Luiz Gustavo Nascimento de Melo

Influência da associação do plasma rico em plaquetas ao enxerto de osso autógeno no reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico em calvárias de coelhos. Estudo histológico e histométrico.

unesp

2007

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Luiz Gustavo Nascimento de Melo

Influência da associação do plasma rico em plaquetas ao enxerto de osso autógeno no reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico em calvárias de coelhos. Estudo histológico e histométrico.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Unesp, para obtenção do Grau de "Doutor em Odontologia" - Área de Concentração Periodontia.

Orientador: Profª. Drª. Maria José Hitomi Nagata

unesp

ARAÇATUBA-SP

2007

Catalogação-na-Publicação

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

M528i

Melo, Luiz Gustavo Nascimento de
Influência da associação do plasma rico em plaquetas ao enxerto de osso autógeno no reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico em calvárias de coelhos : estudo histológico e histométrico / Luiz Gustavo Nascimento de Melo. -Araçatuba : [s.n.], 2007
79 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2007
Orientador: Profa. Dra. Maria José Hitomi Nagata

1. Regeneração óssea 2. Fatores de crescimento 3. Plaquetas 4. Enxerto ósseo

Black D64
CDD 617.632

DADOS CURRICULARES

Luiz Gustavo Nascimento de Melo

Nascimento: 31.05.1974 – Goiânia/GO

Filiação: João Catarino de Melo
Maria Alice Nascimento de Melo

1996-1999: Curso de Graduação em Odontologia
Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA – UNESP).

2001-2002: Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA-UNESP).

2004-2005: Especialização em Implantodontia pelo Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo (HRAC-USP).

2004-2006: Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA-UNESP).

DEDICATÓRIA

A **Deus**

Obrigado, meu senhor, pela Vossa presença,
Em todos os momentos da minha vida.
Obrigado pelas dificuldades, porque precisei ter força para superá-las,
Pelas dúvidas, porque precisei de sabedoria para entendê-las,
Obrigado pelas oportunidades, mesmo quando não as enxergava,
Pela dor, porque foi quando eu mais cresci,
Pela fé, porque precisei seguir em frente... Sempre
Obrigado pelo Vosso amor,
Até mesmo nos momentos em que não
Fui digno dele.

"... Não sou nada. Não posso querer ser nada. À parte disso, tenho em mim todos os sonhos do mundo..."

(Fernando Pessoa)

Aos meus pais,

João Catarino e **Maria Alice**

Nossos pais carregam um enorme sentimento de responsabilidade, com a missão de transformar seus filhos em homens e mulheres de verdade. Os anos passam e nós, filhos, crescemos e a grande transformação se passa dentro deles também. Os nossos sentimentos em relação às expectativas da vida são os deles. Por isso, é a eles que eu dedico toda uma vida de esforço e dedicação ao estudo.

"...Teus ombros suportam o mundo e ele não pesa mais que a mão de uma criança..."

(Carlos Drummond de Andrade)

Aos meus irmãos

Anna Paula e **Carlos Sérgio**,

"... Depois de algum tempo você aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer, mesmo a longas distâncias. E o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida. E a família são os bons amigos que a vida nos permitiu ter..." Obrigado pelo suporte de vocês durante todos esses anos e por compreenderem a minha ausência nos vários momentos em que eu não pude estar presente.

"... Pode ser que um dia o tempo passe...
Mas, se a união permanecer,
Um do outro há de se lembrar.

Pode ser que um dia nos afastemos...
Mas, se formos unidos de verdade,
A amizade nos reaproximará..."

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A Profª. Drª. **Maria José Hitomi Nagata**

Obrigado por acreditar em mim,
Quando eu achei difícil acreditar em mim mesmo.
Obrigado por dizer, algumas vezes,
O que eu realmente precisava ouvir,
Em vez do que eu queria que você dissesse,
E por ter me mostrado um outro lado a considerar, além do meu.
Porque para ensinar é preciso também saber humanizar e
Tão importante quanto formar bons pesquisadores é transformá-los em
Pesquisadores bons.
Aprendi a conhecê-la, respeitá-la e admirá-la nestes cinco anos de convívio.
Tenha certeza de ter impresso em mim os princípios que norteiam a sua vida
profissional: a dedicação incondicional à pesquisa e o amor à docência.

"Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de
água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota."
(Madre Teresa de Calcutá)

AGRADECIMENTOS

Quando se consegue chegar ao final de um trabalho proposto, pode-se sentir o peso das contribuições dadas por pessoas que ao ajudarem, mesmo supondo serem contribuições simples ou obrigações, muitas vezes não avaliam o peso de suas atitudes para quem as recebeu. Minha gratidão a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para elaboração deste trabalho.

A minha sincera gratidão. . .

À Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (FOA-UNESP), nas pessoas de seu Diretor Prof. Dr. **Paulo Roberto Botacin** e Vice-Diretor Prof. Dr**. Célio Percinotto** pela oportunidade da realização deste curso e desta pesquisa nesta instituição.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FOA-UNESP, na pessoa de seu coordenador Prof. Dr. **Wilson Roberto Poi** pela seriedade e responsabilidade na condução do programa e pelo apoio e viabilização dos recursos para realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. **Alvaro Francisco Bosco** da Disciplina de Periodontia do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da FOA-UNESP, por ter tido influência, de maneira decisiva, nos principais momentos da minha vida acadêmica, desde os tempos do estágio na disciplina. Lembro que decidi pela Periodontia na primeira vez em que o vi fazer uma cirurgia. Desde o início professor, você foi meu referencial como profissional.

Ao Prof. Dr. **Valdir Gouveia Garcia** da Disciplina de Periodontia do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da FOA-UNESP, pela possibilidade de poder ter aprendido sobre a Periodontia e sobre a vida, com sua experiência e sabedoria. Meu profundo respeito e admiração à sua pessoa, professor.

Ao Prof. Dr**. Tetuo Okamoto** do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da FOA-UNESP pela valiosa contribuição na análise das lâminas histológicas deste trabalho e pela humildade com que sempre me recebeu durante todo o curso de pós-graduação.

Á Profª. Drª. **Rita Cássia Menegati Dornelles,** da Disciplina de Fisiologia do Departamento de Ciências Básicas da FOA-UNESP, por ter tido sempre a generosidade de disponibilizar e conciliar o uso do seu laboratório com os meus horários, geralmente irregulares. Obrigado também pelas boas condições oferecidas para realização da etapa experimental deste trabalho em seu laboratório.

Á Profª. Drª. **Sandra Helena Penha de Oliveira** da Disciplina de Farmacologia do Departamento de Ciências Básicas da FOA-UNESP, pela confiança em permitir a realização de parte deste trabalho em seu laboratório de cultura de células.

Ao Prof. Dr. **Cláudio Aparecido Casatti** e Profª. Drª**. Alaíde Gonçalves** da Disciplina de Histologia do Departamento de Ciências Básicas da FOA-UNESP, por disponibilizarem os meios necessários para o armazenamento das amostras de parte desta tese.

À Profª. Drª. **Suely Regina Mogami Bomfim** do Laboratório Clínico Veterinário da FMVA-UNESP, responsável pelas análises clínicas das amostras de sangue dos animais usados neste experimento. Obrigado pela dedicação, tranqüilidade e grande paciência demonstrada durante a realização deste difícil trabalho. A sua assistência durante os experimentos foram fundamentais para realização desta tese.

À Profª. Drª. **Valéria Nobre Leal de Souza Oliva** da Disciplina de Anestesiologia do Depto. de Clínica e Cirurgia e Reprodução Animal da FMVA-UNESP, pela orientação criteriosa na determinação dos protocolos de terapia antibiótica, anestesia e cuidados pós-operatórios usados nos animais deste experimento.

Ao Prof. Dr. **José Eduardo Corrente** do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB-UNESP), pelo empenho na realização da análise estatística desta pesquisa.

Ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia (IB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), na pessoa de seu Chefe de Departamento, profª. Drª. **Carmem Veríssima Ferreira** pela oportunidade do uso do laboratório para realização dos procedimentos de cultura de células.

À profª. Drª**. Giselle Zenker Justo** do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP pelas valiosas sugestões na conduta de todo o experimento em cultura de células.

Ao Dr. **Stephen Fuccini,** pelo auxílio fundamental nas traduções durante todo o curso de pós-graduação. Obrigado também pelas importantes sugestões no início da tese e por ter torcido, mesmo à distância, para que tudo desse certo.

Ao prof. **Dietmar Weng,** ex-professor do "Department of Prosthodontics, School of Dental Medicine, Julius-Maximilians-University, Würzburg, Germany" pela possibilidade única de poder ter trabalhado ao lado de um grande pesquisador em importantes pesquisas na área de Implantodontia e regeneração durante o curso de pós-graduação.

Ao prof. **Guy Gagnon** do "Department of Periodontics, Faculté de Médecine Dentaire, Université Laval, Canadá" pelas importantes sugestões e orientações fornecidas para realização de parte dos procedimentos experimentais desta tese.

Ao prof. **Rheinard Gruber** do "Department of Oral Surgery, Bernhard Gottlieb Dental School, Medical University of Vienna, Vienna, Austria" que, mesmo por

e-mail, contribui com informações importantes para os experimentos com cultura de células.

Á **3i Implant Innovations®** pelo financiamento parcial dos materiais usados nesta tese.

Ao Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo (HRAC-USP), nas pessoas de seu Superintendente, Prof. Dr. **José Alberto de Souza Freitas** e Diretor da Divisão de Assistência Odontológica, Prof. Dr**. Laerte Fiori de Godoy,** por ter tido a oportunidade de me formar em Implantodontia em um centro de referência mundial no tratamento de pacientes portadores de anomalias craniofaciais.

À Profª Drª. **Maria Lúcia Rubo de Rezende,** da Disciplina de Periodontia do Departamento de Prótese da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP) e minha orientadora pela Especialização em Implantodontia no HRAC-USP. Tive a grande oportunidade de ter sido orientado por uma das mais importantes profissionais da área de Implantodontia do país. A sua competência e senso de ética serão sempre referenciais para minha vida profissional e pessoal. Agradeço por ter me aceito como orientado e pela compreensão e paciência em todos os momentos de dificuldade que enfrentei durante o curso.

Ao Prof. Dr. **Luís Eduardo Marques Padovan,** do Setor de Implantodontia do HRAC-USP, pelos valiosos ensinamentos dados durante o curso de Especialização em Implantodontia. Admiro-o pela seriedade profissional, pela liderança e pelo entusiasmo que tem em ensinar. Agradeço pelas oportunidades dadas no início do curso e também pelas cobranças e conselhos nos momentos de erro, que foram muito importantes para minha formação. Terá sempre o meu respeito professor.

Aos Profs. **Roberta Pires Dias, Caio Márcio Figueiredo** e **Flávio Monteiro Amado**, do Setor de Implantodontia do HRAC-USP, pela contribuição fundamental à minha formação em Implantodontia. Agradeço também pela compreensão nos dias de estresse e por permitirem, em todos os momentos necessários, o concílio da dura rotina diária da Especialização com o Doutorado.

À Profª. Drª. **Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida,** do Setor de Periodontia do HRAC-USP pela oportunidade de poder ter trabalhado, mesmo que no final da Especialização, com uma pessoa determinada. Tenho admiração pela sinceridade e praticidade com que leva a vida. São pessoas assim que fazem as coisas acontecerem.

Ao Dr. **Luiz Henrique Marchesano**, farmacêutico bioquímico do Laboratório de Análises Clínicas do HRAC-USP, pela oportunidade de ter tido acesso ao seu laboratório para podermos aplicar, na prática clínica cirúrgica, os princípios do Plasma Rico em Plaquetas e pela constante troca de informações sobre este tema durante os dois anos de convivência no Centrinho.

Ao amigo **Michel Reis Messora**. Quantas dificuldades para fazer esta tese. Quantos momentos de estresse, cansaço e sacrifício de vários finais de semana para realizar os experimentos desta tese. Quantos dias de dúvidas sobre o que fazer e como fazer, para terminar a tese. Em todos estes momentos, era você quem estava sempre ajudando. Foram nesses momentos que eu conheci o valor de uma amizade e o significado real da palavra altruísmo.

À amiga **Flávia Aparecida Chaves Furlaneto,** por ter convivido, durante o Doutorado, com uma amiga de verdade. Obrigado por todas as vezes que pude contar com seu apoio e, principalmente, por ter me mostrado que a humildade e simplicidade são, sempre, as melhores escolhas.

À amiga **Tatiana Miranda Deliberador.** Obrigado por todos os momentos em que me ajudou durante o curso de pós-graduação. Tenho a sorte de poder ter você como amiga e a certeza de que conheci uma das futuras grandes periodontistas do país.

Ao amigo **Alex Semenoff Segundo,** pelas boas conversas e importantes conselhos recebidos durante todo o curso de Doutorado. Tenho respeito pela pessoa e profissional que é. Vejo o reflexo de um grande pesquisador em você e agradeço pela possibilidade de ser seu amigo.

À **Luciana Liarte Gasparini Ribeiro,** amiga durante todo o curso de pós-graduação. Começamos juntos e terminamos juntos. Tenho admiração por sua integridade como pessoa e pela amizade que sempre teve por mim. Agradeço por todas as ocasiões em que pôde me ajudar, em todos esses anos de convivência.

Aos amigos e colegas do Mestrado e Doutorado em Periodontia da FOA-UNESP, **Alex Semenoff Segundo**, **Célia Tomiko Matida Hamata Saito**, **Danielle Shima Luize**, **Fernando José de Oliveira Nóbrega**, **Flávia Aparecida Chaves Furlaneto**, **Juliano Milanezi de Almeida**, **Luciana Liarte Gasparini Ribeiro**, **Leandro Araújo Fernandes, Michel Reis Messora**, **Samara Bonfante**, **Sérgio Ricardo de Oliveira**, **Tatiana Miranda Deliberador**, **Thiago Marchi Martins e Valmir Macarini,** pelas oportunidades de aprendizado e crescimento pessoal com o convívio de vocês.

Às amigas **Natália Campos** e **Natália Pola,** estagiárias da Periodontia e futuras colegas de profissão. Obrigado pela boa companhia e ajuda nos longos dias de trabalho ao lado do micrótomo.

Às colegas **Celina** e **Tatiana**, residentes em Diagnóstico Veterinário do Laboratório de Clínico Veterinário da FMVA-UNESP. Quantas vezes, por

telefone, nós passamos por momentos de grande expectativa diante dos resultados das análises de parte desta tese. No final, deu tudo certo. Obrigado pela ajuda fundamental de vocês para realização deste trabalho.

Ao amigo **Frederico Ciporkin**. Tenho saudade das nossas conversas sobre as inúmeras possibilidades de podermos mudar o que já existe na Odontologia e das várias vezes em que íamos à capela de São Francisco de Assis no Centrinho pra pedir proteção para nossas cirurgias. Agradeço o companheirismo verdadeiro durante todo o curso no Centrinho e a certeza de ter conquistado sua amizade.

Ao amigo **José Sérgio Maia Neto**. Não vou esquecer dos bons momentos no centro cirúrgico do Centrinho. Com o bisturi nas mãos e um pouco de criatividade, nós colocamos nossas idéias sempre "revolucionárias" em prática e escrevemos nossa estória no Centrinho. Inventamos técnicas, modificamos técnicas e com isso percebemos que ainda temos muito que fazer na nossa profissão.

À amiga **Mônica Moraes Waldemarin Lopes,** mestre em Ciência da Reabilitação pelo HRAC-USP, pelo importante auxílio durante todo o período da Especialização no Centrinho. Sem sua ajuda na realização da monografia, eu jamais teria conseguido terminá-la.

Aos amigos e colegas da Especialização em Implantodontia do HRAC-USP, **Adriana Correa Queiroz, Fernando Rizzo Alonso, Frederico Ciporkin, Gabriela Gennaro, João F. Avelar Pinto, José Sérgio Maia Neto, Milena Nahás Matiello e Wendel Teixeira.** Obrigado a cada um de vocês por terem me ajudado tanto, estando sempre presentes nas minhas ausências e aceitando meus momentos de estresse durante os dois anos de convívio no Centrinho.

Ao amigo **Antônio Hernandes Chaves Neto,** doutorando em Bioquímica pelo Instituto de Biologia da UNICAMP, pela grande capacidade de trabalho

demonstrada na realização de todos os experimentos com cultura de células. A possibilidade de termos incorporado esta nova e importante metodologia à tese só foi possível pelo seu total comprometimento com esta parte da pesquisa. Não vou esquecer do seu empenho, sempre deixando em segundo plano a própria tese, para finalização dos experimentos nos prazos estabelecidos. Tive a grande sorte de ter conhecido um verdadeiro pesquisador e a possibilidade de tê-lo como amigo.

Ao amigo **Marcelo Pereira Nunes** e seus irmãos **Djalma Pereira Nunes Filho e Fernando Pereira Nunes**, amigos para uma vida inteira. Amizade que começou na graduação e está muito presente até hoje. Obrigado por poder fazer parte desta família que a vida permitiu-me conhecer e a qual eu considero tanto.

Ao amigo **Marcos Heidy Guskuma**, pelos momentos de descontração, pelas várias saídas prometidas e não cumpridas. Obrigado por ter tornado este último ano muito divertido aqui em casa. Terei saudades das nossas "festas" no apartamento, que foi só uma, mas que valeu por várias.

À **Nica,** por ter cuidado de mim e da casa desde que eu me formei. Obrigado por ter feito parte da minha estória aqui em Araçatuba. Vou sentir saudades da sua presença alegre.

À **Antônia, Claudiomiro, Maria Dirce C. Boatto, Gilmar Martins de Oliveira** e **Bernadete Maria Nunes Kimura**, funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, da FOA-UNESP, pelos serviços prestados durante todo o curso de pós-graduação. Em especial à **Dirce** e ao **Gilmar** pelo empenho e dedicação com que coraram e montaram as lâminas no prazo estabelecido.

Ao **Odair,** funcionário da Periodontia da FOA-UNESP, pelo apoio fundamental no manuseio dos animais usados neste experimento. Obrigado pelo

importante auxílio na difícil tarefa de coleta de sangue dos animais e, principalmente, pela companhia agradável durante as cirurgias.

Ao **Camilo**, **José Lúcio e João Batista,** funcionários do Biotério da FOA-UNESP, pela disponibilidade e a alegria com que sempre me trataram durante todo o curso de pós-graduação.

À **Marina M. S. Kawagoi** e **Adélia Barreto C. Silva,** funcionárias da Seção de Pós-Graduação da FOA-UNESP, pela atenção, simpatia e paciência que sempre tiveram comigo.

À **Alexandra**, **Ana Claudia**, **Claudia**, **Cláudio**, **Helena**, **Isabel**, **Ivone**, **Izamar**, **Jessica**, **Luzia** *e* **Maria Cláudia,** funcionários da Biblioteca da FOA – UNESP, pela disponibilidade com que sempre me atenderam.

À **Beth** e **Roseli,** auxiliares do Setor de Implantodontia do HRAC-USP, pela oportunidade de ter trabalhado com vocês, profissionais experientes e altamente qualificadas, durante os dois anos de curso no Centrinho.

A todos os funcionários do HRAC-USP, que contribuíram de forma direta ou indireta para minha formação em Implantodontia. Conheci e aprendi a respeitar o notável trabalho realizado por todas as pessoas que fazem parte desta instituição. Nos dois anos de convívio direto, pude compreender o real significado da palavra caridade, que expressa literalmente o que vocês fazem todos os dias neste hospital.

Aos pacientes do HRAC-USP, que foram imprescindíveis à minha formação em Implantodontia, o meu sincero agradecimento. Que Deus os abençoe.

EPÍGRAFE

"**Ad partus ovium noscuntur pondera ventrum**"

"No final é que se cantam as glórias"

(Cícero)

RESUMO

Melo LGN. Influência da associação do plasma rico em plaquetas ao enxerto de osso autógeno no reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico em calvárias de coelhos. Estudo histológico e histométrico. (tese). Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2007.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar, histologicamente, a influência da associação do plasma rico em plaquetas (PRP) ao enxerto de osso autógeno (OA) no reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico (DTC) em calvárias de coelhos. Sessenta coelhos foram divididos em 3 grupos: C (controle), OA (osso autógeno) e OA/PRP (osso autógeno associado ao plasma rico em plaquetas). Um defeito de tamanho crítico, com 15 mm de diâmetro, foi criado na calvária de cada animal. No Grupo C, o defeito foi preenchido somente com coágulo sanguíneo. No Grupo OA, o defeito foi preenchido com osso autógeno particulado. No Grupo OA/PRP, o defeito foi preenchido com osso autógeno particulado associado ao PRP. Todos os grupos foram divididos em subgrupos (n = 10) para eutanásia aos 30 ou 90 dias pós-operatórios. Foram realizadas análises histológica e histométrica. A quantidade de osso neoformado foi calculada como uma porcentagem da área total do defeito original. Os dados em porcentagem foram transformados em raiz quadrada para análise estatística (ANOVA, teste *t*, $p<0,05$). Aos 30 dias pós-operatórios, o Grupo OA/PRP apresentou uma quantidade significativamente maior de osso neoformado que o Grupo OA (64,44% e 46,88%, respectivamente). Aos 90 dias, todos os espécimes dos Grupos OA/PRP e OA mostraram fechamento ósseo completo do defeito, com quantidades similares de osso neoformado (77,9% e 75%, respectivamente). Dentro dos limites deste trabalho, pode-se concluir que o PRP acelerou o processo de reparo do enxerto de osso autógeno em defeitos de tamanho crítico em calvária de coelhos.

Palavras-chave: Regeneração óssea; fatores de crescimento; plaquetas.

ABSTRACT

Melo LGN. Effect of platelet-rich plasma on bone healing in autogenous bone graft in critical-size defects. A histologic and histometric study in rabbit calvaria (tesis). Araçatuba: Dental School of Araçatuba, São Paulo State University. 2007.

The purpose of this study was to histologically analyze the effect of platelet-rich plasma (PRP) on bone healing in an autogenous bone graft placed in surgically created critical-size defects (CSD) in rabbit calvaria. 60 rabbits were divided into 3 groups: C (control); AB (autogenous bone graft) and AB/PRP (autogenous bone graft with platelet-rich plasma). A 15 mm diameter CSD was created in the calvarium of each animal. In Group C the defect was filled by blood clot only. In Group AB the defect was filled with particulate autogenous bone. In Group PRP it was filled with particulate autogenous bone in combination with platelet-rich plasma. All groups were divided into subgroups (n=10) and euthanized at either 30 or 90 days post-operative. Histometric, using image analysis software, and histologic analyses were performed. Amount of new bone was calculated as a percentage of the total area of the original defect. Percentage data were transformed into square root for statistical analysis (ANOVA, *t* test, $p<0.05$). At 30 days post-op, Group AB/PRP had a statistically greater amount of bone formation than Group AB (64.44% and 46.88%, respectively). At 90 days, complete bone regeneration of the defect was seen in all specimens of Groups AB/PRP and AB, with similar amounts of newly formed bone (77.9% and 75%, respectively). Within the limits of this study, it can be concluded that PRP accelerated the healing of autogenous bone graft in critical-size defects in rabbit calvaria.

Key-words: Bone regeneration; growth substances; blood platelets.

LISTA DE FIGURAS

Lista de Figuras

Figura 1 - Defeito de tamanho crítico (15 mm de diâmetro) e as duas marcações de referência criados na calvária. 63

Figura 2 - (A) Corte longitudinal ao longo da linha central (y) do DTC; (B) cortes tranversais (x); (C) espécime histológico pronto para inclusão em parafina. 63

Figura 3 - Quantidade média de plaquetas por microlitro (µl) nas amostras de PRP e de sangue periférico. 64

Figura 4 - Efeito da concentração do sPRP sobre a proliferação dos pré-osteoblastos MC3T3-E1 (72 horas). *$p < 0.05$ em relação aos controles (Análise de Variância; teste de Dunnett). 64

Figura 5 - Vistas panorâmicas dos defeitos cirúrgicos mostrando osso neoformado. (A) Grupo C - 30 dias; (B) Grupo C - 90 dias; (C) Grupo OA - 30 dias; (D) Grupo OA - 90 dias; (E) Grupo OA/PRP - 30 dias; (F) Grupo OA/PRP - 90 dias. Tricrômico de Masson. Aumento original 25x. 65

Figura 6 - Médias (%) e desvios-padrão da AON para os Grupos C, OA e OA/PRP. 30 e 90 dias pós-operatórios. 66

Figura 7 - Efeito da concentração do sPRP sobre a proliferação dos pré-osteoblastos MC3T3-E1 (24 horas). *$p < 0.05$ em relação aos controles (Análise de Variância; teste de Dunnett). 76

Figura 8 - Cultura de pré-osteoblastos MC3T3-E1 (72 horas). (A) Alfa-MEM +10% SBF; (B) (A) Alfa-MEM + 10% SBF + 10% sPRP. 76

Figura 9 - Esfregaço de amostra de sangue periférico (A) mostrando menor número de plaquetas (setas) que o esfregaço de amostra de PRP (B). Panótico. Aumento de 1000x. 78

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Porcentagem média da Área de Osso Neoformado (AON) dentro da área do defeito cirurgicamente criado, com comparação entre os grupos. 30 e 90 dias pós-operatórios. 62

Tabela 2 - Teste de Correlação de Pearson para a quantidade de plaquetas presentes nas amostras de sangue periférico e de Plasma Rico em Plaquetas (PRP) 77

Tabela 3 - Teste de Correlação de Pearson para a quantidade de plaquetas presentes nas amostras de Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e a Área de Osso Neoformado (AON) 77

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

ACD-A	=	Ácido Citrato Dextrose-A
ANOVA	=	Análise de Variância
AON	=	Área de Osso Neoformado
AT	=	Área Total
C	=	Controle
cm	=	Centímetro(s)
cm^2	=	Centímetro(s) quadrado(s)
DTC	=	Defeito(s) de Tamanho Crítico
EDTA	=	Ácido Etilenodiaminotetracético
g	=	Grama(s)
H.E.	=	Hematoxilina e Eosina
Kg	=	Quilograma(s)
Ltda.	=	Limitada
mg	=	Miligrama(s)
ml	=	Mililitro(s)
mm	=	Milímetro(s)
mm2	=	Milímetro(s) quadrado(s)
µl	=	Microlitro(s)
µm	=	Micrômetro(s)
PCCS	=	Platelet Concentrate Collection System
PRP	=	Plasma Rico em Plaquetas
rpm	=	Rotações por minuto

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE SÍMBOLOS

p	=	Probabilidade do valor do teste
<	=	Menor
n	=	Tamanho da amostra
%	=	Por cento
ºC	=	Graus Celsius
x	=	Vezes
r	=	Coeficiente de correlação
>	=	maior

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Manuscrito para Publicação	40
Resumo	41
Introdução	42
Material e Métodos	43
Resultados	49
Discussão	52
Referencias Bibliográfica	56
Tabela	62
Figuras	63
Anexos	67

MANUSCRITO PARA PUBLICAÇÃO[1]

[1]De acordo com as normas da Revista Clinical Oral Implants Research

Influência da associação do plasma rico em plaquetas ao enxerto de osso autógeno no reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico em calvárias de coelhos. Estudo histológico e histométrico.

Luiz Gustavo N. Melo, DDS, MS[1]

Maria J. H. Nagata, DDS, PhD[1]

[1]Disciplina de Periodontia, Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, Brasil.

Título resumido: **Defeitos de tamanho crítico tratados com osso autógeno e PRP**

Autora responsável para correspondência:

Maria José Hitomi Nagata

Telephone: +55 18 3636 3200 – Ramal 3871

Fax: +55 18 3636-3333

Rua José Bonifácio, 1193

CEP: 16015 - 050 Araçatuba, SP, Brazil

e-mail: mjnagata@foa.unesp.br

Palavras-chave: Regeneração óssea; Fatores de crescimento; Plaquetas; Enxerto ósseo

Melo, L. G. N.; Nagata, M. J. H. Influência da associação do plasma rico em plaquetas ao enxerto de osso autógeno no reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico em calvárias de coelhos. Estudo histológico e histométrico. *Clin Oral Impl Res*

O objetivo do presente trabalho foi avaliar, histologicamente, a influência da associação do plasma rico em plaquetas (PRP) ao enxerto de osso autógeno (OA) no reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico (DTC) em calvárias de coelhos. Sessenta coelhos foram divididos em 3 grupos: C (controle), OA (osso autógeno) e OA/PRP (osso autógeno associado ao plasma rico em plaquetas). Um defeito de tamanho crítico, com 15 mm de diâmetro, foi criado na calvária de cada animal. No Grupo C, o defeito foi preenchido somente com coágulo sanguíneo. No Grupo OA, o defeito foi preenchido com osso autógeno particulado. No Grupo OA/PRP, o defeito foi preenchido com osso autógeno particulado associado ao PRP. Todos os grupos foram divididos em sub-grupos (n = 10) para eutanásia aos 30 ou 90 dias pós-operatórios. Foram realizadas análises histológica e histométrica. A quantidade de osso neoformado foi calculada como uma porcentagem da área total do defeito original. Os dados em porcentagem foram transformados em raiz quadrada para análise estatística (ANOVA, teste *t*, $p < 0,05$). Aos 30 dias pós-operatórios, o Grupo OA/PRP apresentou uma quantidade significativamente maior de osso neoformado que o Grupo OA (64,44% e 46,88%, respectivamente). Aos 90 dias, todos os espécimes dos Grupos OA/PRP e OA mostraram fechamento ósseo completo do defeito, com quantidades similares de osso neoformado (77,9% e 75%, respectivamente). Dentro dos limites deste trabalho, pode-se concluir que o PRP acelerou o processo de reparo do enxerto de osso autógeno em defeitos de tamanho crítico em calvária de coelhos.

Introdução

Os fatores de crescimento representam uma classe de mediadores biológicos que regulam a proliferação, quimiotaxia e diferenciação celular (Lynch et al. 1989). A aplicação terapêutica desses fatores, objetivando a regeneração de um determinado tecido, fundamenta-se na tentativa de mimetizar os eventos biológicos responsáveis pela formação (estágio embrionário) e manutenção (estágio pós-natal) deste tecido (Schilephake 2002).

Marx et al. (1998) propuseram o uso do plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo como uma técnica economicamente viável para obter-se uma alta concentração de fatores de crescimento. Esses autores observaram uma maturação mais rápida dos enxertos ósseos autógenos, quando associados ao PRP, usados no tratamento de defeitos mandibulares resultantes da remoção de tumores benignos e malignos. Este estudo clínico pioneiro de Marx et al. (1998) foi importante para o estabelecimento da metodologia e aplicação clínica do PRP na odontologia. Posteriormente, outros pesquisadores avaliaram os efeitos clínicos do PRP associado ou não a enxertos ou substitutos ósseos usados em levantamento de seio maxilar (Wiltfang et al. 2003; Raghoebar et al. 2005), procedimentos para aumento ósseo vertical ou horizontal de rebordos atróficos (Shanaman et al. 2001), alvéolos de extração de terceiros molares (Sammartino et al. 2005), defeitos ósseos de fissura lábio-palatina (Oyama et al. 2004), defeitos mandibulares provocados por cirurgias ressectivas (Simon et al. 2006) e em defeitos periodontais (Christgau et al. 2006). Estes trabalhos, entretanto, têm demonstrado resultados contraditórios em relação à formação e maturação óssea.

Resultados contraditórios também têm sido observados em modelos animais. A influência do PRP tem sido avaliada em defeitos em crânios de coelhos tratados com osso autógeno (Aghaloo et al. 2002), osso bovino inorgânico (Kim et al. 2001; Aghaloo et al. 2004), aloenxerto ósseo desmineralizado seco e congelado (Aghaloo et al. 2005) ou proteína óssea

morfogenética (Jung et al. 2005); em defeitos mandíbulares de cabras (Fennis et al. 2004) e cães (Choi et al. 2004; Gerard et al. 2006) tratados com osso autógeno e em defeitos em crânios de porcos tratados com colágeno bovino (Schlegel et al. 2004), osso autógeno (Wiltfang et al. 2004; Thorwarth et al. 2005) ou osso bovino inorgânico (Thorwarth et al. 2006).

Analisando-se a grande variação de resultados desses estudos, pode-se notar que muitos deles são empíricos, sem dados controles. Por existirem poucos estudos controlados, com variação nos materiais de enxerto e sítios usados e nos protocolos de preparação do PRP, há ainda muitas dúvidas existentes sobre o quão efetivo o PRP é em favorecer a cicatrização de enxertos ósseos.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar, histologicamente, a influência da associação do plasma rico em plaquetas (PRP) ao enxerto de osso autógeno (OA) no reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico (DTC) em calvárias de coelhos.

Material e métodos

Modelo experimental

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus de Araçatuba. Foram utilizados 60 coelhos machos (New Zealand), com idade entre 4 a 5 meses, pesando entre 3,5 a 4,5 kg (UNESP, Biotério da Faculdade de Medicina, Campus de Botucatu). Os animais foram aleatoriamente divididos em 3 grupos experimentais: Grupo C (controle), Grupo OA (osso autógeno) e Grupo OA/PRP (osso autógeno associado ao plasma rico em plaquetas).

Procedimento cirúrgico

Vinte e quatro horas antes da realização das cirurgias, os coelhos receberam injeção intramuscular de enrofloxacino (0,1 ml/kg) (Baytril®, Bayer S.A., São Paulo, SP, Brasil). Para realização de todos os procedimentos experimentais, os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de xilazina (0,25 ml/kg de peso corporal) e quetamina (0,35 ml/kg de peso corporal). Após anti-sepsia, foi feita uma incisão semi-lunar na calvária e um retalho de espessura parcial foi levantado em direção posterior, seguido de uma incisão no periósteo, o qual foi também afastado na mesma direção (Vikjaer et al. 1997). Um defeito de tamanho crítico (DTC) de 15 mm de diâmetro (Hollinger & Kleinschmidt 1990) foi criado com uma trefina acoplada em uma peça de mão de baixa rotação, sob irrigação abundante com solução salina estéril. O defeito incluiu uma porção da sutura sagital. Com auxílio de um guia cirúrgico previamente confeccionado, uma marcação no formato de "L" foi feita 2 mm anterior e outra 2 mm posterior às margens do defeito cirúrgico com uma broca carbide tronco-cônica. O longo eixo de cada "L" localizou-se sobre uma linha imaginária longitudinal que dividia o defeito cirúrgico ao meio. As marcações foram, então, preenchidas com amálgama (Fig. 1). Estas foram usadas para identificação do meio do defeito cirúrgico original durante o processamento laboratorial e, também, para localização das suas margens ósseas originais durante a análise histométrica.

No Grupo C, o defeito cirúrgico foi preenchido somente com coágulo sangüíneo. No Grupo OA, o defeito foi preenchido com aproximadamente 0,30 g de osso autógeno particulado. No grupo OA/PRP, o defeito foi preenchido com aproximadamente 0,30 g de osso autógeno particulado associado com 0,5 ml de PRP. O osso autógeno foi obtido da calota craniana durante a criação dos defeitos e particulado usando um particulador ósseo manual (Quentin Bone Mill, Quentin Dental Products, Leimen, BW, Germany).

Os tecidos moles foram, então, reposicionados e suturados para obter um fechamento primário da ferida (Vycril 4-0, Ethicon, São Paulo, SP, Brasil para suturas internas e Seda 4-0, Ethicon, São Paulo, SP, Brasil para suturas externas). Cada animal recebeu injeções intramusculares diárias de enrofloxacino (0,1 ml/kg de peso corporal) (Baytril®, Bayer S.A., São Paulo, SP, Brasil) durante cinco dias pós-operatórios e de cloridrato de tramadol (0,04 ml/kg de peso corporal) (Tramal®, Pfizer Ltda, São Paulo, SP, Brasil) durante três dias pós-operatórios.

Preparo do PRP

Quarenta ml de sangue foram coletados de cada animal, via punção cardíaca, com auxílio de uma cânula adaptada a uma seringa contendo 5 ml do anti-coagulante ácido citrato dextrose (ACD-A). O mesmo volume de soro fisiológico (40 ml) foi, então, injetado via endovenosa para manutenção do volume sangüíneo sistêmico do animal. O preparo do PRP foi feito de acordo com as instruções do fabricante para uso do sistema PCCS II™ (3i Implant Innovations Inc., Palm Beach, FL, EUA). Cada amostra de sangue foi centrifugada a 3200 rpm por 12 minutos. 0,5 ml de PRP foi ativado com 0,025 ml de solução de cloreto de cálcio a 10% (Calcium Chloride 10% Solution, ScienceLab.com Inc., Houston, TX, EUA) e imediatamente associado com aproximadamente 0,30 g de osso autógeno particulado. Em 3 a 5 minutos após a ativação do PRP, esta mistura apresentou-se com consistência gelatinosa, sendo então colocada no defeito cirúrgico.

Contagem de plaquetas

O líquido de Brecher foi usado para lisar os eritrócitos e diluir as amostras de sangue periférico e de PRP. As plaquetas nas amostras diluídas foram, então, contadas manualmente em uma câmara de Neubauer. Além disso, esfregaços de sangue periférico foram corados com "Panótico Rápido LB" (LaborClin, Pinhais, PR, Brasil) para verificar a morfologia das plaquetas.

Avaliação *in vitro* das propriedades mitogênicas do sobrenadante do PRP

Preparo do sobrenadante

O sobrenadante do PRP (sPRP) foi preparado de acordo com o protocolo recomendado por Martineau et al. (2004). Uma amostra de 6 ml de PRP foi ativada com uma solução de cloreto de cálcio a 10% (Calcium Chloride 10% Solution, ScienceLab.com Inc., Houston, TX, EUA), na proporção de 0,05 ml para cada 1 ml de PRP. Em seguida, foi incubada por uma hora a 37°C, na presença de 5% de CO_2 (Auto-Flow incubator, NuAire Inc., Plymouth, MN, USA). Após este período, a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 4000 g para coletar o sPRP. Este foi, então, imediatamente armazenado à - 80°C, para uso em culturas de células.

Cultura de células

Células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 (subclone 4) foram adquiridas da "American Type Culture Collection". Estas foram mantidas em meio essencial mínimo alfa (α-MEM) (Nutricell Nutrientes Celulares, Campinas, SP, Brasil), sem ácido ascórbico, suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10% (Nutricell Nutrientes Celulares, Campinas, SP, Brasil), em uma incubadora a 37 °C, com 5% de CO_2. O meio foi trocado a cada 3 dias até as células alcançarem a confluência, quando foram então subcultivadas.

Análise de proliferação celular

As células foram plaqueadas em uma densidade de 5 x 10^4 células/cm^2 em placas de 96 poços (TPP®, Techno Plastic Products AG, Trasadingen, SH, Switzerland). Após um período de incubação de 24 horas, o meio de cultura celular foi substituído por meios de cultura contendo 1, 5, 10, 15, 20, 30 e 50% de sPRP solubilizado em meio α-MEM livre e suplementado com SFB a 10%. Os meios α-MEM livre e suplementado com SFB a 10% foram usados como controle. As placas foram incubadas por 24 e 72 horas a 37 °C e 5% de CO_2. A análise de proliferação celular foi realizada usando o teste do MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio]}. Após tratamento com diferentes concentrações de sPRP, o meio de cultura foi substituído por outro sem SFB e com MTT a uma concentração final de 0,5 mg/mL, por 3 horas. Os cristais de formazan foram solubilizados com dimetil sulfóxido, agitados por 5 minutos e os resultados da densidade ótica foram lidos num leitor de microplacas a 570 nm.

Processamento tecidual

Cada grupo de animais foi dividido em 2 sub-grupos, para eutanásia aos 30 e 90 dias pós-operatórios. A área do defeito cirúrgico original e os tecidos circunjacentes foram removidos em bloco. As peças foram fixadas em solução de formol neutro a 10%, lavadas em água corrente e descalcificadas em solução de ácido etilenodiaminotetracético a 18%. Após descalcificação inicial, cada peça foi dividida longitudinalmente em dois blocos, exatamente ao longo do centro do defeito cirúrgico original, usando-se o longo eixo de cada marcação de amálgama em formato de “L” como referência. Foram realizados, também, cortes transversais que tangenciaram o eixo menor de ambas as marcações em “L”, de modo que cada espécime ficou com 19 mm de extensão no sentido longitudinal. Assim, tornou-se possível a determinação precisa dos limites do defeito cirúrgico original para realização das

análises histológica e histométrica (Fig. 2). Após um período de descalcificação adicional, as peças foram processadas e incluídas em parafina. Foram realizados cortes seriados longitudinais, com 6 µm de espessura, iniciados a partir do centro do defeito cirúrgico original. Os cortes foram corados pelas técnicas de Hematoxilina e Eosina (H.E.) ou Tricrômico de Masson para análises com microscopia de luz.

Análise histomorfométrica

Foram selecionados 2 cortes histológicos, representando o centro do defeito cirúrgico original, para as análises histológica e histométrica. As imagens dos cortes histológicos foram capturadas por uma câmera digital acoplada a um microscópio óptico, com um aumento de 32x e salvas em um computador. Como não foi possível capturar o defeito inteiro em uma mesma imagem devido ao aumento usado, foram unidas 4 imagens digitais para formar um quadro único que compreendia toda a extensão do defeito e as suas margens ósseas originais. A análise histomorfométrica foi realizada com o auxílio do software “ImageLab 2000” (Diracon Bio Informática Ltda., Vargem Grande do Sul, SP, Brasil).

Os seguintes critérios, baseados em parte no estudo de Melo et al. (2005), foram usados para padronizar a análise histomorfométrica das imagens digitalizadas:

1) A Área Total (AT) a ser analisada correspondeu à área total do defeito cirúrgico original. Esta área foi determinada, primeiramente, pela identificação das superfícies externa e interna da calvária original nas margens direita e esquerda do defeito cirúrgico. Estas superfícies foram conectadas com linhas desenhadas seguindo suas respectivas curvaturas. Foram então medidos, a partir de ambas as extremidades do espécime, 2 mm em direção ao centro do defeito para estabelecer os limites do defeito

cirúrgico original. A Área de Osso Neoformado (AON) foi delineada dentro dos limites da AT.

2) A AT foi medida em mm^2 e considerada 100% da área a ser analisada. A AON também foi medida em mm^2 e calculada como uma porcentagem da AT.

Análise estatística

Os valores de AON de cada animal foram representados pela porcentagem média dos 2 cortes histológicos. Estes dados percentuais foram transformados em raiz quadrada para a análise estatística. A significância das diferenças entre os grupos em relação à AON foi determinada pela análise de variância, seguida por um teste *t de Student post hoc* quando a análise de variância mostrou uma diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). O coeficiente de correlação de Pearson (r_p) foi usado para demonstrar a relação entre a AON e a quantidade de plaquetas das amostras de PRP, bem como entre a quantidade de plaquetas das amostras de PRP e de sangue periférico. Na análise da proliferação celular, a significância das diferenças entre os grupos foi determinada pela análise de variâncìa, seguida pelo teste de Dunnett *post hoc*, adotando o nível de significância de 5%.

Resultados

Um espécime do Grupo OA/PRP de 30 dias pós-operatórios foi perdido devido a problemas no processamento laboratorial.

Acompanhamento clínico

Os animais toleraram bem o procedimento cirúrgico e mantiveram-se saudáveis durante todo o período experimental.

Estudo da contagem de plaquetas

As contagens de plaquetas confirmaram que a técnica usada para o preparo de PRP neste estudo produziu amostras com altas concentrações de plaquetas. Esfregaços de amostras de PRP exibiram maior quantidade de plaquetas do que esfregaços de amostras de sangue periférico. A quantidade média de plaquetas nas amostras de sangue periférico foi 327,83 ± 73,61 x 10^3 plaquetas/µl, enquanto que nas amostras de PRP foi 1204,03 ± 369,875 x 10^3 plaquetas/µl (Fig. 3). Portanto, a concentração de plaquetas nas amostras de PRP foi aproximadamente 4 vezes maior que aquela observada nas amostras de sangue periférico.

Análise de proliferação celular

As células da linhagem MC3T3-E1, tratadas com o sPRP, apresentaram uma taxa de proliferação dose-dependente. Com a adição de 10% de sPRP suplementado com SFB a 10% ou com a adição de 20% de sPRP somente, as células mostraram uma taxa de proliferação aproximadamente 100 % maior que a do grupo controle em 72 horas de cultura (Fig. 4).

Análise histológica qualitativa

Grupo C (controle): Em 30 dias pós-operatórios, quase toda a extensão do defeito cirúrgico estava ocupada por tecido conjuntivo com feixes de fibras colágenas orientadas paralelamente à superfície da ferida e um moderado número de fibroblastos. Observou-se, junto às margens do defeito cirúrgico, pequena quantidade de tecido ósseo neoformado (Fig. 5A) circundado por poucos osteoblastos. Em 90 dias pós-operatórios, a maioria dos espécimes apresentou uma formação óssea similar àquela observada nos espécimes de 30 dias

pós-operatórios (Fig. 5B), enquanto poucos apresentaram uma maior formação óssea. O tecido conjuntivo apresentou um moderado número de fibroblastos ao lado de feixes de fibras colágenas.

Grupo OA (osso autógeno):

Aos 30 dias pós-operatórios, nenhum espécime apresentou o fechamento completo do defeito cirúrgico por tecido ósseo. Contudo, observou-se um fechamento quase completo do mesmo em 6 espécimes. De forma geral, a região do defeito cirúrgico estava ocupada por formações isoladas de tecido ósseo neoformado imaturo ao lado de tecido conjuntivo fibroso (Fig 5C). Em toda a extensão do mesmo, observou-se a presença de remanescentes de partículas ósseas do enxerto. Áreas de tecido conjuntivo provisório também estavam presentes. Em alguns espécimes, notou-se a presença de um discreto número de linfócitos e macrófagos em áreas isoladas. Aos 90 dias, observou-se o fechamento completo do defeito por tecido ósseo trabecular maduro em todos os animais (Fig 5D). Em algumas áreas, remanescentes de partículas ósseas do enxerto ainda estavam presentes. Em ambos os períodos de análise, a espessura dos tecidos neoformados na região do defeito era, na maioria dos espécimes, mais delgada que o osso original da calota.

Grupo OA/PRP (osso autógeno/plasma rico em plaquetas): Aos 30 dias pós-operatórios, 2 espécimes apresentaram um fechamento completo do defeito cirúrgico por tecido ósseo (Fig. 5E), enquanto 8 espécimes apresentaram um fechamento quase completo do mesmo com tecido ósseo trabecular imaturo. Em toda a extensão do defeito, observou-se a presença de remanescentes de partículas ósseas do enxerto. A espessura dos tecidos neoformados era, na maioria dos espécimes, maior que o osso original da calota. Aos 90 dias pós-operatórios, observou-se o fechamento completo do defeito em todos os animais. Em alguns espécimes,

houve o restabelecimento quase completo das duas corticais, separadas por uma porção central medular (Fig. 5F). Em outros, o defeito estava preenchido por tecido ósseo trabecular maduro. Poucos remanescentes de partículas ósseas do enxerto estavam ainda presentes em algumas áreas. A estrutura óssea neoformada apresentou, na maioria dos espécimes, espessura semelhante àquela do osso original da calota.

Análises histométrica e estatística

As médias e os desvios-padrão da AON para os grupos C, OA e OA/PRP de 30 e 90 dias pós-operatórios, assim como os resultados da comparação entre os grupos, estão apresentados na Tabela 1 e na Fig. 6. Foi observada uma correlação estatisticamente significante entre a quantidade de plaquetas nas amostras de sangue periférico e de PRP ($r = 0,66$, $p = 0,0021$). Contudo, não foi observada uma correlação estatisticamente significante entre a quantidade de plaquetas nas amostras de PRP e a AON ($r = - 0,245$, $p = 0,3116$). Os resultados da análise estatística dos dados obtidos no teste de proliferação celular estão apresentados na Fig. 4.

Discussão

Estudos clínicos e em animais têm demonstrado que a associação do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) ao osso autógeno pode potencializar a formação óssea (Marx et al. 1998; Fennis et al. 2004). Contudo, outros autores não obtiveram resultados satisfatórios com a associação do PRP ao osso autógeno (Aghaloo et al. 2002; Choi et al. 2005). A necessidade de estudos usando protocolos padronizados para avaliar os reais efeitos biológicos do PRP tem sido enfatizada por Grageda et al. (2004) e Marx (2004).

A escolha do modelo animal e do sítio cirúrgico adequados é fundamental para que as avaliações obtidas sejam confiáveis e possam mimetizar, de forma reprodutível, os possíveis efeitos dos biomateriais em seres humanos (Hollinger & Kleinschmidt 1990). O coelho foi selecionado como modelo experimental no presente estudo por ter elementos figurados do sangue morfologicamente semelhantes ao dos humanos (Jain 1993) e por possibilitar a coleta de um volume de sangue suficiente para o preparo de um PRP autólogo (Efeoglu et al. 2004). A calvária foi selecionada por possuir várias similaridades com a região maxilo-facial e apresentar baixa capacidade regenerativa (Frame 1980; Dahlin et al. 1991). Além disso, um defeito de tamanho crítico (DTC) foi realizado, confirmado pela pequena e limitada formação óssea observada no Grupo C no presente estudo (Tabela 1), para permitir a avaliação da real influência do biomaterial no reparo ósseo (Hollinger & Kleinschmidt 1990).

A seleção de uma técnica adequada para o preparo do PRP é um outro aspecto de fundamental importância para uma avaliação confiável dos efeitos deste biomaterial. Neste trabalho, o PRP foi preparado segundo o protocolo do sistema PCCS II™. A primeira versão deste sistema, o PCCS, foi avaliada em estudos clínicos (Wiltfang et al. 2003; Raghoebar et al. 2005), animais (Wiltfang et al. 2004, Thorwarth et al. 2005) e laboratoriais (Weibrich et al. 2005; Leitner et al. 2006). Esses estudos laboratoriais demonstraram que o referido sistema apresentou as características ideais para o preparo do PRP, pois concentra as plaquetas em níveis adequados, requer um volume reduzido de sangue, é semi-automatizado e não danifica mecanicamente as plaquetas durante a centrifugação. Assim como a primeira versão deste sistema, que foi recomendada por Marx (2004) por proporcionar uma concentração de plaquetas considerada terapêutica, o sistema PCCS II™ utilizado no presente estudo manteve esta propriedade, como constatado pelo aumento constante e previsível do número de plaquetas nas amostras de PRP em relação as do sangue periférico (Fig. 3). Esta previsibilidade na concentração de plaquetas apresentada pelo sistema PCCS II™ pôde ser

confirmada pela correlação estatisticamente significante observada entre a quantidade de plaquetas nas amostras de sangue periférico e de PRP. Além dessa propriedade, o sistema PCCS II™ provavelmente também preservou a integridade da membrana das plaquetas durante o processamento do PRP, o que é fundamental para que as mesmas secretem fatores de crescimento em um estado bioativo (Marx 2004), como indicado pelos resultados favoráveis obtidos com a avaliação *in vitro* das propriedades mitogênicas do sobrenadante do PRP no presente estudo (Fig. 4).

Um aumento significativo na neoformação óssea foi observado no Grupo OA/PRP em relação ao Grupo OA, aos 30 dias pós-operatórios (Tabela 1). Estes dados corroboram os achados de estudos prévios, onde um aumento significativo na neoformação óssea somente pôde ser constatado nos períodos iniciais do reparo ósseo de DTC criados em crânios de mini-porcos (Wiltfang et al. 2004; Schlegel et al. 2004; Thorwarth et al. 2005; Thorwarth et al. 2006) e de defeitos ósseos segmentares realizados em mandíbulas de cães (Gerard et al. 2006). A maior quantidade de novo osso observado no Grupo OA/PRP, aos 30 dias, deveu-se, provavelmente, a um aumento na proliferação das células endoteliais (Fréchette et al. 2005), pré-osteoblastos (Gruber et al. 2006), osteoblastos (Choi et al. 2005; Ogino et al. 2006) e osteoclastos (Gruber et al. 2002) no sítio da ferida devido à ação do PRP. É interessante ressaltar que este aumento do número de osteoclastos deve ter contribuído para uma maior biodisponibilidade das proteínas morfogenéticas ósseas no microambiente da ferida cirúrgica (Marx & Garg 1998).

No período tardio de avaliação, os Grupos OA e OA/PRP apresentaram quantidades similares de osso neoformado (Tabela 1), com fechamento ósseo completo do defeito cirúrgico em todos os espécimes. Estes resultados corroboram os achados de um estudo animal recente realizado por Gerard et al. (2006). De fato, era de se esperar, no período final de avaliação, o fechamento ósseo completo do defeito cirúrgico com o uso do enxerto de osso autógeno,

considerado como “gold standard” para procedimentos de reconstrução óssea. Apesar da similaridade nos resultados finais do processo de reparo ósseo dos Grupos OA e OA/PRP, é importante ressaltar que o Grupo OA/PRP apresentou, já aos 30 dias pós-operatórios, uma quantidade de osso neoformado similar àquela observada no Grupo OA aos 90 dias pós-operatórios (Tabela 1). Isto significa que o uso do PRP acelerou o processo de reparo ósseo em aproximadamente duas vezes, corroborando os achados de Marx et al. (1998). Essa evolução mais rápida no processo de reparo ósseo do defeito cirúrgico pôde também ser observada na análise qualitativa dos espécimes aos 90 dias pós-operatórios, que evidenciou um reparo ósseo mais desenvolvido no Grupo OA/PRP, como observado pelo restabelecimento quase completo das corticais e porção central medular da calvária em alguns espécimes.

Grageda et al. (2004) sugeriram que se avaliasse a correlação entre a análise histomorfométrica e o número de plaquetas no PRP. No presente estudo, nenhuma correlação foi constatada entre a quantidade de plaquetas nas amostras de PRP e a AON. Considerando que o potencial regenerativo do PRP depende dos níveis dos fatores de crescimento, poder-se-ia inferir que este resultado suporta os achados de Weibrich et al. (2002), que demonstraram que tanto o número de plaquetas no PRP como no sangue periférico não podem confiavelmente predizer os níveis de fatores de crescimento resultantes no PRP. De acordo com esses autores, o conhecimento dos níveis de fatores de crescimento nas amostras de PRP é necessário para assegurar um uso confiável e reproduzível do PRP para tratamento clínico. Infelizmente, não há um procedimento simples disponível para obter estimativas pré-operatórias dos níveis de fatores de crescimento individuais em uma amostra de PRP. Portanto, estudos adicionais são necessários neste tópico.

Dentro dos limites deste trabalho, pode-se concluir que o PRP acelerou o processo de reparo do enxerto de osso autógeno em defeitos de tamanho crítico em calvária de coelhos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba (FOA) - UNESP na pessoa do seu Chefe de Departamento, Profª. Drª. Rita Cássia Menegati Dornelles, pela disponibilização do laboratório e pelo empréstimo de equipamentos necessários para a realização deste estudo; ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP, na pessoa do seu Chefe de Departamento, Profª. Drª. Carmem Veríssima Ferreira, por disponibilizar os recursos necessários para a realização dos testes *in vitro*; à Profª. Drª. Suely Regina Mogami Bomfim da Faculdade de Medicina Veterinária do Campus de Araçatuba – UNESP, pela assessoria técnica prestada e ao Prof. Dr. Tetuo Okamoto da FOA – UNESP, pelo auxílio na análise histológica.

Referências Bibliográficas

Aghaloo, T.L., Moy, P.K. & Freymiller, E.G. (2002) Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **60:** 1176-1181.

Aghaloo, T.L., Moy, P.K. & Freymiller, E.G. (2004) 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* **19**: 59-65.

Aghaloo, T.L., Moy, P.K. & Freymiller, E.G. (2005) Evaluation of platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone in the rabbit cranium. A pilot study. *Clinical Oral Implants Research* **16**: 250-257.

Choi, B.H., Im, C.J., Huh, J.Y., Suh, J.J. & Lee, S.H. (2004) Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **33**: 56-59.

Choi, B.H., Zhu, S.J., Kim, B.Y., Huh, J.Y., Lee, S.H. & Jung, J.H. (2005) Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation alveolar bone cells: an in vitro study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **34**: 420-424.

Christgau, M., Moder, D., Hiller, K.A., Dada, A., Schmitz, G. & Schmalz, G. (2006) Growth factors and cytokines in autologous platelet concentrate and their correlation to periodontal regeneration outcomes. *Journal of Clinical Periodontology* **33**: 837-845.

Dahlin, C., Alberius, P. & Linde, A. (1991) Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique. *Journal of Neurosurgery* **74**: 487-491.

Efeoglu, C., Akcay, Y.D. & Erturk, S. (2004) A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **62**: 1403-1407.

Fennis, J.P., Stoelinga, P.J. & Jansen, J.A. (2004) Mandibular reconstruction: a histological and histomorphometric study on the use of autogenous scaffolds, particulate cortico-cancellous bone grafts and platelet rich plasma in goats. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **33**: 48-55.

Frame, J.W. (1980) A convenient animal model for testing bone substitute materials. *Journal of Oral Surgery* **38**: 176-180.

Fréchette, J.P., Martineau, I. & Gagnon, G. (2005) Platelet-rich plasmas: growth factor content and roles in wound healing. *Journal of Dental Research* **84**: 434-439.

Gerard, D., Carlson, E.R., Gotcher, J.E. & Jacobs M. (2006) Effects of platelet-rich plasma on the healing of autologous bone grafted mandibular defects in dogs. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **64**: 443-451.

Grageda, E. (2004) Platelet-rich plasma and bone graft materials: a review and a standardized research protocol. *Implant Dentistry* **13**: 301-309.

Gruber, R., Kandler, B., Fischer, M.B. & Watzek, G. (2006) Osteogenic differentiation induced by bone morphogenetic proteins can be suppressed by platelet-released supernatant in vitro. *Clinical Oral Implants Research* **17**: 188-193.

Gruber, R., Karreth, F., Fischer, M.B. & Watzek, G. (2002) Platelet-released supernatants stimulate formation of osteoclast-like cells through a prostaglandin/RANKL-dependent mechanism. *Bone* 30: 726-732.

Hollinger, J.O. & Kleinschmidt, J.C. (1990) The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *The Journal of Craniofacial Surgery* **1**: 60-68.

Jain, N.C. (1993). The platelets. In: Lea & Febiger, eds. *Essentials of veterinary hematology*, 1st edition, p. 105. Philadelphia: Lea & Febiger.

Jung, R.E., Schmoekel, H.G., Zwahlen, R., Kokovic, V., Hammerle, C.H. & Weber, F.E. (2005) Platelet-rich plasma and fibrin as delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Clinical Oral Implants Research* **16**: 676-682.

Kim, E.S., Park, E.J. & Choung, P.H. (2001) Platelet concentration and its effect on bone formation in calvarial defects: an experimental study in rabbits. *The Journal of Prosthetic Dentistry* **86**: 428-433.

Leitner, G.C., Gruber, R., Neumuller, J., Wagner, A., Kloimstein, P., Hocker, P., Kormoczi, G.F. & Buchta, C. (2006) Platelet content and growth factor release in platelet-rich plasma: a comparison of four different systems. *Vox Sanguinis* **91**: 135-9.

Lynch, S.E., Colvin, R.B. & Antoniades, H.N. (1989) Growth factors in wound healing. Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. *The Journal of Clinical Investigation* **84**: 640-646.

Martineau, I., Lacoste, E. & Gagnon, G. (2004) Effects of calcium and thrombin on growth factor release from platelet concentrates: kinetics and regulation of endothelial cell proliferation. *Biomaterials* **25**: 4489-4502.

Marx, R.E. (2004) Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **62**: 489-496.

Marx, R.E., Carlson, E.R., Eichstaedt, R.M., Schimmele, S.R., Strauss, J.E. & Georgeff, K.R. (1998) Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral surgery, Oral Medicine, Oral pathology, Oral radiology, and Endodontics* **85**: 638-646.

Marx, R.E. & Garg, A.K. (1998) Bone structure, metabolism, and physiology: its impact on dental implantology. *Implant Dentistry* **7**: 267-276.

Melo, L.G., Nagata, M.J., Bosco, A.F., Ribeiro, L.L. & Leite, C.M. (2005) Bone healing in surgically created defects treated with either bioactive glass particles, a calcium sulfate barrier, or a combination of both materials. A histological and histometric study in rat tibias. *Clinical Oral Implants Research* **16**: 683-691.

Ogino, Y., Ayukawa, Y., Kukita, T. & Koyano, K. (2006) The contribution of platelet-derived growth factor, transforming growth factor-beta1, and insulin-like growth factor-I in platelet-rich plasma to the proliferation of osteoblast-like cells. *Oral surgery, Oral Medicine, Oral pathology, Oral radiology, and Endodontics* **101**: 724-729.

Oyama, T., Nishimoto, S., Tsugawa, T. & Shimizu, F. (2004) Efficacy of platelet-rich plasma in alveolar bone grafting. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **62**: 555-558.

Raghoebar, G.M., Schortinghuis, J., Liem, R.S., Ruben, J.L., van der Wal, J.E. & Vissink, A. (2005) Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? *Clinical Oral Implants Research* **16**: 349-356.

Sammartino, G., Tia, M., Marenzi, G., di Lauro, A.E., D'Agostino, E. & Claudio, P.P. (2005) Use of autologous platelet-rich plasma (PRP) in periodontal defect treatment after extraction of impacted mandibular third molars. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **63**: 766-770.

Schilephake, H. (2002) Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **31**: 469-484.

Schlegel, K.A., Donath, K., Rupprecht, S., Falk, S., Zimmermann, R., Felszeghy, E. & Wiltfang, J. (2004) De novo bone formation using bovine collagen and platelet-rich plasma. *Biomaterials* 25: 5387-5393.

Shanaman, R., Filstein, M.R. & Danesh-Meyer, M.J. (2001) Localized ridge augmentation using GBR and platelet-rich plasma: case reports. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* **21**: 345-355.

Simon, E.N., Merkx, M.A., Shubi, F.M., Kalyanyama, B.M. & Stoelinga, P.J. (2006) Reconstruction of the mandible after ablative surgery for the treatment of aggressive, benign odontogenic tumours in Tanzania: a preliminary study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **35**: 421-426.

Thorwarth, M., Rupprecht, S., Falk, S., Felszeghy, E., Wiltfang, J. & Schlegel, K.A. (2005) Expression of bone matrix proteins during de novo bone formation using a bovine collagen and platelet-rich plasma (prp)--an immunohistochemical analysis. *Biomaterials* **26**: 2575-2584.

Thorwarth, M., Wehrhan, F., Schultze-Mosgau, S., Wiltfang, J. & Schlegel, K.A. (2006) PRP modulates expression of bone matrix proteins in vivo without long-term effects on bone formation. *Bone* **38**: 30-40.

Vikjaer, D., Blom, S., Hjorting-Hansen, E. & Pinholt, E.M. (1997) Effect of platelet-derived growth factor-BB on bone formation in calvarial defects: an experimental study in rabbits. *European Journal of Oral Sciences* **105**: 59-66.

Weibrich, G., Kleis, W.K., Hafner, G., Hitzler, W.E. (2002) Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *Journal of Cranio-maxillo-facial Surgery* **30**: 97-102.

Weibrich, G., Kleis, W.K., Hitzler, W.E. & Hafner, G. (2005) Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma-rich-in-growth-factors kit to produce platelet-rich plasma: a technical report. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. **20**: 118-123.

Wiltfang, J., Kloss, F.R., Kessler, P., Nkenke, E., Schultze-Mosgau, S., Zimmermann, R. & Schlegel, K.A. (2004) 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* **15**: 187-193.

Wiltfang, J., Schlegel, K.A., Schultze-Mosgau, S., Nkenke, E., Zimmermann, R. & Kessler, P. (2003) Sinus floor augmentation with beta-tricalciumphosphate (beta-TCP): does platelet-rich plasma promote its osseous integration and degradation? *Clinical Oral Implants Research* **14**: 213-21.

Tabela

Tabela 1. Porcentagem média da Área de Osso Neoformado (AON) dentro da área do defeito cirurgicamente criado, com comparação entre os grupos. 30 e 90 dias pós-operatórios.

Grupo	n	Médias AON (%) 30 dias	Desvios-Padrão 30 dias	n	Médias AON (%) 90 dias	Desvios-Padrão 90 dias
C	10	8,99 a	± 2,62	10	5,31 a	± 1,69
OA	10	46,88 b	± 14,15	10	75,00 cd	± 8,11
OA/PRP	9	64,44 c	± 15,00	10	77,90 d	± 8,13

*Letras iguais indicam que não há diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

Figuras

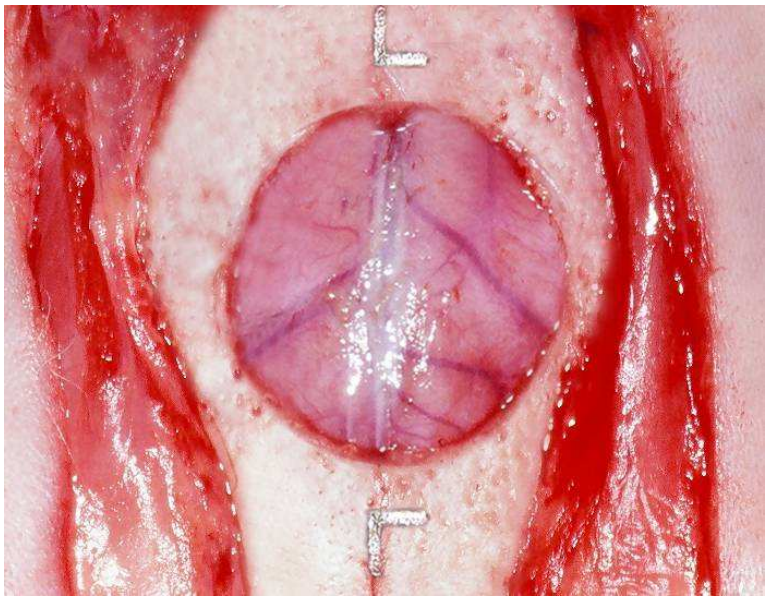

Figura 1. Defeito de tamanho crítico (15 mm de diâmetro) e as duas marcações de referência criados na calvária.

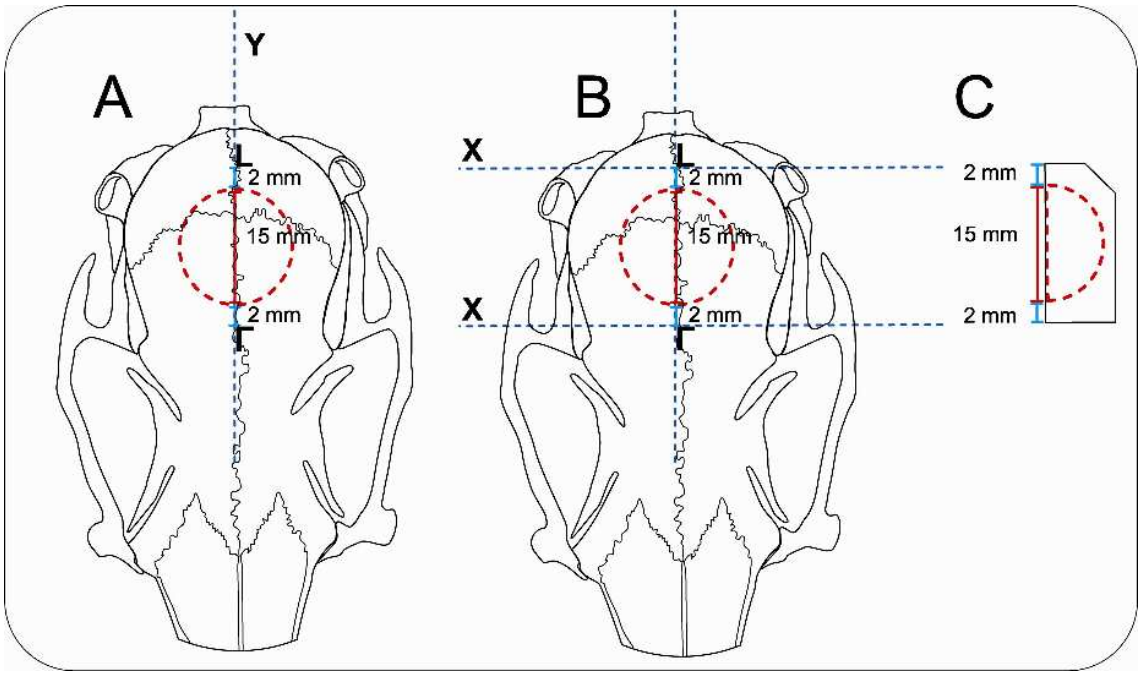

Figura 2. (A) Corte longitudinal ao longo da linha central (y) do DTC; (B) cortes tranversais (x); (C) espécime histológico pronto para inclusão em parafina.

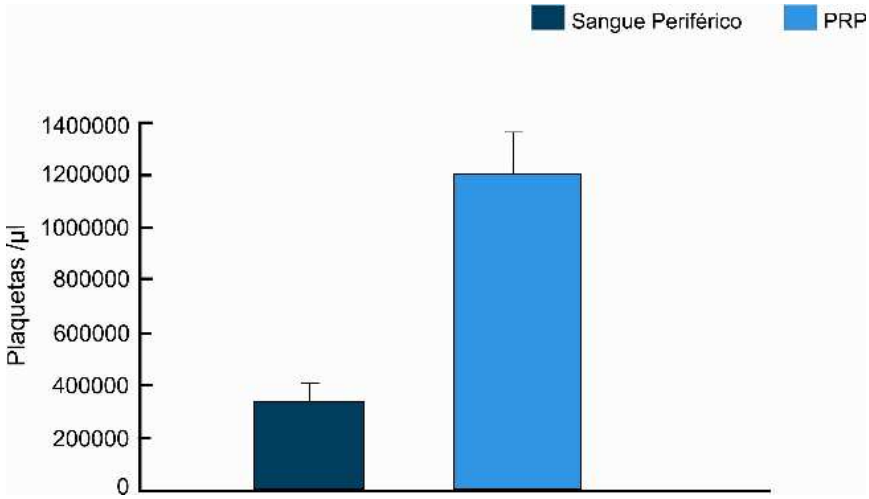

Figura 3. Quantidade média de plaquetas por microlitro (µl) nas amostras de PRP e de sangue periférico.

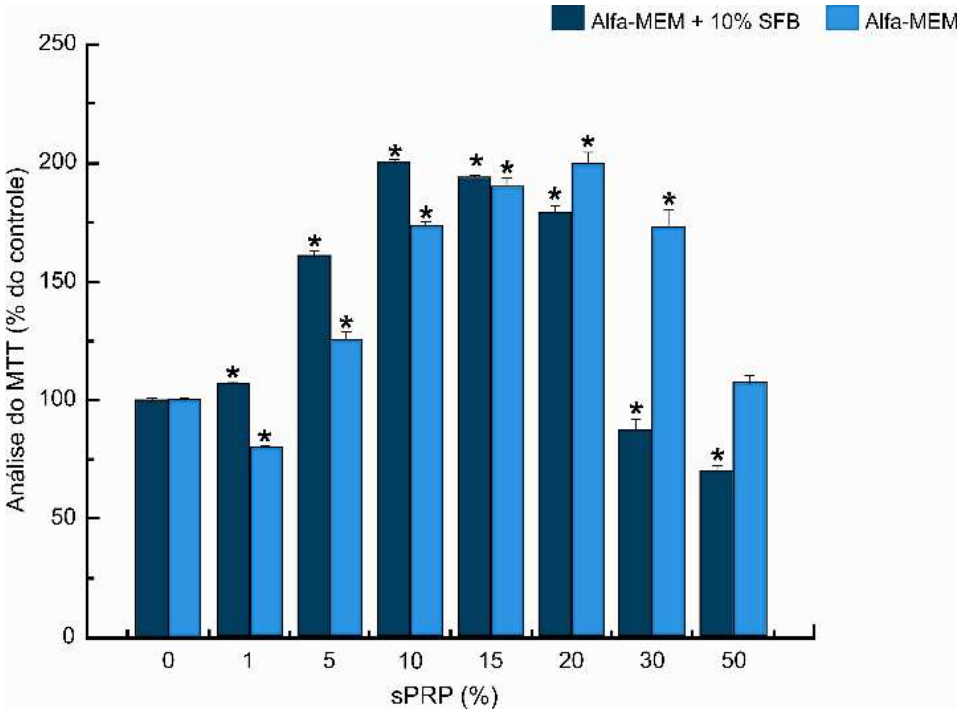

Figura 4. Efeito da concentração do sPRP sobre a proliferação dos pré-osteoblastos MC3T3-E1 (72 horas). *$p < 0.05$ em relação aos controles (Análise de Variância; teste de Dunnett).

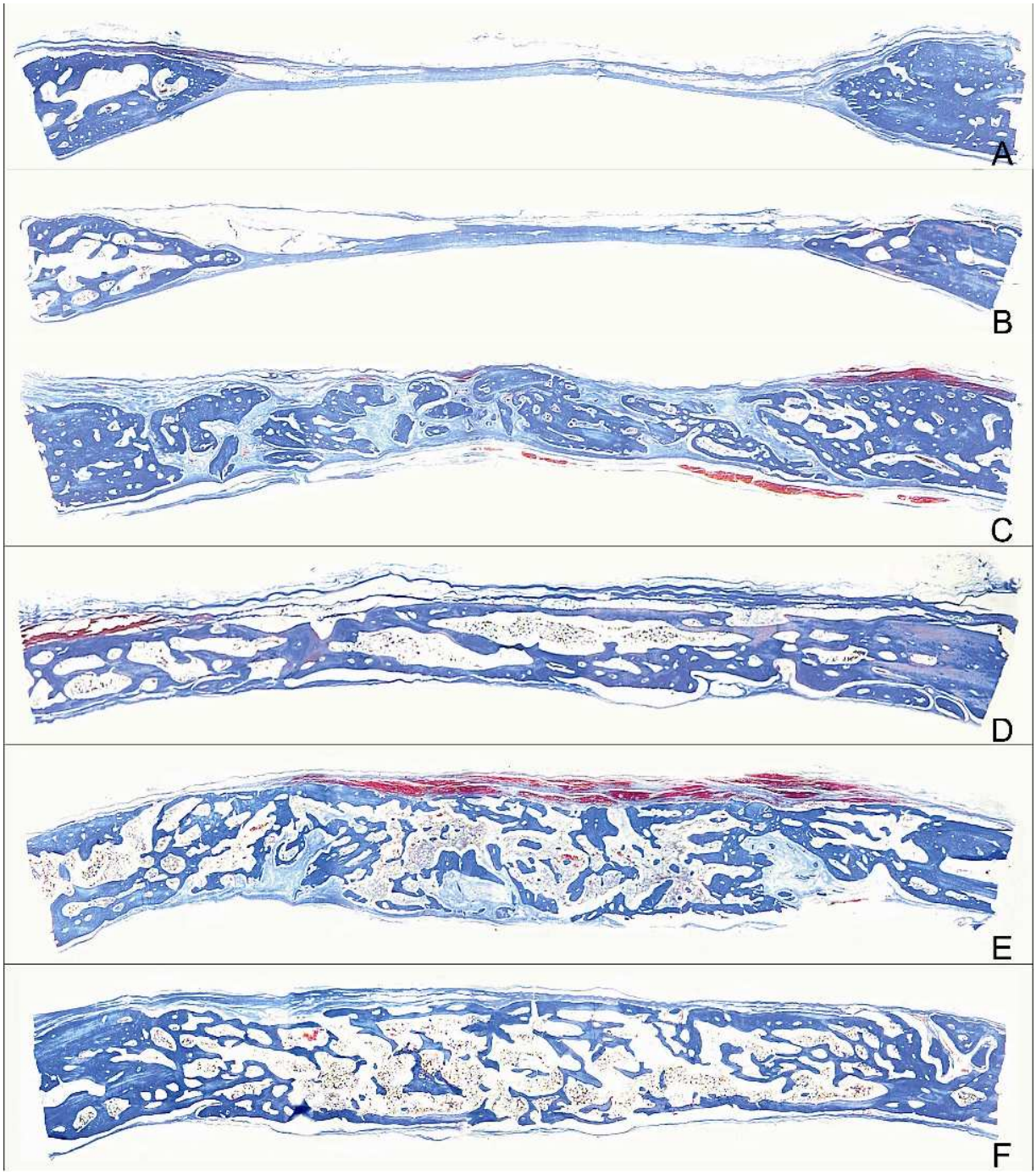

Figura 5. Vistas panorâmicas dos defeitos cirúrgicos mostrando osso neoformado. (A) Grupo C - 30 dias; (B) Grupo C - 90 dias; (C) Grupo OA - 30 dias; (D) Grupo OA - 90 dias; (E) Grupo OA/PRP - 30 dias; (F) Grupo OA/PRP - 90 dias. Tricrômico de Masson. Aumento original 25x.

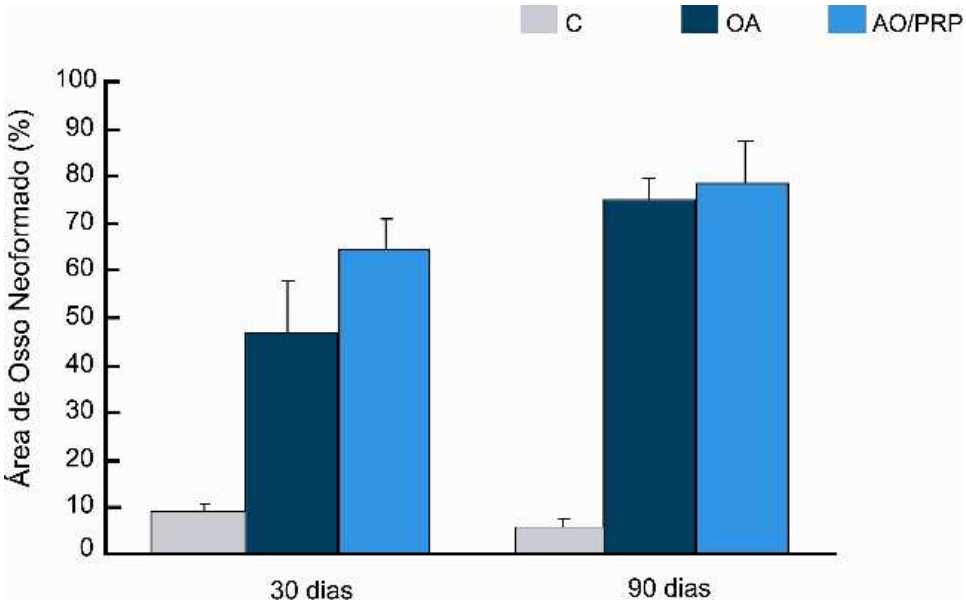

Figura 6. Médias (%) e desvios-padrão da AON para os Grupos C, OA e OA/PRP. 30 e 90 dias pós-operatórios.

ANEXOS

ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Projeto **"AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE REPARO ÓSSEO EM CAVIDADES CIRÚRGICAS PREENCHIDAS COM OSSO AUTÓGENO ASSOCIADO OU NÃO AO PLASMA RICO EM PLAQUETAS. ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA EM CRÂNIOS DE COELHOS "** sob responsabilidade de **Maria José Hitomi Nagata e Luiz Gustavo Nascimento de Melo** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado, de acordo com o protocolo nº 01/05.

Araçatuba, 09 de abril de 2005.

Prof.ª Ass. Dr.ª Maria Gisela Laranjeira
Presidente

Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária – DEPARTAMENTO DE CLÍNICA, CIRURGIA E REPRODUÇÃO ANIMAL – Rua Clóvis Pestana, 793 CEP 16050-680 Araçatuba – SP
Tel (18) 3636-3295 Fax (18) 3622-4542 E-mail: laranjei@fmva.unesp.br

ANEXO B - Normas para Publicação Segundo o Periódico “Clinical Oral Implants Research”

Blackwell Publishing

CLINICAL ORAL IMPLANTS RESEARCH

Clinical Oral Implants Research

Official publication of the European Association for Osseointegration

Edited by:
Niklaus P. Lang

Print ISSN: 0905-7161
Online ISSN: 1600-0501
Frequency: Bi-monthly
Current Volume: 18 / 2007
ISI Journal Citation Reports® Ranking: 2005: 13/49 (Dentistry, Oral Surgery & Medicine); 11/41 (Engineering, Biomedical)
Impact Factor: 1.897

Author Guidelines

From December 1st 2005 all print (hard) copy submissions will be returned to the author and will not be accepted for review. Online Submission is now available and submissions will be welcomed. **http://mc.manuscriptcentral.com/coir**

Complete instructions for preparing and submitting manuscripts online are provided at the submission site. The review process is entirely electronic-based.

Editorial Office:
Clinical Oral Implants Research
Department of Comprehensive Dental Care
University of Berne
School of Dental Medicine
Freiburgstrasse 7
CH-3010 Berne
Switzerland
Editorial Assistant Ms. Brigitte Baur:

coir@zmk.unibe.ch

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work has not been published before, is not being considered for publication elsewhere and has been read and approved by all authors. The submission of the manuscript by the authors means that the authors automatically agree to assign exclusive copyright to Blackwell Munksgaard if and when the manuscript is accepted for publication. An Exclusive Licence Form has to be returned to the production department signed on behalf of all co-authors. An article will not proceed in production before the Exclusive Licence Form has been received at the production office.**The Exclusive Licence Form can be downloaded at www.blackwellpublishing.com/clr** or **http://mc.manuscriptcentral.com/coir** under 'Instructions and Forms'.

Please send the form to:

Clinical Oral Implants Research
Blackwell Publishing
101 George Street
Edinburgh
EH2 3ES
UK
Fax: +44 (0)131 2263803

The work shall not be published elsewhere in any language without the written consent of the publisher. The articles published in this journal are protected by copyright, which covers translation rights and the exclusive right to reproduce and distribute all of the articles printed in the journ No material published in the journal may be stored on microfilm or videocassettes or in electro databases and the like or reproduced photographically without the prior written permission of t publisher.

The instructions to authors will be strictly adhered to by the Editor. Manuscripts otherwise prepared will be returned to the authors for revision prior to review.

Acceptable material - Original investigations, reviews, and case reports. The last will be published only if they provide new fundamental knowledge and if they use language understandable to the clinician. Proceedings of international meetings may also be considered for publication at the discretion of the Editor.

Electronic submission: Authors must submit their manuscripts electronically to the online submission site: **http://mc.manuscriptcentral.com/coir** Complete instructions for preparing and submitting manuscripts online are provided at the submission site. Authors are notified promptly by e-mail that their manuscripts have been received. If this acknowledgement is not received within a week or so then authors should enquire at the editorial office: Editorial Assistant Ms. Brigitte Baur: **coir@zmk.unibe.ch**

Manuscripts - The author is responsible for all statements made in the work, including changes made by the copy editor, which must be reviewed in proof. Manuscripts must be written in English. Articles should not normally exceed 10 printed pages, including illustrations and references. One printed page is the equivalent of 3.8 typed double-spaced pages using a 12-pitch font (12 characters per inch). Additional pages will be charged to the author(s) at the rate of DKK 800 per page. The author must list 5 appropriate key words for indexing purposes. The Online Submission System offers a list of keywords to choose from and additional keywords can be manually added.

The article should be clearly divided as follows:

Title page - The first page should contain the title of the article, full name(s) of the authors (no more than 6) and institutional affiliation(s), a running title not to exceed 60 letters and spaces, and the name, telephone and fax numbers, email and complete mailing address of the author responsible for correspondence. The author must list appropriate key words for indexing purposes.

Abstract - An abstract should not to exceed 250 words. This should be structured into: objectives - material and methods - results - conclusions, and no other information.

Introduction - Summarise the rationale and purpose of the study, giving only strictly pertinent references. Do not review existing literature extensively. State clearly the working hypothesis.

Material and methods - Material and methods should be presented in sufficient detail to allow confirmation of the observations. Published methods should be referenced and discussed only briefly, unless modifications have been made. Indicate the statistical methods used, if applicable.

Results - Present your results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all data in the tables and illustrations. The important observations should be emphasised.

Discussion - Summarise the findings without repeating in detail the data given in the Results section. Relate your observations to other relevant studies and point out the implications of the findings and their limitations. Cite other relevant studies.

Acknowledgements - Acknowledge persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. Sources of financial support may be acknowledged.

Short communications -Short communications, limited to two printed pages including illustrations and references, will be considered for rapid publication. Such papers must be based on work that is of special importance or has the potential for great impact. Short communications need not follow the usual division into Material and methods, etc., but should have an abstract.

References - in the text should quote the last name(s) of the author(s) and the year of publication (Black & Miller 1988). Three or more authors should always be referred to as, for example, (Fox et al. 1977).

A list of references should be given at the end of the paper and should follow the recommendations in *Units, symbols and abbreviations: a guide for biological and medical editors and authors* (1988), p. 52, London: The Royal Society of Medicine.

a) The arrangement of the references should be alphabetical by author's surname.

b) The order of the items in each reference should be:

(i) for journal references:
name(s) of author(s), year, title of paper, title of journal, volume number, first and last page numbers.
(ii) for book references:
name(s) of author(s), year, title of book, edition, volume, chapter and/ or page number, town of publication, publisher.

c) Author's names should be arranged thus:
Daniels, J.A., Kelly, R.A. & Til, T.C.

Note the use of the ampersand and omission of comma before it. Author's names when repeated in the next reference are always spelled out in full.

d) The year of publication should be surrounded by parentheses: (1966).

e) The title of the paper should be included, without quotation marks.

f) The journal title should be written in full, italicised (single underlining on typescript), and followed by volume number in bold type (double underlining on typescript), and page numbers.

Examples - Tonetti, M. S., Schmid, J., Hämmerle,C. H. & Lang, N. P. (1993) Intraepithelial antigen-presenting cells in the keratinized mucosa around teeth and osseointegrated implants. *Clinical Oral Implants Research* 4: 177-186.

Poole, B., Ohkuma, S. & Warburton, M. (1978) Some aspects of the intracellular breakdown of erogenous and endogenous proteins. In: Segal, H.S. & Doyle, D.J., eds. *Protein turnover and lysosome function,* 1st edition, p. 43. New York: AcademicPress.

Illustrations - All figures should clarify the text and their number should be kept to a minimum. Details must be large enough to retain their clarity after reduction in size. Illustrations should preferably fill a single-column width (81mm) after reduction, although in exceptional cases 120mm (double-column) and 168mm (full page) widths will be accepted. Micrographs should be designed

to be reproduced without reduction, and they should be dressed directly on the micrograph with a linear size scale, arrows, and other designators as needed.

Line drawings should be professionally drawn; halftones should exhibit high contrast. Colour illustrations in small numbers may be accepted free of charge to the authors at the discretion of the Editor. Please find the Electronic Artwork Guidelines on the Blackwell Publishing Author Service website
http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/author.asp

Tables - Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals. Type each table on a separate sheet, with titles making them self-explanatory. Due regard should be given to the proportions of the printed page.

Scientific names - Proper names of bacteria should be binomial and should be singly underlined on the typescript. The full proper name (e.g., *Streptococcus sanguis)* must be given upon first mention. The generic name may be abbreviated thereafter with the first letter of the genus (e.g., *S. sanguis).* If abbreviation of the generic name could cause confusion, the full name should be used. If the vernacular form of a genus name (e.g., streptococci) is used, the first letter of the vernacular name is not capitalised and the name is not underlined. Use of two letters of the genus (e.g., *Ps. for Peptostreptococcus)* is incorrect, even though it might avoid ambiguity. With regard to drugs, generic names should be used instead of proprietary names. If a proprietary name is used, it must be attached when the term is first used.

Abbreviations and symbols - The symbol % is to be used for percent, h for hour, min for minute, and s for second. *In vitro, in vivo, in situ* and other Latin expressions are to be italicised. Use only standard abbreviations. All units will be metric. Use *no roman* numerals in the text. In decimals, a decimal point and not a comma will be used. Avoid abbreviations in the title. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement. In cases of doubt, the spelling orthodoxy of *Webster's third new international dictionary* will be adhered to.

Author material archive policy - Please note that unless specifically requested, Blackwell Publishing will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible if you have not yet done so.

Proofs - The corresponding author will receive an e-mail alert containing a link to a web site. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following web site:
http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html
This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately.

Offprints - The senior authors will receive a PDF offprint of their article. Additional hard copy offprint can be ordered from the publisher by using the offprint order form accompanying the proofs when page proofs are returned.

NEW: Online production tracking is now available for your article through Blackwell's Author Services.
Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit **www.blackwellpublishing.com/bauthor** for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

ANEXO C - Figuras e Tabelas Adicionais

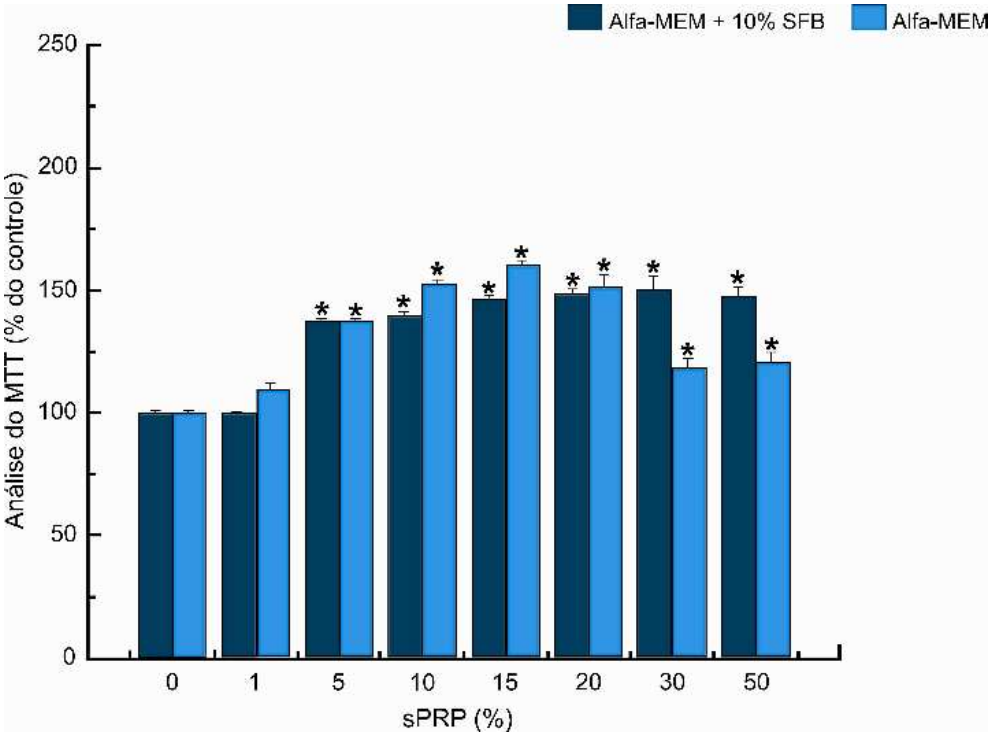

Figura 7. Efeito da concentração do sPRP sobre a proliferação dos pré-osteoblastos MC3T3-E1 (24 horas). *p < 0.05 em relação aos controles (Análise de Variância; teste de Dunnett).

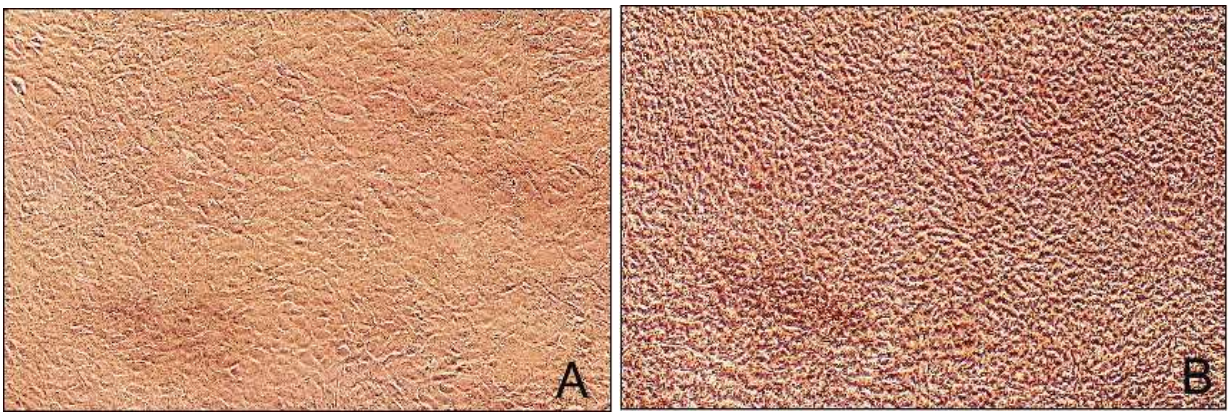

Figura 8. Cultura de pré-osteoblastos MC3T3-E1 (72 horas). (A) Alfa-MEM +10% SBF; (B) (A) Alfa-MEM + 10% SBF + 10% sPRP.

Tabela 2. Teste de Correlação de Pearson para a quantidade de plaquetas presentes nas amostras de sangue periférico e de Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

Grupo	Médias	Desvio-Padrão	n	r = 0,66
Plaquetas (Sangue Periférico)	327833	73608	19	p valor = 0,0021
Plaquetas (PRP)	1204028	369875	19	

Tabela 3. Teste de Correlação de Pearson para a quantidade de plaquetas presentes nas amostras de Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e a Área de Osso Neoformado (AON)

Grupo	Médias	Desvio-Padrão	n	r = - 0,245
Plaquetas (PRP)	1204028	369875	19	p valor = 0,3116
Área de Osso Neoformado	71,80	13,09	19	

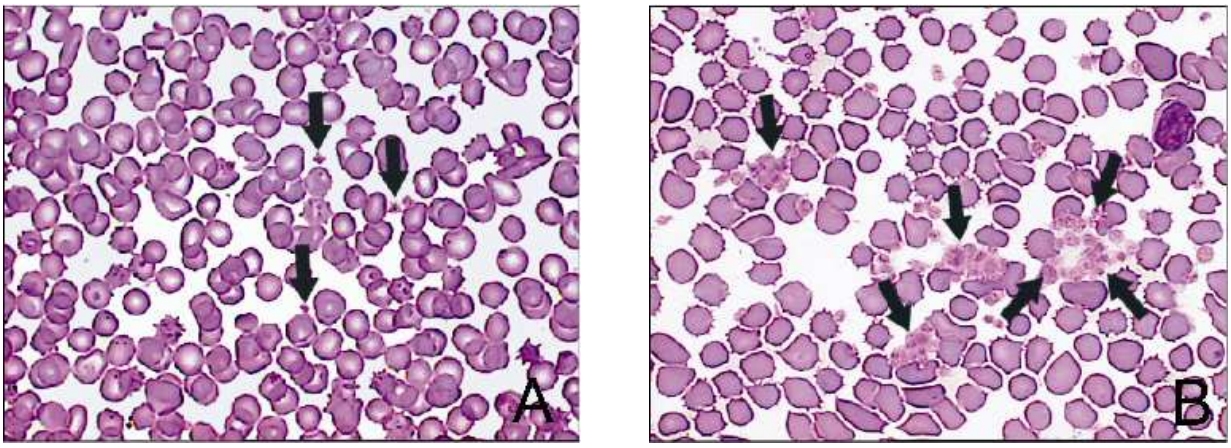

Figura 9. Esfregaço de amostra de sangue periférico (A) mostrando menor número de plaquetas (setas) que o esfregaço de amostra de PRP (B). Panótico. Aumento de 1000x.

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