo da densidade óptica (DO)..... 43
- Figura 9 - Visualização do programa ImageLab demonstrando o cálculo da área selecionada..... 44
- Figura 10 - Imagens radiográficas do rádio direito do animal 8 (grupo HA/PRP). No momento 30D observa-se áreas de lise na porção óssea distal ao foco de fratura e linha radiotransparente evidente (A). No momento 45D visibiliza-se extensa área de lise na porção distal ao foco de fratura e linha radiotransparente evidente, porém mais delgada (B). Áreas de lise no momento 60D semelhantes ao momento anterior (C)..... 53
- Figura 11 - Imagens radiográficas do rádio esquerdo do animal 4 (grupo HA). Momento POI visibiliza-se linha de fratura evidente - graduação 2 (A). No momento 30D a linha de fratura apresenta-se pouco evidente - graduação 1 (B). No momento 60D não visibiliza-se a linha de fratura – graduação 0 (C) 54
- Figura 12 - Imagens radiográficas do rádio direito do animal 5 (grupo HA/PRP). Pós-operatório imediato demonstrando grânulo de hidroxapatita em quase todo defeito ósseo e linha de fratura evidente - graduação 2 (A). Aos 45 dias de pós-operatório visibiliza-se linha de fratura pouco evidente – graduação 1 (B) e aos 60 dias de pós-operatório observa-se linha de fratura ausente – graduação 0 (C)..... 54

- Figura 13 - Imagens radiográficas do rádio direito do animal 2 (grupo HA/PRP) nos momentos 45D (**A**) e 60D (**B**). Visibiliza-se os grânulos de hidroxiapatita implantados concentrados na região cranial do foco de fratura e linha de fratura muito evidente em ambas as radiografias 55
- Figura 14 – Imagens radiográficas do rádio direito do animal 3 (grupo HA/PRP) no momento POI demonstrando o preenchimento do defeito ósseo pelos grânulos de hidroxiapatita (**A**). No momento 30D não é possível visibilizar a linha de fratura e observa-se reação periosteal caudal ao foco sugestiva de calo ósseo organizado (**B**)..... 55
- Figura 15 – Imagens radiográficas do rádio esquerdo do animal 2 (grupo HA) no momento POI (**A**) e 15D demonstrando reabsorção parcial da hidroxiapatita (**B**)..... 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Quantidade de plaquetas em milímetros cúbicos (mm ³) presentes no sangue total e PRP no momento pré-operatório imediato e o incremento plaquetário (%) no PRP. São Paulo, 2006.....	46
Tabela 2 -	Avaliação radiográfica simples da linha de fratura dos animais do grupo HA/PRP e grupo HA nos diferentes momentos pós-operatórios (POI, 15D, 30D, 45D e 60D). São Paulo, 2006	49
Tabela 3 -	Valores médios da avaliação radiográfica simples da linha de fratura no grupo HA/PRP nos diferentes momentos (POI, 15D, 30D, 45D e 60D). São Paulo, 2006	50
Tabela 4 -	Valores médios da avaliação radiográfica simples da linha de fratura no grupo HA nos diferentes momentos (POI, 15D, 30D, 45D e 60D). São Paulo, 2006	50
Tabela 5 -	Avaliação radiográfica simples da reabsorção parcial dos grânulos de hidroxiapatita nos animais do grupo HA/PRP e grupo HA nos diferentes momentos pós-operatórios (POI, 15D, 30D, 45D, 60D). São Paulo, 2006. 51	
Tabela 6 -	Valores da Densidade Mineral Óssea (DMO) em milímetros de alumínio (mmAl) dos animais do grupo HA/PRP e grupo HA nos diferentes momentos de observação (PRE, POI, 15D, 30D, 45D e 60D). São Paulo, 2006	57
Tabela 7 -	Valores da Densidade Mineral Óssea (DMO) média em milímetros de alumínio (mmAl) e desvio padrão (DP) do grupo HA/PRP nos diferentes momentos pós-operatórios (PRE, POI, 15D, 30D, 45D e 60D). São Paulo, 2006	59
Tabela 8 -	Valores da Densidade Mineral Óssea (DMO) média em milímetros de alumínio (mmAl) e desvio padrão (DP) do grupo HA nos diferentes momentos pós-operatórios (PRE, POI, 15D, 30D, 45D e 60D). São Paulo, 2006	59

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Representação individual do número de plaquetas (mm^3) presentes no sangue total no momento pré-operatório imediato e no plasma rico em plaquetas (PRP) 47
- Gráfico 2 - Representação individual das Densidades Minerais Ósseas (DMO) em mmAl do grupo HA/PRP e grupo HA nos diferentes momentos de observação 58
- Gráfico 3 - Representação da Densidade Mineral Óssea (DMO) média em mmAl do grupo HA/PRP e grupo HA nos diferentes momentos de observação 60

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

® -	marca registrada
% -	porcentagem
ABNT -	Associação Brasileira de Normas Técnicas
D -	dias
DMO -	densidade mineral óssea
DNA -	ácido desoxiribonuclêico
DO -	densidade óptica
DP -	desvio padrão
DXA -	absorciometria de raios x de dupla energia
FCDP -	fator de crescimento derivado das plaquetas
FCE -	fator de crescimento epidérmico
FCI-I -	fator de crescimento semelhante à insulina tipo I
FCVE -	fator de crescimento vascular endotelial
FTC- β -	fator transformador de crescimento - β
HA -	grupo hidroxiapatita
HA/PRP -	grupo hidroxiapatita e plasma rico em plaquetas
IM -	intramuscular
IV -	intravenoso
JPEG -	Joint Photographic Experts Group
POI -	pós-operatório imediato
POMs -	proteínas ósseas morfogenéticas
PPP -	plasma pobre em plaquetas
PRE -	pré-operatório
PRP -	plasma rico em plaquetas
VO -	via oral
cm -	centímetros
g -	gravidade
h -	hora
Kg -	kilogramas
mg -	miligramas
ml -	mililitros
mm -	milímetros
mm ³ -	milímetros cúbicos
mmAl -	milímetros de alumínio
rpm -	rotações por minuto
UI -	unidades internacionais
μ l -	microlitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	REPARAÇÃO ÓSSEA	19
2.2	PRINCIPAIS FATORES DE CRESCIMENTO PRESENTES NAS PLAQUETAS	20
2.3	PLASMA RICO EM PLAQUETAS	21
2.4	HIDROXIAPATITA	27
2.5	OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS	28
2.6	DENSITOMETRIA ÓPTICA RADIOGRÁFICA	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1	ANIMAIS	32
3.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	32
3.3	CONDUTA PRÉ-OPERATÓRIA	33
3.4	CONDUTA OPERATÓRIA	33
3.5	PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS... 34	
3.5.1	Contagem de Plaquetas.....	39
3.6	PÓS-OPERATÓRIO	39
3.7	PROCEDIMENTOS DE AVALIAÇÃO	40
3.7.1	Avaliação Clínica.....	40
3.7.2	Avaliação Radiológica.....	40
3.7.2.1	Técnica Radiográfica.....	41
3.7.3	Avaliação por Meio de Densitometria Óptica por Imagem Radiográfica	41
3.7.3.1	Técnica Densitométrica	42
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
4	RESULTADOS.....	46
4.1	CONTAGEM DE PLAQUETAS.....	46
4.2	RESULTADOS CLÍNICOS.....	47
4.3	RESULTADOS RADIOLÓGICOS SIMPLES	48
4.3.1	Avaliação da Linha de Fratura	48
4.3.2	Avaliação da Reabsorção da Hidroxiapatita	51
4.4	RESULTADOS DA DENSITOMETRIA ÓPTICA RADIOGRÁFICA	57
5	DISCUSSÃO	61

6	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

As fraturas em ossos longos são comuns na clínica de pequenos animais e, na maioria dos casos, consolidam adequadamente após correta estabilização. Entretanto, algumas fraturas, mesmo após tratamento adequado, resultam em união retardada ou não união. A fim de se evitar estas complicações ortopédicas, vem aumentando o interesse dos cirurgiões em utilizar agentes osteoindutores naturais ou sintéticos que apresentam capacidade quimiotática, mitótica e de diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas em células osteogênicas, produzindo matriz óssea (MARTINEZ; WALKER, 1999).

Os agentes osteoindutores como enxertos, hormônios e fatores de crescimento têm sido utilizados com sucesso no homem e nos animais, no intuito de promover a formação óssea em fraturas, artrodeses e principalmente em defeitos ósseos e fraturas cominutivas para o tratamento e prevenção de uniões retardadas e não uniões (KAWAGUCHI et al., 2001; KERWIN; LEWIS; ELKINS, 1991; PASCALEV; AMINKOV; MECHKARSKI, 1997; WILKENS et al., 1996).

A regeneração óssea depende de fatores biomecânicos e biológicos. A atuação dos fatores de crescimento locais e sistêmicos nas diferentes fases da regeneração (inflamação, reparo e remodelação) são essenciais para o recrutamento de células imediatamente após a injúria, assim como potencializar a produção de tecido ósseo (REMEDIOS, 1999).

Por estarem no sangue, as plaquetas são as primeiras células presentes na lesão e liberam fatores de crescimento responsáveis pela migração e ativação das células que iniciarão o processo de reparo de tecidos moles e ósseos (CARLSON, 2000).

O plasma rico em plaquetas é fonte natural de fatores de crescimento obtido a partir da centrifugação do sangue total. Sendo autógeno, impede a transmissão de doenças infecto-contagiosas e reações imunológicas (OBARRIO et al., 2000).

A combinação do plasma rico em plaquetas (PRP) e enxertos autógenos, alógenos, xenógenos e substitutos ósseos demonstrou ser eficaz no tratamento de defeitos ósseos periodontais, maxilares e mandibulares, estimulando a regeneração óssea, aumentando a velocidade de formação óssea e sua qualidade (MARX et al., 1998; OBARRIO et al., 2000; WILTFANG et al., 2003; MAZOR et al., 2004). Porém, a literatura referente ao uso do plasma rico em plaquetas em ossos longos tanto no homem como nos animais é escassa (DALLARI et al., 2006; GANDHI et al., 2006; SARKARA et al., 2006).

Tendo em vista esta realidade, avaliou-se os efeitos do PRP associado ou não a hidroxiapatita não absorvível em fraturas transversas induzidas experimentalmente em terço médio de rádio de cães e fixadas com placas e parafusos ósseos. No grupo controle utilizou-se a mesma técnica sem adição do PRP. Avaliou-se comparativamente a evolução clínica diária dos animais, o tempo de formação e a densidade mineral do calo ósseo por exames radiográficos simples e por densitometria óptica aos 15, 30, 45 e 60 dias de pós-operatório.

Investigou-se os efeitos do PRP autógeno para fins cirúrgicos como adjuvante nas osteossínteses das fraturas com placas e parafusos ósseos, visando a aceleração do processo de formação do calo ósseo em cães.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 REPARAÇÃO ÓSSEA

Após a injúria óssea, há migração plaquetária, degranulação e liberação de fatores de crescimento derivados das plaquetas (FCDP) e fatores de transformação de crescimento beta (FTC- β) que iniciam o processo de regeneração óssea. Por estarem presentes no sangue, as plaquetas são as primeiras células a migrarem para a lesão liberando seus fatores de crescimento e iniciando o processo de hemostasia e regeneração tecidual (CARLSON, 2000). Os FCDP estimulam a mitogênese de células tronco medulares que irão produzir FTC- β , transferem osteoblastos do endósteo para a fratura, iniciam a angiogênese estimulando a mitose de células endoteliais e atraem macrófagos para o foco de fratura. O FTC- β ativa a mitose de fibroblastos e pré-osteoblastos e promove sua diferenciação em osteoblastos funcionais. Estimulam também os fibroblastos a produzirem matriz colágena e os osteoblastos a produzirem a matriz óssea que suportará os vasos neoformados (MARX et al.,1998; TISCHLER, 2002).

Os macrófagos também são atraídos ao foco de fratura pelo baixo gradiente de oxigênio e liberam fatores de crescimento derivados dos macrófagos e fatores angiogênicos que são semelhantes ao FCDP. Estes fatores associados ao FTC- β liberado pelas células tronco medulares irão atuar na regeneração e não mais os fatores liberados pelas plaquetas. O período no qual as plaquetas atuam diretamente com seus fatores de crescimento não é superior a 5 dias (MARX, 2001).

Em quatro semanas, há a presença de osteóide, osso jovem revascularizado e, os macrófagos migram da região (KNIGHTON; SILVER; HUNT, 1981). A maturação do osso jovem envolve a presença de proteínas ósseas morfogenéticas (POMs) que não estão presentes no plasma rico em plaquetas (MARX et al.,1998).

2.2 PRINCIPAIS FATORES DE CRESCIMENTO PRESENTES NAS PLAQUETAS

A concentração de plaquetas autógenas em pequeno volume plasmático promove a concentração de pelo menos sete fatores de crescimento: fator de crescimento derivado das plaquetas (FCDP- $\beta\beta$; FCDP- $\alpha\alpha$; FCDP- $\alpha\beta$), fator de transformação de crescimento beta-1 (FTC- β 1), fator de transformação de crescimento beta-2 (FTC- β 2), fator de crescimento semelhante a insulina tipo I (FCI-I) e fator de crescimento epidérmico (FCE) (MARX, 2004). Há também a presença do fator de crescimento vascular endotelial (FCVE) (MARX, 2001).

O PRP aumenta principalmente a concentração de FCDP e FTC- β , demonstrado através de estudos de anticorpos monoclonais, que também indicaram a presença de receptores para estes fatores nas células osteoprogenitoras e células tronco da medula óssea (MARX et al., 1998).

FCDP é uma glicoproteína sintetizada pelas plaquetas e armazenado em alfa grânulos. É sintetizado e armazenado por outras células como macrófagos, células endoteliais, fibroblastos e células musculares (MILLIS, 1999; ROSS; RAINES; BOWEN-POPE, 1986). É o primeiro fator de crescimento presente na lesão, iniciando o processo de regeneração tecidual e óssea (MARX et al., 1998). Aumenta a migração de monócitos, neutrófilos, e fibroblastos para a lesão. Quanto mais células migram para a lesão, maior a quantidade de FCDP liberado, estabelecendo assim um “*feed-back*” positivo (MILLIS, 1999). Sugere-se que o aumento na concentração de FCDP está diretamente relacionado ao aumento no infiltrado celular na lesão. O FCDP também ativa algumas células como neutrófilos e fibroblastos que liberam enzimas lisossomais e colagenase que facilitam a migração de novas células à lesão e a remodelação (MILLIS, 1999).

O FCDP estimula a angiogênese, a formação de tecido de granulação, síntese de DNA, ativa a expressão de FTC- β pelos macrófagos e é um potente mitogênico para fibroblastos e osteoblastos, além de aumentar a síntese de prostaglandinas e reabsorção óssea (CARLSON, 2000; MILLIS, 1999).

Os fatores de transformação de crescimento (FTC) beta 1 e beta 2 pertencem a superfamília de fatores de crescimento e de diferenciação, assim como as proteínas ósseas morfogenéticas (POMs) (CELESTE et al., 1990). Estão geralmente envolvidos no reparo tecidual e ósseo (MIYAZONO, 1994; ROBERTS; SPRON, 1993). São liberados pelas plaquetas por degranulação e apresentam efeito prolongado. Atuam sobre fibroblastos, células tronco da medula, células mesenquimais indiferenciadas, principalmente pré-osteoblastos,

influenciando nos mecanismos de reparo tardio e de remodelação do osso produzido (BECK et al., 1993; MARX et al., 1998). Apresentam funções importantes como quimiotaxia e mitogênese das células precursoras dos osteoblastos e estimulação da deposição da matriz de colágeno pelos osteoblastos no reparo ósseo, além de inibir a formação de osteoclastos e reabsorção óssea, favorecendo a formação do tecido ósseo (CARLSON, 2000).

O FTC β - 2 regula a diferenciação, proliferação e expressão de populações celulares como os precursores de condrócitos, osteoblastos e osteoclastos (LANE; BOSTRON, 1999).

Os fatores de crescimento semelhantes a insulina I e II são estimuladores da formação óssea e sua presença nas plaquetas parece atuar nos precursores de osteoblastos e osteoblastos endoteliais que irão produzir o tecido ósseo primário (CARLSON, 2000).

2.3 PLASMA RICO EM PLAQUETAS

O plasma rico em plaquetas (PRP) consiste na concentração de plaquetas no plasma e de seus fatores de crescimento (CARLSON, 2000; SCHLIEPHAKE, 2002). Segundo Marx (2001), para ser eficaz, o PRP deve apresentar pelo menos 1.000.000 plaquetas/microlitro. Whitman, Berry e Gree (1997) e Obarrio et al. (2000) consideram como ideal 500.000 a 1.000.000 de plaquetas/microlitro no plasma rico em plaquetas, entretanto há relatos de números inferiores a estes com efeitos benéficos (OKUDA et al., 2003; WEIBRICH; KLEIS; HAFNER, 2002).

Segundo Marx et al. (1998), o PRP apresenta concentração plaquetária 338 % maior que a presente no sangue e este aumento plaquetário na lesão, ativa a cascata responsiva ao FCDP e FTC- β .

A alta concentração plaquetária está relacionada com o aumento na concentração dos fatores de crescimento no plasma, entretanto as proporções dos diferentes fatores de crescimento no PRP não se apresentam proporcionais e seu significado biológico ainda é incerto (LANDSBERG; ROY; GLICKMAN, 2000; OKUDA et al., 2003; WEIBRICH; KLEIS; HAFNER, 2002; WEIBRICH et al., 2003).

Segundo alguns autores, a alta concentração de leucócitos no PRP aumenta a resistência tecidual local e reduz os riscos de processos infecciosos, o que comprometeria a formação do calo ósseo (OBARRIO et al., 2000).

O PRP apresenta combinação dos fatores de crescimento em coágulo natural, autógeno, composto também por fibrina, fibronectina e vitronectina que são moléculas de adesão necessárias na migração celular existente na osteocondução, epitelização e integração óssea (MARX, 2001, 2004). Atua estimulando a mitogênese, angiogênese e a formação óssea quando associado ao enxerto autógeno isolado ou combinado aos substitutos ósseos não celulares e POMs (MARX, 2001).

Em 1997, Whitman, Berry e Gree ilustraram o primeiro método de preparo do gel plaquetário como substituto da cola de fibrina, um biomaterial utilizado como agente hemostático e adesivo cirúrgico. A natureza adesiva do gel plaquetário foi utilizada em diversos procedimentos cirúrgicos e permitiu melhor adaptação do flap mucogengival, hemostasia e suporte para a cicatrização tecidual, além do aumento da consolidação de enxertos ósseos autógenos.

A utilização do PRP é indicada na cirurgia bucomaxilofacial, principalmente para melhorar a incorporação de enxertos autógenos. O gel de plaquetas funciona como adesivo, permitindo que enxertos particulados possam ser adaptados e mantidos no leito receptor (KASSOLIS; ROSEN; REYNOLDS, 2000; SHANAMAN; FILSTEIN; DANESH-MEYER, 2001; WHITMAN; BERRY; GREE, 1997), facilitando as reconstruções ósseas, reparos de fissuras e fistulas buconasais e sinusais (SIMON et al., 2006; WHITMAN; BERRY; GREE, 1997).

Na década de 90, iniciou-se o estudo da concentração de plaquetas no plasma autólogo, os fatores de crescimento presentes nas plaquetas e sua relação com o aumento na integração de enxertos (MARX et al., 1998).

Marx et al. (1998) avaliaram as regenerações ósseas no homem em osteotomias de mandíbulas com 5 cm ou mais, devido à presença de tumores benignos e malignos, utilizando enxerto ósseo esponjoso autólogo, associado ou não ao PRP. Os resultados radiográficos demonstraram que o PRP promoveu a formação de tecido ósseo 2,16 vezes mais maduro após 2 meses, 1,88 vezes mais maduro em 4 meses e 1,62 vezes mais maduro em 6 meses, além de uma quantidade maior de osso, comparado com o grupo controle.

Fennis, Stoelinga e Jansen (2002) realizaram osteotomia do ângulo da mandíbula de cabras, fixação do fragmento com placa e parafusos e enxertia de osso autólogo coletado da crista ilíaca, associado ou não ao PRP, no foco de fratura. Nos animais em que o PRP foi utilizado, observou-se radiograficamente aumento considerável do osso regenerado. A avaliação histológica e histomorfométrica demonstrou calo ósseo mais abundante em 3 e 6

semanas e preenchimento ósseo maior após 6 e 12 semanas (FENNIS; STOELINGA; JANSEN, 2004).

O preenchimento do alvéolo dentário com PRP e osso autólogo após a extração dentária no homem demonstrou maior quantidade de osso maduro com melhor organização trabecular e maior regeneração óssea comparada com o grupo controle, que apresentou tecido conjuntivo preenchendo a maior parte do defeito (ANITUA, 1999; SAMMARTINO et al., 2005). Tamae (2005) verificou através da análise sob microscopia de fluorescência que a aplicação do PRP em alvéolos dentários de coelhos proporcionou real aceleração da neoformação óssea.

Em pacientes humanos que apresentavam fenda labial e palatina unilateral, a adição do PRP ao enxerto esponjoso autólogo da crista ilíaca demonstrou na avaliação tomográfica computadorizada, aceleração da osteogênese e diminuição da reabsorção do enxerto (OYAMA et al., 2004).

Mendonça-Caridade, Juiz-Lopez e Rubio-Rodriguez (2006) relataram formação óssea precoce em reconstrução craniofacial e obliteração do seio frontal em um paciente tratado com osso autólogo da crista ilíaca ou osso cortical alógeno proveniente de banco de ossos humano associados ao PRP.

Defeitos ósseos em mandíbulas fixados com placas e preenchidos com osso autólogo da crista ilíaca e PRP após a ressecção de tumores odontogênicos benignos em 5 pacientes humanos apresentaram boa consolidação óssea sem complicações pós-operatórias e durante 24 meses de acompanhamento. Segundo os autores, as partículas de osso autólogo no gel plaquetário foram facilmente mantidas no leito receptor (SIMON et al., 2006).

Robiony et al. (2002) avaliaram em humanos a presença do PRP associado ao enxerto ósseo autólogo da crista ilíaca na osteogênese por distração em mandíbulas atroficas, cujos resultados radiográficos demonstraram formação óssea com mineralização precoce.

Wiltfang et al. (2003) citam que a combinação do PRP aos transplantes ósseos aumenta a atividade das células alvo – osteoblastos - presentes, resultando na aceleração da formação óssea e integração do enxerto.

A adição do PRP em cultura de osteoblastos humanos promoveu a proliferação celular, sugerindo sua aplicação clínica (FERREIRA et al., 2005; KANNO et al., 2005). Segundo Arpornmaeklong et al. (2004), a adição do PRP em cultura de células da medula óssea promovem a proliferação celular mas não a sua diferenciação em pré-osteoblastos.

Os enxertos ósseos autólogos possuem alto potencial osteogênico, resposta precoce e aceleram o processo de reparo ósseo, porém sua quantidade é limitada, necessita de um

campo cirúrgico para a colheita, gera dor, edema e sangramento no local da doação e são facilmente reabsorvidos após a enxertia (KIM et al., 2002a; FLO; PIERMATTEI, 1999). Devido a estes fatos, os substitutos ósseos, enxertos alógenos e xenógenos são muito utilizados quando se deseja aumentar o volume ósseo do paciente (KIM et al., 2002a).

Os substitutos ósseos apresentam características osteocondutoras, podem ser produzidos naturalmente ou sinteticamente, são incorporados no osso do receptor em quantidade ilimitada e, associados ao PRP, promovem a regeneração óssea (HOKUGO et al., 2005; KIM et al., 2002a).

Obarrio et al. (2000) foram os primeiros a relatar o uso do PRP associado ao enxerto ósseo liofilizado alógeno na cirurgia periodontal. As observações clínicas demonstraram que a presença do PRP em defeitos periodontais no homem aumenta a taxa de osso neoformado e produz osso de excelente qualidade, conferindo a esta biotecnologia ótimo potencial. Os autores sugeriram o uso do PRP não somente em cirurgias periodontais, como também em cirurgias orais, maxilofaciais, implantologia, ortopedia e neurocirurgia.

Nos pacientes humanos, o PRP combinado ao enxerto ósseo liofilizado alógeno em lesões periodontais, reconstruções mandibulares, alveolares e para o levantamento de seios maxilares, atua como suporte para a formação óssea, melhora a qualidade de tecido ósseo neoformado e diminui o tempo de cicatrização (KASSOLIS; REYNOLDS, 2005; KASSOLIS; ROSEN; REYNOLDS, 2000; LEKOVIC et al. 2002).

Mazor et al. (2004) realizaram o levantamento do seio maxilar em 105 pacientes, utilizando 30 a 40% de osso autólogo, 60 a 70% de xenoenxerto (osso inorgânico bovino) e PRP. A radiografia panorâmica e tomografia computadorizada demonstraram consolidação precoce e estes resultados permitiram redução do período de exposição do implante dentário em 66%.

Kim et al. (2002b) estudaram a eficácia do PRP associado ao osso desmineralizado e liofilizado na osteointegração de implantes dentários em defeitos ósseos de cães e observou maior formação óssea e maturação precoce quando comparado ao grupo controle .

A adição do PRP ao fosfato- β -tricálcico em seios maxilares acelerou a formação do osso neoformado e reduziu a degradação do material enxertado (WILTFANG et al., 2003). Velich et al. (2004) realizaram defeitos ósseos bilaterais em mandíbulas de cães e preencheram com fosfato- β -tricálcico e fosfato- β -tricálcio associado ao PRP. Após 6 semanas os resultados histomorfométricos e histológicos não demonstraram diferenças entre os dois grupos, porém após 12 semanas a formação óssea apresentou-se significativamente maior no grupo PRP e fosfato- β -tricálcico. Kovács et al. (2005) observaram que a presença do fosfato-

β -tricálcico em defeitos ósseos mandibulares de cães aumentou a densidade na avaliação tomográfica no momento pós-operatório e o grupo tratado com fosfato- β -tricálcico e PRP apresentou densidade maior após 6 semanas porém com maior relação tecido ósseo / tecido mole significante em 12 semanas.

Yazawa et al. (2004) observaram através de exames histopatológicos, a presença de osso jovem neoformado em defeito de 8 mm no osso craniano de coelhos preenchido com fosfato- β -tricálcico e PRP após 1 mês. No grupo controle, somente com fosfato- β -tricálcico, o osso jovem foi observado após 2 meses.

Hauschild et al. (2005) relataram o uso clínico do fosfato- β -tricálcico associado ao PRP em artrodese da articulação tarsica no cão obtendo-se fusão óssea e completa biodegradação do enxerto.

Wiltfang et al. (2004) comparam o uso do PRP combinado ao osso autólogo, fosfato- β -tricálcico, ao osso inorgânico bovino ou à esponja colágena bovina em defeitos críticos no osso craniano de mini-porcos. Os defeitos preenchidos com osso autólogo e PRP apresentaram ossificação maior na fase inicial comparado com os defeitos preenchidos com osso autólogo somente. Após 12 semanas os resultados foram semelhantes. Já a adição do PRP aos substitutos ósseos não apresentou efeitos significantes e os autores não recomendam o PRP nestas combinações.

A avaliação dos efeitos do PRP associado ao enxerto autólogo da crista ilíaca na regeneração óssea de pequenos defeitos em coelhos e em seios maxilares de ovelhas e coelhos demonstrou resultados radiográficos, tomográficos e histomorfométricos não significativos estatisticamente (AGHALOO; MOY; FREYMILLER, 2002; BUTTERFIELD et al., 2005; JASKE et al., 2003).

Segundo Jaske et al. (2003), o modelo de regeneração óssea animal deve ser diferente do modelo humano, justificando a baixa capacidade regenerativa do plasma rico em plaquetas em seus estudos em ovelhas.

Os resultados da análise histomorfométrica do estudo realizado por Choi et al. (2003) em cães demonstraram que a combinação PRP e enxerto ósseo autólogo causou retardo da consolidação óssea em defeitos ósseos mandibulares, quando comparado ao grupo sem o PRP.

Aghaloo, Moy e Freymiller (2004) comparam o efeito do osso autólogo isolado, PRP e osso inorgânico bovino e osso inorgânico bovino isolado em defeitos de 8 mm realizados em osso craniano de coelhos. Não foram observadas diferenças entre as densidades do grupo xenoenxerto e xenoenxerto/PRP, porém o estudo histomorfométrico demonstrou

aumento da área óssea significativa após 1, 2 e 4 meses de pós-operatório no grupo tratado com PRP/xenoenxerto comparado com o xenoenxerto isolado. Entretanto o osso autólogo demonstrou efeito superior aos demais grupos.

Roldán et al. (2004) observaram que a combinação do PRP ao enxerto autólogo ou ao osso inorgânico bovino no aumento da espessura mandibular de ratos não apresentou diferenças quando comparados com os grupos sem a adição do PRP.

A associação do PRP ao enxerto ósseo liofilizado mineralizado e ao enxerto ósseo liofilizado desmineralizado em defeitos ósseos de 8 mm no crânio de coelhos, apresentou na avaliação radiográfica, tendência ao aumento da densidade óssea e, na avaliação histomorfométrica tendência ao aumento da área óssea, porém ambos sem diferenças estatísticas (AGHALOO; MOY; FREYMILLER, 2005).

Grageda et al. (2005) realizaram o aumento do seio maxilar em ovelhas adicionando enxerto ósseo xenógeno liofilizado desmineralizado combinado ou não ao PRP. Os resultados das avaliações histomorfométricas após 3 e 6 meses não demonstraram diferenças estatísticas entre os grupos. A presença do PRP associado ao enxerto ósseo xenógeno liofilizado desmineralizado em defeitos peri-implantes dentários em cães não apresentou no primeiro, segundo e terceiro mês de pós-operatório diferença entre as densidades minerais ósseas avaliadas por meio da absorciometria de raios-x de dupla energia (DXA), quando comparadas ao grupo sem o PRP (SÁNCHEZ et al., 2005).

A aplicação do PRP isolado ou combinado a proteína óssea morfogenética-2 (POM-2) e defeitos ósseos em coelhos não apresentou diferenças significantes quando comparado ao grupo sem tratamento (JUNG et al., 2005).

Sarkara et al. (2006) avaliaram o efeito do PRP em defeitos ósseos críticos em tíbia de ovelhas, fixados com haste bloqueada e placa óssea. Os resultados radiográficos, tomográficos e histológicos não demonstraram diferenças nas áreas mineralizadas, densidade mineral e volume ósseo entre o grupo com e sem o PRP. A quantidade e distribuição do osso neoformado, cartilagem e tecido conjuntivo no foco de fratura variou individualmente, porém a distribuição média foi semelhante nos dois grupos.

Gerard et al. (2006) compararam a consolidação de defeitos bilaterais realizados na margem inferior de mandíbulas de cães preenchidos com osso autólogo com e sem adição do PRP. No grupo com PRP, observou-se na análise histomorfométrica, aumento na quantidade de osso jovem e aumento na degradação do enxerto após o primeiro e segundo mês de pós-operatório. A avaliação radiográfica, após o primeiro e segundo mês, demonstrou maior radiopacidade no grupo sem o PRP e, no terceiro e sexto mês, ambos os grupos apresentaram

radiopacidade semelhante. Os autores concluíram que o PRP apresenta efeito estimulador somente no início da consolidação, provavelmente, devido ao aumento do número de osteoblastos ativados que formarão o osteóide, e a reabsorção do enxerto deve-se ao aumento do número de osteoclastos ativados; concluíram também que o produto final dos enxertos suplementados ou não com o PRP apresenta o mesmo volume ósseo e densidade mineral.

2.4 HIDROXIAPATITA

A hidroxiapatita é material cerâmico utilizado com muita frequência em cirurgias maxilofaciais (KIM et al., 2002a) isolado ou associado ao PRP (EWERS, 2005; FÜRST et al., 2003). Sua característica estrutural é semelhante à fase mineral do tecido ósseo, além de sua porosidade que influencia na sua osteocondutividade (BLOKHUIS et al., 2000).

Estudos experimentais da hidroxiapatita em cães demonstraram sua propriedade osteocondutora isolada ou associada a agentes osteoindutores, sem apresentar efeitos adversos (CEHRELI et al., 2003; DE KOK et al., 2005; RAHBEK et al., 2005).

Hu et al. (2003) implantaram composto de hidroxiapatita e colágeno associados ou não à proteínas ósseas morfogenéticas (POMs) com o intuito de mimetizar a matriz óssea em defeitos de 2 cm em rádio de cães. Os defeitos preenchidos com o composto e POMs consolidaram em 6 meses, enquanto o grupo controle desenvolveu união fibrótica. Os resultados confirmam o efeito osteoindutor das POMs e osteocondutor da hidroxiapatita.

A implantação de cilindros cerâmicos porosos de hidroxiapatita e fosfato- β -tricálcico com 1,5 cm de comprimento e 1,2 cm de diâmetro combinado ao perióstio autólogo em defeitos ósseos em fêmores de 21 cães apresentou osso neoformado e fusão gradual ao tecido ósseo dos receptores após 2 meses. Observou-se após 4 a 6 meses osteointegração do implante com a presença de sistemas Haversianos, confirmando a efetividade do substituto ósseo (CONG et al., 2001). Manjubala, Sastry e Kumar (2005) implantaram 55% de hidroxiapatita e 45 % de fosfato- β -tricálcico em defeitos parciais em fêmores de cães e os resultados radiográficos e histológicos provaram a boa biocompatibilidade do implante.

2.5 OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS

O plasma rico em plaquetas (PRP) pode ser obtido através de diferentes protocolos e todos os procedimentos devem ser realizados com técnica asséptica e simultaneamente ao preparo do leito receptor (MARX et al., 1998; MARX, 2004). A quantidade de sangue necessária é variável e depende do método de obtenção utilizada (TISCHLER, 2002).

Na literatura há relatos de protocolos que utilizam centrifugação única (ANITUA, 1999; FONTANA et al., 2004) ou dupla, realizadas em centrifugas laboratoriais comuns (KIM et al., 2002a; KIM et al., 2002b), através de plasmaferese (SHANAMAN et al., 2001), centrifugação seriada (DUGRILLON et al., 2002; FENNIS et al., 2002) ou utilizando separadores celulares específicos para a obtenção do PRP (WEIBRICH et al., 2003).

Através da punção venosa periférica ou central, obtém-se sangue em frascos estéreis contendo citrato de sódio (ROSSI JR.; LEMOS; PISPICO, 1999). A coleta de sangue deve ser realizada antes do início do procedimento cirúrgico para que a fluidoterapia não dilua o sangue, diminuindo o número de plaquetas (MARX, 2001).

Na primeira centrifugação, o sangue é separado em diferentes camadas de acordo com a densidade celular. As hemácias ocupam a porção inferior e o plasma a porção superior. O plasma diferencia-se em duas camadas: o plasma pobre em plaquetas (PPP) na porção superior e o plasma rico em plaquetas na porção central do tubo (MARX et al., 1998) contendo plaquetas e leucócitos (OBARRIO et al., 2000). Na segunda centrifugação, utiliza-se o PRP e o PPP, as células brancas e uma pequena quantidade de células vermelhas (MARX, 2001; SCHILIEPHAKE, 2002).

A coagulação do PRP deve ser realizada no momento da aplicação adicionando cloreto de cálcio a 10% e trombina bovina (MARX, 2001; TISCHLER, 2002; WHITMAN; BERRY; GREE, 1997). A trombina, na presença do cálcio, promove a clivagem do fibrinogênio plasmático em fibrina, promovendo a polimerização dessa enzima (WHITMAN et al., 1997). A coagulação ativa as plaquetas que degranulam e secretam os fatores de crescimento imediatamente. Em 10 minutos elas secretam 70 % e, na primeira hora, já terão secretado 100 % de seus fatores de crescimento (MARX, 2001).

Muitos protocolos obtêm o PRP através de plasmaferese ou centrifugação seriada, necessitando maior quantidade de sangue (450 a 500 ml), sendo centrifugado em sistema de

autotransusão e separação de células¹. Após a produção do PRP, o PPP e as hemácias são reinfundidas no paciente (CARLSON, 2000; DUGRILON et al, 2002; FÜRST et al, 2003; MARX et al., 1998; OBARRIO et al., 2000; SHANAMAN; FILSTEIN; DANESH-MEYER, 2001; WHITMAN; BERRY; GREE, 1997).

Existem separadores celulares que necessitam de pequena quantidade de sangue (45 a 60 ml de sangue venoso), porém, estes equipamentos desenvolvidos para a obtenção do plasma rico em plaquetas automático apresentam alto custo, tornando o processo muitas vezes inviável (ROSSI JR.; LEMOS; PISPICO, 1999).

Anitua (1999) coletou 10 a 20 ml de sangue em tubos de 5ml contendo 10% de citrato trisódico e centrifugou a 160 gravidades (g) por 6 minutos em temperatura ambiente. Descartou 1 ml do PPP de cada tubo e o restante do plasma foi separado incluindo 1 a 2 milímetros da fase das células vermelhas. Para a formação do gel adicionou-se 50 microlitros de cloreto de cálcio 10% em cada tubo contendo 1,2 ml de PRP (ANITUA, 1999).

Em 1999, Rossi Jr., Lemos e Pispico desenvolveram um novo protocolo em cães o qual coletou 3 tubos estéreis com anticoagulante citrato de sódio² contendo 4,5 ml de sangue venoso. Os tubos foram centrifugados em centrífuga laboratorial comum³ a 750 rpm por 10 minutos e após a centrifugação, pipetou-se o plasma rico em plaquetas dos três tubos e adicionou-se ao PRP 1 ml de cloreto de cálcio a 10% e 10.000 UI de trombina bovina, obtendo-se o coágulo após 10 minutos. A contagem de plaquetas do PRP demonstrou valores entre 1.000.000 e 1.200.000 plaquetas/microlitro, confirmando a positividade do plasma. Este protocolo foi modificado por Rossi Jr (2003) a fim de se produzir um PRP com maior concentração de plaquetas. Após a primeira centrifugação, todo o plasma e 1 ml do creme leucoplaquetário ("buffy coat") é pipetado e recentrifugados a 1300 rpm por 10 minutos (400 g). Após a segunda centrifugação, retira-se 50% do plasma sobrenadante e utiliza-se os 50 % de plasma restante e o botão plaquetário para a formação do plasma rico em plaquetas. Pode-se retirar maior quantidade de plasma para aumentar a concentração de plaquetas. Homogeniza-se o PRP e adiciona-se tromboplastina associada ao cloreto de cálcio para obter a coagulação.

¹ - ELMD-500 - Medtronic

² - Vacutainer - BD

³ - Centrifuga Fanen 260 mp de 8x15 ml

2.6 DENSITOMETRIA ÓPTICA RADIOGRÁFICA

O reparo ósseo após injúria resulta em alterações da densidade mineral óssea. Estas mudanças podem ser mensuradas através de técnicas invasivas como a análise de cinzas, histomorfometria microscópica eletrônica, porém estas técnicas não permitem a avaliação sequencial de pacientes já que muitas vezes requerem a eutanásia. Nestes casos as técnicas não invasivas radiológicas ou não radiológicas são indicadas (LOUZADA et al., 1998a; MARKEL; SIELMAN; BODGANSKE, 1994).

A densitometria óptica radiográfica, também conhecida como fotodensitometria, é uma técnica radiológica não invasiva, precisa, de fácil execução e de baixo custo que avalia a variação da densidade mineral óssea por meio de imagens radiográficas (LOUZADA et al., 1994; LOUZADA et al., 1998a; MURAMOTO, 2003). A mensuração da densidade óptica (DO) das imagens radiográficas consiste em um método relativo que fornece valores de densidade mineral em milímetros de alumínio, por meio da comparação da imagem radiográfica de uma região óssea de interesse à imagem de um penetrômetro de alumínio, escala graduada de características conhecidas que, por ser exposta a radiação X simultaneamente ao osso, serve como padrão referencial (LOUZADA, 1994; LOUZADA et al., 1998b; MACK; VOSE; NELSON, 1959). A utilização do alumínio como material para a confecção do penetrômetro padrão deve-se ao fato deste material possuir coeficiente de absorção à radiação X semelhante ao do tecido ósseo (MACK; VOSE; NELSON, 1959; OWEN, 1956).

A avaliação radiográfica simples não é eficiente na detecção de alterações do processo de mineralização óssea quando há reabsorção inferior a 30% de seu conteúdo (GARTON et al., 1994). A densitometria óptica radiográfica é indicada por Louzada et al. (1998b) para transpor as limitações visuais e a subjetividade da interpretação radiográfica simples.

A metodologia da densitometria óptica radiográfica requer padronização acurada da técnica radiográfica e dos processos de digitalização das imagens obtidas para minimizar as variações dos valores obtidos (DELAQUIERRE-RICHARDSON et al., 1982).

Na Medicina Veterinária, a densitometria óptica ainda é pouco utilizada e há relatos de sua utilização para a padronização dos valores normais da massa óssea em cães e gatos de acordo com peso, sexo e idade (MURAMOTO, 2003; SANTOS, 2002; VULCANO et al., 1998) e em potros Quarto de Milha em crescimento (VULCANO et al., 1997). É um método que permite o diagnóstico precoce da osteopenia em doenças metabólicas (RAHAL et al.,

2002), a determinação das variações de densidade óssea em função da idade cronológica de coelhos normais (LOUZADA; MESQUITA-FILHO, 1999) e avaliação seriada da densidade em defeitos ósseos para o acompanhamento da neoformação óssea (DE VRIES et al., 1996; GUERRA, 2002; LOUZADA, 1988).

Louzada et al. (1998a) avaliaram as densidades ósseas em tíbias de cães e compararam com as medidas de suas massas secas. Como referencial densitométrico, foi utilizado neste estudo um penetrômetro de alumínio com 18 degraus e cada degrau com 0,5 mm de altura. Os autores observaram correlação entre as duas formas avaliadas e concluíram que a técnica densitométrica é prática, precisa, prescinde de padronização rigorosa uma vez que as análises são feitas de forma relativa, fazendo o uso de objeto de referência e metodologia apropriada.

Rahal et al. (2002) verificaram as alterações da densidade mineral óssea no hiperparatireoidismo secundário nutricional em gatos e concluíram que a densitometria óptica em imagens radiográficas é um método eficiente de avaliação da desmineralização óssea observada anteriormente ao início dos sinais clínicos.

Louzada (1988) utilizou a técnica de densitometria óptica em radiografias com o intuito de avaliar o preenchimento ósseo em perfurações em ulna de coelhos. No estudo, empregou-se escala de alumínio com 9 degraus e 2 mm de altura cada degrau. A avaliação densitométrica demonstrou aumento de densidade óssea nas regiões perfuradas compatíveis com as análises histopatológicas.

Guerra (2002) avaliou o efeito de perfurações ósseas na consolidação de fraturas em terço distal de rádio de cães e segundo o autor, o exame densitométrico do foco de fratura permite avaliar a solidez do calo ósseo em formação e os resultados são compatíveis com a avaliação histológica e tomográfica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, estando de acordo com os princípios éticos de experimentação animal.

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 8 animais adultos da espécie canina, sem raça definida, machos ou fêmeas, com pesos compreendidos entre 5 e 15 kg, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Mauá.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Estudou-se os efeitos do plasma rico em plaquetas associado a hidroxiapatita comparativamente à utilização isolada da hidroxiapatita em fraturas transversas induzidas em terço médio de rádios, fixadas com placas e parafusos ósseos e suas implicações na evolução do processo de formação de calo ósseo. Para tanto, avaliou-se os fenômenos relativos à evolução clínica dos animais e evolução do calo ósseo por meio de radiografias simples e densitometria óptica radiográfica.

Realizou-se ostectomia em terço médio dos rádios bilateralmente e considerou-se o rádio direito grupo HA/PRP e o rádio esquerdo grupo HA. No grupo HA implantou-se somente a hidroxiapatita no foco de fratura e no grupo HA/PRP, hidroxiapatita associada ao plasma rico em plaquetas. A quantidade de hidroxiapatita implantada foi o suficiente para preencher o defeito ósseo e semelhante em ambos os grupos. Analisou-se os achados clínicos, radiográficos simples e por densitometria óptica relativos a proposição aos 15 (15D), 30 (30D), 45 (45D) e 60 (60D) dias de pós-operatório.

3.3 CONDUTA PRÉ-OPERATÓRIA

Os animais foram previamente vacinados (óctupla Recombitek® C6/CV¹ e anti-rábica) e vermifugados (Bulvermin®²). Para o controle de ectoparasitas utilizou fipronil tópico (FrontLine Plus®³).

Realizou-se hemograma completo e contagem de plaquetas no Laboratório Clínico VCM-HOVET/USP no período pré-operatório e nova contagem de plaquetas no período pré-operatório imediato.

Foram selecionados para o estudo, os animais sadios que não apresentaram alterações no exame clínico, no hemograma, no leucograma e na contagem de plaquetas.

3.4 CONDUTA OPERATÓRIA

Os cães foram submetidos a jejum hídrico de 6 horas e alimentar de 12 horas. O protocolo anestésico foi padronizado pelo Serviço de Anestesia do Hospital Veterinário da FMVZ-USP. Como medicação pré-anestésica administrou-se acepromazina (0,05 mg/kg) associada a morfina (1 mg/kg) por via intramuscular (IM). Decorridos 20 minutos, cateterizou-se a veia safena para indução da anestesia e a realização da fluidoterapia com Ringer Lactato (5 a 10 ml/kg/h). Procedeu-se então indução anestésica com propofol (5 mg/kg) intravenoso (IV) e a intubação orotraqueal com sonda de calibre adequado para cada animal. A manutenção anestésica foi realizada com isoflurano em quantidade suficiente para manutenção de plano anestésico adequado.

Após tricotomia e antissepsia com álcool 70%, realizou-se colheita de sangue venoso da veia jugular para o preparo do PRP simultâneo à intervenção cirúrgica.

Após tricotomia, antissepsia com álcool 70% e solução de iodo PVPI e preparo rotineiro de campo operatório, realizou-se incisão cutânea na face crânio-medial do rádio. A seguir, efetuou-se a divulsão dos tecidos subjacentes ao rádio. Após a visualização da diáfise

¹ - Merial Saúde Animal Ltda

² - Copeli

³ - Merial Saúde Animal Ltda

do osso, iniciou-se os procedimentos de ostectomia e fixação dos fragmentos fraturados. A ulna permaneceu íntegra.

Para melhor estudo e quantificação da formação do calo ósseo, retirou-se com auxílio de serra oscilatória pneumática Synthes Mini Air® fragmento ósseo, formando defeito de aproximadamente 25 % do diâmetro do rádio. Concluídas as manobras, implantou-se no foco de fratura do grupo HA hidroxiapatita (Gen-Phos®⁴) e, no grupo HA/PRP, hidroxiapatita com adição do PRP. Findada esta etapa operatória, iniciou-se a técnica de colocação de placa e parafusos ósseos, que compreendeu a fixação da placa de tamanho adequado ao osso, perfuração das corticais ósseas com broca e furadeira pneumática, macheamento, medição da profundidade do orifício e por fim a introdução do parafuso cortical. Realizou-se a sutura da musculatura e tecido subcutâneo com fio de poliglactina 3-0⁵ em pontos simples contínuos e, posteriormente, a sutura de pele com nylon 3-0 em pontos simples separados.

3.5 PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS

Nos animais previamente anestesiados, realizou-se colheita de sangue da veia jugular em 4 tubos estéreis de 3,0 ml contendo anticoagulante citrato de sódio⁶.

Os tubos foram centrifugados em centrífuga comum⁷ de acordo com o protocolo de Kim et al. (2002a) e Kim et al. (2002b) a 1000 rpm, equivalente a 90 gravidades por 10 minutos (Figuras 1 e 2).

Após a primeira centrifugação, pipetou-se cuidadosamente com técnica asséptica todo o plasma e a camada de creme leucoplaquetário (“buffy-coat”) os quais foram transferidos para 2 tubos estéreis.

O plasma foi centrifugado novamente a 1500 rpm, equivalente a 200 gravidades por 10 minutos.

Após a segunda centrifugação, o botão plaquetário permaneceu no fundo do tubo (Figura 3). Retirou-se 2/3 do plasma sobrenadante com o auxílio de uma pipeta estéril e homogenizou-se cuidadosamente o plasma restante (1/3) às plaquetas obtendo-se o plasma

⁴ - Baumer

⁵ - Vicryl® - Ethicon

⁶ - Monovette® - Sarstedt

⁷ - Centrífuga Excelsa Baby® 260 mp de 8 x 15 ml - Fanen

rico em plaquetas. Uma amostra do PRP foi separada para a contagem manual do número de plaquetas presentes.

No momento da aplicação do enxerto ao leito receptor, adicionou-se ao PRP e à hidroxiapatita, 20% de tromboplastina cálcica⁸ (Figura 4) hidratada com 2 ml de água destilada estéril para a coagulação do PRP (Figura 5). Homogenizou-se até a formação do gel (Figura 6). O gel de PRP associado à hidroxiapatita foi adicionada ao foco de fratura no Grupo HA/PRP.

⁸ - Soluplastin® - Wiener



Figura 1 - Centrifuga laboratorial comum Fanem Excelsa Baby® utilizada para obtenção do plasma rico em plaquetas

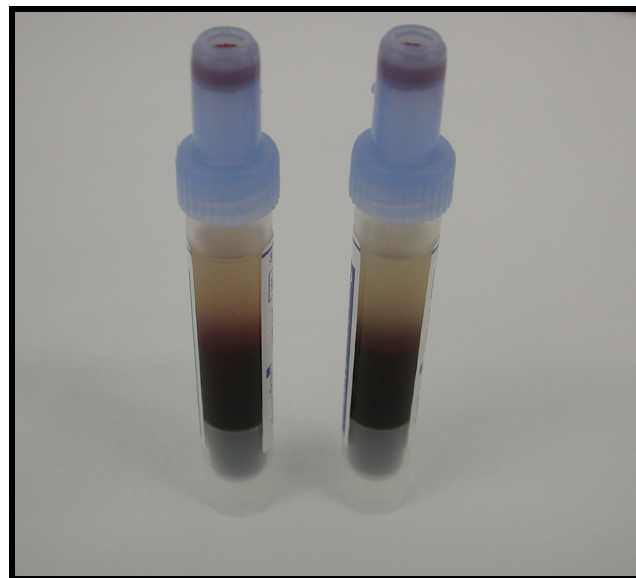


Figura 2 - Tubos após a primeira centrifugação do sangue total. Visualiza-se o plasma na porção superior e as hemácias na porção inferior

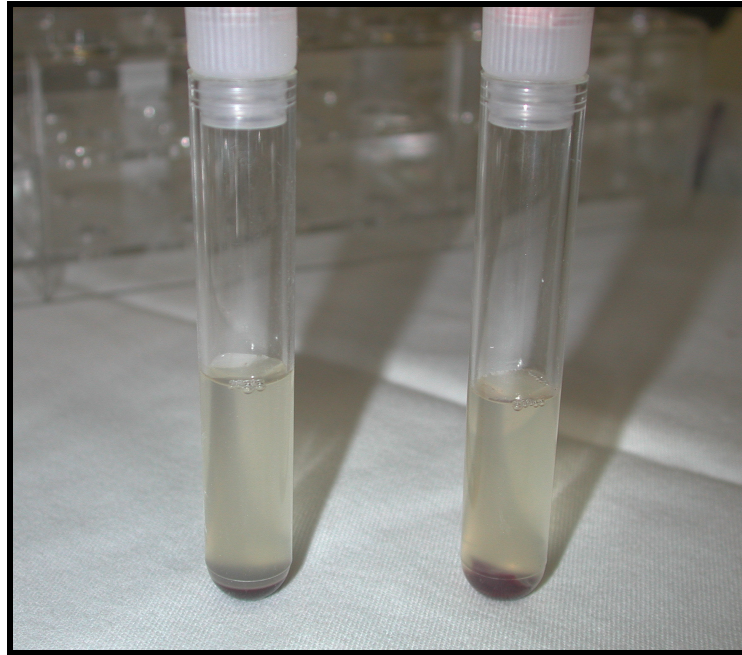


Figura 3 - Tubos estéreis após a segunda centrifugação. Visualiza-se o plasma e o botão plaquetário no fundo dos tubos



Figura 4 - Tromboplastina cálcica utilizada para a coagulação do plasma rico em plaquetas

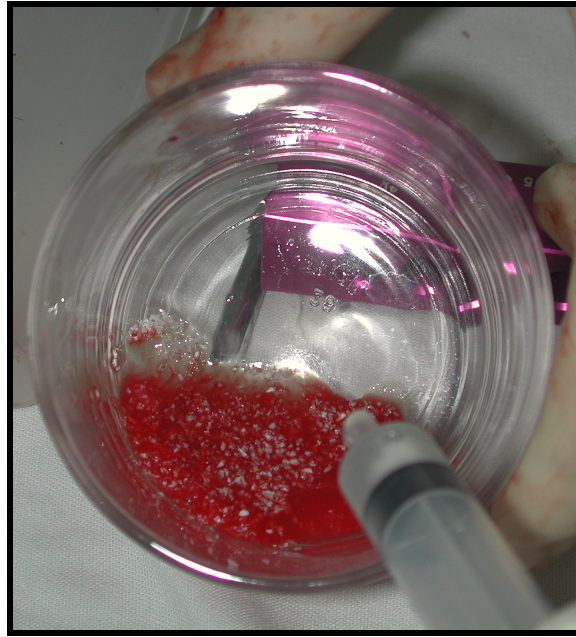


Figura 5 - Adição da tromboplastina cálcica ao plasma rico em plaquetas e hidroxiapatita para a coagulação

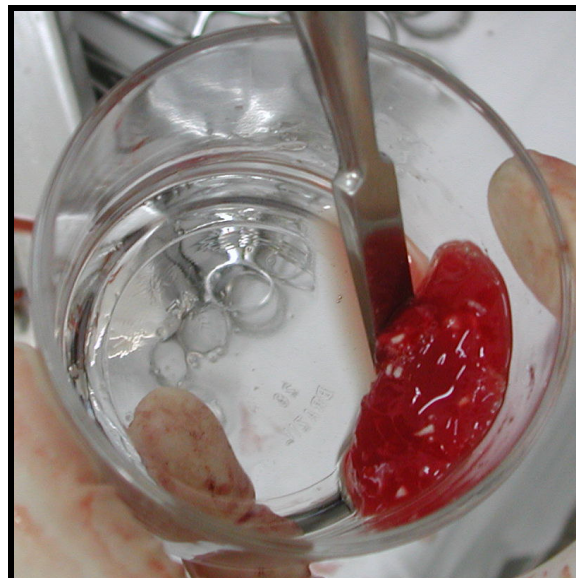


Figura 6 - Obtenção do gel plaquetário após a coagulação com tromboplastina cálcica

3.5.1 Contagem de Plaquetas

A contagem do número de plaquetas presentes no PRP foi realizada com o auxílio da câmara de Newbauer, segundo protocolo utilizado pelo Laboratório Clínico do HOVET-USP. Diluiu-se 20µl do PRP em 980µl de oxalato de amônio a 1% em tubos de polipropileno, homogenizou-se e a solução repousou por 10 minutos. A câmara de Newbauer foi preparada umedecendo as laterais com álcool 70%, sobrepondo a lamínula ao centro da câmara e realizando fricção firme até a adesão da mesma à câmara. Após o repouso da solução, preencheu-se os espaços da câmara com 10µl da solução em cada lado e, em seguida, a câmara de Newbauer repousou em câmara úmida com o auxílio de um Becker de vidro e um chumaço de algodão umedecido por 10 minutos. Após o período de repouso, contou-se as plaquetas presentes nos quatro quadrantes periféricos e no quadrante central presentes nos dois lados da câmara. A média do número das plaquetas contadas na câmara foi aplicada à seguinte fórmula: $N = N_p \times P \times D \times 5$ no qual, N= número de plaquetas por mm^3 , N_p = número de plaquetas contidas nos cinco quadrantes, P= profundidade da câmara (10), D= fator de diluição (50) e 5= número de quadrantes quantificados.

3.6 PÓS-OPERATÓRIO

Findadas as etapas operatórias, foram confeccionados pensos no modelo de Robert Jones que mantiveram-se por 7 dias.

Os animais foram tratados com azitromicina⁹ na dose de 10mg/kg por via oral a cada 24 horas durante 7 dias.

A analgesia no período pós-operatório imediato foi realizada com cetoprofeno¹⁰ por via IM na dose de 2 mg/kg, dipirona sódica na dose de 25 mg/kg pela via intravenosa (IV) e doses adicionais de morfina (0,2 mg/kg) pela via IV como medicação resgate até controle total da dor. Para o controle algico nos momentos subseqüentes, utilizou-se tramadol¹¹ na dose de 3 mg/kg a cada 12 horas via oral (VO) durante 5 dias, dipirona sódica na dose de 25

⁹ - Aziplus® - Labyes

¹⁰ - Profenid injetável® - Aventis

¹¹ - Sensitran® - Libbs

mg/kg, VO a cada 12 horas durante 5 dias e meloxicam¹² na dose de 0,1 mg/kg VO a cada 24 horas durante 7 dias.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais durante três meses, alimentados com ração seca para cães adultos e água “*ad libitum*”.

Após este período, os animais foram encaminhados para o programa de doação.

3.7 PROCEDIMENTOS DE AVALIAÇÃO

3.7.1 Avaliação Clínica

Os animais foram observados diariamente com objetivos voltados ao estudo da evolução clínica pós-operatória. Avaliou-se a estabilidade dos focos de fratura através da palpação do membro, aumento de volume e dor na região da intervenção cirúrgica e a utilização do membro na deambulação.

3.7.2 Avaliação Radiológica

Os animais foram submetidos a exames radiográficos para avaliação da evolução do calo ósseo nos seguintes momentos de observação: pós-operatório imediato (POI), 15 (15D), 30 (30D), 45 (45D) e 60 (60D) dias de pós-operatório. Para tanto, considerou-se a presença ou ausência de linha radiotransparente no foco de fratura (linha de fratura) respeitando a seguinte graduação:

- 0= linha de fratura ausente
- 1= linha de fratura pouco evidente
- 2= linha de fratura evidente
- 3= linha de fratura muito evidente

¹² - Maxican ® - Ouro Fino

Acompanhou-se também a presença dos grânulos de hidroxiapatita no foco de fratura e sua reabsorção parcial, considerando-se :

- presente (+) = diminuição da visibilização dos grânulos de hidroxiapatita devido à sua reabsorção parcial
- ausente (-) = a quantidade dos grânulos de hidroxiapatita visibilizada manteve-se semelhante ao momento anterior

Os laudos foram realizados por Médico Veterinário radiologista “cego” para os diferentes tratamentos empregados.

3.7.2.1 Técnica Radiográfica

As radiografias foram realizadas com chassi metálico marca Kodak Lanex equipado com tela intensificadora “regular screens” e filme de 18x24 cm de marca Kodak T-MAT G/RA. Utilizou-se aparelho de raio X de marca Ray Tec, modelo RT 500/125, com ampola Toshiba Rotanode Tm Fluray unit model E 7239 X. As radiografias foram realizadas na projeção médio-lateral, utilizando-se técnica individual devido aos diferentes tamanhos e pesos dos animais estudados. Para a padronização das radiografias, foi utilizada a mesma técnica radiológica nos diferentes momentos de observação. O tempo de exposição de 0,025 segundos e a distância entre o foco e o filme de 1 metro foi padronizada para todos animais.

Para o processo de revelação e fixação, utilizou-se processadora automática¹³.

3.7.3 Avaliação por Meio de Densitometria Óptica por Imagem Radiográfica

Nos devidos momentos de observação, os animais foram submetidos a exames de densitometria óptica por meio de imagem radiográfica para a mensuração da densidade mineral óssea (DMO) do calo ósseo.

¹³ - Processadora automática RP-X-OMAT (Kodak Eastman Company)

3.7.3.1 Técnica Densitométrica

Foram realizadas radiografias simples do osso fraturado, em projeção médio-lateral, com os animais em decúbito lateral, utilizando-se aparelho radiográfico convencional. Junto ao chassi e paralelamente ao eixo maior do osso radiografado, fixou-se o penetrômetro de alumínio de liga específica¹⁴, usado como referencial densitométrico (LOUZADA et al., 1998) (Figura 7). A escala de referência é constituída de 25 degraus, o primeiro degrau com 1mm de espessura, variando a seguir de 1mm em 1 mm até o vigésimo quinto degrau. Os filmes radiográficos foram revelados em processadora automática padrão. Para a digitalização das imagens radiográficas empregou-se scanner de mesa Scan Maker 9800XL Microtek®.

Uma vez digitalizadas pelo programa computacional Deskscan, as imagens foram armazenadas no computador¹⁵ no formato JPEG (Joint Photographic Experts Group) e convertidas em escala em tons de cinza.

As imagens digitalizadas do rádio e do penetrômetro foram recapturadas e analisadas por meio do software de processamento e análise de imagem ImageLab¹⁶ segundo Muramoto (2003).

Para a realização das leituras e análise da densidade óptica radiográfica, selecionou-se com auxílio do mouse, a janela óssea realizada durante a osteossíntese (Figura 8). Foram realizadas 3 leituras consecutivas do foco de fratura de cada animal e de ambos os grupos, para a obtenção de valor médio de densidade mineral óssea, expressos em milímetros de alumínio (mmAl) (Figura 9).

¹⁴ - Liga de alumínio 2026, ABNT

¹⁵ - Microcomputador Pentium III Processador de 450MHz; 128 Mb de memória RAM e Winchester de 12Gb de memória.

¹⁶ - Softium Sistemas de Informática Ltda-ME.

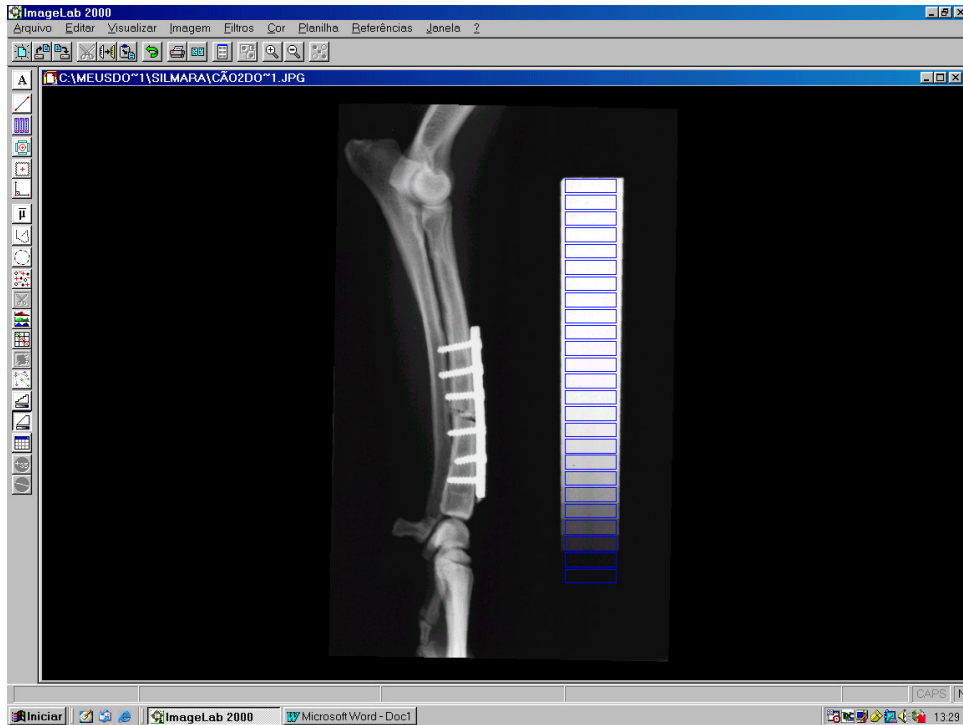


Figura 7 – Visualização do programa ImageLab demonstrando antebraço em projeção médio-lateral e penetrômetro com 25 degraus demarcados

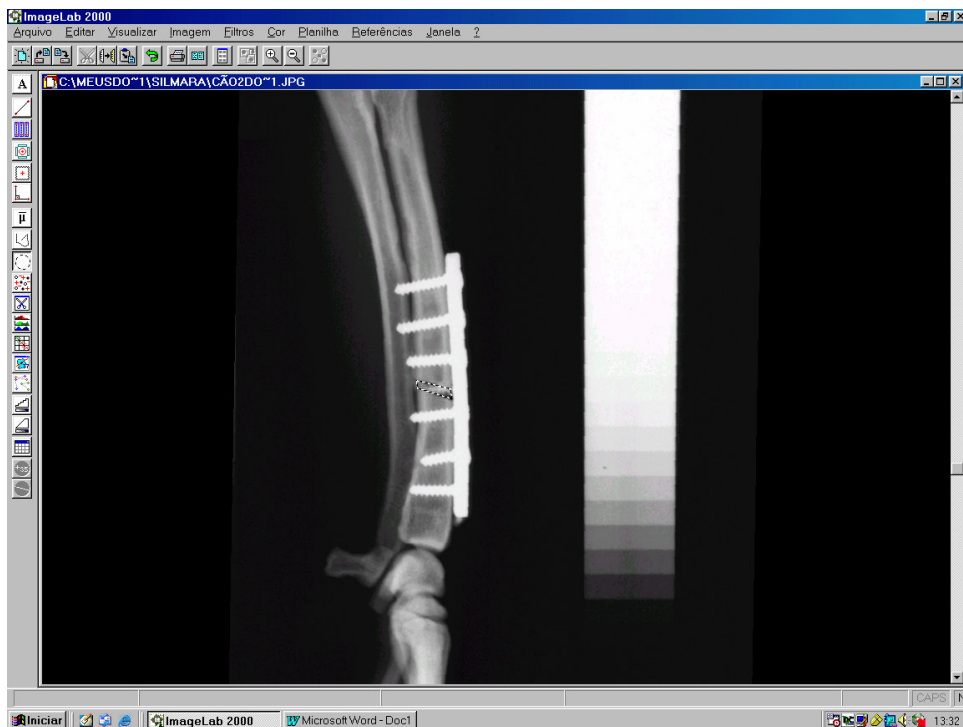


Figura 8 – Visualização do programa ImageLab demonstrando a seleção da área para o cálculo da densidade óptica (DO)

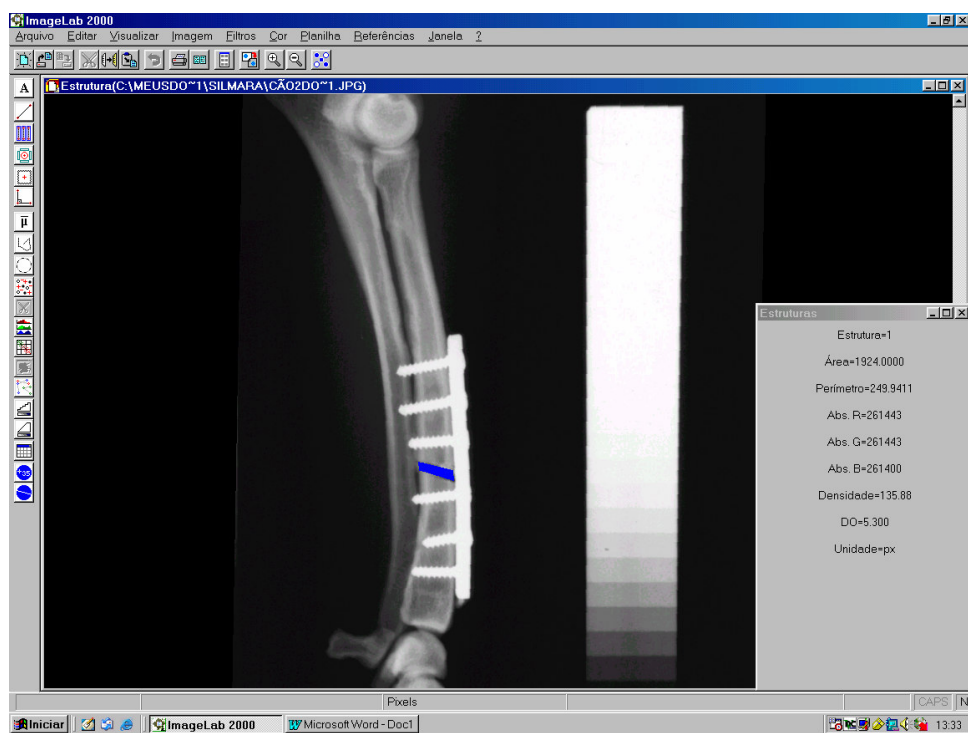


Figura 9 – Visualização do programa ImageLab demonstrando o cálculo da área selecionada

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos na avaliação da linha de fratura nos diferentes momentos de observação do mesmo grupo foram confrontados estatisticamente através do teste de Friedman¹⁷ (ANOVA para medidas repetidas não paramétricas). Para o confronto estatístico entre os resultados do grupo HA/PRP e grupo HA no mesmo momento de observação, empregou-se o teste de Wilcoxon¹⁸.

Para o confronto dos resultados da avaliação da reabsorção da hidroxiapatita dos dois grupos no mesmo momento de observação pós-operatório foi empregado o teste de McNemar¹⁹. Para a comparação dos resultados do mesmo grupo nos diferentes momentos pós-operatórios, empregou-se o teste exato de Fisher¹⁹.

Os valores das densidades minerais ósseas foram confrontados estatisticamente empregando-se análise de variância para medidas repetidas²⁰ seguidas do teste de Turkey para a comparação dos diferentes momentos de observação de um mesmo grupo. Para avaliar as possíveis diferenças entre os dois grupos no mesmo momento, empregou-se teste-T para duas amostras (variâncias iguais)²¹.

O grau de significância estabelecido foi de 5% ($p < 0,05$).

¹⁷ - Graph Pad InStat 3,01 – Graph Pad Software, Inc., 1998

¹⁸ - Graph Pad InStat 3,01 – Graph Pad Software, Inc., 1998

¹⁹ - Programa StatXact 3.1- Cytel Software Corporation, 1997

²⁰ - Graph Pad InStat 3,01 – Graph Pad Software, Inc., 1998

²¹ - Minitab 14.1 – Minitab Inc., 2003

4 RESULTADOS

Todos os cães apresentaram hemograma e contagem de plaquetas com valores dentro do padrão de normalidade.

4.1 CONTAGEM DE PLAQUETAS

Os valores referentes ao número de plaquetas no sangue total no momento pré-operatório imediato e no plasma rico em plaquetas foram apresentados sob a forma de tabela (Tabela 1) e gráfico (Gráfico 1).

Tabela 1 - Quantidade de plaquetas em milímetros cúbicos (mm^3) presentes no sangue total e PRP no momento pré-operatório imediato e o incremento plaquetário (%) no PRP. São Paulo, 2006

Animais	Número de plaquetas sangue total (mm^3)	Número de plaquetas no PRP (mm^3)	Incremento plaquetário (%)
1	207.000	730.500	252,89
2	354.000	275.000	- 22,30
3	431.000	652.500	51,40
4	232.000	465.000	100,43
5	202.000	775.000	283,66
6	354.000	800.000	125,99
7	291.000	950.000	226,46
8	236.000	1.145.000	385,17

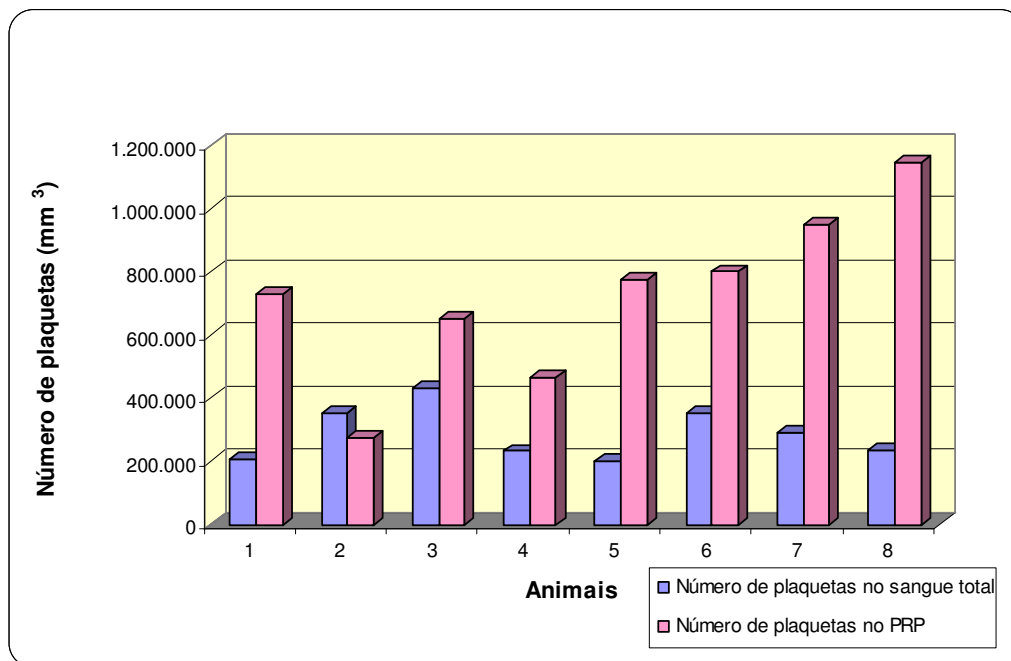


Gráfico 1 – Representação gráfica individual do número de plaquetas (mm³) presentes no sangue total no momento pré-operatório imediato e no plasma rico em plaquetas (PRP)

4.2 RESULTADOS CLÍNICOS

Todos os animais apresentaram apoio dos membros operados em todo o período pós-operatório.

As medicações analgésicas administradas no pós-operatório foram suficientes para promover bem estar aos animais, permitindo a manipulação dos membros operados.

Durante o estudo, não ocorreu falência dos implantes nos dois grupos e o eixo ósseo foi mantido em todos os membros avaliados. As feridas cirúrgicas cicatrizaram de maneira adequada.

Os animais 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 não apresentaram sinais de infecção ou outras complicações durante o estudo. O animal 8 apresentou fístulas cutâneas na região do foco de fratura do membro direito com secreção pio-sanguinolenta após 30 dias da intervenção cirúrgica. O exame radiográfico revelou áreas de lise óssea em fragmento distal do rádio direito compatível com osteomielite. Iniciou-se antibioticoterapia com Clindamicina 11 mg/Kg a cada 12 horas. Os exames radiográficos aos 45 e 60 dias de pós-operatório e 15 e 30 dias após o início da antibioticoterapia, respectivamente, demonstraram manutenção da

área de lise óssea. Devido à presença de secreção sero-sanguinolenta após 30 dias do início da antibioticoterapia, realizou-se remoção do implante e observou-se durante o procedimento cirúrgico a presença de fragmento ósseo (sequestro) no foco de fratura. No período pós-operatório, realizou-se a troca do antibiótico por Cefalexina 30 mg/Kg a cada 12 horas durante 30 dias. O animal apresentou ótima evolução clínica.

4.3 RESULTADOS RADIOLÓGICOS SIMPLES

Observou-se em ambos os grupos, bom alinhamento do eixo ósseo e boa visualização do foco de fratura nos diferentes momentos de observação.

O animal 8 apresentou no grupo HA/PRP áreas de osteólise próximas aos 3 parafusos distais ao foco de fratura e na porção cranial do rádio nos momentos 30D (Figura 10A), 45D e 60D. Aos 45 dias, a linha de fratura apresentou-se menos evidente comparado ao momento 30D e as áreas de osteólise apresentaram-se mais extensas (Figura 10B). No momento 60D as imagens apresentaram-se semelhantes ao momento 45D (Figura 10C).

Os resultados das avaliações do grupo HA e grupo HA/PRP referentes à presença de linha de fratura e reabsorção da hidroxiapatita nos momentos pós-operatório imediato (POI), 15 dias (15D), 30 dias (30D), 45 dias (45D) e 60 dias (60D) de pós-operatório foram apresentados sob a forma de tabela.

4.3.1 Avaliação da Linha de Fratura

A evolução do calo ósseo ocorreu de maneira favorável nos diferentes momentos em ambos os grupos (Figuras 11 e 12), exceto no animal 2 em que a visualização da linha de fratura do grupo HA/PRP tornou-se mais evidente no momento 45D e 60D (Tabela 2 e Figura 13).

Tabela 2 - Avaliação radiográfica simples da linha de fratura dos animais do grupo HA/PRP e grupo HA nos diferentes momentos pós-operatórios (POI, 15D, 30D, 45D e 60D). São Paulo, 2006

Animal	1		2		3		4		5		6		7		8	
	HA/PRP	HA	HA/PRP	HA	HA/PRP	HA	HA/PRP	HA	HA/PRP	HA	HA/PRP	HA	HA/PRP	HA	HA/PRP	HA
Momento																
POI	2	2	2	2	0	2	3	2	2	3	2	3	1	2	3	2
15D	2	3	2	3	1	2	2	1	2	2	3	2	3	2	2	2
30D	2	3	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	2	2	2	1
45D	1	2	2	1	0	0	1	1	1	0	2	2	2	2	1	1
60D	1	2	2	1	0	0	0	0	0	0	2	1	1	1	1	0

(0)= linha de fratura ausente. (1)= linha de fratura pouco evidente. (2)= linha de fratura evidente. (3)= linha de fratura muito evidente. (POI) pós-operatório imediato. (15D) 15 dias de pós-operatório. (30D) 30 dias de pós-operatório. (45D) 45 dias de pós-operatório e (60D) 60 dias de pós-operatório.

A presença da linha de fratura não foi observada em 3 raios (1 raio do grupo HA/PRP e 2 raios do grupo HA) no momento 45D (Figura 14) e em 7 raios (3 raios do grupo HA/PRP e 4 raios do grupo HA) no momento 60 dias (Tabela 2).

Comparando-se os diferentes momentos de observação do mesmo grupo, obteve-se resultados estatisticamente significativos no grupo HA/PRP entre 15D e 60D ($p < 0,05$) e no grupo HA entre POI e 60D ($p < 0,01$) e 15D e 60D ($p < 0,01$) (Tabelas 3 e 4). Em ambos os grupos, a evolução do calo ósseo foi mais evidente e estatisticamente significativa no momento 60D.

No grupo HA/PRP, a média no momento POI apresentou-se menor que a média no momento 15D devido à presença da hidroxiapatita no foco que dificultou a visibilização da linha de fratura e diminuiu a graduação da mesma (animal 3 e animal 7). No momento 15D no grupo HA/PRP, a média apresentou-se superior ao momento POI devido a reabsorção do substituto ósseo, tornando a comparação entre as médias no momento 15D e 60D diferentes na análise estatística (Tabela 3).

Os resultados obtidos entre a comparação dos grupos no mesmo momento de observação foram, POI: $p = 0,4375$, 15D: $p = 0,9999$, 30D: $p = 0,8125$, 45D: $p = 0,3750$ e 60D: $p = 0,3750$, não sendo considerados estatisticamente significantes ($p > 0,05$). Este valores

demonstram que a evolução radiográfica da linha de fratura foi semelhante no grupo HA e no grupo HA/PRP em todos os momentos pós-operatórios.

Tabela 3 – Valores médios da avaliação radiográfica simples da linha de fratura no grupo HA/PRP nos diferentes momentos (POI, 15D, 30D, 45D e 60D). São Paulo, 2006

Momento	Média
POI	1,87
15D	2,12 [#]
30D	1,62
45D	1,25
60D	0,87 [#]

[#] - Diferenças significantes entres os momentos (p<0,05)

Tabela 4 – Valores médios da avaliação radiográfica simples da linha de fratura no grupo HA nos diferentes momentos (POI, 15D, 30D, 45 D e 60D). São Paulo, 2006

Momento	Média
POI	2,25 [*]
15D	2,12 [#]
30D	1,62
45D	1,25
60D	0,62 ^{*#}

^{*} - Diferenças significantes entre os momentos (p<0,05)

[#] - Diferenças significantes entre os momentos (p<0,05)

4.3.2 Avaliação da Reabsorção da Hidroxiapatita

Visibilizou-se no momento POI inúmeros pontos radiopacos correspondentes aos grânulos de hidroxiapatita implantados (Figura 15A). No momento 15D, a diminuição da quantidade dos pontos radiopacos foi evidente tanto no grupo HA/PRP quanto no grupo HA (Tabela 5 e Figura 15B).

Tabela 5 - Avaliação radiográfica simples da reabsorção parcial dos grânulos de hidroxiapatita nos animais do grupo HA/PRP e grupo HA nos diferentes momentos pós-operatórios (POI, 15D, 30D, 45D, 60D). São Paulo, 2006

Animal	1		2		3		4		5		6		7		8	
	HA/PRP	HA	HA/PRP	HA	HA/PRP	HA	HA/PRPR	HA	HA/PRP	HA	HA/PRP	HA	HA/PRPR	HA	HA/PRPR	HA
Momento																
POI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15D	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
30D	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
45D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) presente. (-) ausente. (POI) pós-operatório imediato. (15D) 15 dias de pós-operatório. (30D) 30 dias de pós-operatório. (45D) 45 dias de pós-operatório e (60D) 60 dias de pós-operatório.

A presença da reabsorção parcial da hidroxiapatita no grupo HA/PRP e grupo HA no mesmo momento pós-operatório, foi confrontada, estatisticamente, não havendo diferenças

significantes ($p>0,05$), demonstrando que a presença do PRP não alterou a degradação do substituto ósseo.

Na comparação dos resultados do mesmo grupo nos diferentes momentos pós-operatórios, obteve-se diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) no grupo HA/PRP entre os momentos 15DxPOI, 15Dx45D e 15Dx60D e, no grupo HA, entre os momentos 15DxPOI, 15Dx30D, 15Dx45D, 15Dx60D, isto é, a reabsorção parcial da hidroxiapatita foi mais evidente no momento 15D tanto no grupo HA/PRP quanto no grupo HA.



Figura 10 – Imagens radiográficas do rádio direito do animal 8 (grupo HA/PRP). No momento 30D observa-se áreas de lise na porção óssea distal ao foco de fratura e linha radiotransparente evidente (A). No momento 45D visibiliza-se extensa área de lise na porção distal ao foco de fratura e linha radiotransparente evidente, porém mais delgada (B). Áreas de lise no momento 60D semelhantes ao momento anterior (C)

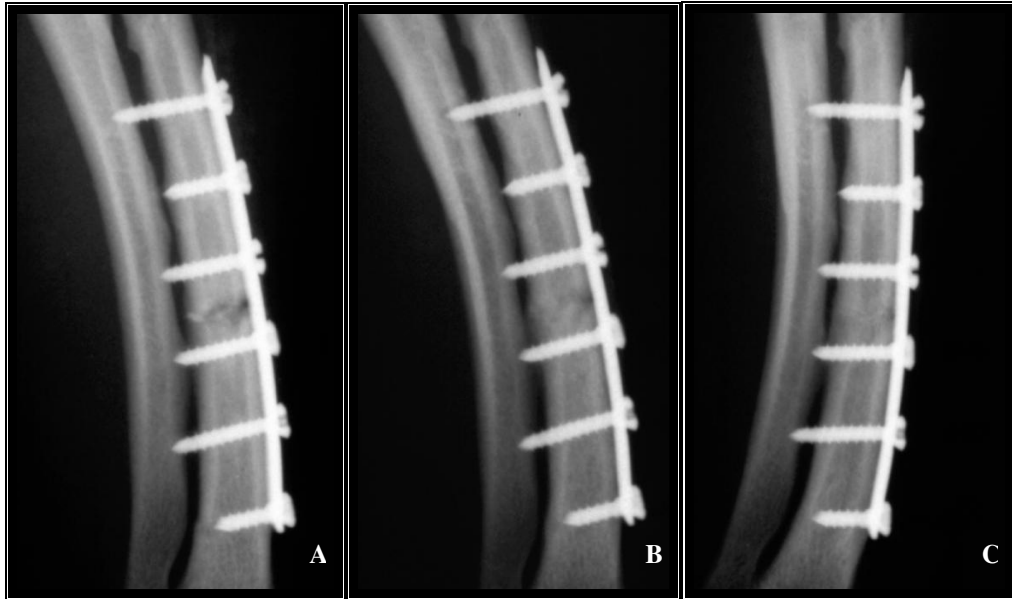


Figura 11 – Imagens radiográficas do rádio esquerdo do animal 4 (grupo HA). Momento POI visibiliza-se linha de fratura evidente - graduação 2 (A). No momento 30D a linha de fratura apresenta-se pouco evidente - graduação 1 (B). No momento 60D não visibiliza-se a linha de fratura – graduação 0 (C)



Figura 12 – Imagens radiográficas do rádio direito do animal 5 (grupo HA/PRP). Pós-operatório imediato demonstrando grânulos de hidroxiapatita em quase todo defeito ósseo e linha de fratura evidente - graduação 2 (A). Aos 45 dias de pós-operatório visibiliza-se linha de fratura pouco evidente – graduação 1 (B) e aos 60 dias de pós-operatório observa-se linha de fratura ausente – graduação 0 (C)

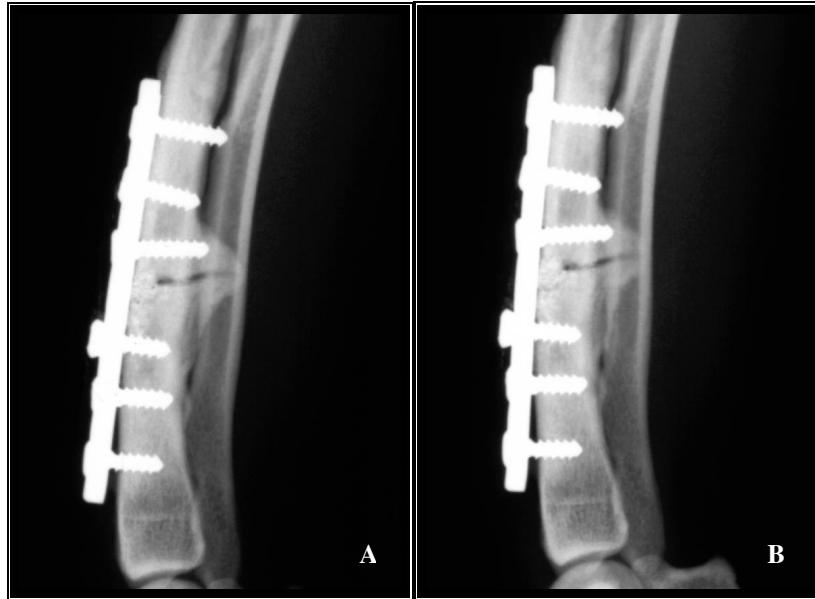


Figura 13 – Imagens radiográficas do rádio direito do animal 2 (grupo HA/PRP) nos momentos 45D (A) e 60D (B). Visibiliza-se os grânulos de hidroxiapatita implantados concentrados na região cranial do foco de fratura e linha de fratura muito evidente em ambas as radiografias

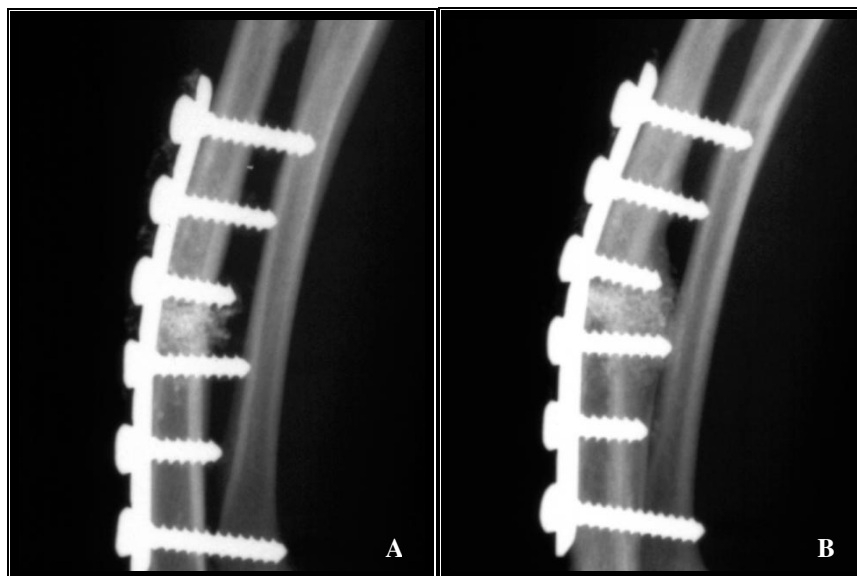


Figura 14 – Imagens radiográficas do rádio direito do animal 3 (grupo HA/PRP) no momento POI demonstrando o preenchimento do defeito ósseo pelos grânulos de hidroxiapatita (A). No momento 30D não é possível visibilizar a linha de fratura e observa-se reação periosteal caudal ao foco sugestiva de calo ósseo organizado (B).

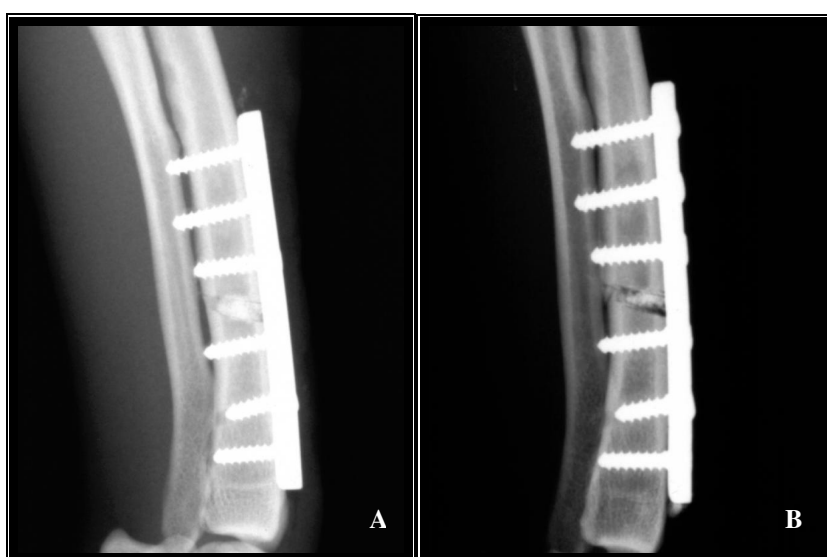


Figura 15 – Imagens radiográficas do rádio esquerdo do animal 2 (grupo HA) no momento POI (A) e 15D demonstrando reabsorção parcial da hidroxiapatita (B)

4.4 RESULTADOS DA DENSITOMETRIA ÓPTICA RADIOGRÁFICA

Os valores médios de densidade mineral óssea (DMO) dos animais do grupo HA/PRP e grupo HA no momento pré-operatório (PRE), pós-operatório imediato (POI), 15 dias (15D), 30 dias (30D), 45 dias (45D) e 60 dias (60D) de pós-operatório foram apresentados sob a forma de tabela (Tabela 6) e gráfico (gráfico 2).

Tabela 6 - Valores da Densidade Mineral Óssea (DMO) em milímetros de alumínio (mmAl) dos animais do grupo HA/PRP e grupo HA nos diferentes momentos de observação (PRE, POI, 15D, 30D, 45D e 60D). São Paulo, 2006

Momento	PRE		POI		15D		30D		45D		60D	
	HA/PRP	HA	HA/PRP	HA	HA/PRP	HA	HA/PRP	HA	HA/PRP	HA	HA/PRP	HA
Grupo												
Animal												
1	3,9	3,44	5,23	5,9	5,01	6,1	3,94	3,51	4,39	3,23	4,9	3,39
2	4,04	4,21	6,32	6,46	5,85	4,55	5,6	5,62	5,91	6,25	5,9	6,64
3	2,38	2,98	6,53	4,51	6,32	5,46	5,04	4,55	5,43	4,44	4,42	4,81
4	3,79	3,05	3,88	3,92	3,65	5,6	4,16	4,68	4,62	4,46	4,88	4,48
5	3,26	3,4	6,41	2,37	4,01	3,32	6,34	6	6,44	5,47	5,3	5,45
6	3,72	3	3,01	4,32	2,98	3,35	3,21	2,54	3,78	3,63	4,21	4,26
7	2,93	3,65	5,46	3,74	2,3	2,38	2,45	2,89	2,4	3,17	3,16	3,01
8	3,74	4,02	4	3,17	4,53	4,63	5,57	6,32	8,07	7,3	6,96	7,39

(PRE) pré-operatório. (POI) pós-operatório imediato. (15D) 15 dias de pós-operatório. (30D) 30 dias de pós-operatório. (45D) 45 dias de pós-operatório e (60D) 60 dias de pós-operatório

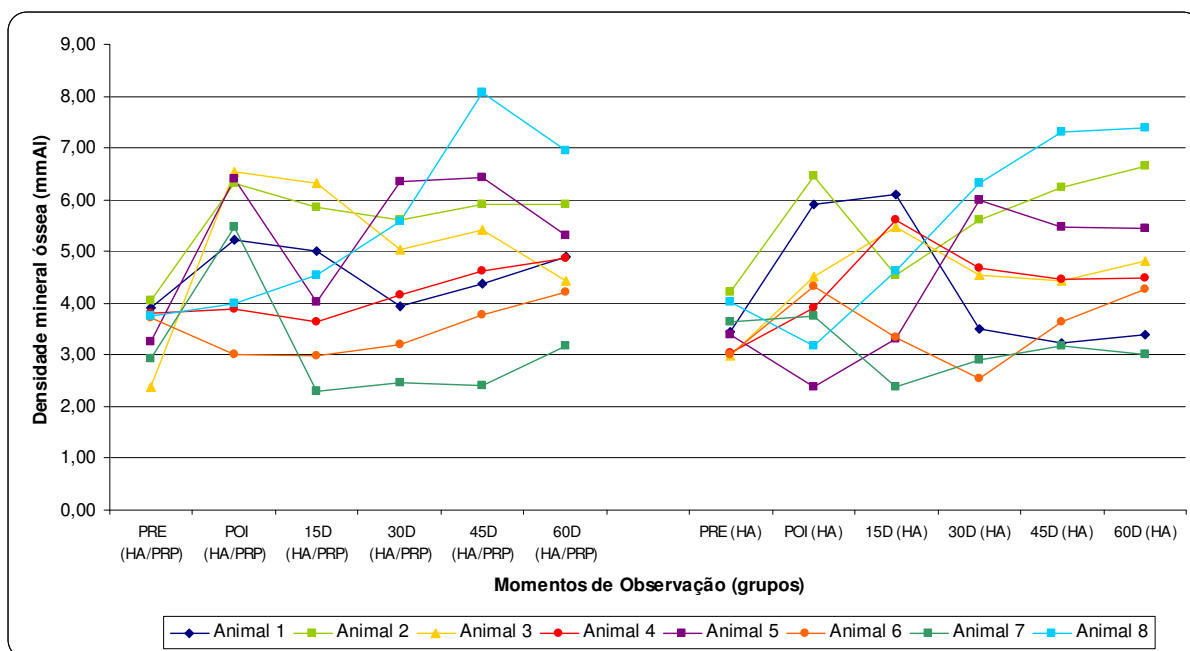


Gráfico 2 – Representação das Densidades Minerais Ósseas individuais em mmAl do grupo HA/PRP e grupo HA nos diferentes momentos de observação

Em ambos os grupos obteve-se a DMO média no momento POI maior que a média do momento PRE (Tabelas 7 e 8). No grupo HA/PRP foi observado diferença estatística significativa entre o PRE e os momentos POI, 45D e 60D ($p < 0,05$), cujas médias estão acima das médias observadas no pré-operatório (Tabela 7 e Gráfico 3). No grupo HA, a DMO média apresentou aumento progressivo a partir do momento POI até o momento 60D, porém, na análise estatística não foram observadas diferenças entre as médias ($p > 0,05$) (Tabela 8 e Gráfico 3).

Os resultados do confronto estatístico entre os dois grupos no mesmo momento foram: momento pré-operatório (PRE) $p = 0,996$, pós-operatório imediato (POI) $p = 0,249$, 15 dias de pós-operatório (15D) $p = 0,892$, 30 dias de pós-operatório (30D) $p = 0,972$, 45 dias de pós-operatório $p = 0,640$ e 60 dias de pós-operatório (60D) $p = 0,956$, não havendo diferenças estatísticas ($p > 0,05$).

Tabela 7 - Valores da Densidade Mineral Óssea (DMO) média em milímetros de alumínio (mmAl) e desvio padrão (DP) do grupo HA/PRP nos diferentes momentos pós-operatórios (PRE, POI, 15D, 30D, 45D e 60D). São Paulo, 2006

Momento	Média ± DP
PRE	3,47 ± 0,20*#●
POI	5,10 ± 0,47*
15D	4,33 ± 0,48
30D	4,53 ± 0,46
45D	5,13 ± 0,61#
60D	4,96 ± 0,40●

(PRE) pré-operatório. (POI) pós-operatório imediato. (15D) 15 dias de pós-operatório. (30D) 30 dias de pós-operatório. (45D) 45 dias de pós-operatório e (60D) 60 dias de pós-operatório. DP= desvio padrão.

* = diferenças estatísticas entre os grupos

= diferenças estatísticas entre os grupos

● = diferenças estatísticas entre os grupos

Tabela 8 - Valores da Densidade Mineral Óssea (DMO) média em milímetros de alumínio (mmAl) e desvio padrão (DP) do grupo HA nos diferentes momentos pós-operatórios (PRE, POI, 15D, 30D, 45D e 60D). São Paulo, 2006

Momento	Média ± DP
PRE	3,46 ± 0,16
POI	4,29 ± 0,47
15D	4,42 ± 0,46
30D	4,51 ± 0,50
45D	4,74 ± 0,52
60D	4,92 ± 0,53

(PRE) pré-operatório. (POI) pós-operatório imediato. (15D) 15 dias de pós-operatório. (30D) 30 dias de pós-operatório. (45D) 45 dias de pós-operatório e (60D) 60 dias de pós-operatório. DP= desvio padrão.

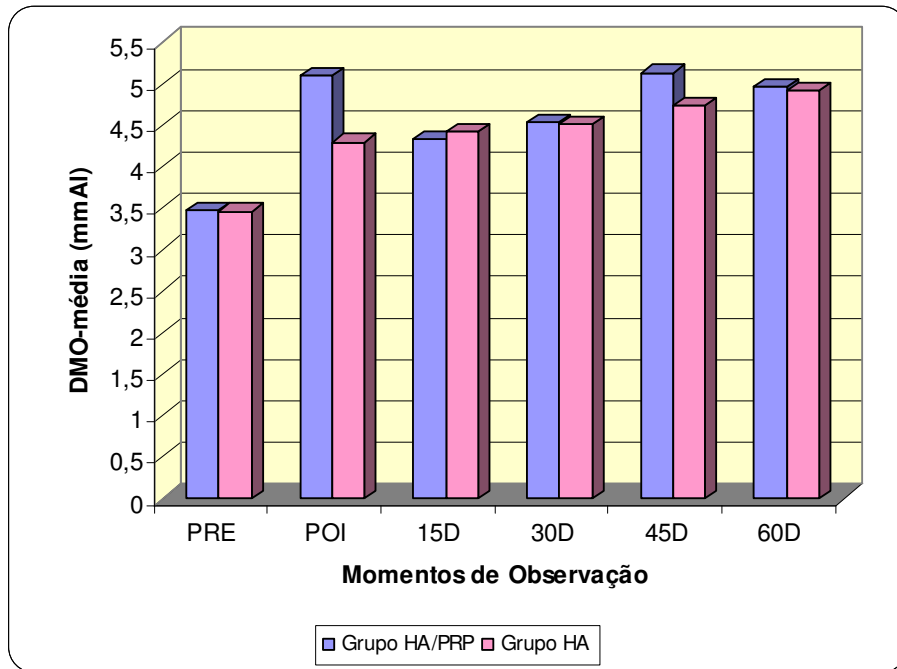


Gráfico 3 – Representação da Densidade Mineral Óssea (DMO) média em mmAl do grupo HA/PRP e grupo HA nos diferentes momentos de observação

5 DISCUSSÃO

O plasma rico em plaquetas possui propriedades osteoindutoras e tem sido utilizado desde a década de 90 como fonte autógena de fatores de crescimento combinado aos diferentes enxertos e substitutos ósseos no intuito de aumentar a formação de tecido ósseo. É geralmente utilizado no homem para reconstruções ósseas maxilofaciais, levantamento de seios maxilares, defeitos ósseos alveolares, bolsas periodontais e em implantodontia com a finalidade de melhorar a osteointegração dos implantes dentários (ANITUA, 1999; LEKOVIC et al., 2003; MARX et al., 1998; MAZOR et al., 2004; ROBIONY et al., 2002; SCHLIEPHAKE, 2002).

Em animais, a aplicação experimental do PRP em procedimentos maxilofaciais e peri-implantes dentários apresentam resultados controversos (GRAGEDA et al., 2005; ROLDÁN et al., 2004; SÁNCHEZ et al., 2005) sugerindo a possibilidade do processo de regeneração óssea no modelo animal diferir do processo no homem (JASKE et al., 2003).

Devido à escassez de relatos do uso do PRP em ortopedia humana (FLORYAN; BERGHOFF, 2004) e, principalmente, veterinária, propomos avaliar os efeitos do PRP na evolução do calo ósseo em fraturas transversas induzidas experimentalmente em rádio de cães. Horugo et al. (2005), Dallari et al. (2006) e Sarkara et al. (2006) avaliaram experimentalmente o uso do PRP em ossos longos de coelhos e ovelhas. Ghandi et al. (2006) observaram os efeitos do PRP na consolidação de femores de ratos diabéticos. Hauschild et al. (2005) relataram único caso clínico no qual utilizaram PRP e fosfato- β -tricálcico em artrodese da articulação tibio-társica de cão, proporcionando fusão completa após 4 meses sem a presença de efeitos adversos.

A habilidade de aceleração da regeneração óssea do PRP no homem foi observada quando associado a enxertos autólogos (ANITUA, 1999; MARX et al., 1998; OYAMA et al., 2004; ROBYONY et al., 2002; SAMMARTINO et al., 2005; SIMON et al., 2005), aloenxertos (KASSOLIS; REYNOLDS, 2005; KASSOLIS; ROSEN; REYNOLDS, 2000; LEKOVIC et al., 2002; MENDONÇA-CARIDADE; JUIZ-LOPEZ; RUBIO-RODRIGUEZ, 2006; OBARRIO et al., 2000), xenoenxertos combinado ao enxerto autólogo (MAZOR et al., 2004) e substitutos ósseos (WILTFANG et al., 2003).

No presente estudo, o PRP combinado a hidroxiapatita não aumentou a velocidade de formação do calo ósseo através das avaliações radiográficas simples e densitométricas, estando de acordo com diversos estudos realizados em animais, os quais associaram o PRP a

enxertos autólogos (AGHALOO; MOY; FREYMILLER, 2002; BUTTERFIELD et al., 2005; JASKE et al., 2003), xenógenos (AGHALOO; MOY; FREYMILLER, 2004, 2005; GRAGEDA et al., 2005; ROLDÁN et al., 2004; SÁNCHEZ et al., 2005) e proteína óssea morfogenética (JUNG et al., 2005).

A combinação PRP e substitutos ósseos em estudo realizado com cães, demonstrou maior densidade no defeito ósseo somente após 12 semanas (VELICH et al., 2004). As densidades dos calos ósseos no grupo HA/PRP e no grupo PRP foram avaliadas durante 8 semanas e, neste período, não foram observadas diferenças entre as densidades dos grupos, estando de acordo com o estudo realizado por Velich et al. (2004).

Optou-se pelo estudo da regeneração óssea no rádio devido a alta incidência de fraturas e não uniões em cães (FLO; PIERMATTEI, 1999) e também por apresentar menor quantidade de tecidos moles adjacentes, auxiliando a avaliação radiográfica simples e por densitometria óptica. A acurácia da análise por densitometria óptica é maior em osso com menor recobrimento de tecidos moles (DE VRIES et al., 1996).

A avaliação da evolução do calo ósseo por meio da radiografia simples e densitometria óptica radiográfica foi um método de fácil execução, rápido e permitiu a avaliação sequencial do mesmo animal, conforme citado por Louzada et al. (1994), Louzada et al. (1998a) e Markel, Sielman e Bodganske (1994).

Os cães foram facilmente posicionados para a realização das radiografias e não necessitaram da administração de anestésicos ou sedativos, assim como observado em estudo realizado por Muramoto (2003). Respeitou-se no estudo a padronização da técnica radiográfica e dos processos de digitalização conforme citado por Delaquierre-Richardson et al. (1982)

A evolução favorável do calo ósseo nas radiografias simples foi avaliada por meio da visibilização do aumento da radiopacidade no foco de fratura, correspondente a proliferação periosteal junto aos bordos fraturados, característica da formação do calo e diminuição ou ausência da linha radiotransparente, quando há remineralização da região fraturada. A graduação individual da linha de fratura no momento pós-operatório imediato (POI) foi diferente nos animais em estudo, devido à quantidade heterogênea de grânulos de hidroxiapatita implantados no foco, que são radiopacos (dificultando, em alguns casos, a adequada visibilização do foco por sobreposição). Kovács et al. (2005) relataram o aumento da densidade em defeitos ósseos com fosfato-tricálcico na avaliação tomográfica.

Durante o procedimento cirúrgico, procurou-se implantar a mesma quantidade de hidroxiapatita em ambos os defeitos ósseos, entretanto, as imagens radiográficas

demonstraram que isto não foi possível em todos os animais. O tamanho reduzido dos defeitos ósseos dificultou a implantação de quantidades semelhantes de hidroxiapatita em ambos os rádios.

No rádio direito (grupo HA/PRP) do animal 3, o preenchimento do defeito ósseo com a hidroxiapatita dificultou a visualização da linha de fratura nos momentos POI e 15D, porém foi possível diferenciar a hidroxiapatita da cortical óssea. A partir do momento 45D, visualizou-se proliferação periosteal e foco de fratura com densidade mais homogênea, compatíveis com consolidação óssea.

A análise radiográfica simples do presente estudo demonstrou no grupo HA/PRP e grupo HA formação progressiva do calo ósseo, consolidação óssea em 3 rádios no momento 45D e 7 rádios no momento 60D, entretanto sem diferenças estatísticas na comparação entre os dois grupos no mesmo momento de observação. Estes resultados radiográficos são semelhantes aos do estudo de Aghaloo, Moy e Freymiller (2002) e Sarkara et al. (2006) que avaliaram os efeitos do PRP em modelo animal.

No rádio direito do animal 2 (grupo HA/PRP) visualizou-se nos momentos 45D e 60D linha de fratura muito evidente, com evolução radiográfica desfavorável quando comparado ao momento 30D e não visualizou-se outras alterações radiográficas. Considerando no estudo um único caso de retardo na evolução do calo ósseo, não foi possível sugerir efeito inibitório do PRP nas regenerações ósseas como citado por Choi et al. (2003).

Observou-se no rádio direito (grupo HA/PRP) do animal 8, áreas de lise na porção óssea distal à linha de fratura no momento 30 D, e áreas mais extensas no momento 45D. A linha de fratura apresentou-se menos evidente no momento 45D comparada ao momento 30D. Quando se compararam os focos de fratura nos diferentes momentos avaliados, observou-se evolução radiográfica favorável do calo ósseo e, desta forma, o animal em questão não foi excluído do estudo.

Devido à implantação da hidroxiapatita no foco de fratura, observou-se aumento das densidades minerais ósseas (DMO) em ambos os grupos no momento POI e as DMO no rádio direito e esquerdo do mesmo animal, apresentaram-se heterogêneas em 5 cães (62,5%). Entretanto os valores das densidades no momento POI não estão correlacionados aos valores no momento 15D, 30D, 45D e 60D, isto é, densidades superiores em um grupo no momento POI apresentaram-se inferiores nos outros momentos. Sendo assim, observou-se que a hidroxiapatita demonstrou somente propriedade osteocondutora, conforme relatado por Blokhuis et al. (2002) e Hu et al. (2003).

Na avaliação radiográfica simples, a reabsorção parcial da hidroxiapatita foi mais evidente e, estatisticamente significativa no período 15D, comparada aos demais momentos, tanto no grupo HA/PRP como no grupo HA. A adição do plasma rico em plaquetas ao substituto ósseo implantado não alterou sua reabsorção. Segundo Wiltschko et al. (2003, 2004), a hidroxiapatita em defeitos ósseos demonstra efeito osteocondutor marcante, entretanto a adição do PRP dificilmente influencia a degradação da cerâmica, estando de acordo com os resultados observados no estudo em questão.

A hidroxiapatita apresentou no presente estudo propriedades osteocondutoras e biocompatibilidade, sem apresentar efeitos adversos, assim como observado por Ewers (2005) e Fürst et al. (2003) no homem, e por Cehreli et al. (2003), Cong et al. (2001), De Kok et al. (2005), Manjubala, Sastry e Kumar (2005) e Rahbek et al. (2005) em cães.

Os resultados da avaliação por meio da densitometria óptica radiográfica do grupo HA/PRP e do grupo HA nos diferentes momentos de observação não apresentaram diferenças estatisticamente significantes. Estes resultados estão de acordo com Sánchez et al. (2005) que compararam a densidade mineral através da absorciometria de raios-x de dupla energia (DXA) peri-implante adicionado xenoenxerto associado ou não ao PRP.

A DMO no momento pré-operatório (PRE) não pôde ser utilizada como referência para a comparação com as DMO nos diferentes momentos pós-operatórios e acompanhamento da evolução do calo ósseo devido à presença dos grânulos de hidroxiapatita que aumentaram a radiopacidade do foco.

A média das DMO nos diferentes momentos, tanto no grupo HA/PRP, como no grupo HA, apresentou-se maior que a média da DMO pré-operatória. As médias das DMO do grupo HA nos diferentes momentos de observação aumentou progressivamente, estando de acordo com os resultados da avaliação radiográfica simples que demonstram aumento da densidade do foco de fratura devido a evolução do calo ósseo. Em contrapartida, no grupo HA/PRP não se observou o aumento progressivo, o que difere dos resultados radiográficos simples.

Mesmo com os resultados das avaliações radiográficas simples e densitométricas semelhantes estatisticamente, observou-se tendência ao aumento da densidade e podemos sugerir que, foi devido ao conseqüente aumento na mineralização óssea, durante o processo de consolidação, no momento 45D no grupo HA/PRP. As DMO foram superiores em 6 casos do grupo HA/PRP (75%) e DMO média = 5,13 mmAl, enquanto o grupo HA apresentou DMO média = 4,74 mmAl. Fennis et al. (2002, 2004) também observaram aumento na graduação radiográfica referente a formação do calo ósseo, e calo ósseo mais abundante na avaliação histológica, nos defeitos em mandíbulas de cabras com PRP após 6 semanas.

Na Medicina Veterinária a densitometria óptica radiográfica tem sido utilizada como método de padronização da variação mineral óssea em ossos íntegros (LOUZADA; MESQUITA FILHO, 1999; MURAMOTO, 2003; RAHAL et al., 2002; SANTOS, 2002; VULCANO et al., 1997; VULCANO et al., 1998) ou para a avaliação da consolidação óssea em defeitos com a presença (DE VRIES et al., 1996) ou ausência de enxertos ósseos (GUERRA, 2002; LOUZADA, 1988).

Como a densitometria óptica radiográfica faz a leitura da densidade óptica por comparação dos tons de cinza entre a região de interesse selecionada e a escala de referência, que apresenta absorção à radiação-x semelhante a do osso (LOUZADA, 1994; LOUZADA et al., 1998b; MACK; VOSE; NELSON, 1959; OWEN, 1956), ela interpreta que a hidroxiapatita tem densidade maior que a do osso, por ela ser mais radiopaca, ou seja, por apresentar à radiografia simples um tom de cinza mais branco que o osso natural. Assim, este método de medida de densidade não reflete somente a densidade do ambiente ósseo do animal, mas sim do material radiopaco que se sobrepõe a região estudada.

Por este motivo, a análise através da densitometria óptica dos defeitos ósseos enxertados com grânulos de hidroxiapatita não permitiu a adequada correlação da densidade mineral óssea com a evolução do calo ósseo e com a avaliação da consolidação da fratura. Em ambos os grupos, pôde-se observar DMO elevada com a presença de linha radiotransparente evidente. Os resultados densitométricos obtidos neste trabalho não estão correlacionados aos resultados radiográficos simples e contradizem o estudo realizado por Guerra (2002) que se refere à eficácia da densitometria óssea como instrumento de avaliação não invasiva do reparo ósseo de fraturas sem enxertos.

No presente estudo, a adição do plasma rico em plaquetas à hidroxiapatita em fraturas de rádio de cães não demonstrou na avaliação radiográfica simples e densitometria óptica efeitos estimulatórios na regeneração óssea. Sánchez et al. (2005) relatam que no período de 3 meses, não foram observados por meio da absorciometria de raio-x de dupla energia (DXA), diferenças entre as densidades minerais ósseas em defeitos tratados com e sem o PRP. Sarkara et al. (2006) não observaram diferenças radiográficas, tomográficas e histológicas entre os defeitos ósseos em diáfise de tíbia de ovelhas tratados com e sem PRP. A combinação do PRP a xenoenxertos e enxertos autógenos em defeitos no osso craniano de coelhos demonstrou tendência ao aumento da densidade radiológica e ao aumento na formação de osso porém sem diferenças estatísticas (AGHALOO; MOY; FREYMILLER, 2002, 2005). A imagem radiográfica sobrepõe estrutura e, devido a isto, talvez não seja um método adequado de avaliação da regeneração óssea na presença de enxertos.

A análise da densidade do defeito ósseo com PRP pode não demonstrar os efeitos estimulatórios da regeneração óssea, pois o PRP apresenta os fatores de crescimento FCDP, FTC- β e FCI-I (MARX, 2004; ROSS; RANES; BOWEN-POPE, 1986) não específicos que atuam nos pré-osteoblastos, fibroblastos, células tronco da medula e células mesenquimais indiferenciadas (BECK et al., 1993; MARX et al., 1998), estimulando o processo de regeneração óssea principalmente na fase inicial (CARLSON, 2000; CELESTE et al., 1990; LANE; BOSTRON, 1999; MARX, 2001; MILLIS, 1999; MIYAZONO et al., 1994; ROBERT; SPRON, 1993; TISCHLER, 2002). Por ser pouco mineralizado, a avaliação do osso jovem, por meio radiográfico, pode não apresentar sensibilidade e, neste caso, a avaliação invasiva histomorfométrica é considerada método conclusivo, conforme estudo realizado por Aghaloo, Moy e Freymiller (2004) e Gerard et al. (2006). A análise histológica de defeitos ósseos em coelhos preenchidos com fosfato- β -tricálcico e PRP demonstrou a presença de osso jovem após 1 mês, enquanto no grupo sem PRP, o osso jovem foi observado somente após 2 meses (YAZAWA et al., 2004)

O protocolo de obtenção do PRP utilizado obedeceu às técnicas assépticas, porém apresenta como desvantagem a possibilidade de contaminação durante a transferência do plasma para o segundo frasco antes da segunda centrifugação e durante a retirada do plasma pobre em plaquetas após a segunda centrifugação. Obarrio et al. (2000) consideram que a alta concentração de leucócitos presente no PRP poderia atuar como um “antibiótico autógeno” reduzindo os riscos de infecção. Segundo Marx (2004), o PRP estéril não promoveu ou inibiu infecções durante seus estudos.

No período pós-operatório, os animais apresentaram boa evolução clínica. O animal número 8 desenvolveu sinais de osteomielite, ausência de falência do implante em rádio direito tratado com hidroxiapatita e PRP, sem apresentar claudicação. Houve a remissão dos sinais de osteomielite (lise óssea e drenagem de secreção) somente após a retirada do implante e fragmento ósseo (sequestro). Estes sinais podem estar associados à contaminação do campo operatório durante a intervenção cirúrgica ou a contaminação do plasma rico em plaquetas, sendo que o único membro que apresentou sinais de osteomielite foi tratado com o PRP.

No presente estudo, foi adotado o protocolo simplificado para a obtenção de plasma rico em plaquetas realizado por Kim et al. (2002a, 2002b) em cães, o qual necessitou de centrífuga laboratorial comum, pequeno volume sanguíneo e baixo custo financeiro o que torna o protocolo viável na Medicina Veterinária. A descrição de técnicas simplificadas de obtenção do PRP e que dispensam a utilização de equipamentos sofisticados podem ser

encontradas atualmente (ANITUA, 1999; ROSSI JR., 2003; ROSSI JR.; LEMOS; PISPICO, 1999).

O preparo do PRP foi de fácil execução e com duração de aproximadamente 30 minutos a partir da colheita do sangue. Exigiu mão-de-obra de um profissional exclusivo para sua obtenção para que o mesmo fosse preparado simultaneamente ao procedimento cirúrgico, diminuindo o intervalo entre sua obtenção e aplicação no leito receptor, fato que pode contribuir para a agregação plaquetária.

Para a coagulação do PRP, adicionou-se tromboplastina cálcica. O mesmo foi utilizado por Fontana et al. (2004) e Rossi Jr. (2003). O gel plaquetário facilitou a manipulação dos grânulos de hidroxapatita, sua implantação e permanência no leito receptor, assim como observado por Kassolis, Rosen e Reynolds (2000), Shanaman, Filstein e Danesh-Meyer (2001), Whitman, Berry e Gree (1997) e Simon et al. (2006).

Não foi possível no estudo, o incremento plaquetário superior a 338% como proposto por Marx et al. (1998) e obtido por Kim et al. (2002a, 2002b). Em 6 animais (75%) obteve-se número de plaquetas no PRP superior a $500.000/\text{mm}^3$, considerado por Obarrio et al. (2000) e Whitman, Berry e Gree (1997) número ideal por apresentar efeitos benéficos.

O rendimento plaquetário variou entre 51,4 a 385,17% e, em um caso (12,5%), obteve-se decréscimo no número de plaquetas do PRP comparado ao sangue total. O decréscimo no número plaquetário foi relatado por Grageda et al. (2005) no PRP de 10 ovelhas obtido em separador específico para PRP (Harvest Smart Prep Processing- Plymouth, Mass) e por Weibrich, Kleis e Hafner (2002) em PRP humanos obtidos através do kit Curasan (Curasan, Kleinostheim, Germany), também específico para PRP. Grageda et al. (2005) verificaram incremento plaquetário no PRP de 0,7 a 5 vezes maior que o número de plaquetas do sangue total e em dois casos observaram o decréscimo plaquetário. A possibilidade de agregação plaquetária justificaria a quantificação reduzida no PRP, já que as plaquetas agregadas podem não ser contadas (GRAGEDA et al., 2005).

Estudos foram realizados questionando o efeito de diferentes centrifugações na integridade das plaquetas (DUGRILLON et al., 2002; LANDSBERG; ROY; GLICKMAN, 2000). Segundo Marx (2004), o processo de centrifugação não deve causar lise ou danificar as plaquetas para que elas possam secretar ativamente seus fatores de crescimento. As forças mecânicas provenientes da centrifugação podem ativar as plaquetas formando peletes e conseqüente degranulação plaquetária sem o aumento dos fatores de crescimento presentes no PRP (DUGRILLON et al., 2002; LANDSBERG; ROY; GLICKMAN, 2000). As técnicas para

a obtenção do PRP não são semelhantes e algumas podem não concentrar número suficiente de plaquetas ativas viáveis para promover o aumento da consolidação óssea (MARX, 2004).

Não houve correlação entre o incremento plaquetário do PRP e a evolução do calo ósseo entre os diferentes grupos, estando de acordo com Grageda et al. (2005) e Sarkara et al. (2006) que obtiveram resultados semelhantes em estudo realizado em levantamento de seio maxilar e em tibia de ovelhas respectivamente. Diferente dos resultados obtidos por Tamae (2005) que observou a quantidade de osso neoformado diretamente relacionado a média da porcentagem da concentração de plaquetas, e por Wiltfang et al. (2004) que demonstraram a correlação entre o número de plaquetas, aumento na quantidade de fatores de crescimento plaquetários e consequente aumento da regeneração óssea.

A concentração das plaquetas está diretamente relacionada a quantidade de fatores de crescimento que desempenharão atividade quimiotática, mitótica e de diferenciação celular (OKUDA et al, 2003; WEIBRICH; KLEIS; HAFNER, 2002; WEIBRICH et al., 2003). A evolução do calo ósseo não apresentou diferenças estatísticas entre o grupo HA/PRP e grupo HA tanto na comparação entre as médias dos grupos nos diferentes momentos como na comparação individual do rádio direito e rádio esquerdo, demonstrando que mesmo com concentrações plaquetárias diferentes no PRP, o comportamento do calo ósseo em ambos os grupos foi semelhante (Gráfico 2). O modelo experimental, o tamanho do defeito ósseo e a localização, assim como o protocolo empregado, podem estar relacionados aos resultados do estudo.

Resultados benéficos são observados na Odontologia e em reconstruções maxilofaciais (AGHALOO; MOY; FREYMILLER, 2004; MARX, 1998; MAZOR et al., 2004; ROBIONY et al., 2002). O processo de reparo ósseo nos ossos do crânio e mandíbula pode ser diferente dos ossos longos, além disso os ossos da face são planos ou alongados (mandíbula) e as forças atuantes são diferentes das forças que atuam nos ossos longos, fatos que também poderão justificar os resultados controversos.

A atuação do PRP na presença de diferentes enxertos deve ser considerada já que o PRP promove, principalmente, a proliferação das células presentes (ARPORNMAEKLONG et al. 2004; FERREIRA et al., 2005; KANNO et al., 2005), potencializando o processo de reparo ósseo quando associado a enxertos autólogos combinados ou não aos agentes osteoindutores (MARX, 2001; WHITMAN; BERRY; GREE, 1997). Wiltfang et al. (2004) observaram em mini-porcos que o PRP estimula a regeneração somente quando associado ao enxerto ósseo esponjoso autólogo e não recomenda seu uso com substitutos ósseos. Contudo

Wiltfang et al. (2003), Yazawa et al. (2004) e Hokugo et al. (2005) citam efeitos benéficos do PRP combinado ao substitutos ósseos no homem e em coelhos.

Estudos adicionais serão importantes para a padronização do protocolo de obtenção do plasma rico em plaquetas em cães, assim como a avaliação de seu efeito na regeneração óssea em procedimentos ortopédicos, associado aos diferentes enxertos e agentes osteoindutores.

6 CONCLUSÃO

A combinação do PRP e hidroxiapatita não acelerou a formação do calo ósseo em fraturas de terço médio em rádio de cães por meio da avaliação radiográfica simples e da densitometria óptica radiográfica.

O presente estudo promoveu as seguintes observações:

O plasma rico em plaquetas não alterou o tempo de degradação da hidroxiapatita.

A densitometria óptica isolada não promove o estudo da evolução do calo ósseo em defeitos ósseos tratados com enxertos radiopacos. É um método que auxilia a avaliação da densidade, porém, não deve ser considerada como único método de avaliação.

A hidroxiapatita não promoveu efeitos adversos nos animais em estudo e não apresentou efeito osteoindutor, mas sim, osteocondutor.

REFERÊNCIAS *

AGHALOO, T. L.; MOY, P. K.; FREYMILLER, E. G. Evaluation of platelet-rich plasma in combination with anorganic bovine bone in the rabbit cranium: a pilot study. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 19, n. 1, p. 59-65, 2004.

AGHALOO, T. L.; MOY, P. K.; FREYMILLER, E. G. Evaluation of platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone in the rabbit cranium. A pilot study. **Clinical Oral Implants Research**, v. 16, n. 2, p. 250-257, 2005.

AGHALOO, T. L.; MOY, P. K.; FREYMILLER, E. G. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: a pilot study. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 60, n. 10, p. 1176-1181, 2002.

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

ARPORNMAEKLONG, P.; KOCHER, M.; DEPPRICH, R.; KÜBLER, N. R.; WÜRZLER, K. K. Influence of platelet-rich plasma (PRP) on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. An *in vitro* study. **International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v. 33, n. 1, p. 60-70, 2004.

BECK, L. S.; DE GUZMAN, L.; LEE, W. P.; YVETTE, X. U.; SIEGEL, M. W.; AMENTO, E. P. One systemic administration of transforming growth factor-beta 1 reverses age or glucocorticoid-impaired wound healing. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 93, n. 6, p. 2841-2849, 1993.

BLOKHUIS, T.J.; TERMAAT, M. F.; DEN BOER, F. C.; PATKA, P.; BARKER, F. C.; HAARMAN, H. J. Properties of calcium phosphate ceramics in relation to their *in vivo* behavior. **The Journal of Trauma**, v. 48, n. 1, p. 179-186, 2000.

BUTTERFIELD, K. J.; BENNETT, J.; GRONOWICZ, G.; ADAMS, D. Effect of platelet-rich plasma with autogenous bone graft for maxillary sinus augmentation in a rabbit model. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 63, n. 3, p. 370-376, 2005.

CARLSON, E. R. Bone grafting the jaws in the 21st century: The use of platelet-rich plasma and bone morphogenetic protein. **Alpha Omegan**, v. 93, n. 3, p. 26-30, 2000.

CEHRELI, M. C.; SAHIN, S.; KESENCI, K.; TUZLAKOGLU, K.; PISKIN, E.; OZTURK, S.; RUALAN, S.; CANER, B.; BOZKURT, M. F. Biological reactions to a poly (L-lactide)-hydroxyapatite composite: a study in canine mandible. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 17, n. 4, p. 265-276, 2003.

* Conforme as Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 4. ed. rev. atual. e ampl. São Paulo: FMVZ-USP, 2003. 84 f.

CELESTE, A. J.; IANNAZZI, J. A.; TAYLOR, R. C.; HEWICK, R. M.; ROSEN, V.; WANG, E. A., et al. Identification of transforming growth factor-beta to family members present in bone-inductive protein purified bovine bone. **Proceedings of the National Academy Sciences of United States of America**, v. 87, n. 24, p. 9843-9847, 1990.

CHOI, B. H.; IM, C. J.; HUH, J. Y.; SUH, J. J.; LEE, S. H. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. **International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v. 33, n. 4, p. 56-59, 2003.

CONG, Z.; JIANXIN, W.; HUAIZHI, F.; BING, L.; HINGDONG, Z. Repairing segmental bone defects with living porous ceramic cylinders: an experimental study in dog femora. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 55, n. 1, p. 28-32, 2001.

DALLARI, D.; FINI, M.; STAGNI, C.; TORRICELLI, P.; NICOLI ALDINI, N.; GIAVARESI, G.; CENNI, E.; BALDINI, N.; CENACCHI, A.; BASSI, A.; GIARDINO, R.; FORNASARI, P. M.; GIUNTI, A. In vivo study on the healing of bone defects treated with bone marrow stromal cells, platelet-rich plasma and freeze-dried bone allografts, alone and in combination. **Journal of Orthopaedics Research**, v. 24, n. 11, p. 877-888, 2006.

DE KOK, I. J.; DRAPEAU, S. J.; YOUNG, R.; COOPER, L. F. Evaluation of mesenchymal stem cells following implantation in alveolar sockets: a canine safety study. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 20, n. 4, p. 511-518, 2005.

DE VRIES, W. J.; RUNYON, C. L.; MARTINEZ, S. A.; IRELAND, W. P. Effects of volume variations on osteogenic capabilities of autogenous cancellous bone graft in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, n.10, p.1501-1505, 1996.

DELAQUERRIERE-RICHARDSON, L.; ANDERSON, C.; JORCH, U. M.; COOK, M. Radiographics morphometric and radiographic photodensitometry of the femur in the Beagle at 13 and 21 months. **American Journal of Veterinary Research**, v. 43, n. 12, p. 2255-2258, 1982.

DUGRILLON, A.; EICHLER, H.; KERN, S.; KLÜTER, H. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. **International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v. 31, n. 6, p. 615-619, 2002.

EWERS, R. Maxilla sinus grafting with marine algae derived bone forming material: a clinical report of long-term results. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 63, n. 12, p. 1712-1723, 2005.

FENNIS, J. P.M; STOELINGA, P. J. W.; JANSEN, J. A. Mandibular reconstruction: A clinical and radiographic animal study on the use of autogenous scaffolds and platelet-rich plasma. **International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v. 31, n. 3, p. 281-286, 2002.

FENNIS, J. P. M.; STOELINGA, P. J. W.; JANSEN, J. A. Mandibular reconstruction: a histological and histomorphometric study on the use of autogenous scaffolds, particulate cortico-cancellous bone grafts and platelet rich plasma in goat. **International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v. 33, n. 1, p. 48-55, 2004.

- FERREIRA, C. F.; CARRIEL GOMES, M. C.; FILHO, J. S.; GRANJEIRO, J. M.; OLIVEIRA SIMÕES, C. M.; MAGINI, R. S. Platelet-rich plasma influence on human osteoblasts growth. **Clinical Oral Implants Research**, v. 16, n. 4, p. 456-460, 2005.
- FLO, G. L.; PIERMATTEI, D. L. Enxertos ósseos. In: FLO, G. L.; PIERMATTEI, D. L. **Manual de ortopedia e tratamento das fraturas dos pequenos animais**. São Paulo: Manole, 1999. p. 139.
- FLORYAN, K. M.; BERGHOFF, W. J. Intraoperative use of autologous platelet-rich and platelet-poor plasma for orthopedic surgery patients. **AORN Journal**, v. 80, n. 4, p. 668-678, 2004.
- FONTANA, S.; OLMEDO, D. G.; LINARES, J. A.; GUGLIELMOTTI, M. B.; CROSA, M. H. Effect of platelet-rich plasma on the peri-implant bone response: an experimental study. **Implant Dentistry**, v. 13, n. 1, p. 73-78, 2004.
- FÜRST, G.; GRUBER, R.; TANG, S.; ZECHNER, W.; HAAS, R.; MAILATH, G.; SANROMAN, F.; WATZEK, G. Sinus grafting with autogenous platelet-rich plasma and bovine hydroxyapatite. **Clinical Oral Implants Research**, v. 14, n. 4, p. 500-508, 2003.
- GHANDI, A.; DUMAS, C.; O'CONNOR, P.; PARSONS, J. R.; LIN, S. S. The effects of local platelet rich plasma delivery on diabetic fracture healing, **Bone**, v. 38, n. 4, p. 540-546, 2006.
- GARTON, M. J.; ROBERTSON, E. M.; GILBERT, F. J.; GOMERSALL, L.; REID, D. M. Can radiologist detect osteopenia on plain radiographs? **Clinical Radiology**, v. 49, n. 2, p. 118-122, 1994.
- GERARD, D.; CARLSON, E. R.; GOTCHER, J. E.; JACOBS, M. Effects of platelet-rich plasma on the healing of autologous bone grafted mandibular defects in dog. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 64, n. 3, p. 443-451, 2006.
- GRAGEDA, E.; LOZADA, J. L.; BOYNE, P. J.; CAPLANIS, N.; MCMILLAN, P. J. Bone formation in the maxillary sinus by using platelet-rich plasma: an experimental study in sheep. **Journal of Oral Implantology**, v. 31, n. 1, p. 2-17, 2005.
- GUERRA, P.C. **Utilização de perfurações na consolidação de fraturas do terço distal do rádio de cães**: avaliação radiográfica, densitométrica, tomográfica e histológica. 2002. 69 f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.
- HAUSCHILD, G.; MERTEN, H. A.; BADER, A.; UHR, G.; DEIVICK, A.; MEYER-LINDERBERG, A. Bioartificial bone grafting: tarsal joint fusion in a dog using a bioartificial composite bone graft consisting of β -tricalciumphosphate and platelet rich plasma – a case report. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 18, n. 1, p. 52-54, 2005.
- HOKUGO, A.; OZEKI, M.; KAWAKAMI, O.; SUGIMOTO, K.; MUSHIMOTO, K.; MORITA, S.; TABATA, Y. Augmented bone regeneration activity of platelet-rich plasma by biodegradable gelatin hydrogel. **Tissue Engineering**, v. 11, n. 7-8, p. 1224-1233, 2005.

HU, Y.; ZHANG, C.; ZHANG, S.; XIONG, Z.; XU, J. Development of a porous poly (L-lactic acid) hydroxyapatite / collagen scaffold as a BMP delivery system and its use in healing canine segmental bone defect. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 67, n. 2, p. 591-598, 2003.

JASKE, N.; TANGL, S.; GILLI, R.; BERGHOLD, A.; LORENZONI, M.; ESKICI, A.; HAAS, R.; PERTL, C. Influence of PRP on autogenous sinus grafts. An experimental study on sheep. **Clinical Oral Implants Research**, v. 14, n. 5, p. 578-583, 2003.

JUNG, R. E.; SCHMOEKEL, H. G.; ZWAHLEN, R.; KOKOVIC, V.; HAMMERLE, C. H.; WEBER, F. E. Platelet-rich plasma and fibrin as delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2. **Clinical Oral Implants Research**, v. 16, n. 6, p. 676-682, 2005.

KANNO, T.; TAKAHASHI, T.; TSUJISAWA, T.; ARIYOSHI, W.; NISHIHARA, T. Platelet-rich plasma enhances human osteoblast-like cell proliferation and differentiation. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 63, n. 3, p. 362-369, 2005.

KASSOLIS, J. D.; REYNOLDS, M. A. Evaluation of the adjunctive benefits of platelet-rich plasma in subantral sinus augmentation. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v. 16, n. 2, p. 280-287, 2005.

KASSOLIS, J. D.; ROSEN, P. S.; REYNOLDS, M. A. Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: case series. **Journal of Periodontology**, v. 71, n. 10, p. 1654-1661, 2000.

KAWAGUCHI, H.; NAKAMURA, K.; TABATA, Y.; IKADA, Y.; AOYAMA, I.; ANKAI, J.; NAKAMURA, T.; HIYAMA, Y.; TAMURA, M. Acceleration of fracture healing in nonhuman primates by fibroblast growth factor-2. **The Journal of Clinical Endocrinology & metabolism**, v. 86, n. 2, p. 875-880, 2001.

KERWIN, S. C.; LEWIS, D. D.; ELKINS, A. D. Bone grafting and banking. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 13, n. 10, p. 1558-1563, 1991.

KHIGHTON, D.; SILVER, I.; HUNT, T. K. Regulation of wound healing angiogenesis: effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. **Surgery**, v. 90, p. 262-270, 1981.

KIM, S.G.; CHUNG, C. H.; KIM, Y. K.; PARK, J. C.; LIM, S. C. Use of particulate dentin-plaster of Paris combination with/without platelet-rich plasma in the treatment of bone defects around implants. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 17, n. 1, p. 86-94, 2002b.

KIM, S. G.; KIM, W. K.; PARK, J. C.; KIM, H. J. A comparative study of osseointegration of Avana implants in a demineralized freeze-dried bone alone or with platelet-rich plasma. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 60, n. 9, p. 1018-1025, 2002a.

- KOVÁCS, K.; VELICH, N.; HUSZÁR, T.; FENYVES, B.; SUBA, Z.; SZABO, G. Histomorphometric and densitometric evaluation of the effects of platelet-rich plasma on the remodeling of β -tricalcium phosphate in beagle dogs. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v. 16, n. 1, p. 150-154, 2005.
- LANDSBERG, R.; ROY, M.; GLICKMAN, R.S. Quantification of growth factors levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 58, n. 3, p. 297-301, 2000.
- LANE, J. M.; BOSTRON, M. P. G. Biosynthetics bone grafting. **Clinical Orthopaedics**, n. 367S, p. 107-117, 1999.
- LEKOVIC, V.; CAMARGO, P. M.; WEILAENDER, M.; VASILIC, N.; ALEKSIC, Z.; KENNEY, E. B. Effectiveness of a combination of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral and guided tissue regeneration in the treatment of mandibular grade II molar furcation in humans. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 30, n. 8, p. 746-751, 2003.
- LEKOVIC, V.; CAMARGO, P. M.; WEINLAENDER, M.; VASILIC, N.; KENNEY, E. B. Comparison of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral, and guided tissue regeneration versus platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects: a reentry study. **Journal of Periodontology**, v. 73, n. 2, p. 198-205, 2002.
- LOUZADA, M. J. Q. **Microdensitometria em radiografias de perfurações óssea**. 1988. 92 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1988.
- LOUZADA, M. J. Q. **Otimização da técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas de peças ósseas. Estudo “in vitro”**. 1994. 191 f. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica) – Faculdade de Engenharia Elétrica, UNICAMP, Campinas, 1994.
- LOUZADA, M. J. Q.; MESQUITA FILHO, J. Densidade óssea em função da idade cronológica de coelhos normais, através da densitometria óptica radiográfica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOMECÂNICA, 8., 1999, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: UDESC, 1999. p. 559-564.
- LOUZADA, M. J. Q.; PELÁ, C. A.; BELANGERO, W. D.; SANTOS-PINTO, R. Avaliações de densidade óssea em imagens radiográficas: estudo em peças ósseas de cães. **RBE – Caderno de Engenharia Biomédica**, v. 14, n. 1, p. 47-64, 1998 a.
- LOUZADA, M. J. Q.; PELÁ, C. A.; BELANGERO, W. D.; SANTOS-PINTO, R. Metodologia para avaliação de densidade em imagem radiográfica. **RBE- Caderno de Engenharia Biomédica**, v. 14, n. 2, p. 37-47, 1998b.
- MACK, P. B.; VOSE, G. P.; NELSON, J. D. New development in equipment for the roentgenographic measurement of bone density. **American Journal of Roentnology**, v. 82, n. 2, p. 303-310, 1959.
- MANJUBALA, I.; SASTRY, T. P.; KUMAR, R. V. Bone in-growth induced by biphasic calcium phosphate ceramic in femoral defect of dogs. **Journal of Biomaterial Applications**, v. 19, n. 4, p. 341-360, 2005.

MARKEL, M. D.; SIELMAN, E.; BODGANSKE, J. J. Densitometric properties of long bones in dogs, as determined by use of dual-energy x-ray absorptiometry. **American Journal of Veterinary Research**, v. 55, n. 12, p. 1750-1756, 1994.

MARTINEZ, S. A.; WALKER, T. Bone grafts. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 29, n. 5, p. 1207-1219, 1999.

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

MARX, R. E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 64, n. 8, p. 489-496, 2004.

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.

MAZOR, Z.; PELEG, M.; GARG, A. K.; LUBOSHITZ, J. Platelet-rich plasma for bone graft enhancement in sinus floor augmentation with simultaneous implant placement: patient series study. **Implant Dentistry**, v. 13, n. 1, p. 65-72, 2004.

MENDONÇA-CARIDADE, J. J.; JUIZ-LOPEZ, P.; RUBIO-RODRIGUEZ, J. P. Frontal sinus obliteration and craniofacial reconstruction with platelet rich plasma in a patient with fibrous dysplasia. **International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v. 35, n. 1, p. 88-91, 2006.

MILLIS, D. L. Bone and non bone derived growth factors and effects on bone healing. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 29, n. 5, p. 1221-1240, 1999.

MIYAZONO, K.; TEN-DIJKE, P.; ICHIYO, H.; HELDIN, C. H. Receptors for transforming growth factor-beta. **Advances in Immunology**, v. 55, p. 181-220, 1994.

MURAMOTO, C. **Estabelecimento de valores de densidade mineral óssea (DMO) das regiões metafisárias e diafisárias do rádio em cães da raça Poodle por meio da densitometria óptica radiográfica**. 2003. 125 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

OBARRIO, J. J.; ARAÚZ-DUTARI, J. I.; CHAMBERLAIN, T. M.; CROSTON, A. The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology – case reports. **The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 20, n. 5, p. 487-497, 2000.

OKUDA, K.; KAWASE, T.; MOMOSE, M.; MURATA, M.; SAITO, Y.; SUZUKI, H.; WOLFF, L. F.; YOSHIE, H. Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. **Journal of Periodontology**, v. 74, n. 6, p. 849-857, 2003.

- OYAMA, T.; NISHIMOTO, S.; TSUGAWA, T.; SHIMIZU, F. Efficacy of platelet-rich plasma in alveolar bone grafting. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.62, n. 7, p. 555-558, 2004.
- OWEN, M. Measurement of the variations in calcification in normal rabbit bone. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 38B, n.3, p. 762-769, 1956.
- PASCALÉV, M.; AMINKOV, B.; MECHKARSKI, S. Evaluation of autogenous cancellous bone grafts and bone replacing materials Bioceracol and Osteoplast in postoperative complications in dogs. **Veterinarski Arhiv**, v. 67, n. 1, p. 41-51, 1997.
- RAHAL, S. C.; MORTARI, A. C.; CAPORALI, E. H. G.; VULCANO, L. C.; SANTOS, F. A. M.; TAKAHIRA, R. K.; CROCCI, A. J. Densitometria óptica radiográfica na avaliação do hiperparatireoidismo secundário nutricional induzido em gatos. **Ciência Rural**, v. 32, n. 3, p. 421-425, 2002.
- RAHBEK, O.; KOLD, S.; BENDIX, K.; OVERGAARD, S.; SOBALLE, K. No effect of hydroxyapatite particles in phagocytosable sizes on implant fixation: an experimental study in dogs. **Journal of Biomedical Materials Research. Part A**, v. 73, n. 2, p. 150-157, 2005.
- REMEDIOS, A. Bone and bone healing. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 29, n. 5, p. 1029-1042, 1999.
- ROBERTS, A. B.; SPRON, M. B. physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta). **Growth Factors**, v. 8, n. 1, p.1-9, 1993.
- ROBIONY, M.; POLINI, F.; COSTA, F.; POLITI, M. Osteogenesis distraction and platelet-rich plasma for bone restoration of the severely atrophic mandible: Preliminary results. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 60, n. 6, p. 630-635, 2002.
- ROLDÁN, J. C.; JEPSEN, S.; MILLER, J.; FREITAG, S.; RUEGER, D. C.; AÇIL, Y.; TERHEYDEN, H. Bone formation in the presence of platelet-rich plasma vs. bone morphogenetic protein-7. **Bone**, v. 34, n. 1, p. 80-90, 2004.
- ROSS, R.; RAINES, E. W.; BOWEN-POPE, D. F. The biology of platelet derived growth factor. **Cell**, v. 46, n. 2, p. 155-169, 1986.
- ROSSI JR., R.; LEMOS, J. J.; PISPICO, R. Utilização de plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos – proposta de um protocolo de obtenção simplificado. 1999. Disponível em: <<http://www.Dentalnet.com.br>>. Acesso em: 2003.
- ROSSI JR., R. Modificação do protocolo simplificado de obtenção de PRP. Disponível em: <<http://www.Dentalnet.com.br>>. Acesso em: 2003.
- SAMMARTINO, G.; TIA, M.; MARENZI, G.; DI LAURO A.E.; D'AGOSTINO, E.; CLAUDIO, P.P. Use of autologous platelet-rich plasma (PRP) in periodontal defect treatment after extraction of impacted mandibular third molars. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v.63, n.6, p.766-770, 2005.

- SÁNCHEZ, A. R.; ECKERT, S. E.; SHERIDAN, P. J.; WEAVER, A. L. Influence of platelet-rich plasma added to xenogenic bone grafts on bone mineral density associated with dental implants. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 20, n. 4, p. 526-532, 2005.
- SANTOS, F. A. M. **Determinação dos valores normais da densidade mineral óssea (DMO) da extremidade distal do rádio-ulna em gatos, por meio da técnica da densitometria óptica em imagens radiográficas: correlação entre peso, sexo e idade.** 2002. 54 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.
- SARKARA, M. R.; AUGATB, P.; SHEFELBINED, S. J.; SCHORLEMMERB, S.; HUBER-LANGA, M.; CLAESB, L.; KINZLA, L.; IGNATIUSB, A. Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold. **Biomaterials**, v. 27, n. 9, p. 1817-1823, 2006.
- SCHLIEPHAKE, H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. **International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v. 31, n. 5, p. 469-484, 2002.
- SHANAMAN, R.; FILSTEIN, M. R.; DANESH-MEYER, M. J. Localized ridge augmentation using GBR and platelet-rich plasma: case reports. **The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 21, n. 4, p. 345-355, 2001.
- SIMON, E. N. M.; MERKX, M. A. W.; SHUBI, F. M.; KALYANYAMA, B. M.; STOELINGA, P. J. W. Reconstruction of the mandible after ablative surgery for the treatment of aggressive, benign odontogenic tumors in Tanzania: a preliminary study. **International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v. 35, n. 5, p. 421-426, 2006.
- TAMAE, P. E. **Avaliação da neoformação óssea do alvéolo dentário com plasma rico em plaquetas (PRP) em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*).** 2005. 91 f. Dissertação (Mestrado em Anatomia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- TISCHLER, M. Platelet rich plasma. The use of autologous growth factors to enhance bone and soft tissues graft. **The New York State Dental Journal**, v. 68, n. 3, p. 22-24, 2002.
- VELICH, N.; KOVACS, K.; HUSZAR, T.; SEMJEN, G.; REICZIGEL, J.; SZABO, G.; SUBA, Z. The effects of platelet-rich plasma on new bone formation by augmentation with osseointegrative bone substitute material in beagle dogs. **Fogorvosi Szemle**, v. 97, n. 1, p. 23-27, 2004.
- VULCANO, L. C.; CIARLINI, L. D. R. P.; LOUSADA, M. J. Q.; CALDAS, E. L. C. Valores normais da densidade óssea do carpo ulnar em potros em crescimento da raça Quarto de Milha através da densitometria óptica radiográfica. **A Hora Veterinária**, v. 17, n. 100, p. 52-54, 1997.
- VULCANO, L. C.; LEAL, A. C. R.; LOUZADA, M. J. Q.; MUNIKZ, L. M. R.; MAMPRIM, M. J. The determination of the normal values of the radius density in Rottweilers dogs using the radiographic optical densitometry. (an experimental study). In: CONGRESS OF THE WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION, 23., 1998, Buenos Aires. **Anais...**, Argentina, Buenos Aires: WSAVA, 1998. p. 767.

WEIBRICH, G.; KLEIS, W. K. G.; HAFNER, G. Growth factor levels in the platelet-rich plasma produced by 2 different methods: Curasan-type PRP kit versus PCCS PRP system. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 17, n. 2, p. 184-190, 2002.

WEIBRICH, G.; KLEIS, W. K. G.; HAFNER, G.; WAGNER, W. Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-rich plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. **Clinical Oral Implants Research**, v. 14, n. 3, p. 357-362, 2003.

WHITMAN, D. H.; BERRY, R. L.; GREE, D. M. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 55, n. 11, p. 1294-1299, 1997.

WILKENS, B. E.; MILLIS, D. L.; DANIEL, G. B.; MUNSON, L.; PATEL, K. R.; BUONOMO, F. C. Metabolic and histologic effects of recombinant canine somatotropin on bone healing in dogs, using an unstable osteotomy gap model. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 9, p. 1395-1401, 1996.

WILTFANG, J.; KLOSS, F. R.; KESSLER, P.; NKENKE, E.; SCHULTZE-MOSGAU, S.; ZIMMERMANN, R.; SCHLEGEL, K. A. Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. An animal experiment. **Clinical Oral Implants Research**, v. 15, n. 2, p. 187-193, 2004.

WILTFANG, J.; SCHLEGEL, K. A.; SCHULTZE-MOSGAU, S.; NKENKE, E.; ZIMMERMANN, R.; KESSLER, P. Sinus floor augmentation with β -tricalciumphosphate (β -TCP): does platelet-rich plasma promote its osseous integration and degradation? **Clinical Oral Implants Research**, v. 14, n. 2, p. 213-218, 2003.

YAZAWA, M.; OGATA, H.; KIMURA, A.; NAKAJIMA, T.; MORI, T.; WATANABE, N. Basic studies on the bone formation ability by platelet rich plasma in rabbits. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v. 15, n. 3, p. 439-446, 2004.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)