



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



## **Estudo sobre o processo de incorporação de enxertos ósseos na mandíbula de coelhos**

**MIGUEL GUSTAVO SETÚBAL ANDRADE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Imunologia.

**Professor Doutor MOYSÉS SADIGURSKY**  
Orientador

Salvador (BA), junho de 2007

Ficha Catalográfica elaborada pela

***Biblioteca do ICS / UFBA – Salvador – Bahia***

A553 Andrade, Miguel Gustavo Setúbal,

Estudo sobre o processo de incorporação de enxertos ósseos na mandíbula de coelhos / Miguel Gustavo Setúbal Andrade. – Salvador, 2007.

175 f.; il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2007.

Orientador: Prof. Dr. Moysés Sadigursky.

1. Transplante autólogo. 2. Transplante alogênico. 3. Regeneração óssea . 4. Transplante Ósseo. 5. Criopreservação. 6. Plasma Rico em Plaquetas. 7. Imunologia. I. Sadigursky, Moysés. II. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 616-089.843

***FOLHA DE APROVAÇÃO***

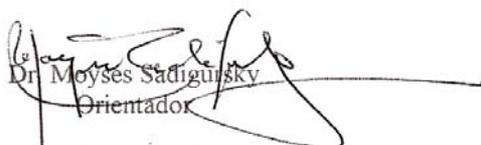


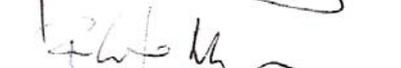
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA

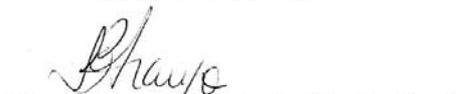


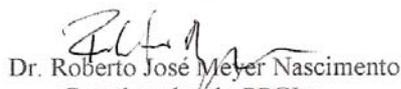
ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA PARA JULGAMENTO DA TESE DE DOUTORADO DO ALUNO MIGUEL GUSTAVO SETÚBAL ANDRADE.

Aos cinco dias do mês de junho do ano de dois mil e sete, às 14h00, no auditório Ophélia Gaudenzi no terceiro andar do Instituto de Ciências da Saúde, em sessão pública, reúne-se a Banca Examinadora composta pelos Professores: Dr. Moyses Sadigursky Orientador, Dr. Arlei Cerqueira, Dr. Roberto José Meyer Nascimento, Dr. Urbino da Rocha Tunes e Dra. Iguaracyra Barreto de Oliveira Araújo, com a finalidade de discutir, avaliar e julgar o trabalho de Tese intitulado: “**Estudo Sobre o Processo de Incorporação de Enxertos Ósseos na Mandíbula de Coelhos**” do pós-graduando **MIGUEL GUSTAVO SETÚBAL ANDRADE**. Após a apresentação, foram feitos os comentários pelos examinadores. Havendo cumprido as exigências para a defesa, a Banca Examinadora conclui que o pós-graduando teve a sua defesa de Tese de Doutorado APROVADA, emitindo pareceres individuais que serão anexados à ata. Nada mais havendo a tratar, encerra-se a sessão, da qual é lavrada a presente ata que após lida e aprovada vai assinada pelas componentes da Banca examinadora, pelo Doutorando e pelo Coordenador do Programa de Pós-Graduação. Salvador, 05 de junho de 2007.

  
Dr. Moyses Sadigursky  
Orientador

  
Dr. Roberto José Meyer Nascimento  
Banca Examinadora

  
Dra. Iguaracyra Barreto de Oliveira Araújo  
Banca Examinadora

  
Dr. Roberto José Meyer Nascimento  
Coordenador do PPGIm

  
Dr. Arlei Cerqueira  
Banca Examinadora

  
Dr. Urbino da Rocha Tunes  
Banca Examinadora

  
Miguel Gustavo Setúbal Andrade  
Doutorando

***DEDICATÓRIA***

## **DEDICATÓRIA**

***Aos meus pais, Evaristo e Alice.*** Ao ler a história de vocês eu me vejo lendo o *making off* da minha história e a de meus irmãos. Obvio, vocês dedicaram suas vidas a nós. Tudo que posso fazer em retribuição é, além de dispensar carinho e cuidado a vocês, dedicar o que tenho feito de mais grandioso em minha vida. Essa tese é um dos melhores exemplos disso. Tomara que eu consiga ser para meus filhos ao menos a metade do exemplo de pais que vocês tem sido para mim. Para concluir deixo a mesma frase do Dalai Lama que dediquei a vocês na dissertação:

*“Então quando nosso último dia chegar, poderemos olhar para trás e ver que vivemos vidas plenas, produtivas e significativas, o que nos trará algum conforto.”*

***O caminho da tranquilidade***  
***Dalai Lama***

***Ao Prof Moysés Sadigursky.*** Também lhe dedico esta tese, pois ele é fruto de sua confiança em mim. Não posso chamar-lhe simplesmente de amigo, seria pouco, por isso dedico-lhe este soneto, que reflete bem mais meu sentimento pela sua doçura, singeleza e compromisso.

*A vós correndo vou, braços sagrados*  
*Nessa cruz sacrossanta descobertos*  
*Que, para receber-me, estais abertos,*  
*E, por não castigar-me, estais cravados.*

*A vós, divinos olhos, eclipsados*  
*De tanto sangue e lágrimas abertos,*  
*Pois, para perdoar-me, estais despertos,*  
*E, por não condenar-me, estais fechados.*

*A vós, pregados pés, por não deixar-me,*  
*A vós, sangue vertido, para ungir-me,*  
*A vós, cabeça baixa, p'ra chamar-me*

*A vós, lado patente, quero unir-me,*  
*A vós, cravos preciosos, quero atar-me,*  
*Para ficar unido, atado e firme.*

***Buscando a Cristo,***  
***Gregório de Matos Guerra, Século XVII***

***AGRADECIMENTOS***

## **AGRADECIMENTOS**

**A Deus.** Primeiro vou agradecer, mas depois, como todo “bom cristão”, vou voltar a pedir. Muito obrigado pela força que tive, pela inspiração, e pela paciência dos amigos e familiares. Mas, vou continuar pedindo como fazia o papa João Paulo II. Mande-me Vosso Espírito Santo. Ele sabe melhor do que eu tudo que tenho que Te agradecer e Te pedir. Ah, também quero agradecer pelas *waves* que muito me ajudaram nesse período, valeu quinta-essência dos surfistas.

**Ao Professor Márcio Marchionni** pela amizade forte e eterna e pelo companheirismo incondicional.

**À Professora Dra Sílvia Reis** um grande e eterno carinho, respeito, admiração. Muito obrigado.

**A Fernanda Ribeiro** um grande amor que nasceu no fim deste trabalho.

**À Professora Dra Maria das Graças Vieira** que muito me ajudou nas colorações e imunomarcações e pela longa amizade.

**À Dra Camila Neves Sá** fiel escudeira neste trabalho, pelo apoio e ajuda inestimável no experimento.

**A Juçara Andrade** pela sua ajuda com meu material, pela divertidíssima companhia e pela amizade.

**Ao Professor Dr Urbino Tunes** pelo inestimável apoio em diversas decisões envolvendo esse experimento.

**À Professora Dra Maria Luiza Soliani** pelo imensurável apoio em relação ao biotério, e pela sua grande gentileza.

**Ao professor Dr Eduardo Café** pela incondicional cessão do Núcleo de Pesquisa em Cirurgia Experimental.

**Ao Dr Cláudio Brandão** pela acessoria nos aspectos biológicos e padronização do PRP, aferição das células do sangue e princípios de coagulação.

**Ao Professor Dr Luiz Erlon Rodrigues** pelo empréstimo da centrífuga e de outros equipamentos do seu laboratório e pela amizade construída.

**À Professora Cláudia Valle** pela indispensável assessoria veterinária e pela amizade que construímos.

**A JP Farmacêutica SA,** pelo presente do ACD fórmula A.

**A Dra Paula Regina Santana Moreira** pela ajuda na padronização dos protocolos de coleta do sangue.

**A Dr Carlos André** pela assessoria com a anestesia dos coelhos.

*A **Technicare*** pela doação dos parafusos.

*A **Gilson Soldera, da SETE*** pelas esterilizações em óxido de etileno dos sacos para congelamento do osso que foi usado como enxerto alógeno.

*À **sra Eliene Alpoim*** pela presteza em acondicionar, autoclavar e arrumar todo material e instrumental dessa pesquisa.

*À **Professora Ana Maria Salgado Lobo*** pela correção ortográfica e sintática desta tese.

*A **Lorena, Eliane, Luciana e Tereza, Raimunda, Verônica, Jacira, Carlos e especialmente Lourdes*** pela amizade que fizemos nas minhas visitas ao laboratório e pela paciência no manuseio de minhas amostras e material.

*A **Rodrigo de Oliveira*** muito obrigado pelo zelo e cuidado com essas imunomarcações.

*A **Euniciana, Ana Meire, Maurício*** pela presteza em disponibilizar o Núcleo de Cirurgia Experimental e gerenciamento do bem-estar dos coelhos

*À **Professora Dra Sílvia Sardi*** pela alocação dos enxertos nos frezeres.

*À **Professora Dra Thereza Bittencourt*** pela análise e assessoria estatística.

*À **Professora Dra Marília Gerhardt*** pelo incentivo e incansável cobrança desta tese.

*Aos meus alunos da **Graduação e da Pós-graduação em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial***, que apesar de não ter me ausentado fisicamente em qualquer momento, por muitas vezes, minhas preocupações estavam voltadas para este trabalho.

*Aos meus colegas de disciplina e grandes amigos, professores **Eduardo Azoubel, Arlei Cerqueira, Fernando Bastos, Carlos Elias, Alena Medrado, Gabriela Martins, Sandra Sardinha*** pela amizade e apoio recebido.

*Ao colega e amigo **Prof Dr Getúlio Nogueira***, pelo empréstimo do microscópio e apoio incondicionais.

*Ao **Programa de Pós-graduação em Imunologia e todos os seus professores*** pela minha formação e por este passo importante em minha carreira e minha vida.

*À **Universidade Federal da Bahia*** pela minha formação na graduação e na pós-graduação e especialmente pela Rede UFBA e os excelentes serviços prestados.

*À **CAPES*** pela página de periódicos de onde vieram todos os artigos desta revisão.

*À **FAPESB*** pelo inestimável apoio financeiro a este projeto. Longa vida a essa Fundação!

*À **Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências*** meu lar enquanto docente, pelo apoio na cessão do biotério e de alguns animais usados nesse experimento e pelo alento que sinto em servir-lhe como professor.

*Ao **Hospital da Cidade*** pelo apoio na leitura dos parâmetros do sangue total e do PRP.

*A **todos meus amigos e familiares*** pelo apoio, paciência e consistência da amizade.



## **RESUMO**

A enxertia dos maxilares com osso córtico-medular aposicionado condiciona o rebordo para receber implantes de titânio. O osso alógeno congelado tem conquistado espaço por eliminar a necessidade de área doadora. Clinicamente, os enxertos aposicionados sofrem absorção, e o plasma rico em plaquetas (PRP) poderia minimizar esse fenômeno. Nesta tese, foram realizadas três pesquisas. A principal delas estudou a incorporação de enxertos autógenos e alógenos aposicionados à mandíbula de coelho em associação ou não com PRP. As alterações que o congelamento promoveu no osso e o processo de preparação do PRP também foram investigados. Utilizaram-se 54 coelhos. Enxertos córtico-medulares foram removidos do osso ilíaco e aposicionados bilateralmente à cortical externa da mandíbula. Parte dos animais recebeu osso autógeno fresco e outra parte recebeu osso alógeno congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 120 dias. Em um lado da mandíbula, foi colocado PRP. A eutanásia ocorreu após 3, 7, 14, 28 e 56 dias. A diferença entre os grupos foi ponderada pelo teste de Bonferroni. O osso alógeno foi menos absorvido, mais osteogênico e fibrogênico que o osso autógeno. Sua cortical estava mais espessa e ele induziu maior quimiotaxia de macrófagos e osteoclastos. O PRP, apesar de melhorar, não interferiu significativamente nessas variáveis. Não houve reação de células T e B contra os enxertos. O efeito da criopreservação foi analisado no osso congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $-70^{\circ}\text{C}$  por 30, 60, 90 e 120 dias e foi comparado ao osso fresco. A diferença foi estimada pelo teste de Tukey. O congelamento aumentou a área das células e dos núcleos na medular e diminuiu a área dos núcleos da cortical. O colágeno da cortical desnaturou com a diminuição da temperatura e o aumento do tempo de congelamento. Essas alterações só comprometeram a morfologia do tecido após 90 ou 120 dias na temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ . O sangue total e o PRP foram comparados pelo teste de correlação de Pearson. A plaquetometria do PRP não dependeu dos eritrócitos e do plasma pobre em plaquetas removidos, mas do hematócrito e da plaquetometria do sangue total. O hematócrito do PRP não interferiu na sua plaquetometria e leucometria, que foi dependente da leucometria inicial. Concluiu-se que o osso alógeno congelado foi bom material para enxertia aposicionada dos maxilares e não induz uma rejeição imunológica. O PRP apresentou apenas uma tendência em melhorar o reparo de enxertos aposicionados, e o congelamento foi eficaz em diminuir a antigenicidade do osso.

**Palavras-chave:** Transplante Autólogo; Transplante Alogênico; Regeneração Óssea; Transplante Ósseo; Criopreservação; Plasma Rico em Plaquetas; Imunologia.

***ABSTRACT***

## ***ABSTRACT***

Maxillary reconstruction with onlay corticalcancellous bone grafts conditions alveolar ridge before receiving titanium implants. Alogenous frozen bone has received special attention since it eliminates the necessity of a surgery at a donor area. Clinically, onlay grafts suffer a absorption and platelet rich plasma (PRP) could minimize this phenomenon. In this thesis, three researches were elaborated. The major one studied the biology of onlay bone grafted at rabbit mandible, in association or not with PRP. The modification that freezing promoted in bone and PRP preparation process has also been investigated. Fifty-four rabbits were used. Corticalcancellous grafts were removed from the iliac bone and grafted bilaterally at the mandible external cortical after receptor bed conditioning. Part of the animals received autogenous fresh bone and another part received alogenous bone after freezing at  $-70^{\circ}\text{C}$  during 120 days. One side of mandible received PRP. Euthanasia occurred after 3, 7, 14, 28 and 56 days. The differences among the groups were analyzed by Bonferroni test. Alogenous bone was less absorbed and induced more osteogenesis and fibrogenesis than the autogenous bone. Its cortical was thicker and it induced greater macrophage and osteoclasts chemotaxis. PRP improved, however, did not interfere, in a significant manner, with these variables. There was no reaction of T and B cells against bone grafts. In order to study cryopreservation effects, bone fragments were frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  and  $-70^{\circ}\text{C}$  during 30, 60, 90 and 120 days. Bone freezing increased cellular and nuclear areas at cancellous bone and diminished nuclear area at the cortical bone. Cortical bone collagen suffered desnaturation proportionally to temperature decrease and to freezing duration. These alterations compromised the morphology of tissues after 90 or 120 days of freezing at the temperature of  $-70^{\circ}\text{C}$ . Whole blood and PRP were compared by Pearson correlation test. PRP platelet count was not dependent on erythrocytes and poor platelet plasma harvested, but, on whole blood hematocrit and platelet count. PRP hematocrit did not interfere at its platelet concentration even at its leukocyte count that was dependent on whole blood leukocyte count. It was possible to conclude that frozen alogenous bone was a good material for onlay bone graft of the jaws and does not induce immunologic rejection. PRP presented only a trend to improve the repair of onlay bone grafts and freezing was efficient in reducing bone antigenicity.

**Key-words:** Autologous Transplant; Alogenic Transplant; Bone Regeneration; Bone Transplantation; Cryopreservation; Platelet-Rich Plasma; Immunology.



## SUMÁRIO

<b>FOLHA DE APROVAÇÃO</b> .....	III
<b>DEDICATÓRIA</b> .....	V
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	VII
<b>RESUMO</b> .....	X
<b>ABSTRACT</b> .....	XII
<b>LISTA DE TABELAS, GRÁFICOS, FIGURAS E ABREVIATURAS</b> .....	XX
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	XXI
<b>LISTA DE GRÁFICOS</b> .....	XXII
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	XXIV
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	XXVI
<b>1. Introdução</b> .....	página 27
<b>2. Objetivos</b> .....	página 32
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	página 33
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	página 33
<b>2.2.1 Almejados em relação à avaliação do comportamento biológico dos enxertos aposicionados</b> .....	página 33
<b>2.2.2 Almejados em relação ao processo de congelamento do osso</b> .....	página 33
<b>2.2.3 Almejados em relação ao preparo do PRP</b> .....	página 34
<b>3 Revisão de literatura</b> .....	página 35
<b>3.1 Considerações gerais</b> .....	página 36
<b>3.2 Osteoimunologia</b> .....	página 36
<b>3.2.1 O papel do MHC nas enxertias ósseas</b> .....	página 36
<b>3.2.2 Atividade efetora contra o enxerto alógeno</b> .....	página 38
<b>3.2.3 Citocinas liberadas após o reconhecimento do enxerto</b> .....	página 39
<b>3.2.4 Resposta humoral contra os enxertos</b> .....	página 40

3.2.5	<i>Anergia a outros transplantes induzida por enxertos alógenos</i>	página	41
<b>3.3</b>	<b><i>Efeitos do sistema imunológico sobre o metabolismo ósseo</i></b>	página	42
3.3.1	<i>Filogenética do sistema imune e do sistema osteoarticular</i>	página	42
3.3.2	<i>O mecanismo molecular da osteoclastogênese</i>	página	43
3.3.3	<i>O papel das citocinas sobre a osteoclastogênese</i>	página	45
<b>3.4</b>	<b><i>Tratamento do tecido ósseo para enxertia alógena</i></b>	página	47
3.4.1	<i>Diminuição da antigenicidade</i>	página	47
3.4.2	<i>Protocolos de esterilização</i>	página	49
<b>3.5</b>	<b><i>Avaliação dos efeitos biológicos do plasma rico em plaquetas</i></b>	página	50
3.5.1	<i>Fatores de crescimento presentes nas plaquetas</i>	página	50
3.5.2	<i>Associação do PRP com enxertos colocados dentro de cavidades ósseas</i>	página	52
3.5.2.1	<i>Reparo de defeitos ósseos na prática clínica</i>	página	52
3.5.2.2	<i>Reparo de defeitos ósseos experimentais</i>	página	52
3.5.2.3	<i>Levantamentos da membrana sinusal</i>	página	54
3.5.2.4	<i>Preenchimento de espaços entre implantes e o leito cirúrgico</i>	página	55
3.5.3	<i>Utilização do PRP nas reconstruções dos maxilares</i>	página	56
3.5.4	<i>Desempenho do PRP em cultura de células</i>	página	57
3.5.5	<i>Bioengenharia óssea</i>	página	59
3.5.6	<i>Outras aplicações</i>	página	61
<b>3.6</b>	<b><i>O processo de preparação do PRP</i></b>	página	62
3.6.1	<i>Centrifugação</i>	página	63
3.6.2	<i>Anticoagulantes</i>	página	66
3.6.3	<i>Celularidade do PRP</i>	página	67
3.6.4	<i>Processo de coagulação do PRP</i>	página	69
<b>4</b>	<b><i>Metodologia</i></b>	página	72
4.1	<i>Aspectos éticos da pesquisa</i>	página	73

<b>4.2</b>	<b><i>Desenho do estudo</i></b> .....	página	73
<b>4.3</b>	<b><i>Caracterização das amostras</i></b> .....	página	74
<b>4.4</b>	<b><i>Manejo dos animais</i></b> .....	página	75
4.4.1	<i>Manutenção dos animais</i> .....	página	75
4.4.2	<i>Protocolo de anestesia dos animais</i> .....	página	76
4.4.3	<i>Degermação dos animais para as cirurgias</i> .....	página	76
4.4.4	<i>Eutanásia dos animais</i> .....	página	77
<b>4.5</b>	<b><i>O preparo do PRP</i></b> .....	página	77
4.5.1	<i>Coleta do sangue</i> .....	página	77
4.5.2	<i>Centrifugações</i> .....	página	78
4.5.3	<i>Coagulação do PRP</i> .....	página	80
4.5.4	<i>Contagem de células</i> .....	página	80
4.5.5	<i>Avaliação dos padrões do sangue total e do PRP</i> .....	página	80
<b>4.6</b>	<b><i>Obtenção e tratamento dos enxertos</i></b> .....	página	81
4.6.1	<i>Remoção dos enxertos</i> .....	página	81
4.6.2	<i>Enxertos autógenos</i> .....	página	81
4.6.3	<i>Enxertos alógenos</i> .....	página	82
4.6.3.1	<i>Congelamento do osso para a enxertia alógena</i> .....	página	82
4.6.3.2	<i>Efeito da temperatura na morfologia do osso</i> .....	página	83
4.6.3.3	<i>Leitura e análise das lâminas obtidas a partir do osso congelado</i> .....	página	84
4.6.3.4	<i>Tratamento dos resultados e análise estatística dos dados</i> .....	página	85
<b>4.7</b>	<b><i>Cirurgias para aposição do enxerto na mandíbula</i></b> .....	página	85
4.7.1	<i>Protocolos cirúrgicos</i> .....	página	85
4.7.2	<i>Remoção das peças para estudo</i> .....	página	87
4.7.3	<i>Processamento histotécnico, colorações e imunomarcações</i> .....	página	88
4.7.4	<i>Leitura das lâminas</i> .....	página	89

4.7.5	<i>Tratamento estatístico dos resultados</i>	página	90
<b>5</b>	<b>Resultados</b>	página	92
<b>5.1</b>	<b>Comportamento biológico dos enxertos aposicionados</b>	página	93
5.1.1	<i>Dados gerais das cirurgias, dos enxertos e do PRP</i>	página	93
5.1.2	<i>Estudo morfológico descritivo</i>	página	94
5.1.3	<i>Diferença entre os grupos estudados em cada um dos dias de observação</i>	página	96
5.1.3.1	<i>Terceiro dia</i>	página	97
5.1.3.2	<i>Sétimo dia</i>	página	98
5.1.3.3	<i>Décimo quarto dia</i>	página	99
5.1.3.4	<i>Vigésimo oitavo dia</i>	página	100
5.1.3.5	<i>Quinquagésimo sexto dia</i>	página	103
5.1.4	<i>Efeito do tempo sobre o enxerto aposicionado</i>	página	104
5.1.5	<i>Análise do comportamento dos osteoclastos no tecido</i>	página	107
5.1.6	<i>Imunomarcações de linfócitos T e B</i>	página	109
5.1.7	<i>Correlações entre as variáveis estudadas</i>	página	110
<b>5.2</b>	<b>Congelamento do osso</b>	página	112
5.2.1	<i>Análise qualitativa</i>	página	112
5.2.2	<i>Análise quantitativa das áreas estudadas</i>	página	113
5.2.2.1	<i>Efeito da temperatura de congelamento na área das células e núcleos presentes na medular</i>	página	113
5.2.2.2	<i>Efeito do tempo de congelamento na área das células e dos núcleos presentes na medular</i>	página	116
5.2.2.3	<i>Efeito da temperatura na área dos núcleos dos osteócitos da cortical</i>	página	117
5.2.2.4	<i>Efeito do tempo de congelamento na área dos núcleos dos osteócitos da cortical</i>	página	118
5.2.2.5	<i>Efeito da temperatura na área ocupada pelo colágeno na porção cortical</i>	página	119

5.2.2.6	<i>Efeito do tempo de congelamento na área ocupada pelo colágeno na porção cortical</i> .....	página 120
5.2.3	<i>Diferença entre os dados obtidos para a coloração pela HE e pela reação de Feulgen</i> .....	página 121
5.3	<b><i>Preparação do PRP</i></b> .....	página 122
6	<b><i>Discussão</i></b> .....	página 129
7	<b><i>Conclusões</i></b> .....	página 151
7.1	<b><i>Conclusões gerais</i></b> .....	página 152
7.2	<b><i>Conclusões específicas de cada experimento</i></b> .....	página 152
7.2.1	<i>Alcançadas com a avaliação do comportamento biológico dos enxertos aposicionados</i> .....	página 152
7.2.2	<i>Alcançadas com o processo de congelamento do osso</i> .....	página 153
7.2.3	<i>Alcançadas com o do preparo do PRP</i> .....	página 153
8	<b><i>Referências</i></b> .....	página 154
	<b><i>APÊNDICES E ANEXO</i></b> .....	página 172
	<b><i>APÊNCIDE A – Produtos da tese (artigos escritos)</i></b> .....	página 173
	<b><i>APÊNCIDE B – Produtos da tese (divulgação dos resultados)</i></b> .....	página 174
	<b><i>ANEXO – Parecer do comitê de Ética</i></b> .....	página 175

***LISTAS DE TABELAS, GRÁFICOS, FIGURAS E ABREVIATURAS***

## ***LISTA DE TABELAS***

- Tabela 1** - Discriminação dos protocolos utilizados na imunohistoquímica ..... página 89
- Tabela 2** - Características gerais das cirurgias para enxertia do fragmento de osso ilíaco na mandíbula dos coelhos, n = 40. .... página 93
- Tabela 3** – Mediana, média e desvio padrão da quantidade de osteoclastos e da área ocupada por essas células em função do tipo de enxerto, do lado da mandíbula e dos dias de observação, n=40. .... página 109
- Tabela 4** – Mediana, media e desvio padrão da citometria do sangue total e do PRP, n=50..... página 123
- Tabela 5** – Mediana, média e desvio padrão da quantidade em ml de eritrócitos e PPP removidos, do tempo de coagulação do PRP e da concentração do hematócrito, da leucometria e da plaquetometria após a preparação do PRP, n=50..... página 123

## *LISTA DE GRÁFICOS*

- Gráfico 1** – Área total de matriz óssea em função dos dias e da natureza do enxerto, n=40..... página 98
- Gráfico 2** – Espessura da cortical do enxerto em função dos dias e da natureza do enxerto, n=40 ..... página 99
- Gráfico 3** – Área de matriz óssea neoformada em função dos dias e da natureza do enxerto, n=40 ..... página 101
- Gráfico 4** – Área ocupada pelo colágeno no tecido mole sobre o enxerto em função dos dias e da natureza do enxerto, n=40 ..... página 101
- Gráfico 5** – Área ocupada pelos macrófagos no tecido mole sobre o enxerto em função dos dias e da natureza do enxerto, n=40 ..... página 102
- Gráfico 6** – Associação da área total de matriz óssea presente e da área ocupada pelos osteoclastos com a área de matriz óssea neoformada, n=40 ..... página 110
- Gráfico 7** – Associação da área total de matriz óssea presente no enxerto com a espessura da cortical, n=40..... página 111
- Gráfico 8** – Associação da espessura da cortical e da área ocupada pelos osteoclastos com a área ocupada pelos macrófagos, n=40 ..... página 111
- Gráfico 9** – Análise qualitativa da morfologia do tecido ósseo nos diferentes dias de congelamento à temperatura de -20°C e de -70°C, n=8..... página 112
- Gráfico 10** – Percentual da área que as células ocupavam no tecido medular, em função do tempo e da temperatura de congelamento, analisada em secções coradas através da HE, n=12 ..... página 114
- Gráfico 11** – Percentual da área que os núcleos ocupavam nas células e no tecido medular, em função do tempo e da temperatura de congelamento, analisada em secções coradas através da HE, n=12.. página 116
- Gráfico 12** – Percentual da área que os núcleos ocupavam no tecido medular, em função do tempo e da temperatura de congelamento, analisada em secções coradas através da reação de Feulgen, n=12 ..... página 117

- Gráfico 13** – Percentual da área que os núcleos dos osteócitos ocupavam na porção cortical do osso ilíaco, em função do tempo e da temperatura de congelamento, analisada em secções coradas através da HE e da reação de Feulgen, n=12..... página 119
- Gráfico 14** – Percentual da área o colágeno ocupava na porção cortical do tecido ósseo, em função do tempo e da temperatura de congelamento, analisada em secções coradas através do micro-sirius, n=12..... página 121
- Gráfico 15** – Associação da plaquetometria e do hematócrito do PRP, da quantidade de eritrócitos e de PPP removidos com o hematócrito do sangue total, n=50 ..... página 124
- Gráfico 16** – Associação da plaquetometria do PRP, da quantidade de eritrócitos e de PPP removidos com a plaquetometria do sangue total, n=50.... página 125
- Gráfico 17** – Associação da plaquetometria do PRP, da leucometria do PRP, da quantidade de eritrócitos e de PPP removidos com a leucometria do sangue total, n=50 ..... página 125
- Gráfico 18** – Associação da plaquetometria, do hematócrito e a leucometria do PRP com a quantidade de eritrócito removida, n=50 ..... página 125
- Gráfico 19** – Associação da plaquetometria, do hematócrito e da leucometria do PRP com a quantidade de PPP removida, n=50 ..... página 126
- Gráfico 20** – Associação da plaquetometria e do tempo de coagulação do PRP com o seu hematócrito, n=50 ..... página 127
- Gráfico 21** – Associação do tempo de coagulação do PRP com a sua plaquetometria, n=50 ..... página 128

## **LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1** – Organograma da distribuição dos coelhos em cada um dos experimentos ..... página 75
- Figura 2** – Aspecto do sangue após a primeira centrifugação ..... página 78
- Figura 3** – Aspecto do material após a segunda centrifugação ..... página 79
- Figura 4** – Aspecto do leito cirúrgico no lado esquerdo, onde não foi colocado o PRP (A) e no lado direito, onde foi colocado o PRP (B)..... página 87
- Figura 5** – Interface do enxerto (\*) com o leito receptor após 3 dias. Osso alógeno com PRP. HE, 40X. Escala=0,3mm ..... página 94
- Figura 6** – Interface do enxerto (\*) com o leito receptor no 14º dia mostrando a neoformação sob a cortical do enxerto que é evidente na região onde a mandíbula foi perfurada durante a cirurgia. Osso alógeno sem PRP. HE, 40X. Escala=0,3mm ..... página 95
- Figura 7** – Consolidação do enxerto (\*) ao leito receptor (\*\*). O enxerto apresentava continuidade com a cortical da mandíbula no 28º dia. Não houve inflamação e as fibras encontravam-se espaçadas. Osso alógeno com PRP. HE, 40X. Escala=0,3mm. .... página 96
- Figura 8** – Aspecto do tecido após 56 dias da cirurgia evidenciando o enxerto (\*) e sua integração com o leito receptor (\*\*). Osso autógeno sem PRP. HE, 40X. Escala=0,3mm..... página 103
- Figura 9** – Área neoformada (\*\*) abaixo da cortical do enxerto (\*) no 14º dia. Osso autógeno com PRP. Azul de toluidina, 40X. Escala=0,3mm..... página 105
- Figura 10** – Fibrose (\*\*) ao redor do osso enxertado (\*) no 7º dia após a cirurgia. Osso alógeno com PRP. Picro-sírius, 100X. Escala=0,1mm..... página 106
- Figura 11** – Imunomarcagem de células RAM 11 (macrófagos) no tecido mole sobre o enxerto no 3º dia. Osso alógeno com PRP. 400X. Escala=0,1mm. .... página 107

- Figura 12** – Células multinucleadas TRAP-positivas (seta) em contato com o enxerto no 14º dia. Osso alógeno sem PRP. Coloração para a TRAP, 400X. Escala=0,1mm..... página 108
- Figura 13** – Aspecto da porção medular do osso ilíaco fresco. HE, 400X. Escala=0,1mm..... página 113
- Figura 14** – Aspecto do tecido medular do osso ilíaco após 30 dias de congelamento à temperatura de -20°C. Reação de Feulgen, 400X. Escala=0,1mm..... página 114
- Figura 15** – Aspecto do tecido medular do osso ilíaco após 60 dias de congelamento à temperatura de -70°C. HE, 400X. Escala=0,1mm ..... página 115
- Figura 16** – Aspecto da porção cortical do osso ilíaco após o congelamento por 30 dias à temperatura de -20°C. HE, 400X. Escala=0,1mm..... página 118
- Figura 17** – Aspecto da porção cortical do osso ilíaco após o congelamento por 120 dias à temperatura de -70°C. Reação de Feulgen, 400X. Escala=0,1mm..... página 120
- Figura 18** – Aspecto da porção cortical do osso ilíaco após o congelamento por 120 dias à temperatura de -20°C evidenciando o colágeno perivascular em vermelho. Picro-sirius, 400X. Escala=0,1mm ..... página 122

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

<b><i>ACD-a</i></b>	Ácido cítrico, dextrose monoidratada e citrato de sódio
<b><i>ACR</i></b>	Aceleração relativa de centrífuga
<b><i>BMP</i></b>	Proteína morfogenética óssea
<b><i>CDP</i></b>	Citrato dextrose e fostato
<b><i>DNA</i></b>	Ácido desoxiribonucleico
<b><i>DP</i></b>	Desvio padrão
<b><i>EBF</i></b>	Fator de células B jovens
<b><i>EDTA</i></b>	Ácido etileno diamino tetracético
<b><i>EGF</i></b>	Fator de crescimento epidérmico
<b><i>EBMSP</i></b>	Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública
<b><i>EVGF</i></b>	Fator de crescimento do endotélio vascular
<b><i>FBDC</i></b>	Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências
<b><i>FGF</i></b>	Fator de crescimento fibroblástico
<b><i>GM-CSF</i></b>	Fator de estimulação de colônias de macrófagos e granulócitos
<b><i>HIV</i></b>	Vírus da imunodeficiência humana
<b><i>HLA</i></b>	Antígenos leucocitário humanos
<b><i>IFN-gama</i></b>	Interferon gama
<b><i>Ig</i></b>	Imunoglobulina
<b><i>IGF</i></b>	Fator de crescimento semelhante à insulina
<b><i>IL</i></b>	Interleucina
<b><i>M-CSF</i></b>	Fator de estimulação de colônias de macrófagos
<b><i>MHC</i></b>	Complexo principal de histocompatibilidade
<b><i>NFAT</i></b>	Fator nuclear para ativação de células T
<b><i>PDGF</i></b>	Fator de crescimento derivado de plaquetas
<b><i>PPP</i></b>	Plasma pobre em plaquetas
<b><i>PRP</i></b>	Plasma rico em plaquetas
<b><i>RANK</i></b>	Receptor de ativação do fator nuclear-Kapa B
<b><i>RANK-L</i></b>	Ligante do RANK-1
<b><i>RPM</i></b>	Rotações por minuto
<b><i>SPSS</i></b>	Statistical Package for the Social Science
<b><i>STAT</i></b>	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
<b><i>TGF-beta</i></b>	Fator de crescimento transformador beta
<b><i>TNF-alfa</i></b>	Fator de necrose tumoral
<b><i>TRAP</i></b>	Fosfatase ácida tartarato resistente
<b><i>VCM</i></b>	Volume corpuscular médio
<b><i>VPM</i></b>	Volume plaquetário médio



## ***1 Introdução***

Os implantes de titânio utilizados para reabilitação de espaços edêntulos nos maxilares propiciaram que a Odontologia fosse introduzida em um dos mais importantes paradigmas de sua história (MONOV et al, 2005). O ganho biológico e estético alcançado com essa opção terapêutica se tornou inquestionável, e as áreas desdentadas puderam ser mais eficazmente reabilitadas (AJZEN et al, 2005). Pequenas áreas que exigiam uma prótese dento suportada passaram a ser melhor restauradas através de próteses apoiadas exclusivamente em implantes de titânio, eliminando assim o desconforto de desgastar um dente ou usar uma prótese suportada por grampo metálico (OYAMA et al, 2004). Nesse sentido, é importante frisar os casos de pacientes totalmente desdentados, para quem próteses convencionais eram, até então, as únicas alternativas para a reabilitação do arco inferior, mesmo com resultado funcional sujeito a críticas.

Com o aperfeiçoamento da técnica, a exigência estética aumentou consideravelmente e, assim estabeleceu-se o conceito de que o implante osteointegrável deveria ser instalado na posição mais aproximada da posição original do dente (PELEG et al, 2004; ANITUA et al, 2006). Por conseguinte, os implantes não mais poderiam ser colocados de acordo com a conveniência do seu leito receptor, mas deveriam estar posicionados o mais adequadamente possível, de modo que a prótese final mimetizasse fidedignamente o dente natural (PELEG et al, 2004; YAMADA et al, 2004; AJZEN et al, 2005). Dessa forma, além de preencher requisitos estéticos, o conjunto implante e prótese resgataria com plenitude a biodinâmica da região (OHYA et al, 2005).

Estabeleceu-se então um conflito entre a posição ideal do implante e a quantidade de osso remanescente. Com a exodontia, o osso alveolar de suporte é absorvido, diminuindo assim sua altura e largura (YAMADA et al, 2004; KLONGNOI et al, 2006a, 2006b; NISHIGUCHI et al, 2007), de modo que em uma parcela grande de pacientes há demanda de osso para que o implante de titânio seja colocado na posição ideal. Os enxertos ósseos conciliaram o problema que surgiu devido ao refinamento da técnica e à busca da excelência das reabilitações por implantes (OYAMA et al, 2004; YAMADA et al, 2004; ITO et al, 2006; MANNAI, 2006). Fragmentos de osso cortical ou córtico-medulares removidos de outras partes do sistema esquelético passaram a ser aposicionados aos maxilares (CLAYMAN, 2006). Foi possível obter largura, e até altura, suficiente para a confortável colocação de implantes, respeitando-se

os princípios estéticos e de dissipação correta das cargas mastigatórias no osso de suporte (MERKX; FENNIS; VERHAGEN, 2004; AJZEN et al, 2005)

Diversas regiões do esqueleto são boas áreas doadoras de osso para esse tipo enxertia. Entre elas, destacam-se a linha oblíqua externa da mandíbula, o osso parietal (FERNANDES, 2002), e, sem dúvida, o osso ilíaco fornece a maior quantidade de enxerto, assumindo assim posição de destaque quando se desejam grandes reabilitações (OHYA et al, 2005; YAMADA et al, 2004). Exemplificam essa realidade os casos de maxila e mandíbula atrofica, em que a região de pré-maxila ou a crista do rebordo são espessadas com enxerto córtico-medular do ilíaco, aposicionado à cortical do osso, que é devidamente preparada para receber o enxerto (PIKOS, 1999a, 1999b, 2005a, 2005b; CLAYMAN, 2006).

Os protocolos de enxertia óssea já eram consagrados para diversas outras finalidades cirúrgicas, inclusive dentro da própria Odontologia, como a reconstrução de grandes áreas da mandíbula após a ablação de tumores (MARX et al, 1998; MERKX; FENNIS; VERHAGEN, 2004) ou após grandes descontinuidades (WILTFANG et al, 2004) como as promovidas por projéteis de arma de fogo. A natureza preferencial do enxerto sempre foi a autógena, considerando a ausência de reatividade do organismo contra esse tecido (OHYA et al, 2005; KLONGNOI et al, 2006a, 2006b). Entretanto, procurando contornar os custos biológicos da cirurgia numa segunda área, que funciona como região doadora (WILTFANG et al, 2004; KLONGNOI et al, 2006a, 2006b), as especialidades médicas iniciaram o uso de osso congelado de cadáver (HOU; YANG; HOU, 2005). Além de poder contar com uma massa maior de osso para grandes reconstruções, a utilização de osso de banco diminuiu os desconfortos impostos ao paciente com a remoção de enxerto autógeno.

Nos protocolos iniciais (MUSCOLO et al, 1996; LEE et al, 1997; FARRINGTON et al, 1998; NORDSTRON et al, 1999), as temperaturas usadas na criopreservação eram altas e foram sucessivamente substituídas por temperaturas mais baixas sob o argumento de que elas diminuiriam mais eficientemente a antigenicidade do tecido (HOU, YANG, HOU, 2005; MOREAU et al, 2000). Gradualmente, os protocolos de reconstrução com enxerto alógeno se consagraram nas especialidades médicas, e o osso de banco vem sendo empregado até na reabilitação de áreas submetidas a estresse importante, como o fêmur (LEE et al, 1997; HOU, YANG, HOU, 2005; TETTA et al, 2006). Seguindo essa tendência, o osso alógeno congelado foi recentemente introduzido como opção para reconstrução de áreas dos maxilares, candidatas a receberem implantes de titânio osteointegráveis (MOREAU et al, 2000; JENSEN et al, 2004, 2005).

Apesar do resultado ser bastante satisfatório na maioria dos casos, as enxertias posicionadas nos maxilares, autógenas ou alógenas, invariavelmente estão sujeitas a algum grau de absorção (CLAYMAN, 2006). Possivelmente, o processo inflamatório contribui para isso, aumentando a atividade celular no microambiente em reparo ou acidificando o meio ou mesmo diminuindo a pressão de oxigênio no tecido (MARX et al, 1998).

Apesar dos macrófagos representarem uma célula importante no processo de reconhecimento dos determinantes antigênicos do osso alógeno, uma resposta bem diferenciada e localizada, de linfócitos B ou T contra o tecido, é rara (TSHAMALA et al, 1999; YIN et al, 2003, 2002; KAWALEC-CARROL et al, 2007). Especula-se que a atividade celular contra os enxertos possivelmente ocorre através de citocinas que estimulam a osteoclastogênese (NORDSTROM et al, 1999; TAKANO et al, 2007). A quantidade de anticorpos no interior do material enxertado é muito baixa, a despeito do reconhecimento de proteínas associadas ao sistema de antígenos leucocitários humanos (HLA) (MUSCOLO et al, 1996; LEE et al, 1997; CARTER, 1999).

No intuito de assegurar a regeneração desses enxertos, diminuir o tempo até a colocação dos implantes e também minimizar sua absorção, diversos adjuvantes têm sido propostos (THORWARTH et al, 2005; WILTFANG et al, 2004). Entre eles, pode-se destacar o plasma rico em plaqueta (PRP) que é um concentrado plaquetário autógeno que foi introduzido como adjuvante aos enxertos ósseos no ano de 1997 (WHITMAN; BERRY; GREEN, 1997; MARX et al, 1998). Seu principal argumento era que esse preparado, cuja concentração de plaquetas oscila na ordem de 4 a 5 vezes o valor basal (MARX, 2001; MARX et al, 2004), representava um rica fonte em fatores de crescimento para o osso entre os quais se salientam o PDGF e o TGF-beta (DUGRILLON et al, 2002; EPPLEY; WOODDELL; HIGGINS, 2004).

Com a coagulação do PRP, obtido a partir do sangue total do próprio paciente, os fatores de crescimento, contidos nos grânulos alfa plaquetários, seriam liberados no meio (HARRISON; CRAMER, 1993) e com isso poderiam incrementar a proliferação de pré-osteoblastos (ARPORNMAEKLONG et al, 2004; KANNO et al, 2005; OGINO et al, 2006). O PRP foi incorporado aos protocolos de enxertia óssea justamente para minimizar o tempo de espera entre o condicionamento do leito e a colocação dos implantes (WEIBRICH et al, 2004; JENSEN et al, 2005; ITO et al, 2006) como também otimizar a preservação da massa enxertada nos casos de aposição de maxila ou mandíbula.

Apesar da larga utilização de enxertos posicionados para melhorar a espessura ou altura do osso que receberá implantes de titânio e do grande aprimoramento técnico que tem sido

observado nos seus protocolos cirúrgicos, artigos que estudem a biologia do processo de cicatrização desses enxertos e sua incorporação aos maxilares são escassos. Essa demanda de conhecimento científico é ainda maior em relação aos enxertos alógenos. Embora a ortopedia tenha experimentado a consagração do seu uso e a definitiva consolidação do conceito de que o osso congelado se constitui um tecido seguro (HOU; YANG; HOU, 2005; TETTA et al, 2006), na literatura poucos são os trabalhos que mostram os efeitos que a baixa temperatura empregada nos bancos exerce sobre a morfologia do osso a ser utilizado (STEVENSON; SHAFFER; GOLDBERG, 1996; MOREAU et al, 2000; BLOTTNER et al, 2001; CORCUERA et al, 2007). Outra lacuna de conhecimento existe também em relação ao PRP. Apesar da euforia com a utilização desse preparado ter sido inicialmente grande, a padronização de seu processo de obtenção está longe de ser alcançada (EPPLEY; WOODSELL; HIGGINS, 2006; FREYMILLER; AGHALOO, 2004). Por isso, uma certa polêmica tem sido verificada na literatura com relação aos benefícios inerentes ao seu uso (CASATI et al, 2007; JESSEN et al, 2005).

Desta forma, parece relevante propor uma discussão sobre essas lacunas que existem no estado atual do conhecimento desses processos, que se desenvolveram paralelamente ao aperfeiçoamento dos protocolos de enxertia dos maxilares. O preenchimento dessas lacunas é uma tarefa árdua considerando a dinâmica da evolução da ciência, mas é necessário investigar que fatores podem alterar as propriedades do PRP, quais as modificações que o tecido ósseo removido do osso ilíaco sofre após o seu congelamento e como a regeneração do enxerto aposicionado aos maxilares se processa, quer seja utilizado, ou não, em associação com o PRP. Uma vez que o sistema imunológico desempenha um papel crucial na absorção de osso em processos patológicos dos maxilares, como na periodontite (TUNES, 2006), no desenvolvimento de lesões odontogênicas (GERVASIO et al, 2005; OKA et al, 2005) e mesmo nas alterações condilares secundárias à artrite reumatóide (STRAND; KAVANAUGH, 2004; SATO; TAKAYANAGI, 2006), é lícito estudar o papel de células do sistema imune no processo de incorporação e no invariável processo de absorção que os enxertos aposicionados irão experimentar após a cirurgia.

***OBJETIVOS***

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Estudar a biologia e a reação do sistema imunológico no processo de enxertia óssea autógena e alógena aposicionada na mandíbula de coelhos em associação ou não com o plasma rico em plaquetas

### **2.2 Objetivos específicos**

#### *2.2.1 Almejados em relação a avaliação do comportamento biológico dos enxertos aposicionados*

- Descrever o processo de reparação de enxertos ósseos córtico-medulares autógenos e alógenos aposicionados na mandíbula de coelhos
- Comparar o processo de integração dos enxertos autógenos com o dos enxertos alógenos, associados ou não ao PRP
- Avaliar a influência do sistema imunológico frente a cada um desses enxertos
- Analisar a interação entre os diferentes processos biológicos associados ao processo de regeneração e absorção do enxerto aposicionado

#### *2.2.2 Almejados em relação ao processo de congelamento do osso*

- Identificar as alterações que o congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $-70^{\circ}\text{C}$  promove no tecido do íliaco de coelhos após 30, 60, 90 e 120 dias
- Comparar o efeito de cada tratamento na morfologia deste tecido

### *2.2.3 Almejados em relação ao preparo do PRP*

- Ponderar quais padrões do sangue total interferem nas propriedades do PRP
- Verificar o impacto da extração de componentes do sangue total na celularidade do PRP
- Analisar como a celularidade do PRP interfere em suas propriedades



### ***3 Revisão de literatura***

#### ***3.1 Considerações gerais***

Esta revisão da literatura foi elaborada com o objetivo de compilar o conhecimento produzido por diversos trabalhos sobre os temas dos experimentos elaborados nessa tese. A fundamentação teórica referentes ao mecanismo de reconhecimento do sistema imunológico e sua interação com o osso, como também referentes ao tratamento do tecido ósseo para que ele esteja apto a enxertia alógena, será apresentada. Considerando que o PRP foi introduzido, nesta tese, como uma variável na avaliação do comportamento dos enxertos aposicionados nos maxilares, foi necessário revisar os resultados até então encontrados sobre seu efeito no contexto das enxertias e, sobretudo reunir os protocolos que tem sido utilizados para sua preparação.

#### ***3.2 Osteoimunologia***

##### ***3.2.1 O papel do MHC nas enxertias ósseas***

O enxerto ósseo alógeno configura-se, para o indivíduo receptor, um repositório de antígenos que é, lenta e continuamente, exposto ao sistema imune (MUSCOLO et al, 1996; NORDSTROM et al, 1999). Conforme a resposta imunológica se processa, o osso alógeno é progressivamente absorvido o que ocasiona uma exposição antigênica persistente (MUSCOLO et al, 1996; NORDSTROM et al, 1999). Por isso, acredita-se que o processo de desmineralização prévia incrementa essa exposição e resulta em mais rápida absorção do enxerto ósseo (LEWANDROWSKI et al, 2001).

O reconhecimento do enxerto alógeno pelo sistema imune pode ocorrer de forma indireta pelas células apresentadoras de antígeno do indivíduo receptor. Elas fagocitam e processam antígenos do tecido e exibem-nos, em seu MHC de classe II, para a devida ativação das células efectoras (DEIJKERS et al, 1999). Ainda que as modificações antigênicas induzidas pelo congelamento do tecido, não estejam totalmente elucidadas, acredita-se que ocorra uma necrose das células apresentadoras, genuínas do enxerto ósseo. Dessa forma, a resposta

imunológica contra o osso seria dependente do processamento e da apresentação do antígeno alógeno realizados exclusivamente por células do indivíduo receptor (MUSCOLO et al, 1996).

Outra sistemática de ativação imunológica fica a cargo dos linfócitos T citotóxicos de alta sensibilidade do indivíduo receptor. Essas são células imunológicas capazes de se ativarem a partir de antígenos apresentados na molécula de MHC de classe I de células do próprio enxerto (MUSCOLO et al, 1996; DEJKERS et al, 1999). Osteócitos e células da medula óssea, presentes no enxerto alógeno, sintetizam proteínas do MHC de classe I e, portanto, participarão do processo de reconhecimento e ativação por parte dos linfócitos T citotóxicos de alta sensibilidade (STEVENSON; SHAFFER; GOLDBERG, 1996; LEWANDROWSKI et al, 2001). Células apresentadoras de antígeno presentes na porção medular do enxerto ósseo também podem ativar diretamente as células T citotóxicas do indivíduo receptor (MUSCOLO et al, 1996; STEVENSON; SHAFFER; GOLDBERG, 1996; LEWANDROWSKI et al, 2001).

Apesar de haver uma despreocupação com a compatibilidade do sistema HLA no protocolo de transplante de osso (CARTER, 1999), o sistema imunológico do indivíduo receptor é capaz de sintetizar anticorpos específicos contra antígenos do MHC de classe I e de classe II das células transplantadas (WARD et al, 2005; LEWANDROWSKI et al, 2001). Uma média de 53% (WARD et al, 2005) a 66% (LEWANDROWSKI et al, 2001) dos indivíduos que foram submetidos a transplante de osso produziu esses anticorpos, contudo isso não representou risco para a consolidação e integração do enxerto. A taxa de neoformação óssea foi alta e houve boa incorporação do osso transplantado ao leito receptor, mesmo com a baixa paridade do HLA (LEWANDROWSKI et al, 2001).

A boa integração radiográfica do enxerto também foi verificada em um grupo de pacientes que receberam osso alógeno. Desses indivíduos, apenas 28% apresentavam paridade de alelos entre o HLA do receptor e do doador (MUSCOLO et al, 1996). Apesar dos bons achados imunológicos, havia um processo de vasculite, com infiltração de linfócitos no osso enxertado, no grupo de pacientes cuja paridade de HLA com o doador foi baixa. Esses achados estavam ausentes entre os indivíduos que dividiam pelo menos um antígeno do HLA-A ou do HLA-B (MUSCOLO et al, 1996).

Essa despreocupação no momento da enxertia de osso alógeno (CARTER, 1999) pode afetar a elegibilidade para um potencial transplante de outros órgãos (MUSCOLO et al, 1996). Essa especulação foi confirmada através de uma paciente diabética nefropata que, enquanto aguardava um doador para transplante duplo de pâncreas e rins, desenvolveu um

condrossarcoma no fêmur (LEE et al, 1997). O tratamento do tumor maligno contemplou a ressecção e a reconstrução do membro inferior com osso alógeno congelado. Dois anos depois, 50% dos seus anticorpos circulantes eram contra antígenos do sistema HLA, e o transplante de pâncreas não pode ser realizado pela dificuldade de conciliar um doador compatível.

### *3.2.2 Atividade efetora contra o enxerto alógeno*

O osso é considerado um tecido pouco antigênico, por isso espera-se que a resposta contra ele seja muito tênue (CHACON et al, 2004; TETTA et al, 2006). A pouca reatividade contra o enxerto ósseo alógeno tem fundamento num quimerismo que esse tecido induz no organismo receptor (YIN et al, 2003). Esse mecanismo baseia-se no argumento de que células hematopoiéticas que permaneceram viáveis na medula podem alcançar a circulação e modificar o repertório de células T circulantes. A atividade efetora seria, portanto, mais lenta e crônica e poderia até conduzir a uma tolerância em favor do osso alógeno (MUSCOLO et al, 1999), pois a ativação inapropriada de linfócitos T acarreta hiporreatividade ou anergia (YIN et al, 2003).

Quando presente, a resposta imunológica segue o padrão clássico da rejeição a qualquer tecido transplantado, mas com intensidade menor. A resposta inata, que consiste na principal atividade do leito receptor contra o enxerto ósseo, é responsável pelo reconhecimento da massa enxertada. Suas características mais marcantes são a vasculite (MUSCOLO et al, 1996) e o infiltrado de polimorfonucleares e macrófagos (TSHMALA et al, 1999).

Por conta disso, a inflamação atribuída ao enxerto apresenta um perfil bem semelhante tanto em camundongos normais como naqueles deficientes em células B ou T (KAWALEC-CARROL et al, 2007), sugerindo que a resposta imune específica localizada no tecido tenha pouca participação nesse processo. Isso fica claro ao se constatar que os títulos de interferon gama (IFN-gama) sintetizado por linfócitos T são baixos nos tecidos ao redor desses enxertos (YIN et al, 2003). Outra sustentação para esta hipótese é que linfócitos obtidos do sangue total de animais que receberam enxertos ósseos alógenos não apresentaram maior proliferação do que os linfócitos de animais controles (TSHAMALA et al, 1999).

A resposta imune adaptativa parece ser mais preponderante a nível sérico e evolui depois do reconhecimento direto de peptídeos presentes na superfície das células ósseas pelos linfócitos

T citotóxicos. Observou-se que a quantidade de interleucina (IL) 2 e IL-4, depois da enxertia alógena, aumentou nos linfonodos, a partir de onde os linfócitos T orquestraram o dano tissular e a perda da massa do osso enxertado (DEJKERS et al, 1999; YIN et al, 2003). As células T auxiliares respondem aos peptídeos da matriz óssea que se tornam expostos, à via efetora do sistema imune, na superfície das células apresentadoras de antígenos. Sua função principal é secretar citocinas que estimulam osteoclastos e outras células imunológicas em suas funções. A atividade dos linfócitos B e a liberação de anticorpos são dependentes das citocinas liberadas e do reconhecimento do antígeno (DEJKERS et al, 1999; TSHAMALA et al, 1999; KAWALEC-CARROL et al, 2007).

### *3.2.3 Citocinas liberadas após o reconhecimento do enxerto*

O colágeno II quando inoculado diretamente no tecido subcutâneo de camundongos induziu uma forte liberação de IFN-gama, IL-2 e IL-4 (KAWALEC-CARROL et al, 2007). Entretanto, a inoculação do osso fresco, contendo essa proteína em sua estrutura original, não induziu ativação de células T que foi ainda menor, se o tecido ósseo fosse tratado previamente com fotooxidação. Esses achados sugerem que imunogenicidade do colágeno é menor quando ele está constituindo o tecido. A expressão de IL-4 poderia sugerir que a resposta celular contra o osso fosse do tipo Th2, mas, nessas circunstâncias, haveria coexpressão de IL-5. Como esta citocina não estava presente na circulação, a resposta imune aos enxertos ósseos foi caracterizada como Th1 (KAWALEC-CARROL et al, 2007).

A osteopontina, outra proteína do osso, foi capaz de estimular linfócitos e funcionar como citocina pleiotrópica que regula o sistema imune. Ela polarizou a resposta dos linfócitos T aumentando a liberação de citocinas Th1 e inibindo a síntese de citocinas Th2. O IFN-gama consistiu uma das principais citocinas sintetizadas por linfócitos T depois do desafio imposto pela osteopontina. Essa importante proteína óssea é quimiotática para macrófagos e induz sua adesão no tecido (O'REGAN et al, 2000), confirmando assim a importância destas células na osteoimunologia.

A resposta do tipo Th1 contra os enxertos ósseos alógenos foi comprovada em pacientes que receberam transplante de patela para reconstrução do joelho. A concentração de IL-1 e fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), no soro e no líquido sinovial desta articulação, elevou-se depois da cirurgia e se manteve assim por até 3 anos. A IL-6, citocina cuja secreção é

dependente de uma resposta Th2, também se elevou, mas sua titulação diminuiu rapidamente. Essas citocinas participam ativamente da osteoclastogênese, estimulando o aparecimento e a proliferação de precursores de osteoclastos (NORDSTROM et al, 1999; TAKANO et al, 2007).

Outros achados que comprovam a atividade sérica do tipo Th1 contra o osso são os quadros reumáticos envolvendo esse tecido. O líquido sinovial de pacientes portadores de artrite reumatóide, cuja articulação já exibia algum grau de degeneração, estava rico em citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 e TNF-alfa. A associação entre essas citocinas e a perda óssea pode ser inferida a partir da observação de que o líquido sinovial, presente num meio de cultura contendo pré-osteoclastos, estimulou a proliferação dessas células (TAKANO et al, 2007).

### *3.2.4 Resposta humoral contra os enxertos*

Os enxertos ósseos apresentam potencial antigênico baixo para induzir uma ativação de linfócitos B em plasmócitos e a subsequente secreção de imunoglobulinas (Ig). Os títulos de anticorpos circulantes em paciente que foram submetidos à enxertia alógena variaram muito dos títulos observados antes da cirurgia. A concentração de IgG e IgM no interior da massa enxertada também foi mínima, e ambas observações independeram do osso ter sido enxertado fresco ou após o congelamento (TSHAMALA et al, 1999). Comprova-se, então, que a produção de anticorpos contra esses enxertos é pobre e que as imunoglobulinas participam pouco do processo de perda ou da persistência da inflamação, atribuída à diferença de antigenicidade do tecido (TSHAMALA et al, 1999; YIN et al, 2002, 2003).

No sangue circulante, foi constatada a presença de IgM, e muito raramente, IgG1 e IgG2, contra o osso enxertado no tecido celular subcutâneo de camundongos (KAWALEC-CARROL et al, 2007). A síntese de IgM ocorreu tardiamente, e sua liberação não dependeu de uma ativação de células T (YIN et al, 2002; KAWALEC-CARROL et al, 2007). É válido salientar ainda que a IgM é polirreativa (YIN et al, 2002), e seu aparecimento na circulação pode ter sido resultante da reatividade cruzada contra outros antígenos que não aqueles derivados do osso. Essa imunoglobulina, portanto, não seria um bom marcador da resposta humoral contra o enxerto.

O perfil de síntese das raras IgGs contra o osso, entretanto, é diferente. A IgG1 foi sintetizada pelos linfócitos B ativados por citocinas Th1 ou Th2, enquanto a secreção de IgG2 foi dependente de IFN-gama, uma citocina Th1. Essa interação entre a atividade humoral e celular confirmou o papel da resposta Th1 no processo de reconhecimento do osso e demonstrou que a atividade humoral contra o osso é dependente dessa interação linfocitária (KAWALEC-CARROL et al, 2007; YIN et al, 2002). Uma vez que a resposta celular contra o enxerto alógeno é fraca, os baixos títulos de IgG encontrados foram justificáveis.

### *3.2.5 Anergia a outros transplantes induzida por enxertos ósseos alógenos*

O tecido ósseo enxertado promove uma anergia humoral, e esse fenômeno ainda foi extrapolado quando se observou que o co-transplante de osso intacto ativo diminuiu a rejeição a outros transplantes teciduais. Essa sugestão sustenta-se no achado de que o sinergismo entre o tecido ósseo enxertado e anti-CD40 ligante, administrado em ratos, induziu uma tolerância e suprimiu a resposta de aloanticorpos contra proteínas do tecido cardíaco transplantado (YIN et al, 2002). O mesmo foi observado em relação à resposta celular. A atividade de linfócitos T e a secreção de IFN-gama, contra tecido cardíaco transplantado, estariam diminuídas se houvesse uma enxertia prévia com osso alógeno (YIN et al, 2003).

O tratamento com anti-CD40 ligante isolado ainda propiciou a síntese de aloanticorpos e a ativação de células T, mas o cotransplante de osso suprimiu a secreção de IgG, IgM e de IFN-gama. A tolerância das populações de células B foi confirmada, pois as concentrações de IL-4 e IFN-gama, reguladores da resposta de IgG1 e IgG2, respectivamente, mantiveram-se normais sugerindo que a resposta celular regulatória não foi alterada (YIN et al, 2003).

Achados semelhantes foram encontrados na reatividade imunológica contra a pele transplantada em animais que receberam enxertos ósseos alógenos prévios (TSHAMALA et al, 1999). A titulação de anticorpos contra a pele nos animais que receberam o transplante sem prévia enxertia óssea foi aproximadamente seis vezes maior do que naqueles animais em que foi cotransplantado osso fresco ou osso desmineralizado tratado com óxido de etileno. Nestes dois últimos grupos, a concentração de anticorpos contra antígenos da pele foi bastante semelhante.

### ***3.3 Efeitos do sistema imunológico sobre o metabolismo ósseo***

#### *3.3.1 Filogenética do sistema imune e do sistema osteoarticular*

O sistema imunológico adaptativo e o sistema osteoarticular são dois marcos biológicos na filogenética dos vertebrados. Acredita-se que, no processo de evolução, esses dois sistemas tenham se desenvolvido concomitantemente. Desse modo, os dois compartilham uma série de proteínas e sistemas de ativação (WEIN; JONES; GLIMCHER, 2005; TAKAYANAGI, 2005; KACENA et al, 2006), cuja deficiência modifica a anatomia de ambos (KACENA et al, 2006).

O metabolismo do receptor de ativação do fator nuclear-Kapa b (RANK), molécula presente tanto em osteoclastos quanto em linfócitos T, ilustra claramente essa suposição (TRAN; LUNDY; FOX, 2005). Na deficiência deste receptor, os linfonodos se tornam defeituosos, e ocorre um atraso no processo de diferenciação linfocitária concomitantemente com osteopetrose (TAKAYANAGI, 2005; ASAGIRI; TAKAYANAGI, 2007). Essas alterações também foram encontradas em animais deficientes em megacariócito, sugerindo que o sistema hematopoiético também apresenta justaposição com o sistema osteoarticular (KACENA *et al*, 2006).

A regulação do fator nuclear para ativação de células T (NFAT) também permite conclusões similares e demonstra como os dois sistemas podem ser regidos por mecanismos comuns. O NFAT foi descoberto primeiramente em linfócitos T e assume um papel essencial na ativação de células T e na conseqüente secreção de citocinas (WEIN; JONES; GLIMCHER, 2005; ASAGIRI; TAKAYANAGI, 2007). No sistema osteoarticular, ele é o fator de transcrição mais fortemente estimulado pela sinalização do RANK em seu receptor (TAKAYANAGI, 2005; ASAGIRI; TAKAYANAGI, 2007). A ativação do sistema RANK pelo seu ligante, o RANK-L, estimula a calcinerina que desfosforila o NFAT possibilitando sua translocação para o núcleo e sua ligação ao gene de síntese das metaloproteinases-9. Estas proteínas são expressas nas fases iniciais da osteoclastogênese (SUNDARAM et al, 2007). O NFAT também é responsável pela expressão de fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP) nos osteoclastos (ASAGIRI; TAKAYANAGI, 2007).

A deficiência de NFAT induz um aumento na síntese de citocinas Th2. Concomitante, desenvolve-se alteração no fenótipo ósseo com deformação de articulações e tendência à anquilose osteocartilaginosa (WEIN; JONES; GLIMCHER, 2005). A deficiência desse sinalizador celular aumenta a síntese de matriz cartilaginosa, diminui a osteoclastogênese (WINSLOW et al, 2006) e, por conta disso, animais isentos de NFAT apresentam osteopetrose devido a uma diminuição na absorção óssea fisiológica (WINSLOW et al, 2006).

A interação entre os dois sistemas não está restrita somente a condições fisiológicas. Em processos patológicos que motivam a destruição crônica do osso, tais como doença periodontal (TUNES, 2006), lesões odontogênicas dos maxilares (GERVASIO et al, 2005; OKA et al, 2005) e artrite reumatóide (STRAND; KAVANAUGH, 2004; SATO; TAKAYANAGI, 2006), a atuação de um sistema sobre o outro é marcante (WYZGA et al, 2004). Linfócitos T CD4 positivos ativados, presentes nessas condições, sintetizam maior quantidade de RANK-L e induzem a diferenciação de monócitos em osteoclastos de maneira eficaz por estimular a ativação do RANK nos pré-osteoclastos (WYZGA et al, 2004; TRAN; LUNDY; FOX, 2005; KACENA et al, 2006). Nessas condições, o processo fisiológico de remodelação óssea sofre um desvio para privilegiar a osteoclastogênese (TAKAYANAGI, 2005).

### *3.3.2 O mecanismo molecular da osteoclastogênese*

Um dos mais importantes pontos de comunhão na osteoimunologia está associado ao processo de perda de osso. O sistema RANK-L/RANK, principal ativador da osteoclastogênese, é uma das principais vias regulatórias do metabolismo ósseo. O RANK é uma proteína transmembrana da superfamília do TNF que está presente em osteoclastos, osteoblastos, fibroblastos, linfócitos T, células endoteliais e células mesenquimais (WYZGA et al, 2004; PIOLETTI; KOTTELAT, 2004; BLAIR; ROBINSON; ZAIDI, 2005; TAKAYANAGI, 2005; TRAN; LUNDY; FOX, 2005; BEETON et al, 2006; LARI et al, 2007; NISHIGUSHI et al, 2007; SUNDARAM et al, 2007).

O osteoblasto é um dos principais indutores da osteoclastogênese através de um mecanismo dependente do contato entre esta célula e o monócito precursor do osteoclasto (SHINODA et al, 2003; PIOLETTI; KOTTELAT, 2004; ASAGIRI; TAKAYANAGI, 2007; LARI et al, 2007; SUDARAM et al, 2007;). Acredita-se que as células formadoras de osso sintetizem o

RANK-L, participem da sinalização de células precursoras e da sua diferenciação em osteoclastos (WYZGA et al, 2004; PIOLETTI; KOTTELAT, 2004; TAKAYANAGI, 2005; LARI et al, 2007).

A relevância do osteoblasto na osteoclastogênese surgiu da observação no fenótipo ósseo de animais que apresentam sobreexpressão de NFAT. Esse sinalizador do sistema RANK-L/RANK foi responsável pelo aumento na proliferação de osteoblastos e osteoclastos. Entretanto, o aparecimento das células formadoras de osso era anterior ao aparecimento de osteoclastos no tecido. Isso porque o NFAT é capaz de recrutar monócitos do sangue, mas a sua diferenciação em osteoclasto é dependente da presença e do contato com o osteoblasto (WINSLOW et al, 2006).

Nesse processo de comunicação entre osteoblasto e osteoclasto, outras moléculas ainda exercem fundamental relevância. Além de citocinas secretadas por linfócitos, há ainda moléculas do próprio osteoblasto, como o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) e o fator de células B jovens (EBF2) (PIOLETTI; KOTTELAT, 2004; KIESLINGER et al, 2005; NISHIGUSHI et al, 2007).

O M-CSF é uma molécula tão importante quanto o RANK-L na osteoclastogênese (PIOLETTI; KOTTELAT, 2004; SATO; TAKAYANAGI, 2006), e a sua supressão está associada a osteopetrose. Uma vez que os osteoclastos são derivados de macrófagos, os fatores de crescimento que estimulam estas células, tais como o M-CSF, terão relevância no processo de maturação das primeiras (NISHIGUSHI et al, 2007). Esta molécula participa do processo de recrutamento de monócitos que se diferenciarão em osteoclastos (ASAGIRI; TAKAYANAGI, 2007), assegura sua vitalidade, além de intensificar a expressão de RANK (ASAGIRI; TAKAYANAGI, 2007).

O EBF2 participa do momento final da diferenciação de osteoblastos de modo que sua deficiência não compromete a formação do tecido ósseo, apesar da secreção de osteocalcina estar diminuída. Esse fator, sintetizado por pré-osteoblastos, sobre-regula a síntese de RANK-L inibindo a síntese de osteoprotegerina (KIESLINGER et al, 2005) e intensificando a osteoclastogênese.

A osteoprotegerina é uma importante proteína relacionada à inibição da osteoclastogênese. Ela compete com o RANK-L pelo seu receptor, o RANK (WYZGA et al, 2004; BEETON et al, 2006; KACENA et al, 2006). A sua atividade respalda a inibição da maturação de osteoclastos, atribuída ao megacariócito (KACENA et al, 2006), pois ele secreta a

osteoprotegerina e transmite esse potencial às plaquetas (BEETON et al, 2006; KACENA *et al*, 2006). Constatou-se que o poder inibitório dessa célula hematopoiética é independente da ação de qualquer outra célula e ocorre nos estágios iniciais do processo de diferenciação do monócito em pré-osteoclasto (KACENA et al, 2006).

O fator transformador de crescimento-beta (TGF-beta) também se traduz em outro inibidor da osteoclastogênese. Ele também é sintetizado pelo megacariócito e também está presente nas plaquetas (BLAIR; ROBINSON; ZAIDI, 2005; KACENA et al, 2006). Seu poder inibitório é tão potente que descontinua a diferenciação de osteoclastos iniciada pelo TNF-alfa, RANK-L ou M-CSF (LARI et al, 2007). Essa proteína é ainda um potente indutor de apoptose de osteoclastos e incrementa a produção de osteoprotegerina (BEETON et al, 2006). Dessa forma, o megacariócito promove tanto uma redução no número quanto na atividade dos osteoclastos.

### *3.3.3 O papel das citocinas sobre a osteoclastogênese*

A IL-1 e a IL-6, assim como o TNF-alfa, são as citocinas pró-inflamatórias com maior atuação sobre o tecido ósseo. A IL-1 secretada por linfócitos T (STRAND; KAVANAUGH, 2004) e por macrófagos também atua na expressão do RANK-L (BLAIR; ROBINSON; ZAIDI, 2005; OKA et al, 2005; MOREAU et al, 2007). No metabolismo normal do osso, a liberação do RANK-L, dependente de IL-1, é balanceada pela síntese de osteoprotegerina.

Em condições fisiológicas, a IL-1 fundamenta o balanço entre a absorção e a deposição de osso delineando a homeostasia do tecido (STRAND; KAVANAUGH, 2004; TAKAYANAGI, 2005). Entretanto, em processos inflamatórios crônicos, a síntese de RANK-L está aumentada pela maior circulação da própria IL-1, como também da IL-6 e do TNF-alfa (SHINODA et al, 2003; STRAND; KAVANAUGH, 2004; OKA et al, 2005; BLAIR; ROBINSON; ZAIDI, 2005; TAKANO et al, 2007). Da mesma forma, tem sido demonstrado que o bloqueio farmacológico dessas citocinas pro-inflamatórias reduz o processo de perda de osso e matriz extra celular (STRAND; KAVANAUGH, 2004; WYZGA et al, 2004).

Os macrófagos são as células mais relevantes na secreção do TNF-alfa e por isso são igualmente reconhecidas como células de destaque na osteoclastogênese (KACENA *et al* 2006; BLAIR; ROBINSSON; ZAIDI, 2005). A IL-1 e a IL-6 atuam diretamente sobre

osteoclastos, osteoblastos e fibroblastos e indiretamente sobre as células indiferenciadas, como se constata na diferenciação de pré-osteoclastos em osteoclastos (STRAND e KAVANAUGH, 2004; PIOLETTI; KOTTELAT, 2004). Motivados por este mecanismo de regulação, em condições inflamatórias, os osteoblastos aumentam sua síntese de RANK-L e M-CSF, e, por conseqüência, ocorre um incremento na osteoclastogênese (PIOLETTI; KOTTELAT, 2004; KACENA et al, 2006; LARI et al, 2007).

O TNF-alfa ainda é capaz de atuar diretamente na diferenciação de osteoclastos por um mecanismo independente do RANK-L (BLAIR; ROBINSON; ZAIDI, 2005; KACENA et al, 2006) e também por sinergismo com o M-CSF (TAKANO et al, 2007). Analogamente, essas citocinas ainda estimulam a síntese de metaloproteínases pelos fibroblastos que promovem a hidrólise protéica da matriz, colaborando para a fixação dos osteoclastos no tecido (STRAND; KAVANAUGH, 2004; SUNDARAM et al, 2007).

A participação dos linfócitos na osteoclastogênese, todavia, depende principalmente do mecanismo que induziu sua ativação (WYZGA et al, 2004; SATO; TAKAYANAGI, 2007). Linfócitos T, ativados com enterotoxina A de estafilococos ou com anticorpos anti-CD3epípsilon e anti-CD28, inibem a osteoclastogênese. Esse efeito não foi observado se esses linfócitos fossem ativados com fitohemaglutinina ou concanavalina A (WYZGA et al, 2004).

Portanto, além de secretar citocinas pro-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6 e TNF-alfa, macrófagos e linfócitos T, podem ainda sintetizar citocinas anti-inflamatórias ou imunorreguladoras, como IL-4, IL-10, IL-13 e IL-18, que inibem a osteoclastogênese (SHINODA, 2003; STRAND e KAVANAUGH, 2004; KACENA *et al*, 2006; SATO; TAKAYANAGI, 2007). Esse efeito parece ser dose dependente (SHINODA et al, 2003) e não cessa com o bloqueio dessas citocinas (SHINODA et al, 2003; WYZGA et al, 2004).

Isso também acontece em relação ao IFN-gama que, secretado por linfócitos T CD4-positivos, inibe a osteoclastogênese (SHINODA et al, 2003; WYZGA *et al*, 2004; BLAIR; ROBINSON; ZAIDI, 2005; WEIN; JONES; GLIMCHER, 2005; KIESLINGER et al, 2005; LARI et al, 2007). Cultura de monócitos realizada em conjunto com linfócitos T CD4 ou CD8 positivos mostrou que a inibição da osteoclastogênese ocorreu em ambas, mas foi mais potente na cultura que continha células CD4 positivas cujo sobrenadante apresentava o IFN-gama (SHINODA et al, 2003; WYZGA et al, 2004).

Acredita-se inclusive que um dos mecanismos pelo qual a IL-18 inibe a osteoclastogênese é o estímulo a uma maior síntese de IFN-gama por linfócitos (SHINODA et al, 2003). Apesar da IL-10 ser reconhecida como citocina genuinamente inibitória para a osteoclastogênese, foi demonstrado que ela pode interromper o efeito inibitório do IFN-gama e ativar a síntese de RANK-L por linfócitos T (WYZGA et al, 2004) com substancial aumento da osteoclastogênese e subsequente erosão óssea (STRAND; KAVANAUGH, 2004; TAKAYANAGI, 2005).

A via de sinalização do IFN-gama está associada provavelmente à estimulação da proteína transdutor de sinal e ativadora de transcrição (STAT). A conjugação da citocina com esse transdutor transmembrana inibe a osteoclastogênese e estimula a diferenciação de osteoblastos (WEIN; JONES; GLIMCHER, 2005). Acredita-se que o IFN-gama inibe, através do STAT, o sinal produzido pela ativação do RANK pelo RANK-L (WYZGA et al, 2004), inibindo, entre outras coisas, a síntese de metaloproteinases-9 (SUDARAM et al, 2007). Uma comprovação clínica desse aspecto pode ser observada com o uso da ciclosporina que, em pequenas doses, promove osteopenia por inibir a produção de citocinas anti-inflamatórias por linfócitos T, como a IL-4, e ainda IFN-gama, disparando assim a osteoclastogênese (SHINODA et al, 2003).

Outra citocina linfocitária capaz de inibir a osteoclastogênese é o fator de estimulação de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) (SHINODA et al, 2003; KACENA et al, 2006; LARI et al, 2007). Essa citocina inibe a proliferação de pré-osteoclastos e atribui-se que o mecanismo desse processo seja a redução de c-Fos nestas células (SHINODA et al, 2003; LARI et al, 2007). O c-Fos é outro importante fator de transcrição da osteoclastogênese (LARI et al, 2007) e atua no processo de reconhecimento do sinal emitido pelo RANK após sua ativação (ASAGIRI; TAKAYANAGI, 2007).

### ***3.4 Tratamento do tecido ósseo para enxertia alógena***

#### *3.4.1 Diminuição da antigenicidade*

Os enxertos ósseos alógenos ou xenógenos incitam uma resposta imunológica pobre e que é significativamente diminuída se o tecido for tratado previamente à cirurgia. O

desengorduramento da porção medular é um dos mecanismos utilizados para promover a diminuição da antigenicidade do osso (DEIJKERS et al, 1999; KAWALEC-CARROL et al, 2007; TSHAMALA et al, 1999). Os protocolos de esterilização e conservação também competem para diminuir o potencial antigênico por promoverem necrose e desbridamento de células ósseas (DEIJKERS et al, 1999; KAWALEC-CARROL et al, 2007; TSHAMALA et al, 1999).

O carbonato de sódio, o hidróxido de sódio e o peróxido de hidrogênio são soluções utilizadas para desbridar a gordura do osso. A imersão do osso em carbonato de sódio elimina células da matriz (MOREAU et al, 2000), mas preserva a orientação das fibras colágenas (DUMAS et al, 2006). Os osteoblastos remanescentes se mantêm alinhados com o colágeno e ainda preservam a capacidade de sintetizar fosfatase alcalina. O peróxido de hidrogênio e o hidróxido de sódio inativam vírus apesar de eliminarem tecido osteóide e fragmentarem o colágeno. Por estes processos, os osteoblastos e os osteócitos praticamente desaparecem e os remanescentes caracterizam-se por um baixo potencial secretivo e não apresentam qualquer padrão de organização em meio ao colágeno fragmentado (DUMAS et al, 2006). Em todos os casos, as substâncias promovem a oxidação de lipídios, o que é desfavorável para a atividade dos osteoblastos do leito receptor (MOREAU et al, 2000).

A desmineralização, além de remover a matriz mineral, promove uma depleção dos componentes celulares que apresentam marcadores antigênicos. Depois desse tratamento espera-se uma maior absorção do osso alógeno enxertado após a cirurgia, pois se presume que ainda persiste um alto estímulo antigênico nas células ósseas que permanecem viáveis (LEWANDROWSKI et al, 2001).

O congelamento do tecido é outra modalidade bastante utilizada nos protocolos de banco de osso (FARRINGTON et al, 1998; HOU; YANG; HOU, 2005). Este método necrosa a célula (REIS et al, 2006b), hidrolisa lipídios, rompe sua membrana (BLOTTNER et al, 2001; CORCUERA et al, 2007) e, por conseguinte, desestrutura as proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (STEVENSON; SHAFFER; GOLDBERG, 1998; MOREAU et al, 2000). Na matriz extracelular, foram constatadas a diminuição do colágeno, de proteoglicanas e de sulfato de condroitina (LAOUAR et al, 2007). A resposta humoral ao osso congelado inicia-se rapidamente após a enxertia, mas decresce dentro de uma semana, enquanto a atividade humoral contra enxertos frescos perdura por muito tempo (STEVENSON; SHAFFER; GOLDBERG, 1996).

O congelamento mantém a quantidade de minerais no osso, mas altera o colágeno (MORENO; FORRIOL et al, 2002; LAOUAR et al, 2007) e a estrutura molecular do tecido, de modo que ele se torna mais resistente à atividade dos osteoclastos (KLUGER et al, 2003). A resistência à absorção diminui se a medular não for comprometida com o desgorduramento, mantendo as integrinas preservadas, o que permite fixação dos osteoclastos nessa região, por onde a sua ação se iniciará (KLUGER et al, 2003). As críticas a essa modalidade baseiam-se na sua ineficácia contra microorganismos (MOREAU et al, 2000) e na diminuição da resistência tênsil da cortical quando exposta a temperaturas inferiores a -80°C.

#### 3.4.2 Protocolos de esterilização

Apesar dessas iniciativas diminuírem significativamente a antigenicidade do osso, a possibilidade de contaminação cruzada por vírus não deixa de figurar como uma preocupação (NATHER, 2004; DUMAS et al, 2006; KAWALEC-CARROL et al, 2007). A inquietação com a transmissão de doenças infecto-contagiosas entre doador e receptor impõe um rígido controle na seleção do cadáver que é candidato à doação de osso. A história médica do doador é ricamente levantada buscando afastar anormalidades que possam influenciar o estado de saúde do indivíduo receptor (CARTER, 1999; NATHER, 2004; HOU; YANG; HOU, 2005). Exames complementares ainda investigam infecções pelo vírus da hepatite B, da hepatite C, da imunodeficiência humana (HIV) e pelo *Treponema palidum* (CARTER, 1999; LIU, J.W. et al, 2002; NATHER, 2004; HOU; YANG; HOU, 2005; TETTA et al, 2006). Antes da enxertia, avalia-se, através de cultura, a permanência de microorganismos que permaneceram viáveis após o congelamento (FARRINGTON et al, 1998; HOU; YANG; HOU, 2005).

A experiência de dois bancos de osso mostra que, em média, 18,6% dos enxertos coletados foram descartados (HOU; YANG; HOU, 2005), porque os doadores apresentavam sorologia positiva para algum dos patógenos citados. Os tecidos congelados foram submetidos apenas à desinfecção com antibiótico depois de descongelado (HOU; YANG; HOU, 2005). O teste microbiológico mostrou que 2% a 4% dos tecidos aproveitados estavam contaminados (LIU, J.W. et al, 2002; HOU; YANG; HOU, 2005), mas apenas 8% a 10% dos pacientes que receberam os enxertos contaminados apresentaram infecção pós-operatória (LIU J.W. et al, 2002; HOU; YANG; HOU, 2005). Mesmo assim, em alguns deles, o microorganismo

causador da infecção cirúrgica não foi o mesmo cultivado após o congelamento (HOU; YANG; HOU, 2005).

Alguns procedimentos de esterilização do tecido antes da sua estocagem ainda contribuem para redução da antigenicidade. A radiação gama é eficaz contra bactérias, contudo, para inativar o vírus HIV, é necessária uma dose que compromete a resistência tênsil do material (MOREAU et al, 2000; MORENO; FORRIOL, 2002). Com a irradiação, ocorrem desnaturação protéica e oxidação de lipídios diminuindo o potencial imunogênico. Em compensação, proteínas com potencial de osteoindução também são destruídas e os peróxidos derivados da alteração lipídica promovem a necrose de osteoblastos no leito receptor, comprometendo a integração do enxerto (MOREAU et al, 2000).

O uso de óxido de etileno consiste em outro protocolo para esterilizar o enxerto ósseo, mas está reservado a pequenos fragmentos, pois esse gás não penetra adequadamente em grandes blocos de osso. Esse método induz uma resposta inflamatória ao redor do material após sua enxertia que se constitui eminentemente de macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Ele preserva a quantidade de osteócitos no tecido, mas remanescentes do gás podem se depositar na intimidade do material e induzir esse quadro de inflamação asséptica que dificulta sua revascularização (TSHAMALA et al, 1999). Por isso, tem-se admitido que esse protocolo altera o potencial de osteocondução ou osteoindução dos enxertos (HIGUERA et al, 2005).

### ***3.5 Avaliação dos efeitos biológicos do plasma rico em plaquetas***

#### ***3.5.1 Fatores de crescimento presentes nas plaquetas***

Os grânulos alfa das plaquetas consistem de organelas ricas em fatores de crescimento, fatores de coagulação, proteases e proteínas de adesão (HARRISON; CRAMER, 1993). Os fatores de crescimento são polipeptídeos que funcionam como mediadores naturais regulando a regeneração tecidual, síntese de matriz, quimiotaxia, diferenciação e proliferação celular (KIRITSY, 1993; ANDRADE; BELTRÃO, 2001; GARCIA; CORRAL; BASCONE-MARTINEZ, 2004). Entre esses fatores, recebem maior atenção na literatura o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e o fator de transformador crescimento-beta (TGF-beta). O fator de crescimento epidérmico (EGF), o fator de crescimento fibroblástico

(FGF), o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) são menos estudados (GARCIA; CORRAL; BASCONE-MARTINEZ, 2004).

O PDGF é constituído por duas cadeias de aminoácidos potentes em estimular a síntese de ácidos nucleicos (ANDRADE; BELTRÃO, 2001). Presente nas plaquetas, ele também é sintetizado por macrófagos, células endoteliais, monócitos e fibroblastos (ANITUA, 1999; CARLSON; ROACH, 2002). Quando essa proteína se liga a receptores do tipo tirosina cinase induz a mitose e a liberação de citocinas para quimiotaxia pré-osteoblastos (MARX et al, 1998; ANITUA, 1999; ANDRADE; BELTRÃO, 2001). O TGF-beta apresenta-se nas formas de TGF-beta1, TGF-beta2 e TGF-beta3, mas os dois primeiros são os mais ativos (ANDRADE; BELTRÃO, 2001). Este fator de crescimento induz a mitose de células mesenquimais indiferenciadas, fibroblastos e macrófagos. O TGF-beta1 e o TGF-beta2 funcionam como quimiotáticos e mitogênicos de pré-osteoblastos, induzem a secreção de colágeno por essas células e inibem osteoclastos (ANITUA, 1999; MARX et al, 1998; CARLSON; ROACH, 2002).

O EGF incita a formação do tecido de granulação como também atua sobre células epiteliais (CARTER et al, 2003; GARCIA; CORRAL; BASCONE-MARTINEZ, 2004). Fibroblastos, pré-osteoblastos e pré-condroblastos são ricos em receptores para esse fator de crescimento (ARPORNMAEKLONG et al, 2004). O FGF ativa a migração das células endoteliais, disparando a angiogênese, (GARCIA; CORRAL; BASCONE-MARTINEZ, 2004; AGHALOO; MOY; FREYMILLER, 2005) e coordena a mitose de múltiplos tipos celulares de origem mesenquimal como fibroblastos, osteoblastos e condrócitos (GARCIA; CORRAL e BASCONE-MARTINEZ, 2004). O IGF constitui-se um agente quimiotático potente para as células endoteliais e um mitógeno importante para células osteoprogenitoras (AKEDA et al 2006a, 2006b; EPPLEY; WODEL; HIGGINS, 2004, 2006). O VEGF é um potente fator angiogênico, estimula a diferenciação de osteoblastos e inibe sua apoptose (KLEINHEIZ et al, 2005; ANITUA et al, 2006; LEACH et al, 2006; MENDONÇA-CARIDAD; JUIZ-LOPEZ; RUBIO-RODRIGUEZ, 2006).

Assim sendo, esses fatores de crescimento incrementam a osteogênese diretamente, por intensificar a proliferação de osteoblastos e, indiretamente, por promover uma maior angiogênese. Adicionalmente, eles ainda melhoram o reparo dos tecidos moles sobre os defeitos ósseos, resultando numa melhor cobertura do microambiente ósseo em cicatrização.

Alguns exemplos clássicos dessa simbiose foram constatados na prática odontológica (ANITUA,1999; OBARRIO et al, 2000; OYAMA et al, 2004; MÉNDEZ et al, 2006).

### *3.5.2 Associação do PRP com enxertos colocados dentro de cavidades ósseas*

#### *3.5.2.1 Reparo de defeitos ósseos na prática clínica*

O defeito mais comum na Odontologia é o alvéolo de uma exodontia. O seu preenchimento com PRP resultou numa deposição precoce de osso trabecular maduro e na epitelização mais rápida da superfície (ANITUA,1999). A colocação de PRP em alvéolos de terceiros molares diminuiu a profundidade de sondagem e a retração gengival na face distal do segundo molar (SAMMARTINO et al, 2005). A perda óssea horizontal do osso alveolar, tratada com osso xenógeno e PRP, evoluiu com regeneração da altura óssea e ganho de inserção gengival (OBARRIO et al, 2000). A melhor estabilização do coágulo e a mais rápida neoformação óssea dificultaram a penetração do epitélio juncional no tecido em reparo.

Pacientes fissurados apresentam uma solução de continuidade no rebordo alveolar, agravada pela separação das interfaces ósseas por mucosa. Somente com enxerto ósseo é possível alavancar a reabilitação da região. A associação do PRP melhorou o aproveitamento dos enxertos, pois aumentou a osteogênese a eles atribuída, resultando em sua menor absorção (MÉNDEZ et al, 2006; OYAMA et al, 2004). Os fatores de crescimento das plaquetas ainda intensificaram o reparo dos retalhos confeccionados nos tecidos moles, o que foi advogado como vantagem adicional para a incorporação do enxerto (MÉNDEZ et al, 2006).

#### *3.5.2.2 Reparo de defeitos ósseos experimentais*

A ação do PRP sobre o reparo ósseo foi confirmada com a cicatrização de cavidades experimentais (AGHALOO; MOY; FREYMILLER, 2002, 2005; KIM; PARK; CHOUNG, 2001; THORWARTH et al, 2005; SCHLEGEL et al, 2004; YAZAWA et al, 2004a, 2004b; GERARD et al, 2006). Com o PRP, a angiogênese e quantidade de osso neoformado nos defeitos foram maiores e, por conseguinte, as lojas cirúrgicas estavam mais radiopacas (KIM;

PARK; CHOUNG, 2001; YAZAWA et al, 2004a). Houve melhora na expressão de proteína morfogenética óssea (BMP), colágeno I, osteocalcina, osteopontina, osteonectina em diferentes fases do reparo e numa correlação direta com a plaquetometria (THORWARTH et al, 2005; WILTFANG et al, 2004). Nesse sentido, é válido ressaltar que os melhores resultados foram encontrados nos trabalhos cuja plaquetometria do PRP foi 30% maior (AGHALOO; MOY; FREYMILLER, 2002, 2005) do que a obtida em outros, nos quais ele não se mostrou tão eficaz (THORWARTH et al, 2005; SCHLEGEL et al, 2004).

O rendimento de enxerto xenógeno ou alógeno congelado, inserido em defeitos cirúrgico no osso, foi melhor quando se incorporou o PRP ao biomaterial (AGHALOO; MOY; FREYMILLER, 2005; YAZAWA et al, 2004a). O incremento na osteogênese, entretanto, foi mais evidente quando esse concentrado de fatores de crescimento estava associado ao osso xenógeno fresco (KIM; PARK; CHOUNG, 2001). Com a adição de PRP ao colágeno xenógeno, o reparo dos defeitos só esteve melhor na 12ª semana (SCHLEGEL et al, 2004), mas, com enxerto autógeno, o PRP aumentou a eficiência do reparo na 2ª semana. Esta associação foi mais conveniente para os momentos iniciais e favoreceu a estabilidade do osso neoformado a longo prazo.

A osteogênese atribuída ao colágeno xenógeno não foi eficaz mesmo na presença de PRP. A sua adição ao colágeno para o preenchimento de defeitos ósseos na tíbia (SARKAR et al, 2006) não melhorou o volume, a densidade mineral, a neoformação óssea ou a fibrose. A justificativa para esses achados reside na escassez de tecido medular na tíbia. Uma vez que o PRP não é citodiferenciador, biomateriais osteoindutores ou precursores de osteoblastos, presentes na medula e em enxertos autógenos, seriam necessários para a neoformação óssea (ROLDAN et al, 2004a, 2004b; BUTTERFIELD et al, 2005; RAGHOEBAR et al, 2005; SARKAR et al, 2006).

A despeito desses experimentos sinalizarem um benefício com uso do PRP, na maioria deles, o defeito controle também foi enxertado com algum substituto ósseo. A conclusão a respeito do potencial do PRP fica restrita, pois uma cavidade enxertada exibirá reparo acelerado, independente dos fatores de crescimento. O maior desafio foi avaliado quando se comparou, no crânio de coelho, uma cavidade vazia a outras preenchidas com osso autógeno ou PRP isolados, e osso autógeno associado ao PRP (AGHALOO; MOY; FREYMILLER, 2002; WILTFANG et al, 2004). O PRP isolado induziu uma ossificação semelhante à da cavidade vazia. O enxerto autógeno, associado ou não ao PRP, mostrou um comportamento melhor, embora o uso combinado tenha incrementado o trabeculado e a radiopacidade.

O crânio de coelhos não apresenta diâmetro suficiente para comportar tantos defeitos críticos (AGHALOO; MOY; FREYMILLER, 2002, 2005). Se todos os defeitos assim fossem, os resultados da associação do enxerto autógeno com o PRP seriam melhores, como foi constatado em defeitos extensos na mandíbula de cães (GERARD et al, 2006). Outro grande desafio imposto ao PRP foi a cicatrização de defeitos no fêmur de ratos diabéticos (GANDHI et al, 2006). A adição do concentrado de plaquetas, nestes animais equiparou a deposição de osso com a observada em ratos endocrinologicamente normais. Ela ainda foi significativamente superior a dos ratos diabéticos nos quais não foram colocados fatores de crescimento. Nestes últimos, a formação de cartilagem foi intensa.

### *3.5.2.3 Levantamento da membrana sinusal*

O levantamento da membrana sinusal é uma técnica cirúrgica bastante popularizada quando se discutem as reabilitações dos maxilares. A incorporação do PRP ao protocolo objetiva melhorar o processo de manuseio do enxerto (WHITMAN; BERRY, 1998; DOHAN et al, 2006, FREYMILLER; AGHALOO, 2004, AJZEN et al, 2006), uma vez que, nestes casos, se faz mandatório seu uso na forma particulada (ACOSTA-FERIA et al, 2006). Obviamente, espera-se também intensificar o reparo ósseo, considerando que fatores de crescimento plaquetários serão liberados no meio.

Para preencher o espaço entre as paredes do seio e a membrana sinusal, tem-se empregado o PRP associado com osso autógeno (THORN et al, 2004; AJZEN et al, 2005; BUTTERFIELD et al, 2005; RAGHOEBAR et al, 2005; MANAI, 2006), com osso xenógeno (RODRIGUEZ et al, 2003; ROLDÁN et al, 2004b) ou BMP (ROLDÁN et al, 2004a, 2004b). Nos seios reconstruídos com enxertos associados ao PRP, a densidade óssea foi maior que no lado controle (BUTTERFIELD et al, 2005; RAGHOEBAR et al, 2005; AJZEN et al, 2005). A neoformação óssea com a adição de PRP só foi menor se o preenchimento do seio foi conduzido com osso autógeno e BMP (ROLDÁN et al, 2004a; JUNG et al, 2005).

Em alguns casos, optou-se pela instalação imediata de implantes nos enxertos (ROLDÁN et al, 2004; RODRIGUEZ et al, 2003; THORN et al, 2004). A osteointegração foi mais evidente quando enxerto xenógeno e BMP, sem PRP, preenchiam a cavidade sinusal (ROLDÁN et al, 2004). As perdas de implante em avaliações mediatas não diferiram com o uso do PRP (RODRIGUEZ et al, 2003; RAGHOEBAR et al, 2005; MANAI, 2006; THORN et al, 2004).

Outros autores discordam desses achados ao demonstrar uma maior interface de osteointegração com os implantes de titânio quando o PRP foi associado com o osso autógeno ou aloplástico (KLONGNOI et al, 2006a, 2006b).

A similaridade de achados entre os grupos teste e controle resultou do longo tempo entre a enxertia e a observação pós-operatória. Na maioria dos trabalhos, a primeira observação foi conduzida num período em que o processo já estava consolidado mesmo nos seios sem PRP. O PRP tem atividade quimiotática, mitogênica e angiogênica, mas seu pico de ação ocorre nos dias iniciais. É importante frisar que o PRP não promove citodiferenciação em osteoblastos como fazem a família das BMPs que, por conseguinte, induziram maior aposição de matriz óssea (ROLDAN et al, 2004a; BUTTERFIELD et al, 2005; RAGHOEBAR et al, 2005). O ideal teria sido comparar a BMP isolada com a BMP associada ao PRP. Nesta situação, ocorreria uma simbiose entre dois biomateriais – o primeiro, um citodiferenciador, e o outro, um mitógeno (JUNG et al, 2005).

#### *3.5.2.4 Preenchimento de espaços entre implantes e o leito cirúrgico*

Um questionamento importante é se o PRP pode modificar a osteointegração de implantes de titânio. Esse fenômeno só foi intensificado numa plaquetometria entre 503.000 a 1.700.000 células/ $\mu$ l. Valores abaixo ou acima destes não ocasionaram diferenças de resultados (WEIBRICH et al, 2004). Os achados insatisfatórios foram atribuídos ao método para a aplicação do PRP no alvéolo, que foi realizada com uma seringa de insulina, o que alargou seu diâmetro e diminuiu o contato inicial entre osso e implante - um importante critério para osteointegração (WEIBRICH et al, 2004; MONOV et al, 2005).

Outra situação bastante corriqueira é o preenchimento do inevitável espaço entre osso e implante de titânio quando este é colocado no alvéolo imediatamente após uma exodontia. O espaço entre as roscas do implante e a parede do leito cirúrgico foi preenchido com enxertos de diferente natureza, aglutinados ou não por PRP (KIN et al, 2002; JENSEN et al, 2004, 2005). A associação do PRP com osso xenógeno fresco não induziu uma maior osteointegração nem aumentou o torque necessário para remoção do implante do interior do osso (KIM et al, 2002; JENSEN et al, 2005). O osso desmineralizado mostrou resultados mais satisfatórios, e com esse biomaterial, o PRP intensificou a osteointegração (KIN et al, 2002).

### *3.5.3 Utilização do PRP nas reconstruções dos maxilares*

Os primeiros trabalhos sobre PRP (WHITMAN; BERRY; GREEN, 1997; MARX et al, 1998; WHITMAN; BERRY, 1998) discutiram suas propriedades fundamentando-se em experiências de reconstruções mandibulares após ressecções. A esperança, traduzida pela neoformação constatada, era de que o PRP representava um excelente adjuvante ao reparo ósseo. Além disso, o seu coágulo minimizou o problema da manipulação dos enxertos particulados, que exibem uma baixa taxa de revascularização. Os fatores de crescimento plaquetários por serem angiogênicos diminuíram esse efeito.

Whitman, Berry e Green, (1997) divulgaram casuísticas de reconstrução de mandíbula e de rebordo fissurado com osso particulado com excelentes resultados atribuídos ao PRP. Em 1998, esses autores reforçaram a utilização deste coágulo, salientando sua habilidade como amálgama desse tipo de enxerto (WHITMAN; BERRY; GREEN, 1997). Marx et al (1998) havia enaltecido as propriedades desse concentrado plaquetário quando constatou uma maturidade radiográfica dos enxertos que histologicamente ostentavam osso mais denso que os pacientes reconstruídos sem PRP.

Esses resultados foram validados por Merckx, Fennis e Verhagen (2004), Thorn et al (2004) e Thor, Warfvinge e Fernandes (2006) que obtiveram excelente integração do enxerto autógeno particulado ao osso mandibular. O ganho foi favorável e, quando houve necessidade de mais osso, o tecido neoformado foi submetido à distração osteogênica com sucesso (THOR; WARFVINGE; FERNANDES, 2006). A enxertia de osso particulado com o PRP permitiu a instalação de implantes com irrisória taxa de perda. Roldán et al (2004a) ainda concluíram que o potencial do PRP na osteocondução do enxerto particulado posicionado à mandíbula era semelhante ao da BMP que é um potente osteoindutor.

A enxertia mandibular é uma necessidade após a ressecção de tumores da boca ou traumas, como nos ferimentos por arma de fogo. As placas de titânio isoladas sofrem fraturas devido ao vetor de forças resultante da atividade dos músculos da mastigação (MERKX; FENNIS; VERHAGEN, 2004). A associação com enxertias ósseas previne a fratura das placas que passará a dividir a carga mastigatória com o novo tecido. Nesse sentido, uma série de artigos avaliou a combinação entre o PRP e os enxertos utilizados para este fim (FENNIS; STOELINGA; JASSEN, 2002, 2004, 2005).

Após a fixação da placa de reconstrução, o ângulo mandibular de ovelhas foi ressecado, e a medular curetada, originando um leito de osso cortical que foi preenchido com osso da crista do íliaco particulado, misturado ou não com PRP (FENNIS; STOELINGA; JASSEN, 2002, 2005). Em outros animais, o arcabouço de osso mandibular cortical foi irradiado antes de ser reenxertado e, nesse caso, o osso particulado estava misturado ao PRP (FENNIS; STOELINGA; JASSEN, 2005).

Quando o PRP foi empregado, os enxertos estavam mais homogeneamente radiopacos e formaram um calo ósseo mais exuberante na interface com o leito receptor. A irradiação não causou modificações significativas, mas induziu um calo ósseo mais pobre (FENNIS; STOELINGA; JASSEN, 2002, 2005). Histologicamente, houve neoformação óssea e vascular no interior do leito cortical em intensidade crescente nos grupos sem o PRP, com PRP e leito cortical irradiado e com PRP e leito cortical não irradiado (FENNIS; STOELINGA; JASSEN, 2004, 2005).

Em outra investigação, a descontinuidade obtida na mandíbula após a ressecção experimental foi preenchida com o próprio tecido mandibular triturado, associado ou não ao PRP, mas sem o adjunto do leito cortical (CHOI et al, 2004). Nessas condições, a realidade foi bem diferente. A combinação do enxerto com o concentrado de fatores de crescimento competiu para uma união fibrosa entre o osso normal e o enxerto. O trabeculado ósseo ocupava apenas 36,8% do enxerto, e o remanescente eram ilhas de fibrose. Quando não se usou PRP, um calo unia o osso enxertado ao osso normal e o trabeculado ocupava 56,7% da área do enxerto.

O leito de osso cortical foi uma variável de distinção entre os estudos e sustenta uma explicação para a diferença nos resultados. Esse arcabouço é um microambiente propício para neoformação óssea a partir de enxerto particulado com PRP. Quando está em contato direto com os tecidos vizinhos, os fatores de crescimento podem estimular a proliferação dos fibroblastos do periósteo, resultando maior fibrose no tecido, pois a secreção de fibras ocorre precocemente à de matriz óssea.

#### *3.5.4 Desempenho do PRP em cultura de células*

O potencial mitogênico do PRP pôde ser constatado nas pesquisas com crescimento de células, sejam elas pré-osteoblastos (KANNO et al, 2005; OGINO et al, 2006;) ou células indiferenciadas da medula óssea (LUCARELLI et al, 2003, 2005; ARPORNMAEKLONG et

al, 2004). O crescimento de células de tendões humanos (ANITUA et al, 2005), condrócitos (AKEDA et al, 2006b), disco intervertebral (AKEDA et al, 2006a) e fibroblastos (LIU, Y. et al, 2002) também foi avaliado frente aos fatores de crescimento oriundos das plaquetas. Os meios de cultura foram preparados com diferentes concentrações de PRP (ARPORNMAEKLONG et al, 2004; KANNO et al, 2005; OGINO et al, 2006;) ou com o sobrenadante obtido após sua coagulação (LUCARELLI et al, 2003, 2005; ANITUA et al, 2005; LIU, Y. et al, 2002; AKEDA et al, 2006a, 2006b).

A proliferação celular foi ponderada pela atividade mitocondrial (ARPORNMAEKLONG et al, 2004), pela quantidade de ácido desoxirribonucleico - DNA (AKEDA et al, 2006a, 2006b) ou timidina (LIU, Y. et al, 2002; LUCARELLI et al, 2003; KANNO et al, 2005; OGINO et al, 2006). O crescimento celular aponta para um efeito benéfico do PRP, sugerindo sua atividade mitogênica intrínseca (EPPLEY; WOODDEL; HIGGINS, 2006). Os trabalhos foram unânimes em relação a maior proliferação das células quando o PRP, ou o produto liberado durante sua coagulação, foi adicionado ao meio de cultura (OGINO et al, 2006; ARPORNMAEKLONG et al, 2004; LUCARELLI et al, 2003, 2005; KANNO et al, 2005; AKEDA et al, 2006a, 2006b). Essa constatação desapareceu quando as mesmas células foram colocadas num meio sem fatores de crescimento plaquetários (LUCARELLI et al, 2003, 2005).

Algumas evidências demonstraram que esse efeito foi dose dependente. Diferentes concentrações de plaquetas (ARPORNMAEKLONG et al, 2004; CHOI et al, 2005; OGINO et al, 2006) e de sobrenadante do coágulo do PRP (LUCARELLI et al, 2003, 2005) aumentaram a proliferação celular em correlação direta. O plasma pobre em plaquetas (PPP) (ARPORNMAEKLONG et al, 2004; OGINO et al, 2006; CHOI et al, 2005) ou mesmo o sangue total (KANNO et al, 2005) induziram menor proliferação celular. A adição de BMP, apesar de ser um potente agente na diferenciação da linhagem osteogênica, não intensificou a proliferação como o PRP (ARPORNMAEKLONG et al, 2004).

O aumento da proliferação celular atribuído ao PRP é resultante de um efeito sinérgico do PDGF, do TGF-beta e do IGF (OGINO et al, 2006). A quantidade de células foi menor em meios contendo PRP e anticorpos que neutralizariam um fator de crescimento específico. À proporção que a proliferação celular aumentou, a quantidade de fatores de crescimento no meio diminuiu, do que se depreende que essas proteínas foram endocitadas pelas células (ANITUA et al, 2005). A atividade mitogênica do PRP foi melhor evidenciada num pH em torno de 5. No pH entre 7 e 7,6 houve um decréscimo de proliferação celular devido a uma diminuição na liberação de PDGF (LIU, Y. et al, 2002).

Este aspecto biológico explica por que o PRP é mais eficaz nos primeiros dias do reparo (ROLDÁN et al, 2004b; BUTTERFIELD et al, 2005; RAGHOEBAR et al, 2005), onde, devido à inflamação, o pH da ferida e do meio circunvizinho é baixo, e com a gradação do processo de reparo, há uma tendência ao aumento. O maior aporte de oxigênio às células ocorre também num pH baixo quando a dissociação da oxi-hemoglobina é maior, o que contribui para mitose (RAGHOEBAR et al, 2005).

O PRP também modificou a diferenciação e o metabolismo celular. A fosfatase alcalina, uma enzima que hidrolisa íons fosfato e organiza a hidroxiapatita (LUCARELLI et al, 2003, 2005), é expressa no início do processo de diferenciação dos osteoblastos. A expressão dessa enzima está diretamente relacionada a um maior conteúdo de cálcio no interior das células (ARPORNMAEKLONG et al, 2004). Altos teores de fosfatase alcalina e de cálcio foram titulados na presença de BMP e de PRP. Entretanto, maiores quantidades de fosfatase alcalina foram secretadas quando as células diminuíram a intensidade de proliferação (ARPORNMAEKLONG et al, 2004; KANNO et al, 2005). O PRP, apesar de intensificar a proliferação de pré-osteoblastos, dificultou a diferenciação definitiva dessas células (ARPORNMAEKLONG et al, 2004).

Outras proteínas da matriz óssea, como colágeno I, osteopontina, osteoprotegerina e RANK-L, que atestam a presença de osteoblastos maduros, obedeceram ao mesmo padrão da fosfatase alcalina (ARPORNMAEKLONG et al, 2004). Na fase de crescimento celular, a secreção dessas proteínas diminuiu à proporção que a concentração de PRP aumentou, mas, na fase de confluência, a síntese dessas proteínas aumentou numa relação direta com a concentração do PRP (LIU, Y et al, 2002; KANNO et al, 2005; AKEDA et al, 2006a, 2006b). A síntese de proteoglicanos também é intensificada pela ação do PRP (AKEDA et al, 2006a, 2006b).

### *3.5.5 Bioengenharia óssea*

A tendência consiste na bioengenharia quando o assunto é regeneração tecidual. Células-tronco proliferam num meio de cultura simples ou acrescido de substâncias que propiciam o aparecimento de um determinado fenótipo. A diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em pré-osteoblastos ocorre na presença de dexametasona, beta-

glicerofosfato de sódio e  $\alpha$ -ácido-ascórbico-2-fosfato (YAMADA et al, 2004; KITO et al, 2004, 2007; OHYA et al, 2005).

A inoculação de células mesenquimais indiferenciadas numa interface de osso por si só melhora o reparo (ZHU et al, 2006; LICARELLI et al, 2005). O PRP, devido à coagulação, funciona como um veículo para o transplante dessas células para o leito cirúrgico e, frente à riqueza de fatores de crescimento, sua proliferação fica incrementada no osso receptor (LUCARELLI et al, 2005; KITO et al, 2007).

PRP coagulado contendo em seu interior células indiferenciadas da medula e BMP foi introduzido no tecido celular subcutâneo de camundongos (ZHU et al, 2006). Esse coágulo, contendo fatores mitogênicos e osteoindutores foi encapsulado sem induzir resposta inflamatória. O seu interior foi povoado por trabéculas ósseas e osteoblastos, e a periferia delimitada por osso cortical sem evidência de formação de cartilagem.

A contribuição do PRP à bioengenharia foi também averiguada com preenchimento de cavidades nos maxilares de mamíferos apenas com PRP, apenas com osso autógeno, e com PRP misturado a osso autógeno ou a pré-osteoblastos previamente cultivados (YAMADA et al, 2004; OHYA et al, 2005). As cavidades vazias ou preenchidas apenas com PRP encerraram os piores resultados, enquanto o preenchimento com pré-osteoblastos associados ao PRP resultou em abundante neovascularização e osso bem diferenciado (YAMADA et al, 2004). O comportamento do PRP associado a pré-osteoblastos foi semelhante ao associado a enxerto autógeno (OHYA et al, 2005).

A associação do PRP com osso alógeno e células mesenquimais indiferenciadas resultou também num aumento da neoformação óssea dentro do enxerto e na sua interface com o leito receptor (LUCARELLI et al, 2005). Esses eventos têm respaldo na maior angiogênese que foi atribuída tanto aos fatores de crescimento do PRP como ao perfil das células-tronco. A combinação desses dois adjuvantes ainda contribuiu para uma maior integração dos parafusos de titânio que fixavam o enxerto ao leito receptor (LUCARELLI et al, 2005).

Implantes osteointegráveis ainda foram inseridos nesse osso em regeneração. A cortical ao redor do implante estava fenestrada nas cavidades que estavam sem enxertos ou que foram preenchidas apenas com PRP. As roscas dos implantes estavam cobertas por espessa cortical nas cavidades tratadas com pré-osteoblastos cultivados e PRP (YAMADA et al, 2004). O contato do osso com o implante também foi mais intenso quando se associou pré-osteoblastos ao PRP (ITO et al, 2006). Diferentemente de outros estudos, os grupos tratados apenas com o

PRP, osso autógeno, pré-osteoblastos, ou cola de fibrina exibiram resultados estatisticamente similares (YAMADA et al, 2004).

A introdução do PRP nos protocolos de distração osteogênica melhorou a vascularização da região em tratamento e, conseqüentemente, assegurou adequada produção de osteóide (ROBIONY et al, 2002). Nesses protocolos, ele também foi usado como veículo de células com a vantagem de ser atóxico e inerte (KITOH et al, 2004; HERNANDEZ; ROSSANI, 2005). A inserção desse coquetel, constituído por células indiferenciadas e fatores de crescimento, na região submetida à distração, promoveu mais rápida deposição de osso encurtando o período de consolidação. Do mesmo modo, diminuiu a incidência de complicações após a remoção do distrator (KITOH et al, 2004, 2007).

### *3.5.6 Outras aplicações*

Pacientes que fazem uso de anticoagulantes estão sujeitos a um sangramento pós-operatório de difícil controle. O PRP apresenta plaquetas com elevado potencial de agregação e alta concentração de fatores V e VIII. Deste modo, ele diminui o tempo de coagulação mais eficazmente que outros hemoderivados e propicia a formação de um trombo precoce e mais estável, reduzindo a perda sanguínea pós-operatória (YAMAMOTO et al, 1996; DELLA VALLE et al, 2003). A transfusão de PRP triplica a concentração de plaquetas e fatores de coagulação circulantes.

Esse concentrado de plaquetas foi usado em cirurgias cardíacas (YAMAMOTO et al, 1996) e exodontias (DELLA VALLE et al, 2003) de pacientes que fazem uso de anticoagulantes, objetivando reduzir o risco de sangramento e evitar transfusões alógenas. Em ambas situações, a incidência de hemorragia pós-operatória foi baixa, não foi necessário transfundir fatores de coagulação ou suspender o uso de anticoagulantes. Portanto, diminuíram-se os custos com hospitalização e os riscos de tromboembolismo ou transmissão de doenças.

O sangramento capilar também é um problema nas suspensões faciais (MAN; PLOSKER; WINLAND-BROWN, 2001) e nas artroplastias do joelho (GARDNER et al, 2006; SANCHEZ et al, 2003). O sangramento pós-operatório pode causar hematomas ou seromas e gerar a necessidade de reintervenção. A irrigação do leito cirúrgico com PRP diminuiu a utilização de drenos e curativos compressivos (EPPLEY; WOODDEL; HIGGINS, 2006). Os pacientes cursaram com maiores valores de hemoglobina e menor dor pós-operatória com

conseqüente diminuição do tempo de recuperação. Adicionados aos efeitos clínicos, o PRP ainda cria um arcabouço para a proliferação celular que não se processa em espaços mortos.

Ele também foi associado à enxertia autógena de gordura nas ritidectomias (SERRA RENOM; MOÑOS DEL OLMO; GONZALO CABALLERO, 2006) e no tratamento de celulite (HERNANDEZ; ROSSANI, 2005) com eficácia em observações a longo prazo. A inserção de PRP nos curativos pós-operatórios favoreceu a integração de enxertos cutâneos realizados em cirurgia plástica. As feridas crônicas apresentaram diminuição de diâmetro e desenvolveram um tecido de granulação de melhor qualidade (VENDRAMINI et al, 2006).

O PRP, usado no curativo de feridas ou injetado em incisões, acarretou uma epitelização mais rápida e o aparecimento precoce de melanócitos na camada basal (KIMURA et al, 2005; CARTER et al, 2003). Células expressando citoqueratina 10 estavam presentes em todas as camadas do epitélio e bem próximas do bordo da ferida. Nas feridas que cicatrizaram espontaneamente, apenas a camada superficial do epitélio continha células marcadas e elas estavam mais distantes do bordo. Neste grupo, o colágeno estava aleatoriamente disposto em diversos ângulos, enquanto nas feridas tratadas com PRP, as fibras estavam organizadas e paralelas ao epitélio (CARTER et al, 2003; KIMURA et al, 2005).

### ***3.6 O processo de preparação do PRP***

O PRP é obtido por centrifugação do sangue total, e a seqüência de procedimentos resulta numa concentração da fração plaquetária superior à quantidade basal (PIETRZAK; EPPLEY, 2005; AKEDA et al, 2006a, 2006b; EPPLEY; WOODDEL; HIGGINS, 2006). Diversas metodologias foram utilizadas na sua preparação de modo que não se observa um consenso sobre os protocolos para que se obtenha um PRP com características homogêneas entre os diferentes trabalhos.

### 3.6.1 Centrifugação

Os primeiros protocolos sobre o PRP basearam seus métodos na utilização de equipamentos de separação celular (WHITMAN; BERRY; GREEN, 1997; MARX et al, 1998) que ainda são utilizados (THOR; WARFVINGE; FERNANDES, 2006). A vantagem desse método é a manutenção de um sistema fechado, onde a manipulação do sangue total até o PRP estaria isenta de contaminação (DUGRILLON et al 2002; THORN et al, 2004). As frações que foram removidas, como plasma e eritrócitos, poderiam ser reinfundidas (MARX et al, 1998; CARTER et al, 2003; EPPLEY; WOODDEL; HIGGINS, 2004; FENNIS; STOELINGA; JASSEN 2002, 2004, 2005; THOR; WARFVINGE; FERNANDES, 2006; GARDNER et al, 2006).

Lozano et al (2003) propuseram o emprego de um filtro de redução celular para produzir o PRP e o compararam à aférese e às centrifugações. O filtro e a aférese diminuíram a ativação das plaquetas durante este preparo, prevenindo a liberação precoce de citocinas. A aférese ainda promoveu maior concentração plaquetária que as centrifugações (VASCONCELOS, FIGUEIREDO; SEGHATCHIAN, 2003), mas esse método isola plaquetas menores e com menor quantidade de fatores de crescimento.

Os protocolos que usam bolsas exigem a coleta de grande quantidade de sangue total, cujos valores oscilam entre 200 (THORN et al, 2004; KITOHO et al, 2004, 2007) e 500ml (MERKX; FENNIS; VERHAGEN, 2004). Inclusive, a coleta em equinos, por esse método, envolveu a obtenção de um litro de sangue (CARTER et al, 2003). Os equipamentos para centrifugação das bolsas são de alto custo e estão disponíveis apenas em centros cirúrgicos ou bancos de sangue (LANDESBURG et al, 2000). Recentemente, a possibilidade de obtenção do PRP, a nível ambulatorial, tornou-se uma realidade, o que ampliou sua utilização (GARCIA; CORRAL; BASCONE MARTINEZ 2005).

A comercialização de acessórios, que contemplam todas as etapas do seu preparo, desde a coleta, passando pela centrifugação até a aplicação do PRP no leito cirúrgico, expandiu consideravelmente (WEIBRICH et al, 2002a, 2002b; DOHAN et al, 2006; ACOSTA-FERIA et al, 2006). Esses acessórios, entretanto, agravam o problema da falta de padronização, uma vez que neles não há qualquer referência às forças que são impostas às células (WEIBRICH et al, 2003a, 2003b). A análise da concentração de IGF, TGF-beta e PDGF mostrou que, durante a centrifugação, cada acessório privilegia o aumento de um fator de crescimento diferente,

sugerindo que as plaquetas são submetidas a diferentes tratamentos (WEIBRICH et al, 2003a, 2003b). Somente os artigos que utilizam centrífugas de uso genérico divulgaram os seus parâmetros. Ainda assim, a realidade está distante de uma concordância. Os parâmetros de centrifugação ora foram apresentados em função da velocidade do rotor (rpm), ora na forma de aceleração de centrífuga relativa (ACR) cuja notação utilizada é o g.

É digno ressaltar que a divulgação da velocidade da centrífuga é pouco contributória, pois, de acordo com o diâmetro do rotor, duas amostras de sangue total, centrifugadas numa mesma velocidade, terão suas células expostas a diferentes acelerações. Uma vez que plaquetas expostas a forças altas sofrem ativação e precoce liberação dos seus fatores de crescimento (PIETRZAK; EPPLEY, 2005), se duas amostras de sangue foram centrifugadas na mesma velocidade, o PRP obtido na centrífuga de menor diâmetro terá um rendimento melhor.

A variedade de rotações entre os trabalhos é muito grande. A maioria dos autores utiliza duas rotações com velocidades variando entre 1000 e 5600rpm e forças oscilando entre 150 e 5000g. Uma padronização sobre essa questão sugeriu que a primeira rotação deve ser mais pesada que a segunda (MARX, 2001; PIETRZAK; EPPLEY, 2005). Apenas os trabalhos originais (WHITMAN; BERRY; GREEN 1997; MARX et al, 1998), e aqueles que utilizaram a mesma metodologia (OBARRIO et al 2000; CHOI et al, 2004; THOR; WARFVINGE; FERNANDES, 2006), adotaram este critério. Anitua et al (2005) também empregaram uma força maior durante a primeira centrifugação, mas os valores foram divulgados em ACR, enquanto os demais divulgaram os parâmetros em rpm.

O principal objetivo deste tipo de protocolo é separar o PPP dos componentes figurados do sangue. Para tanto, a primeira rotação, mais rápida, delimita com precisão o início da camada leucoplaquetária. A maior parte do plasma constitui o PPP e é desprezado (WHITMAN; BERRY; GREEN 1997; MARX et al, 1998; OBARRIO et al 2000; KIM et al, 2002; CHOI et al, 2004; ANITUA et al, 2005). Na segunda centrifugação, a interface entre hemácias e camada leucoplaquetária não é clara. O remanescente de plasma, leucócitos e plaquetas e a porção superficial da camada de hemácias constituirão o PRP. A maior parte dos eritrócitos é desprezada.

Na maioria dos protocolos consultados, a segunda rotação foi a mais pesada, e sua preocupação é separar o PPP do PRP. Na primeira rotação, as células do sangue sedimentam-se abaixo do plasma, de acordo com seus gradientes, sem uma definição dos limites de cada camada. Aspira-se o plasma, contendo leucócitos e plaquetas, e a porção superficial dos eritrócitos. O restante destas células é desprezado. Na segunda rotação, fica

bem configurado o limite com o PPP, que é aspirado. O remanescente do tubo de ensaio é designado como PRP.

Entre os trabalhos que usaram os protocolos clássicos, a concentração plaquetária foi muito semelhante, e, em média, inferior a um milhão de células/ $\mu\text{l}$ , exceto Choi et al (2004), que obteve 1.120.000 plaquetas/ $\mu\text{l}$ . Arpornmaeklong et al (2004) utilizou a primeira velocidade mais forte, mas a separação foi conduzida conforme o segundo protocolo. Coincidentemente, sua concentração plaquetária final foi a maior e foi responsável por uma alta proliferação de osteoblastos.

Poucos trabalhos (LANDESBURG et al, 2000; TSAY et al, 2005; KANO et al, 2006) utilizaram a mesma força nas duas rotações. Dois deles (LANDESBURG et al, 2000; TSAY et al, 2005) não divulgaram sua plaquetometria, mas alcançaram uma alta liberação de fatores de crescimento pelo PRP produzido. Outro trabalho que optou por repetir a força exercida encontrou a mais baixa plaquetometria, mas que foi suficiente para estimular a proliferação de osteoblastos em culturas (KANO et al, 2006).

O PRP pode ser obtido por uma única rotação (ANITUA, 1999; FUSEGAWA et al, 1999; SANCHEZ et al, 2003; JENSEN et al, 2004; EPPLEY; WOODDEL; HIGGINS, 2004; THORN et al, 2004; SAMMARTINO et al, 2005; SERRA RENOM; MUÑOZ DEL OLMO; GONZALO CABALLERO, 2006). Advoga-se que sua qualidade fica comprometida, pois não haveria uma adequada identificação dos elementos do sangue no momento da aspiração do sobrenadante (MARX, 2001). A plaquetometria obtida por esse protocolo foi superior a um milhão de células/ $\mu\text{l}$  (ANITUA, 1999; FUSEGAWA et al, 1999; JENSEN et al, 2004) e ficou demonstrado, através da baixa expressão de P-selectina, uma glicoproteína de membrana dos grânulos alfa, expressa na superfície de plaquetas ativadas (EPPLEY; WOODDEL; HIGGINS, 2004), que uma única centrifugação não promoveu ativação plaquetária (EPPLEY; WOODDEL; HIGGINS, 2004).

O tempo de centrifugação das amostras oscilou bastante entre os protocolos, a mediana do tempo de centrifugação foi 10 minutos, sendo que o menor tempo foi 5 (KANNO et al, 2005) e o maior 40 minutos (KIM; PARK; CHOUNG, 2001). Pela análise dos trabalhos, ou a primeira centrifugação, apresenta a mesma duração ou é mais rápida que a segunda. Defende-se que a rotação inferior a 5 minutos não é eficaz em concentrar plaquetas (LANDESBURG et al, 2000), mas é presumível que a exposição das plaquetas a uma força por um tempo grande poderá aumentar sua ativação. São escassos os trabalhos que ponderaram o efeito da

intensidade de centrifugação sobre a quantidade de plaquetas, e as conclusões alcançadas foram de que à proporção que a ACR aumenta, a plaquetometria tende a aumentar (LANDESBURG et al, 2000; DUGRILLON et al, 2002; VENDRAMINI et al, 2006).

### 3.6.2 Anticoagulantes

A escolha do anticoagulante é importante para obtenção de um PRP com alto potencial em liberar fatores de crescimento. A centrifugação excessiva induz agregação e ativação de plaquetas e o anticoagulante adequado poderá prevenir esse efeito deletério. Dessa forma, ele ajuda a manter, no interior da plaqueta, a reserva de fatores de crescimento que serão liberados quando for induzida a coagulação do PRP para sua aplicação no leito cirúrgico.

Prostaglandinas e ácido acetilsalicílico (YAZAWA et al, 2004b; KIMURA et al, 2005) foram avaliados como anticoagulantes por se tratar de compostos que evitam agregação plaquetária (SOARES et al, 2004; YAZAWA et al, 2004b; KIMURA et al, 2005). Esses antiagregantes inibiram a liberação dos fatores de crescimento durante a centrifugação, o que aumentou sua liberação após a coagulação com trombina.

O anticoagulante mais utilizado foi o citrato de sódio, seguido de uma formulação que o associa a dextrose e fosfato (CPD). O citrato é quelante do cálcio, e sua ligação forma um composto solúvel, não iônico, que interrompe a coagulação (PIETRZAK; EPPLEY, 2005), a dextrose funciona como tampão, e associada ao fosfato, otimiza a conservação e a nutrição celular (MARX, 2001; EPPLEY; WOODDEL; HIGGINS, 2006). Outro anticoagulante é o ACD-a (ácido cítrico, dextrose monoidratada e citrato de sódio) que é mais efetivo em manter a viabilidade plaquetária (MARX, 2001). Assim, outros aspectos, que não somente a característica de ser um bom antigregante, devem ser levados em consideração na escolha do anticoagulante.

O ácido etilenodiamino tetra-ácético (EDTA), por exemplo, é prejudicial à membrana (MARX, 2001), altera a morfologia plaquetária (LOZANO et al, 2003) e tem sido contra-indicado para a preparação do PRP. Poucos autores (EFEOGLU; AKÇAY; ERTÜRK, 2004; JENSEN et al, 2004; YAZAWA et al, 2004b) adotaram esse anticoagulante em seus experimentos.

Os fatores de crescimento são armazenados na forma de co-fatores e a desgranulação natural promove alterações na estrutura terciária dessas proteínas, ativando-as (PIETRAZK; EPPLEY, 2005; EPPLEY; WOODDEL; HIGGINS, 2006). Sua liberação abrupta, após o rompimento plaquetário, resulta em ineficácia. Com EDTA não foi observada redução na plaquetometria, mas houve muito desbril celular (LANDESBERG et al, 2000) e plaquetas agregadas (VASCONCELOS; FIGUEIREDO; SEGHATCHIAN, 2003). Jensen et al (2004), inclusive, atribuíram a esse anticoagulante seus resultados biológicos insatisfatórios.

A quantidade de ACD-a utilizada oscilou na razão de 1 parte de anticoagulante para 7 (AGHALLO; MOY; FREYMILLER, 2002, 2005), 10 (AGHALLO; MOY; FREYMILLER, 2002, 2005) e 11 (EPPLEY; WOODDEL; HIGGINS, 2004) partes de sangue total. As proporções de CPD oscilaram em torno de 1 parte de anticoagulante para 5 (WHITMAN; BERRY; GREEN, 1997; MARX et al, 1998) ou 7 (LUCARELLI et al, 2003; BUTTERFIELD et al, 2005) partes de sangue total. O maior consenso está no uso do citrato isolado, e essa relação foi sempre de 1 para 10 (ANITA, 1999; KIM et al, 2002; ROBIONNY et al, 2002; MENDONÇA-CARIDAD; JUIZ-LOPEZ; RUBIO-RODRIGUEZ, 2006). Não há informações a respeito dessa proporção quando foi escolhido o EDTA, já que esse anticoagulante foi usado em tubos de ensaio padronizados para coleta (JENSEN et al, 2004; EFEUGLU; AKÇAY; ERTÜRK, 2004).

### *3.6.3 Celularidade do PRP*

Independente das velocidades ou forças empregadas, atingir uma plaquetometria superior a um milhão de células/ $\mu$ l no PRP é uma tarefa simples. O consenso é que esse parâmetro deve estar situado acima desse valor, o que corresponde a 4-5 vezes o valor basal (MARX, 2004). Nos trabalhos mais recentes, a divulgação desse parâmetro (WEIBRICH et al, 2002a, 2002b; CARTER et al, 2003; ROLDÁN et al, 2004a; GANDHI et al, 2006; AKEDA et al, 2006b) têm sido uma preocupação clara, e concentrações de 6 (OGINO et al, 2006), 7 (JENSEN et al, 2004), 8 (EPPLEY; WOODDEL; HIGGINS, 2004) e até 9 (ARPORNMAEKLONG et al, 2004; MERKX; FENNIS; VERHAGEN, 2004) ou 73 (KIMURA et al, 2005) vezes o valor basal têm sido obtidas.

A quantidade de hemácias presentes no PRP é variável. A recomendação foi aspirar até 1mm da camada eritrocitária junto com a camada leucoplaquetária. Contudo, houve sugestões de se

incluir até 6mm (OYAMA et al, 2004). Essa inserção de hemácias no PRP fundamenta-se no princípio de que as maiores plaquetas apresentam maior quantidade de fatores de crescimento e se superpõem às hemácias menores (MARX, 2001). Outros autores ainda eliminaram toda célula vermelha, o que resultou nas piores plaquetometrias (LANDESBURG et al, 2000; ANITUA et al, 2005; KANNO et al, 2005).

Tem-se demonstrado que o PRP aumenta a quantidade de fatores de crescimento disponível no meio. Um PRP, cuja plaquetometria esteja abaixo de um milhão de células, não apresenta valor terapêutico, e à proporção que se aumenta a plaquetometria, a liberação de fatores de crescimento também aumenta. Essa hipótese foi defendida em trabalhos que concluíram que quanto maior a plaquetometria, maior a quantidade de TGF-beta liberado (DUGRILLON et al, 2002) e mais intensa a proliferação de osteoblastos (ARPORNMAEKLONG et al, 2004; MARX, 2004; PIETRZAK; EPPLEY, 2004). A elevação da plaquetometria na ordem de 8 vezes o valor basal resultou num aumento de 5 vezes na quantidade de PDGF liberado. A quantidade de EGF aumentou 3,9 vezes, a de TGF-beta 3,6, e VEGF, 6,2 vezes com a concentração da fração plaquetária (EPPLEY; WOODDEL; HIGGINS, 2004).

Outros autores (HARRISSON; CRAMER 1993; WEIBRICH et al, 2002a, 2002b, 2003a, 2003a), entretanto, discordam dessa premissa. A separação do sangue total por metodologia de banco de sangue apontou que o aumento da plaquetometria não aumentou a liberação de PDGF e TGF-beta. A comparação do PRP obtido por diferentes acessórios comerciais também confirmou esses achados (WEIBRICH et al, 2002b, 2003a, 2003b; WILTFANG et al, 2004). A produção e armazenamento dessas proteínas são regidos por uma série de variáveis biológicas que determinam variações individuais na concentração intraplaquetária dos fatores de crescimento. A plaquetometria pode não se traduzir num fator predictivo da quantidade de fatores de crescimento que serão liberados. Alguns pacientes cursam com desordem plaquetária congênita e apresentam grânulos alfa de pequeno volume ou mesmo ausência dessa organela (HARRISSON; CRAMER, 1993). Neles, portanto, a alta plaquetometria não incrementaria a quantidade de fatores de crescimento no meio em reparo.

A separação dos componentes do sangue total, no preparo do PRP, prevê que os leucócitos sejam incluídos no produto final, pois a camada leucoplaquetária é mantida homogênea. Foi constatado um incremento na concentração de leucócitos na ordem de 2 a 7 vezes quando comparados com o valor basal (WEIBRICH et al, 2003a, 2003b; JENSEN et al, 2004; THORWARTH et al, 2005). Em alguns casos, inclusive, esse incremento superou o observado para plaquetas (JENSEN et al, 2004, 2005). Quando houve uma preocupação em

eliminar leucócitos do PRP, isso foi conduzido pela lise dessas células (AGHALOO; MOY; FREYMILLER, 2002, 2005; SERINOLLI et al, 2004).

A presença dos leucócitos modifica as propriedades do PRP (ANITUA et al, 2006) e advoga-se que essas células aumentariam a resistência do tecido à infecção (ANITUA, 1999; MARX et al, 1998; HERNANDEZ; ROSSANI, 2005, GARDNER et al, 2006; EVERST et al, 2006). Contudo, é digno salientar que elas foram abruptamente seqüestradas do sangue e colocadas no tecido sem passar pelo processo de diapedese e transmigração, que promovem amadurecimento celular. Apesar disso, a presença de leucócitos no PRP constitui bom aspecto, pois essas células também participam da liberação de fatores de crescimento e não são ativadas pelo processo de centrifugação (EVERST et al, 2006). Tal como as plaquetas, os leucócitos produzem e armazenam essas proteínas (WEIBRICH et al, 2003b). O aumento na sua quantidade resultou no incremento de PDGF no PRP (WEIBRICH et al, 2003a, 2003b). A melhora na imunidade atribuída ao PRP está vinculada a P-selectina, que aumenta a fixação dos macrófagos e neutrófilos nos tecidos (HARRISON; CRAMER, 1999; EVERST et al, 2006).

#### *3.6.4 Processo de coagulação do PRP*

A liberação fisiológica dos fatores de crescimento resulta da ativação plaquetária durante a coagulação, quando os grânulos alfa se concentram no centro da célula e são circundados por um rico anel de microtúbulos contraídos. A secreção dos fatores ocorre com a fusão dos grânulos a um sistema canalicular conectado à membrana celular (HARRISON; CRAMER, 1993). Em torno de 70% da sua quantidade original é liberada nos primeiros minutos após a retração do coágulo, e os remanescentes seriam liberados mais lentamente (MARX, 2001; EVERST et al, 2006).

A coagulação do PRP tem sido induzida de diversas maneiras, mas o modelo clássico preconizava a adição de trombina bovina e cloreto de cálcio (WHITMAN; BERRY; GREEN, 1997; MARX et al, 1998; WHITMAN; BERRY, 1998). A solução era homogenizada no êmbolo de uma seringa contendo 1ml de ar. Essa técnica foi utilizada para coagular o PRP em uma série de casos de reconstrução mandibular (THOR; WARFVINGE; FERNANDES, 2006), e muitos trabalhos também reproduziram essa metodologia ao longo dos anos (OBARRIO et al, 2000; KIM; PARK; CHOUNG, 2001; AGHALOO; MOY; FREYMILLER,

2002; CARLSON; ROACH, 2002; CHOI et al, 2004; ROLDÁN et al, 2004b; GERARD et al, 2006).

Entretanto, como em todo processo de preparação do PRP, a superposição de protocolos para coagulação é muito pequena. A coagulação foi induzida através de trombina bovina, cuja concentração oscilou entre 300 UI (FEENIS; STOELINGA; JANSEN, 2005) e 10000 UI (YAMADA et al, 2004), homogenizada em uma solução de cloreto de cálcio a 10% em quantidades variáveis. Por fim, uma parte dessa solução é adicionada a 2 (YAMADA et al, 2004), 4 (JENSEN et al, 2004), 6 (WHITMAN; BERRY; GREEN, 1997; MARX et al, 1998), 7 (OBARRIO et al, 2000) ou 10 partes de PRP (BUTTERFIELD et al, 2005; GANDHI et al, 2006).

Um grupo de pesquisadores levantou a preocupação da trombina bovina induzir coagulopatias devido à formação de auto-anticorpos contra a trombina e os fatores V e XI (LANDESBURG, 1998, 2000, 2005; TSAY et al, 2005). Essa suposição sustentou-se em acidentes hemorrágicos que se sucederam a cirurgias, nas quais esse coagulante foi empregado como hemostático de uso tópico (ZHENDER; LEUNG, 1990; CHRISTIE; CARRINGTON; ALVING, 1997). A defesa em prol da trombina bovina (MARX, 2000, 2004; EPPLEY; WOODDEL; HIGGINS, 2006) postulou que a coagulopatia resultava da sua contaminação pelo fator V bovino e que esse problema foi sanado com a purificação do material.

Iniciou-se a busca por um produto que induzisse a coagulação do PRP sem comprometer a liberação de fatores de crescimento. O primeiro material sugerido foi o agente gelificante *ITA* que, ao induzir a coagulação, promoveu a liberação de PDGF e TGF-beta em quantidades similares à liberada pelo coágulo induzido por trombina (LANDESBURG et al, 2000). Outras vantagens desse novo coagulante foram a maior retração do coágulo e um maior tempo até sua retração definitiva.

Um peptídeo agonista do receptor de trombina nas plaquetas foi testado considerando que ele mimetiza a função da trombina em ativar plaquetas, fosforilar a tirosina, inibir a ação do AMP-cíclico e aumentar a concentração de cálcio citosólico (LANDESBURG et al, 2005; TSAY et al, 2005). O tempo até a retração do coágulo com a utilização do agonista foi similar, mas seu diâmetro final foi a metade do observado quando se utilizou trombina. A coagulação com a trombina bovina promove a liberação de TGF-beta e do PDGF até por um período de 24 horas enquanto com o agonista, essa liberação foi mais lenta e contínua até o sétimo dia.

Outra alternativa para a coagulação do PRP é a adição de cloreto de cálcio isolado na proporção de 10% (ANITUA, 1999; ROBBIONI et al, 2002; LUCARELLI et al, 2003, SANCHEZ et al, 2003; ANITUA et al, 2005; GIMENEZ; GONZALEZ; ALBANDEA, 2005; HERNANDEZ; ROSSANI, 2005; TSAY et al, 2005; MÉNDEZ et al, 2006; SERRA RENON; MUÑOZ DEL OLMO; GONZALO CABALLERO, 2006). O cálcio, um inibidor do citrato (TOZUM et al, 2005), promove uma rede de trombina no plasma, mimetizando a coagulação fisiológica. Esse coagulante melhora a manipulação do PRP, pois a liberação de fatores de crescimento ocorre num tempo satisfatório (ANITUA et al, 2006). Assim, a maior quantidade deles será liberada no tecido (SANCHEZ et al, 2003) e elimina-se a trombina xenógena, que, além das potenciais coagulopatias, não é registrada na Agência Nacional de Vigilância Sanitária brasileira.

A variação no tempo de coagulação do PRP depende de diversos fatores. A adição da trombina xenógena agiliza a obtenção do coágulo, e esse período oscilou entre 5 e 45 segundos (WHITMAN; BERRY; GREEN, 1997; MARX, 1998; OBARRIO et al, 2000). A coagulação apenas com cloreto de cálcio retarda esse processo que passa a durar de 2 a 13 minutos (ROBIONNY et al 2002; HERNANDEZ; ROSSANI, 2005). Algumas condições do próprio paciente podem modificar o tempo de coagulação. Fumantes tendem a apresentar agregação plaquetária mais rápida, pois esse hábito aumenta a secreção de tromboxano-A2 pro-agregatório (FUSEGAWA et al, 1999). Indivíduos estressados também apresentam similar tendência, pois a epinefrina é um excelente estimulador dos receptores alfa-adrenérgicos plaquetários (YUN-CHOI; PARK; PYO, 2000).



## ***4 Metodologia***

### ***4.1 Aspectos éticos da pesquisa***

O projeto desta pesquisa foi encaminhado para a Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências (FBDC) em Salvador, Bahia. O parecer desta comissão foi favorável, considerando que os trabalhos desenvolvidos neste experimento não caracterizaram abuso contra o bem-estar animal. Dessa forma, eles foram apreciados como eticamente corretos, conforme parecer protocolado e aprovado sob número 02/2006 (Anexo).

### ***4.2 Desenho do estudo***

Fragmentos de osso removidos do osso ilíaco de coelhos foram aposicionados bilateralmente na cortical lateral da mandíbula, como enxertos autógenos ou alógenos, e recobertos com PRP em um dos lados. Objetivando conhecer as variáveis que potencialmente podem interferir nessa investigação, alguns experimentos foram conduzidos paralelamente ao processo de desenvolvimento da pesquisa. O efeito de duas temperaturas de congelamento sobre a morfologia do osso e as propriedades do PRP constituíram outras duas investigações.

Primeiramente foram elucidados, nesta metodologia, os procedimentos comuns às investigações realizadas. Isso inclui os protocolos de seleção geral da amostra, de anestesia, as condições de biotério e a eutanásia. Em seguida, cada experimento realizado foi descrito. A preparação do PRP foi estudada no sentido de identificar fatores que potencialmente interferem na contagem celular final. Como o enxerto alógeno deve ser mantido sob criopreservação, duas temperaturas e quatro períodos diferentes de congelamento foram testados para verificar suas possíveis interferências sobre o tecido ósseo durante o congelamento.

### **4.3 Caracterização das amostras**

Considerando todos os experimentos realizados, foram utilizados 54 coelhos, *Oryctolagus cuniculus*, da linhagem Nova Zelândia. Foram selecionados coelhos não isogênicos, machos, albinos, adultos, pesando entre 2,5 e 3kg. Os animais, nascidos e criados em cativeiro, eram clinicamente saudáveis e livres de ectoparasitas e endoparasitas, estando aptos a constituir a população desta pesquisa.

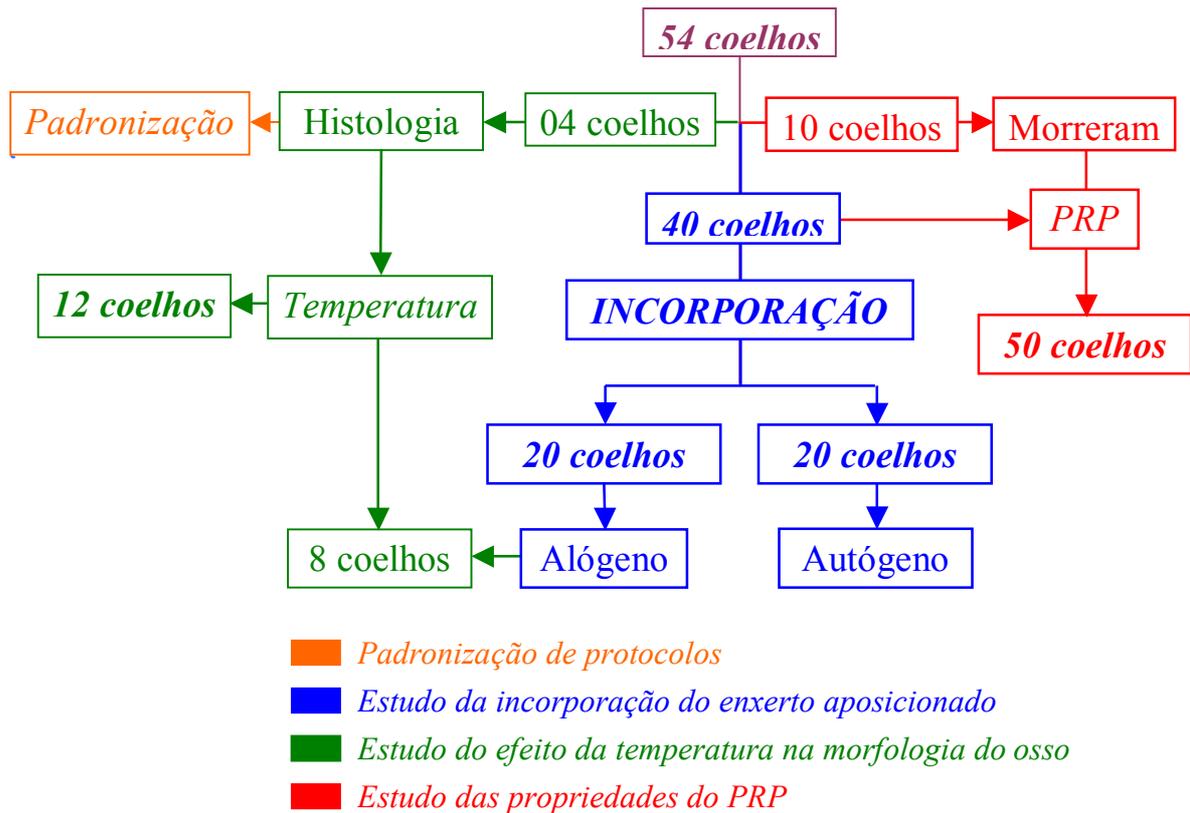
Quatro coelhos foram utilizados no processo de padronização dos protocolos. Nesse momento, a histologia do osso mandibular e do osso íliaco foi estudada assim como se padronizou o método de coleta de sangue para o preparo do PRP. O experimento principal desta tese foi o estudo da incorporação de enxertos ósseos aposicionados na mandíbula, em associação com o PRP. As inferências de seus achados foram realizadas através da análise de quatro grupos assim discriminados: enxerto autógeno com PRP, enxerto autógeno sem PRP, enxerto alógeno com PRP, enxerto autólogo com PRP.

Esta pesquisa demandou 40 coelhos entretanto, para alcançar este montante, 50 animais foram utilizados sendo que 10 deles morreram por causas diversas associadas ao manejo cirúrgico. A lesão do músculo cardíaco foi identificada como provável causa de morte em quatro animais. Em outros quatro, foi verificado um aprofundamento gradual da anestesia até o óbito, e em dois animais houve deiscência de sutura.

Nestes casos, o PRP, que já havia sido preparado, foi utilizado para estudar suas propriedades. Portanto, a avaliação das características do PRP e a comparação com as do sangue total constituíram outro experimento e foram realizadas com 50 coelhos. Neste experimento, os padrões hematimétricos do sangue total foram comparados aos do PRP.

O efeito da temperatura de congelamento sobre a histologia do osso íliaco foi uma terceira investigação realizada. que foi conduzida em fragmentos de osso removidos de 12 coelhos. Desses 12 animais, oito coelhos haviam previamente participado da etapa de incorporação do enxerto e seus fragmentos de osso foram congelados. As alterações observadas foram comparadas aos aspectos da histologia normal estudados nos quatro coelhos do processo de padronização dos protocolos.

A distribuição dos coelhos nos três experimentos é ilustrada através da figura 1.



**Figura 1** - Organograma da distribuição dos coelhos em cada um dos experimentos.

#### 4.4 Manejo dos animais

##### 4.4.1 Manutenção dos animais

Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em condições sanitárias de biotério convencional, nas enfermarias do Núcleo de Pesquisa em Cirurgia Experimental da Escola de Medicina e Saúde Pública (EBMSP) da FBDC. O acondicionamento foi realizado em gaiolas metálicas, individuais, com chão coberto por maravalha. Os coelhos foram alimentados com ração balanceada e água *ad libitum*. O ambiente era limpo e protegido de estímulos auditivos para evitar o estresse. A temperatura se manteve estabilizada na faixa de 16 a 21°C, a umidade relativa do ar, na faixa entre 40 a 60%, e os animais foram expostos à luminosidade artificial entre 8 e 10 horas por dia.

A avaliação dos animais foi realizada pela médica veterinária responsável pelo Biotério da EBMSP da FBDC, professora Cláudia Valle – CRMVBA 1409. Na sua admissão nas

dependências do Núcleo, a infestação por ectoparasitas foi controlada com ivermectina, 400mg/kg, administrado por injeção intramuscular. Durante toda a permanência dos animais nas enfermarias, eles foram acompanhados pela referida médica veterinária.

#### *4.4.2 Protocolo de anestesia dos animais*

Todos os procedimentos desta pesquisa foram conduzidos sob anestesia geral. Pelo protocolo selecionado, os coelhos foram submetidos à administração de atropina, como estimulante cardio-respiratório, na razão de 2mg/kg, administrada por via subcutânea. Decorridos quinze minutos da atropinização, iniciava-se a anestesia, propriamente dita, com a infiltração de um relaxante muscular, a acepromazina, na razão de 1mg/kg, em associação com ketamine, na proporção de 10mg/kg, utilizado como agente dissociativo. Ambas drogas foram infiltradas, por via intramuscular, no músculo reto femoral do membro posterior direito. Esse protocolo foi também utilizado por Aghaloo, Moy e Freymiller, (2002, 2005).

No sentido de melhorar o manejo da hemostasia intra-operatória e da dor pós-operatória, os tecidos foram infiltrados com 2ml de bupivacaína 0,5%, com adrenalina, 1:200.000, na região do íliaco e 1,5ml em cada lado da mandíbula, antes dos procedimentos cirúrgicos. Nas vinte quatro horas subseqüentes à cirurgia, a analgesia foi assegurada pela administração de meperidina 4mg/kg, de 12 em 12 horas, por via intramuscular.

#### *4.4.3 Degermação dos animais para as cirurgias*

Depois de anestesiados, os animais foram tricotomizados na região lateral esquerda do tórax, na região do quadril, no lado direito, e na região submandibular bilateralmente. A polivinilpirrolidona iodada tópica foi o agente usado na degermação da pele. Após a degermação, campos cirúrgicos estéreis foram posicionados.

#### *4.4.4 Eutanásia dos animais*

O método de escolha para eutanásia foi a administração excessiva de droga anestésica. Quando se fazia necessária, a injeção intracardíaca de 250mg de ketamine foi realizada sob anestesia geral. A morte foi constatada pela falta de expansão torácica e batimentos cardíacos, midríase e ausência de reflexo palpebral.

Após as retiradas dos tecidos que seriam objetos de estudo, os animais mortos foram contidos em sacos especiais, segundo os critérios de controle de zoonoses estabelecido pela Vigilância Sanitária do Estado da Bahia, para posterior descarte, seguindo protocolos padrões de manuseio de material biológico que prevêm a sua incineração como lixo hospitalar.

#### **4.5 O preparo do PRP**

O estudo dos protocolos de obtenção do PRP foi realizado no sangue total obtido de 50 coelhos. Todo material que entrou em contato com qualquer fluido biológico nessa etapa foi plástico, pois a sílica do vidro contribui para agregação plaquetária (LANDESBERG et al, 2000). O único instrumental de vidro utilizado foram as pipetas que quantificaram a quantidade de hemácias e PPP removidos do sangue. Esses dois componentes teciduais foram depois desprezados e, portanto, a agregação de potenciais plaquetas à superfície das pipetas é um dado desprezível.

##### *4.5.1 Coleta do sangue*

A preparação do PRP foi conduzida no Laboratório de Bioquímica da EBMSF da FBDC, situado a poucos metros do biotério. Para tanto, 9ml de sangue total foram coletados através de punção cardíaca (YUN-CHOI; PARK; PYO, 2000; ARPORNMAEKLONG et al, 2004; YAZAWA et al, 2004a, 2004b), com agulha de 30X8, montada em seringa descartável de 20ml, contendo 1,5ml de ACD-a utilizado como anticoagulante (JP Farmacêutica, São Paulo, Brasil). Respeitou-se a proporção de 1ml de ACD-a para cada 6ml de sangue total de acordo com as proposições de Lucarelli et al (2003, 2005).

A solução foi gentilmente homogeneizada ainda dentro da seringa e, posteriormente, transferida para um tubo de ensaio plástico. Esta etapa foi executada sem o auxílio da agulha para se evitar hemólise. Com um auxílio de uma pipeta volumétrica e ponteira plástica, 500µl dessa solução foram reservados para avaliação dos padrões hematológicos iniciais do animal (BUTTERFIELD et al, 2005; KANNO et al, 2005).

#### 4.5.2 Centrifugações

Foram utilizadas as mesmas centrifugações propostas por Efeoglu, Akçay e Ertürk (2004). Os 10ml de sangue total anticoagulados foram centrifugados, na centrífuga refrigerada Biofuge Stratos®, (Haereus Inst, Osterode, Germany) numa ACR de 300g por 10 minutos, a uma temperatura constante de 22°C. Devido à diferença de densidade, as células sanguíneas se organizaram, durante a centrifugação, em três níveis diferentes. As hemácias ocuparam a porção inferior, a camada leucoplaquetária a porção intermediária, enquanto o plasma, a porção superior – figura 2.



**Figura 2** – Aspecto do sangue após a primeira centrifugação.

Pipetava-se, utilizando-se uma pipeta com ponteira plástica, todo o sobrenadante constituído pelo plasma sanguíneo, pela série branca do sangue e as plaquetas. Conforme os protocolos

preconizados por Efeoglu, Akçay e Ertürk (2004), após a pipetagem de todo sobrenadante, pipetava-se ainda 1mm da interface com as células vermelhas, pois esta região é rica em plaquetas de grande diâmetro. A quantidade de hemácias restante no tubo de ensaio foi quantificada por meio de uma pipeta graduada de vidro e posteriormente desprezada.

Todo esse pipetado foi contido em outro tubo de ensaio plástico e submetido a centrifugação, através de uma ACR de 5000g, por 5 minutos, a uma temperatura constante de 22°C. Por essa centrifugação depositavam-se células vermelhas presentes na solução e, acima delas, as plaquetas e a série branca – figura 3. O sobrenadante foi pipetado até ao limite que oferecesse segurança para não ressuspender a camada leucoplaquetária. O plasma pipetado constituía o PPP que foi quantificado em uma pipeta graduada de vidro e posteriormente desprezado.

A solução contida no tubo de ensaio, constituída por células vermelhas, plaquetas, leucócitos e uma parte do plasma, foi considerado como PRP. A homogeneização foi feita com um agitador automático de células. Nos animais que seriam enxertados, 500µl desse concentrado plaquetário foram reservados para revestir o enxerto posicionado na mandíbula. O restante foi destinado à contagem das células ali presentes.



**Figura 3** – Aspecto do material após a segunda centrifugação.

#### 4.5.3 Coagulação do PRP

Para sua coagulação, 500µl de PRP foram adicionados a 15µl de uma solução de cloreto de cálcio a 10%, com o auxílio de uma pipeta graduada com ponteira plástica. Toda essa solução foi homogeneizada. A partir da adição do cloreto de cálcio, foi iniciada uma contagem de tempo que foi concluída com a coagulação. O PRP foi considerado coagulado quando se apresentava firme e a sua superfície alterava-se de lisa e brilhante para fosca e rugosa.

#### 4.5.4 Contagem de células

A contagem das células presentes na solução constituída pelo sangue total e ACD-a, e a contagem das células presentes no PRP foram realizadas no analisador hematológico automatizado, Sysmex SF 3000® (Sysmex, Norderstedt, Germany). Esse aparelho fornece todos os dados constantes de um hemograma padrão.

#### 4.5.5 Avaliação dos padrões do sangue total e do PRP

Os testes estatísticos foram realizados no programa SPSS 13.0 (*Statistical Package for the Social Science*). Foram obtidas as médias e o desvio padrão do hematócrito, do volume corpuscular médio (VCM), da plaquetometria, do volume plaquetário médio (VPM) e da leucometria do sangue total e do PRP. O mesmo foi realizado em relação à quantidade, em mililitros, de hemácias e PPP removidos do sangue total durante o preparo do PRP. Estas aferições também foram empregadas no tempo de coagulação do PRP. Foram estabelecidas correlações entre esses diversos fatores. O sentido e a magnitude dessas correlações foram levantados pelo teste paramétrico de Pearson, utilizando-se uma significância de 5%.

As correlações que se seguem foram investigadas e estudadas. Avaliou-se se o hematócrito da solução inicial afetava a quantidade, em ml, de hemácias e de PPP que foi possível remover dessa solução. Foi ponderada qual a interferência da quantidade de hemácias e de PPP retirado, na plaquetometria, no hematócrito e na leucometria do PRP. Investigou-se se variações nesta plaquetometria e neste hematócrito modificavam o tempo de coagulação do

PRP. Foi examinado se o hematócrito e a plaquetometria da solução inicial, assim como o hematócrito do PRP, interferiam na plaquetometria deste concentrado. Por fim, avaliou-se qual a correlação entre a leucometria inicial e a final.

#### ***4.6 Obtenção e tratamento dos enxertos***

##### *4.6.1 Remoção dos enxertos*

A região da asa do osso ilíaco foi eleita como área doadora de todos os enxertos estudados (AGHALOO; MOY; FREYMILLER, 2002, 2005; KIM et al, 2002; BUTTERFIELD et al, 2005). A pele do quadril foi incisada com lâmina 15, e o tecido celular subcutâneo divulsionado até a fáscia da musculatura glútea. Esses músculos foram incisados transversalmente até o periósteo do osso ilíaco, quando, com o auxílio de um descolador de Molt, realizava-se a dissecação subperiosteal expondo o osso. O enxerto foi removido da asa do osso ilíaco com uma broca trefina de 1cm de diâmetro externo, obtendo-se um bloco circular de osso bicortical contendo tecido medular em seu interior. O osso removido foi esqueletizado, retirando-se todo tecido mole de sua superfície cortical (JENSEN et al, 2004).

O leito cirúrgico da região ilíaca foi amplamente irrigado com solução salina fisiológica a 0,9%. Certificava-se da hemostasia, e então, a musculatura foi suturada com fio de mononylon 4-0 e, posteriormente, a pele também foi suturada com esse material. Os fragmentos de osso removidos receberam destinação de acordo com a etapa em estudo.

##### *4.6.2 Enxertos autógenos*

Os blocos de osso que foram utilizados como enxertos autógenos foram removidos sempre da asa do osso ilíaco direito e destinados a imediata aposição. Após sua remoção, eles foram divididos pela medular com uma lâmina 15, obtendo-se dois fragmentos de osso, sendo que, em cada um deles, havia uma superfície cortical e outra medular. O diâmetro e a espessura dos enxertos foram medidos com um paquímetro no intuito de avaliar se os animais receberam mesma quantidade de enxerto.

Esses enxertos foram colocados no leito receptor no mesmo ato cirúrgico sem que fossem submetidos a nenhum tratamento prévio de modo que eles eram enxertados no mesmo ato cirúrgico. Até o momento da sua colocação no leito receptor, os blocos de osso foram mantidos imersos em solução salina fisiológica a 0,9%, pelo tempo necessário à divulsão dos tecidos moles da mandíbula.

#### *4.6.3 Enxertos alógenos*

##### *4.6.3.1 Congelamento do osso para a enxertia alógena*

Os blocos de osso que serviriam como enxertos alógenos foram obtidos dos animais que constituíram o grupo de coelhos submetidos à enxertia autógena no momento de sua eutanásia, logo após a anestesia geral e antes da administração excessiva do anestésico geral. Nos animais do grupo de enxertos alógenos, entretanto, os procedimentos iniciais de retirada de enxerto foram repetidos com três objetivos.

O primeiro deles foi submeter os animais dos dois grupos ao mesmo tratamento cirúrgico e evitar níveis diferentes de resposta metabólica ao trauma, possibilitando assim comparações entre eles. O outro foi incrementar o banco de osso de modo a se manter um estoque de material de estudo, no caso de uma intercorrência com os blocos congelados. Por fim, eles ainda se prestaram para investigar o efeito da temperatura na morfologia do osso.

Para avaliar a resposta imunológica aos enxertos ósseos alógenos no experimento principal, a temperatura considerada para o congelamento dos fragmentos de osso bicortical foi  $-70^{\circ}\text{C}$  por um período de 120 dias conforme os protocolos convencionais de banco de osso (HOU; YANG; HOU, 2005). Completado esse período, eles foram removidos do freezer, lavados com 100ml de solução salina fisiológica a 0,9% e imersos em uma solução de gentamicina a 40%, durante 40 minutos antes de sua colocação no leito receptor (HOU; YANG; HOU, 2005). Antes deste procedimento eles foram divididos e medidos conforme os mesmos critérios utilizados para os fragmentos que foram utilizados como enxertos autógenos.

#### 4.6.3.2 *Efeito da temperatura na morfologia do osso*

Foram estudados vários protocolos para verificar a interferência de diferentes temperaturas e diferentes períodos de congelamento na arquitetura dos tecidos. A preparação do osso até seu congelamento obedeceu a um procedimento padrão (CARTER, 1999; KLUGER et al, 2003; HOU; YANG; HOU, 2005). Após a esqueletização, os blocos bicorticais foram colocados no interior de dois sacos plásticos, previamente esterelizados em óxido de etileno.

Os fragmentos de osso, para essa avaliação, foram obtidos de 12 coelhos. Destes, quatro animais foram utilizados com o intuito de doar fragmentos de osso da asa do íliaco para o estudo da histologia normal e foram, portanto designados como grupo controle. Os oito coelhos restantes haviam participado da etapa de enxertia alógena e doaram osso que foi destinado ao congelamento. Nestes casos, durante a cirurgia se removia o primeiro enxerto, do lado direito do animal e, no momento da eutanásia, os outros três blocos, um a mais do lado direito e outros dois do lado esquerdo. Assim, de cada animal, foram obtidos quatro fragmentos da asa do osso íliaco, dois em cada lado.

O osso obtido de quatro animais foi congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  (FARRINGTON et al, 1998) e o tecido obtido de outros quatro, foi congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$  (WARD et al, 2005). O congelamento de  $-20^{\circ}\text{C}$  foi conduzido em um freezer convencional, e o congelamento de  $-70^{\circ}\text{C}$ , num freezer especial. Todo o congelamento foi realizado no Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Para cada temperatura de congelamento, foram constituídos quatro subgrupos que variaram de acordo com o tempo em que o enxerto permaneceu exposto às temperaturas até serem destinados ao processamento histotécnico. No primeiro subgrupo, os fragmentos foram congelados por 30 dias, no segundo subgrupo, por 60 dias, no terceiro, por 90 dias e, no último, por 120 dias. Cada enxerto foi identificado quanto à sua origem, de modo que em cada subgrupo houvesse fragmento do osso de quatro coelhos diferentes.

Após a sua remoção do congelador, os fragmentos de osso foram fixados em solução tamponada de formol a 10% por 72 horas, depois disso, foram descalcificados em EDTA tetrahidratado a 10%, 1M, pH de 7,2, durante 90 dias, e então submetidos a processamento histotécnico. O processamento histotécnico e as colorações, de todo material desta pesquisa, foram realizados no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Universitário Professor

Edgard Santos. As secções de 5µm obtidas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE), micro-sirius e pela reação de Feulgen (REIS et al, 2002, 2006a).

#### *4.6.3.3 Leitura e análise das lâminas obtidas a partir do osso congelado*

O efeito do congelamento sobre o osso foi analisado inicialmente de forma qualitativa. Essa análise foi realizada por um patologista experiente que qualificou a morfologia do tecido em preservada ou comprometida de acordo o aspecto do tecido medular e da porção cortical após o congelamento. Foram considerados como critérios para a análise, a aparência geral do tecido medular e da cortical, a delimitação das células e de seus respectivos núcleos.

Esses dois últimos fatores foram utilizados para uma avaliação morfométrica do tecido. A leitura das lâminas foi realizada no Programa de Pós-graduação em Odontologia da FBDC. Com o auxílio de um microscópio Motic B5 Professional Series foram selecionados aleatoriamente quatro campos da região medular e quatro campos da região cortical do osso ilíaco. As imagens desses campos foram capturadas com aumento de 400X, por uma máquina acoplada ao microscópio e interligada ao programa de computador Motic Image Advance 3.0. Antes de utilizar o programa, a calibração para cada objetiva era conferida pela imagem padrão, capturada de uma lâmina de calibração fornecida pelo fabricante.

As lâminas coradas com HE foram úteis para estudar a área da matriz óssea cortical, a área de tecido medular, a área das células e dos núcleos. Nas lâminas coradas pela reação de Feulgen foram aferidas área da medular e a área dos núcleos das células.

A histomorfometria foi realizada da mesma forma nas duas colorações. Os campos da região medular foram estudados em relação à área ocupada pelo tecido, desprezando-se os espaços dos acúmulos de gordura. Em seguida, as áreas ocupadas pelas células e pelos núcleos foram quantificadas. Nos campos de osso cortical, a área da matriz óssea foi selecionada, e subseqüentemente quantificada. Em seguida, os núcleos dos osteócitos foram selecionados, e a área ocupada por eles também quantificada automaticamente pelo programa.

A coloração do micro-sirius objetivou o estudo da área de colágeno que se mantinha preservada na cortical após cada tratamento. Uma área padrão retangular de 0,50mm<sup>2</sup> com medidas exatas de 0,259mmX0,194mm foi selecionada em quatro campos capturados num

aumento de 400X. No interior dessa área, a região em vermelho, ocupada pelas fibras colágenas, foi discriminada dos demais tons, e em seguida, quantificada de forma automática.

#### *4.6.3.4 Tratamento dos resultados e análise estatística dos dados*

Para minimizar os efeitos da seleção de campos, os dados foram analisados sob a forma percentual. Nos campos da região da medula óssea, levantou-se, nos cortes corados com HE, a porcentagem da área de medular ocupada por células e por núcleos, e então, sobre a área correspondente as células, a porcentagem da área ocupada pelos núcleos. Nos cortes corados pela reação de Feulgen, foi calculada a porcentagem da área de tecido medular correspondente aos núcleos celulares.

Nos campos onde a porção cortical foi analisada, tanto nos cortes corados com HE como nos cortes corados pela reação de Feulgen, calculou-se a porcentagem da área ocupada por núcleos dos osteócitos na cortical. Os cortes corados pelo picro-sírius contribuíram para analisar a porcentagem ocupada pelo colágeno dentro do tecido cortical na área padrão selecionada. Os resultados obtidos para a área dos núcleos na medular e área dos osteócitos na cortical foram comparados em relação às colorações empregadas nas secções.

Cada uma dessas porcentagens foi comparada em função do tempo e da temperatura de congelamento, utilizando a Análise de Variância através do programa SPSS. A diferença estatística entre todas as variáveis foi avaliada pelo teste de Tukey, utilizando-se uma significância de 5%. Os dados foram apresentados em função do tempo e da temperatura.

### ***4.7 Cirurgias para aposição do enxerto na mandíbula***

#### *4.7.1 Protocolos cirúrgicos*

Nesta investigação, que constituiu o eixo central deste trabalho, foram utilizados 40 coelhos divididos em dois grupos. Um grupo foi constituído por 20 animais nos quais foram colocados enxertos autógenos frescos, e o outro, por 20 animais nos quais foram usados enxertos alógenos previamente congelados.

Entretanto, todos os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos. O tempo da cirurgia se iniciava no momento da antissepsia dos leitos cirúrgicos e foi considerado concluído com a finalização da sutura da pele. Foi instituída antibioticoterapia em todos os animais com enrofloxacina na proporção de 10mg/kg, uma hora antes de iniciar a cirurgia (AGHALOO; MOY; FREYMILLER, 2002, 2005).

A remoção do enxerto da asa do osso ilíaco (KIM et al, 2002; AGHALOO; MOY; FREYMILLER, 2002, 2005; BUTTERFIELD et al, 2005) para o grupo autógeno foi executada sempre do lado direito. Depois de concluído esse procedimento, foi então iniciado o acesso cirúrgico à mandíbula que foi realizado da mesma maneira tanto no lado direito quanto no lado esquerdo.

Mimetizando o acesso de Risdon em humanos (GERARD et al, 2006), a incisão na pele foi planejada numa posição paralela à borda inferior da mandíbula. Ela foi realizada com lâmina 15 que se aprofundava também pelo tecido celular subcutâneo. A divulsão romba do músculo plástima e da fáscia foi realizada com uma tesoura de Metzsembaum curva até o perióstio. Se os vasos faciais fossem identificados, eles eram ligados com eletrocautério, mas na maior parte dos casos obteve-se um afastamento da fáscia junto com esses vasos.

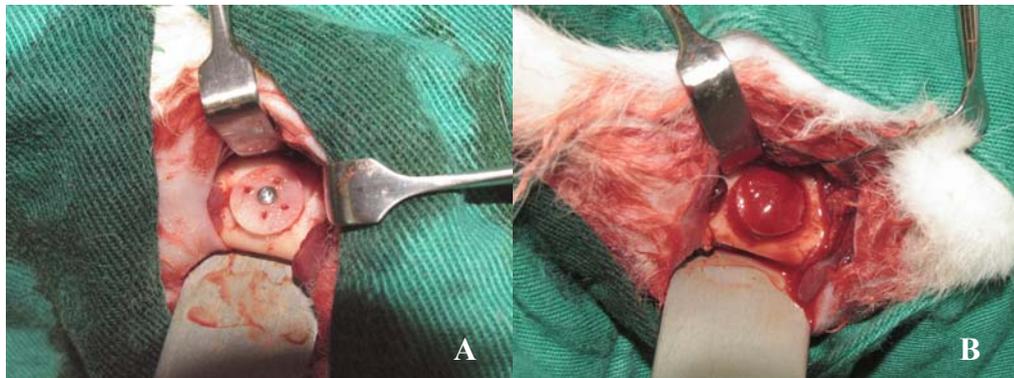
O perióstio foi incisado com lâmina 15 e divulsionado do osso com um descolador de Molt. Exposta a cortical lateral da mandíbula, o osso foi irrigado e realizavam-se várias fenestrações com broca 701 na região onde o enxerto seria aposicionado (ROLDÁN et al, 2004a, 2004b). O enxerto bicortical foi dividido na sua medular de modo a se obterem dois fragmentos córtico-medulares. Uma perfuração, com a broca 701, foi realizada no centro de sua circunferência, e outras quatro, em sua periferia (LEWANDROSKI et al, 2001).

Os enxertos removidos do ilíaco foram cuidadosamente adaptados à cortical da mandíbula (CHACON et al, 2004) sobre a região das perfurações com a porção medular voltada para as mesmas e levemente pressionados contra o leito receptor com o descolador de Molt. Aproveitando-se a perfuração do centro do enxerto, a mandíbula foi então perfurada. Sem retirar o enxerto de posição, ele foi fixado com um parafuso de 1,7mm com 7mm de comprimento pela técnica do *Lag Screw* (CHACON et al, 2004). Por esta técnica, a perfuração do enxerto é maior que o diâmetro da rosca do parafuso. Assim a região da rosca passava livremente pelo enxerto, e a cabeça do parafuso o comprimia contra o leito receptor.

No lado esquerdo da mandíbula, os tecidos moles foram reposicionados diretamente sobre a superfície do enxerto (Figura 4A) e suturados por planos com fio de mononylon 4-0. Somente

depois da sutura do lado esquerdo, iniciava-se a cirurgia do lado direito cujos procedimentos só se diferenciavam pela adição do PRP antes da sutura (Figura 4B). Após as perfurações da mandíbula, a coagulação do PRP foi iniciada com a adição da solução de cloreto de cálcio. Quando ele estava coagulado, uma porção do PRP foi interposta entre as perfurações da cortical lateral da mandíbula e a medular do enxerto. O enxerto foi fixado e todo o PRP foi colocado entre a sua superfície cortical e o tecido mole. A sutura do plano profundo foi realizada com cuidado para que não houvesse extravasamento do PRP. Somente depois, suturava-se a pele. Tanto no lado direito quanto no lado esquerdo, antes da sutura, a hemostasia foi revisada para se evitar hemorragias pós-operatórias e conseqüente formação de hematoma e diluição do PRP.

De cada grupo de animais, aqueles nos quais foram colocados enxertos autógenos e aqueles nos quais foram colocados enxertos alógenos, foram constituídos cinco subgrupos de 4 animais cada. Esses subgrupos foram diferenciados quanto ao tempo até sua eutanásia. O primeiro subgrupo de animais foi submetido à eutanásia após 3 dias da cirurgia, o segundo após 7 dias, o terceiro, após 14 dias, o quarto, após 28 dias, e o quinto, após 56 dias (BUTTERFIELD et al, 2005).



**Figura 4** – Aspecto do leito cirúrgico no lado esquerdo, onde não foi colocado o PRP (A), e no lado direito, onde foi colocado o PRP (B).

#### 4.7.2 Remoção das peças para estudo

Constatada a parada cardíaca pela eutanásia, foram obtidos fragmentos de mandíbula contendo os enxertos e os tecidos moles sobre eles. A pele foi incisada na linha média e

divulsionada pelo tecido celular subcutâneo. O tecido mole sobre o osso foi incisado verticalmente na região dos incisivos e sobre o músculo masseter.

A peça cirúrgica, constituída pelo corpo mandibular contendo o enxerto parafusado e a musculatura acima dele, foi osteotomizada verticalmente na região do incisivo e na região do ramo mandibular. Imediatamente, ela foi imersa em solução tamponada de formol a 10% onde ficava por 72 horas. Os fragmentos removidos foram devidamente identificados da seguinte forma: enxerto autógeno revestido com PRP, enxerto autógeno sem revestimento, enxerto alógeno revestido com PRP, enxerto alógeno sem revestimento, cada um com a devida identificação do tempo de observação.

Cessado esse prazo, iniciava-se a descalcificação com EDTA tetrassódico a 10%, 1M, pH de 7,2, durante 90 dias (KLEINHEIZ et al, 2005; LEACH et al, 2006). Após 60 dias, a localização da cabeça do parafuso foi estimada sobre o tecido mole que foi incisado verticalmente a partir do processo alveolar até que o parafuso fosse alcançado. O parafuso foi delicadamente removido, e o osso parcialmente descalcificado foi dividido, procurando-se respeitar o longo eixo da perfuração realizada no enxerto e na mandíbula para a fixação. Assim o EDTA entraria em contato direto com a região interna da mandíbula, e a descalcificação continuava por mais 30 dias.

#### *4.7.3 Processamento histotécnico, colorações e imunomarcações*

As peças foram incluídas de modo que a superfície criada após a divisão do tecido constituísse a superfície que foi desbastada no micrótomo e de onde seriam, portanto, obtidos os cortes histológicos. Assim, nessas secções histológicas, seriam vistos o leito receptor desde a sua cortical lingual até a lateral, o enxerto e o tecido mole sobre ele.

Após processamento histotécnico padrão, foram obtidos cortes de 5µm de espessura que foram corados com HE, picro-sírius, azul de toluidina e a coloração para a evidenciar a TRAP. A coloração para a TRAP foi desenvolvida conforme os protocolos propostos por Asawa et al, 2004 e Kondo et al, 2006.

O estudo imunohistoquímico foi realizado em cortes de 4µm de espessura, montados em lâminas previamente tratadas com solução de organossilano a 6%. Este estudo objetivou

demonstrar a presença de macrófagos, linfócitos B e linfócitos T, conforme painel discriminado na tabela 1 que mostra também os protocolos elaborados para cada anticorpo.

A recuperação antigênica foi realizada em tampão Tris-EDTA em pH 9,0. A peroxidase endógena foi bloqueada com dois banhos em peróxido de hidrogênio, e o inibidor de proteína (Dako, Hamburg, Germany) bloqueou reações inespecíficas. Os anticorpos primários foram incubados por 10 horas em temperatura de 2°C. Em seguida, eram lavados e o tecido era incubado com anticorpos secundários por 30 minutos a temperatura de 2°C. Após a lavagem, a revelação da reação foi obtida com o diaminobenzidino. A hematoxilina foi usada para a contra-coloração. Como controle positivo, foram utilizadas secções de baço de coelho, fixadas em formol a 10%.

**Tabela 1** – Discriminação dos protocolos utilizados na imunohistoquímica.

<b>Célula</b>	<b>Anticorpo</b>	<b>Clone</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Diluição</b>	<b>Sistema de amplificação</b>
<i>Linfócito B</i>	Anti-CD79 $\alpha\gamma$	HM 59	Dako*	1/50	Envision
<i>Linfócito T</i>	Anti-CD3	Policlonal	Dako*	1/100	LSAB
<i>Macrófago</i>	Anti-macrófago	RAM 11	Dako*	1/100	Envision

\*Dako, Hamburg, Germany

#### 4.7.4 Leitura das lâminas

As lâminas foram visualizadas no microscópio Motic B5 Professional Serie. As imagens foram capturadas por uma máquina acoplada ao microscópio e interligada ao programa de computador Motic Image Advance 3.0.

Nas lâminas coradas com HE as imagens foram capturadas em aumentos de 40X. Por essa coloração foi estudada a área total ocupada pela matriz do enxerto ósseo assim como a espessura da matriz cortical do enxerto em três regiões específicas. Para calcular a área, a matriz de osso foi previamente delimitada e selecionada e então ela foi automaticamente aferida. A espessura da cortical foi aferida em locais situados a 1 mm dos limites do enxerto e

no ponto médio entre essas duas posições. A espessura foi obtida pela leitura direta com a ferramenta de avaliação de distância.

Nas lâminas coradas pelo picro-sirius, as imagens foram capturadas com aumento de 100X. Foram selecionadas três áreas-padrão retangulares de  $0,25\text{mm}^2$ , com medidas exatas de  $0,880\text{mm} \times 0,285\text{mm}$ . Essas áreas foram selecionadas imediatamente acima do enxerto, a partir de cada extremidade e no ponto médio entre elas. No seu interior, a área em vermelho, ocupada pelas fibras colágenas, foi discriminada e, em seguida, quantificada de forma automática.

A coloração com azul de toluidina objetivou identificar a matriz de tecido ósseo neoformado em cada período de observação do experimento. Para essa análise foram utilizados aumentos de 100X. Pelo protocolo proposto por Casati et al (2007), o osso neoformado apresenta-se mais escurecido do que a matriz mais antiga. Toda a área com coloração azulada mais densa foi selecionada e quantificada automaticamente.

A coloração para evidenciar a TRAP tem a propriedade de identificar osteoclastos e pré-osteoclastos em vermelho (TAKANO et al, 2005; KACENA et al, 2006). Por um aumento de 400X, todos os campos da área do enxerto ósseo contendo células positivas para a TRAP foram capturados. As células que continham a enzima foram delimitadas, marcadas com um ponto e o tom de vermelho selecionado. A quantificação automática fornecia a quantidade de pontos presentes no campo, por conseguinte, a quantidade de células nucleadas e também a área ocupada por elas.

Nas lâminas tratadas pela imunohistoquímica foram selecionados na área da fibrose, ao redor do enxerto, cinco campos que foram visualizados num aumento de 400X. A área ocupada por todas as células presentes nesses campos foi selecionada e quantificada.

#### *4.7.5 Tratamento estatístico dos resultados*

Todos os testes estatísticos foram realizados no programa SPSS. Foi levantada a média e o desvio padrão para o tempo de duração da cirurgia, a espessura e a largura do osso enxertado, e para a plaquetometria do plasma rico em plaquetas, tanto para os 20 animais que receberam enxertos autógenos como naqueles outros 20, que receberam enxertos alógenos. A existência

de diferença estatística entre variáveis, nesses grupos, foi estimada pelo teste-T de Student, a uma significância de 5%.

A média e o desvio padrão das variáveis estudadas foram calculados para cada dia de observação, estratificados em função do tipo de enxerto colocado e da adição ou não de PRP. Considerando as estratificações pelo grupo de enxerto, o lado com PRP, no grupo autógeno, foi comparado ao sem PRP, e o mesmo foi realizado no grupo de enxertos alógenos. Foi possível comparar os resultados verificados para os enxertos autógenos aqueles verificados para os enxertos alógenos, estratificadamente em relação ao lado que recebeu o PRP e ao lado que não recebeu PRP. Os efeitos do tempo (MONOV et al, 2005; OHYA et al, 2005) ainda foram analisados através dessa estratificação. A diferença estatística entre as categorias das variáveis foi avaliada pelo teste de Tukey, utilizando-se uma significância de 5%.

A distribuição dos resultados associados às investigações envolvendo os osteoclastos diferiu da distribuição Normal, além do mais, a quantidade de células presentes não se traduz numa variável contínua. Dessa forma, o valor da mediana também foi calculado e não foi possível estabelecer a diferença entre cada categoria separadamente, de forma paramétrica. O método para determinar a diferença estatística do tipo de enxerto e do uso do PRP sobre essas variáveis foi o teste não paramétrico de Mann-Whitney, e para analisar o efeito do tempo, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. O nível de significância utilizado foi de 5%.

Foram estabelecidas entre as variáveis desse estudo correlações que, conforme revisão da literatura, mostraram plausibilidade biológica, e foram apresentadas aquelas de relevância estatística. Desta forma, foram analisadas as correlações entre a matriz óssea presente, a espessura da cortical e quantidade de matriz neoformada, entre a área dos osteoclastos, quantidade de matriz neoformada e área ocupada pelos macrófagos. A área ocupada pelos macrófagos foi ainda correlacionada com a espessura da cortical. Quando as correlações não envolviam os osteoclastos, elas foram ponderadas pela estatística paramétrica de Pearson, quando envolviam essa variável, o sentido e a magnitude da correlação foram avaliados pelo teste paramétrico de Spearman, considerando um nível de significância de 5%.



## 5 Resultados

### 5.1 Comportamento biológico dos enxertos aposicionados

#### 5.1.1 Dados gerais das cirurgias, dos enxertos e do PRP

A média e o desvio padrão referentes aos aspectos relacionados às cirurgias realizadas, às dimensões do enxerto e às características do PRP são apresentadas na tabela 2. Pela análise dos dados, pôde-se inferir que os animais, nos quais foi colocado enxerto autógeno, assemelharam-se àqueles que receberam enxertos alógenos previamente congelados. Essa semelhança ocorreu em relação à duração da cirurgia, à largura do bloco de osso aposicionado no lado direito, à espessura e à largura do bloco aposicionado no lado esquerdo. A plaquetometria no PRP colocado sobre os enxertos autógenos foi similar à do colocado sobre os alógenos ( $p < 0,237$ ), mostrando que cada tipo de enxerto recebeu igual quantidade de plaquetas.

**Tabela 2** – Características gerais das cirurgias para enxertia do fragmento de osso ilíaco na mandíbula dos coelhos, n = 40.

<i>Variável</i>	<i>Osso autógeno,</i>	<i>Osso alógeno,</i>	<i>p*</i>
	<i>n=20</i>	<i>n=20</i>	
	<i>Média±DP</i>	<i>Média±DP</i>	
<i>Duração da cirurgia (min)</i>	52,75±4,84	46,05±6,40	0,183
<i>Espessura do enxerto direito (cm)<sup>a</sup></i>	0,19±0,02	0,17±0,01	0,004
<i>Largura do enxerto direito (cm)<sup>b</sup></i>	0,90±0,03	0,90±0,03	0,630
<i>Espessura do enxerto esquerdo (cm)<sup>a</sup></i>	0,18±0,03	0,17±0,02	0,446
<i>Largura do enxerto esquerdo (cm)<sup>b</sup></i>	0,90±0,01	0,90±0,02	0,548
<i>Plaquetometria do PRP (X10<sup>-3</sup>) células/<math>\mu</math>l</i>	2171,95±973,79	2519,90±855,25	0,237

\* osso autógeno vs grupo alógeno

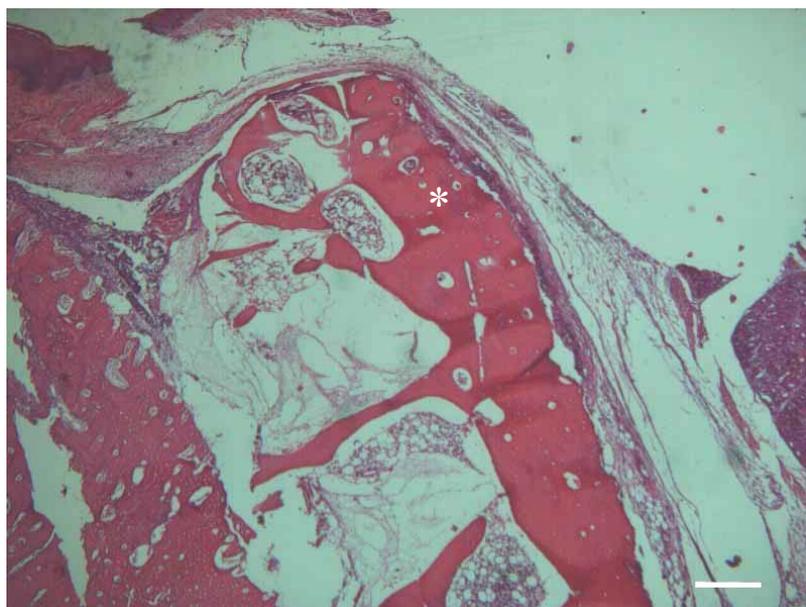
<sup>a e b</sup>  $p > 0,05$  tanto para o grupo autógeno como para o grupo alógeno.

Uma característica, entretanto, foi estatisticamente diferente entre os coelhos que receberam enxertos autógenos e alógenos. A espessura do enxerto posicionado no lado direito foi maior entre os blocos de osso autógeno do que os alógenos ( $p < 0,004$ ).

### 5.1.2 Estudo morfológico descritivo

A cicatrização do fragmento de osso enxertado sobre a cortical da mandíbula ocorreu ao longo dos dias com a substituição do tecido medular por um trabeculado maduro sem evidência de que a inflamação constatada estivesse associada ao reconhecimento específico do enxerto pelo sistema imune.

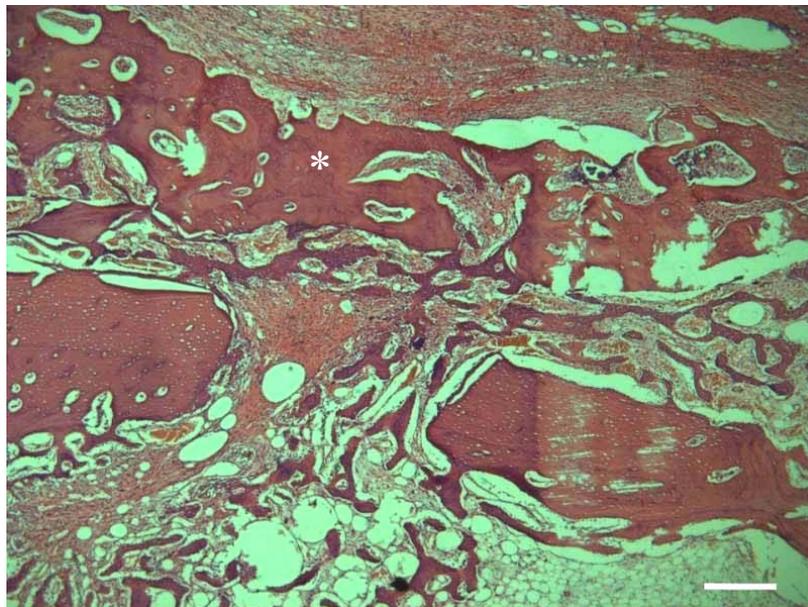
Nos primeiros três dias do experimento, observou-se que o enxerto ainda preservava algumas partes do tecido medular abaixo da cortical. O trabeculado presente era oriundo do osso enxertado e não havia desenvolvido uma conexão com o leito receptor. Todavia, essa interface não estava entremeada por nenhum tecido, tais como fibrose ou inflamação, que pudesse comprometer esse processo à proporção que o enxerto fosse alcançando sua maturidade. Na primeira semana após o enxerto, o processo inflamatório decorrente do procedimento cirúrgico foi predominantemente neutrofilico e estava localizado nos tecidos moles sobre o enxerto, sem infiltrar o tecido ósseo enxertado – figura 5.



**Figura 5** – Interface do enxerto (\*) com o leito receptor após 3 dias. Osso alógeno com PRP. HE, 40X. Escala= 0,3mm.

Com a sucessão dos dias, o colágeno começou a se depositar ao redor do enxerto e, no 7º dia, o colágeno estava bem denso e organizado nessa região. A região entre o enxerto e o leito receptor estava isenta de fibrose e permitiu que a neoformação óssea promovesse uma fusão com a cortical nos demais dias.

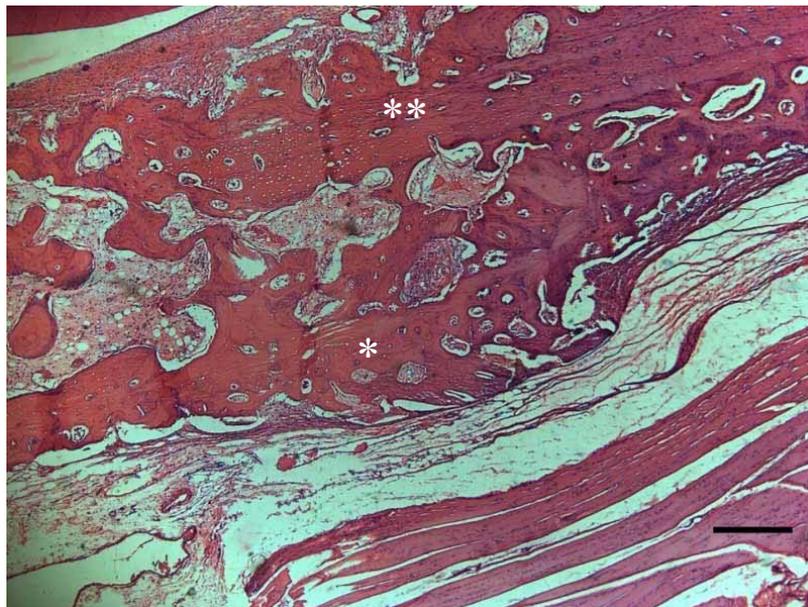
Essa integração do enxerto com o leito receptor se tornou clara no 14º dia quando trabéculas ósseas povoavam o espaço abaixo da cortical do enxerto e o conectavam à mandíbula. Esse evento ocorreu de forma abundante nos locais onde foram realizadas as perfurações no leito receptor – figura 6. A neoformação óssea sobre a cortical foi menor, mas nas porções laterais do enxerto houve osteoindução com o aparecimento de um trabeculado imaturo que foi aumentando a adesão do fragmento de osso com a cortical da mandíbula. A presença de células inflamatórias foi mínima em qualquer ambiente do tecido e não competiu para inviabilizar o processo, que apresentou uma nítida tendência ao reparo e à incorporação do enxerto espessando a mandíbula.



**Figura 6** – Interface do enxerto (\*) com o leito receptor no 14º dia mostrando a neoformação sob a cortical do enxerto que é evidente na região onde a mandíbula foi perfurada durante a cirurgia. Osso alógeno sem PRP. HE, 40X. Escala=0,3mm.

A coalescência do trabeculado abaixo da cortical garantiu a consolidação do enxerto ao leito receptor nos últimos dias do experimento quando a inflamação, que sempre foi discreta, estava ausente e a fibrose era bem tênue. A neorformação óssea nas porções laterais do tecido completou o processo de integração conferindo uma continuidade entre o enxerto e o leito receptor – figura 7.

O aspecto do tecido mostrava tanto nos enxertos autógenos quanto nos alógenos, independentemente do uso do PRP, uma perfeita integração ao meio sem presença de inflamação intensa que foi, provavelmente, resultante do ato cirúrgico. Não foi observada em qualquer animal, pelas secções coradas pelas diferentes técnicas de histoquímica, uma atividade imunológica que representasse uma rejeição ao tecido aposicionado em qualquer dia do experimento.



**Figura 7** – Consolidação do enxerto (\*) ao leito receptor (\*\*). O enxerto apresentava continuidade com a cortical da mandíbula no 28º dia. Não houve inflamação e as fibras encontravam-se espaçadas. Osso alógeno com PRP. HE, 40X. Escala=0,3mm.

### 5.1.3 Diferença entre os grupos estudados em cada um dos dias de observação

A área total de matriz presente no enxerto, a espessura da sua cortical, a quantidade de matriz óssea neoformada, a fibrogênese acima dele e a área ocupada pelos macrófagos foram

comparadas de duas formas. Num primeiro momento, o osso autógeno foi comparado com o alógeno em cada um dos lados, no direito, onde foi colocado o PRP, e no esquerdo. O lado direito foi então especificamente comparado ao esquerdo, quando se usou o enxerto autógeno e quando se usou o enxerto alógeno.

#### *5.1.3.1 Terceiro dia*

Neste dia, a comparação do osso autógeno com o osso alógeno mostrou que, no lado com PRP o enxerto autógeno apresentou uma maior área de matriz óssea. No lado sem PRP, essa tendência se inverteu e no osso alógeno havia mais matriz. Quando se avaliam os lados, a área de matriz óssea foi maior no lado onde foi colocado o PRP, independentemente da natureza do osso enxertado. Essas diferenças, entretanto não foram significativas ( $p > 0,05$ ) – gráfico 1.

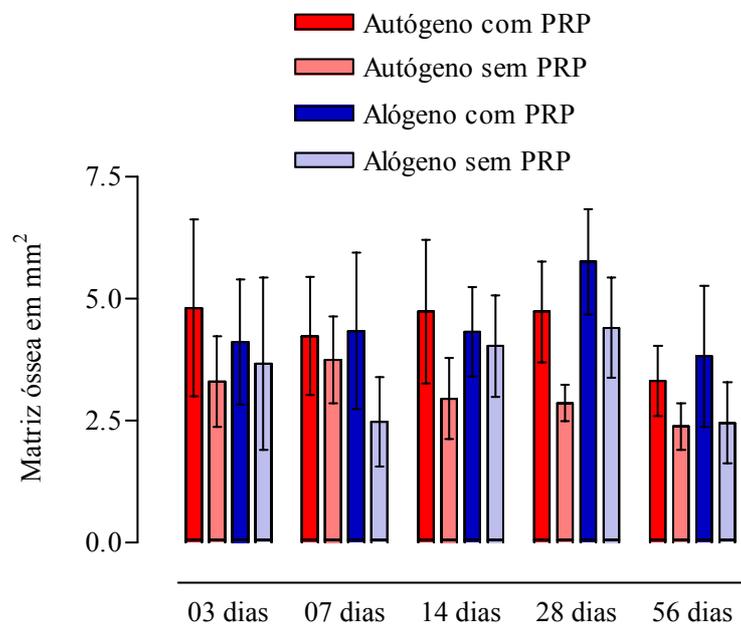
Com relação à cortical, o osso alógeno apresentou uma espessura maior que o autógeno tanto no lado com PRP como no lado sem PRP, mas a análise estatística sugeriu que essas espessuras de corticais foram parecidas ( $p > 0,05$ ). A espessura da cortical nos coelhos enxertados com osso autógeno foi menor no lado com PRP que no lado sem PRP, mas essas diferenças não foram significativamente relevantes ( $p > 0,05$ ). Nos enxertos alógenos, a cortical esteve tão espessa no lado em que se agregou o PRP quanto no outro lado ( $p > 0,05$ ) – gráfico 2.

A quantidade de osso neoformado – gráfico 3 – e a síntese de colágeno – gráfico 4 – nesse dia foram irrisórias. Pela análise estratificada, a adição de PRP permitiu que tanto o osso autógeno quanto o alógeno induzissem um pouco mais de osteocondução e fibrogênese. Esses processos biológicos também foram mais atribuídos ao osso autógeno que ao alógeno, em ambos os lados, mas todas essas diferenças não foram significativas ( $p > 0,05$ ).

Nesse dia, a única significância estatística foi encontrada para a área ocupada pelos macrófagos no tecido mole. O osso autógeno propiciou um menor aparecimento de macrófagos que o alógeno, tanto no lado em que foi colocado o PRP quanto no lado controle ( $p < 0,05$ ). Outro achado dessa análise foi a maior área de macrófagos no lado sem PRP tanto no enxerto alógeno ( $p < 0,05$ ) quanto no autógeno ( $p > 0,05$ ), mas a diferença só foi significativa nos alógeno – gráfico 5.

### 5.1.3.2 Sétimo dia

Quando se avaliou toda matriz presente, os enxertos alógenos foram semelhantes aos autógenos tanto no lado contendo PRP quanto no lado controle ( $p>0,05$ ). Quando se compararam os lados, em cada tipo de enxerto, nos coelhos que receberam enxertos alógenos, o lado com PRP apresentou, em média, o dobro da área do lado controle ( $p<0,05$ ). Nos animais que receberam enxertos autógenos, o lado com PRP também exibiu uma maior área, mas esse achado não foi significativo ( $p>0,05$ ) – gráfico 1.

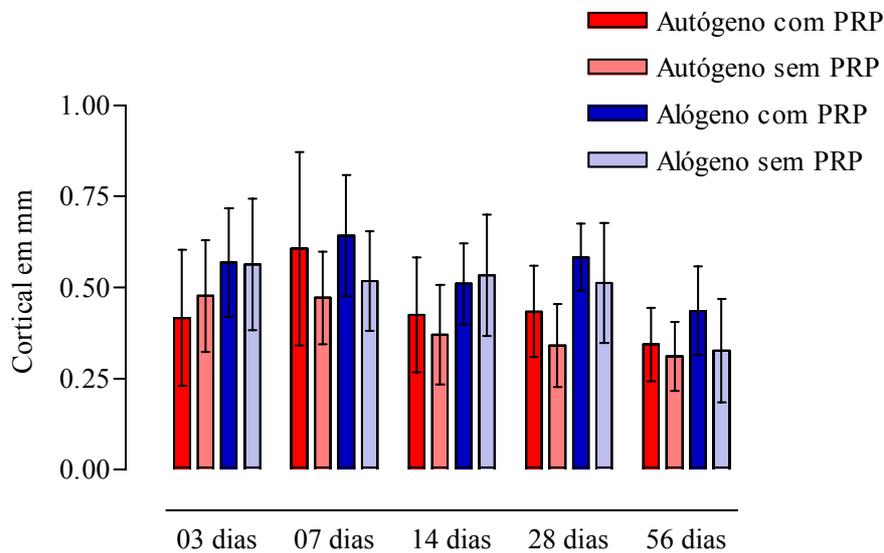


**Gráfico 1** – Área total de matriz óssea em função dos dias e da natureza do enxerto, n=40.

Nesse dia, a espessura da cortical nos animais que receberam osso autógeno foi similar a aferida nos animais que receberam osso alógeno, tanto no lado que recebeu PRP como no outro lado ( $p>0,05$ ). A cortical dos enxertos de natureza alógena e a dos enxertos de natureza autógena estavam mais espessas no lado onde se agregou o concentrado de fatores de crescimento ( $p<0,05$ ).

Com relação à área de matriz neoformada e que se corou mais intensamente pelo azul de toluidina, o enxerto autógeno foi tão osteocondutor quanto o alógeno, e a osteocondução no

lado com PRP foi semelhante a do lado sem PRP em qualquer combinação dessas variáveis ( $p>0,05$ ) – gráfico 3.



**Gráfico 2** – Espessura da cortical do enxerto em função dos dias e da natureza do enxerto,  $n=40$ .

A quantidade de colágeno foi maior sobre os enxertos alógenos e esse perfil de fibrogênese só foi significativo no lado onde não se colocou o PRP ( $p<0,05$ ). Quando se comparou o lado direito ao esquerdo, o lado com PRP induziu uma maior deposição de colágeno no grupo autógeno e o lado sem PRP, no grupo alógeno. A análise estatística, todavia, equiparou os valores encontrados no lado direito aos encontrados no lado esquerdo ( $p>0,05$ ) – gráfico 4.

Os macrófagos continuaram ocupando uma área maior nos tecidos moles sobre os enxertos alógenos ( $p<0,05$ ) tanto no lado com PRP quanto no outro lado. A utilização de PRP não representou um fator de diferenciação entre os dois lados da mandíbula na análise estratificada pelo tipo de enxerto ( $p>0,05$ ) – gráfico 5.

#### 5.1.3.3 Décimo quarto dia

Como nos demais dias, a área total ocupada pela matriz óssea nos enxertos autógenos com PRP foi maior que no osso alógeno com PRP. O mesmo aconteceu nos lados sem PRP. Apesar disso, essas diferenças não foram significativas ( $p>0,05$ ). A quantidade de matriz

óssea foi maior no lado onde se agregou o PRP ao enxerto, entretanto, a diferença entre os lados só foi importante no grupo autógeno ( $p < 0,05$ ) – gráfico 1.

Quando os enxertos foram comparados em relação à espessura de suas corticais, o osso alógeno exibiu valores maiores que o autógeno, mas isso só foi estatisticamente significativo no lado em que não foi colocado o PRP ( $p < 0,05$ ). O PRP permitiu que a cortical estivesse mais espessa tanto nos enxertos autógenos quanto nos alógenos, mas a diferença para o lado sem PRP não apresentou relevância estatística ( $p > 0,05$ ) – gráfico 2.

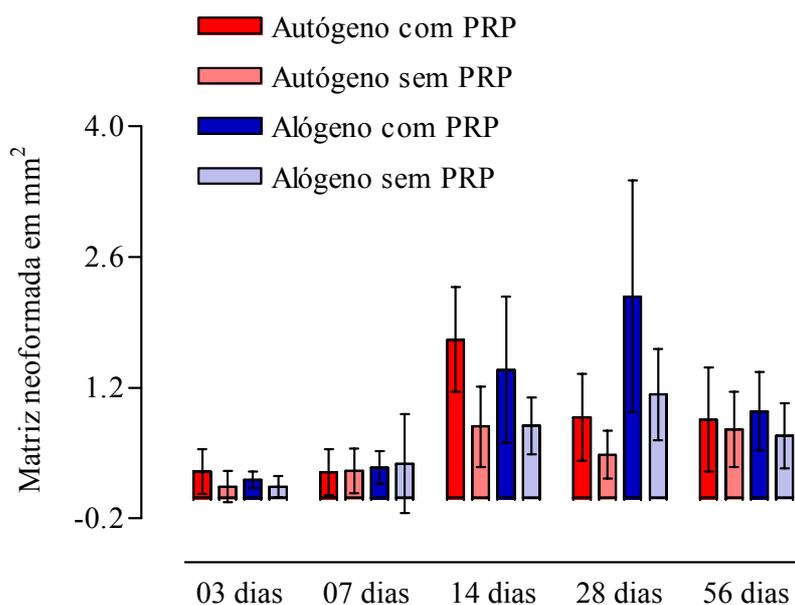
No lado com PRP, o enxerto autógeno foi mais osteocondutor que o alógeno, apesar da diferença não ter sido significativa ( $p > 0,05$ ). No lado sem PRP, eles foram muito semelhantes quanto a essa propriedade ( $p > 0,05$ ). Nos enxertos autógenos, o lado com PRP foi estatisticamente mais osteogênico que o lado controle ( $p < 0,05$ ). No grupo heterógeno, a tendência se manteve, mas não houve significância ( $p > 0,05$ ).

A quantidade de colágeno, a partir desse dia, não mostrou diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) em qualquer extrato resultante da combinação entre os tipos de enxerto e a utilização de PRP. Muito embora, a área de colágeno tenha sido maior no grupo autógeno e nos lados com PRP, nesse dia e em todos os subseqüentes – gráfico 4.

O osso alógeno com PRP apresentou uma área de macrófagos, sobre o enxerto, maior que o osso autógeno com PRP ( $p < 0,05$ ). A diferença entre os tipos de enxerto continuou significativa também no lado sem PRP ( $p < 0,05$ ). A área ocupada pelos macrófagos nesse dia foi maior no lado com PRP do que no lado sem PRP apenas sobre os enxertos autógenos ( $p < 0,05$ ) – gráfico 5.

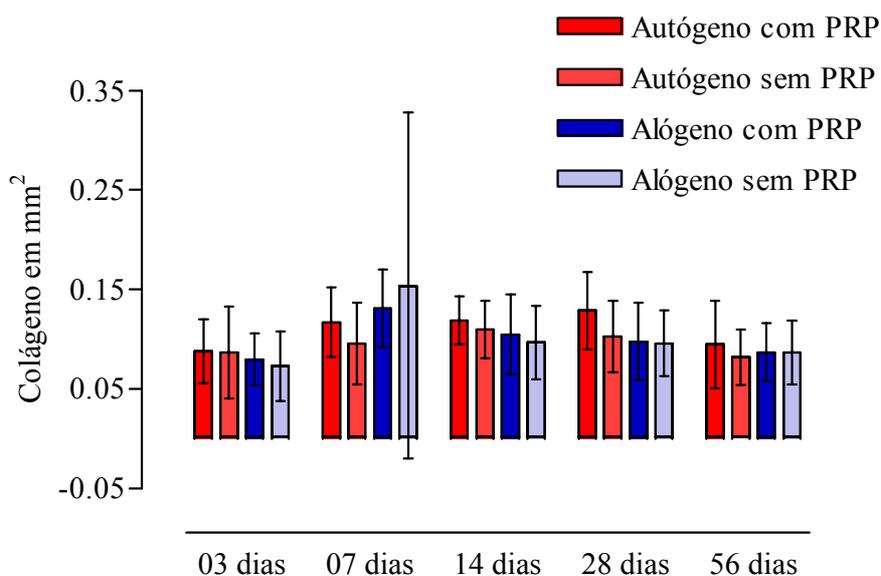
#### *5.1.3.4 Vigésimo oitavo dia*

Considerando o desempenho dos enxertos com relação a toda área de tecido ósseo presente sobre a cortical mandibular neste dia, o enxerto alógeno com PRP estava menos absorvido que o osso autógeno com PRP. O enxerto alógeno sem PRP também se comportou de forma semelhante, todavia esses dois achados não foram significativos ( $p > 0,05$ ). No grupo de enxertos autógenos, a colocação de PRP representou um instrumento para diminuir o processo de absorção do osso ( $p < 0,05$ ). Embora isso também tenha ocorrido em relação aos enxertos alógenos, a diferença entre os lados não foi significativa ( $p > 0,05$ ) – gráfico 1.



**Gráfico 3** – Área de matriz óssea neoformada em função dos dias e da natureza do enxerto, n=40.

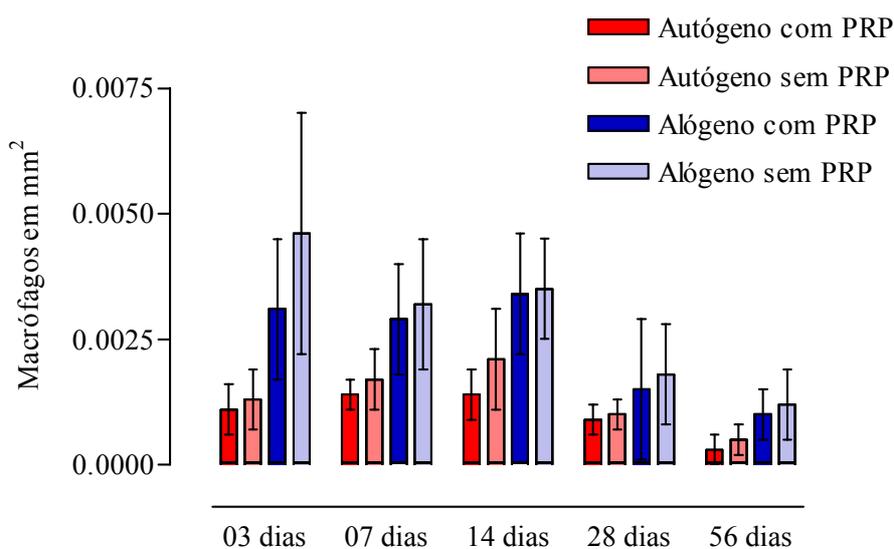
A análise de cada tipo de enxerto e de cada lado da mandíbula evidenciou que tanto nos animais que receberam enxertos autógenos quanto nos animais que receberam enxertos alógenos, o lado com PRP preservou melhor a espessura da cortical que o lado onde o PRP não havia sido aplicado, apesar da inexistência de significância nessas diferenças ( $p>0,05$ ).



**Gráfico 4** – Área ocupada pelo colágeno no tecido mole sobre o enxerto em função dos dias e da natureza do enxerto, n=40.

Contudo, é importante frisar que tanto no lado com PRP, quanto no lado sem PRP, a diferença entre osso autógeno e alógeno se manteve relevante e o osso alógeno apresentava uma cortical mais espessa ( $p < 0,05$ ) – gráfico 2.

Com relação à área de matriz recém secretada, o grupo alógeno só induziu uma maior neoformação óssea, quando comparado com o osso autógeno, no lado que recebeu PRP ( $p < 0,05$ ). No microambiente contralateral, apesar dos enxertos alógenos terem sido mais osteocondutores, sua diferença para o grupo autógeno não foi significativa ( $p > 0,05$ ). Os enxertos alógenos apresentaram no lado com PRP, uma quantidade de matriz recém secretada equivalente ao dobro da observada no outro lado ( $p < 0,05$ ). Não obstante a análise ter sido análoga em relação aos enxertos autógenos, a diferença entre os lados não foi significativa ( $p > 0,05$ ) – gráfico 3.



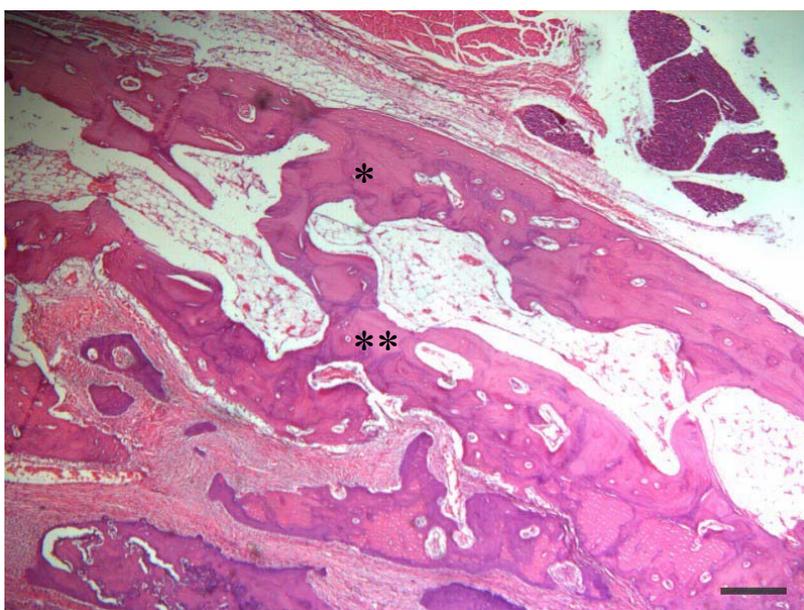
**Gráfico 5** – Área ocupada pelos macrófagos no tecido mole sobre o enxerto em função dos dias e da natureza do enxerto,  $n=40$ .

A quimiotaxia de macrófagos nos lados tratados com PRP foi menor nos enxertos autógenos que nos alógenos, mas a diferença não foi significativa ( $p > 0,05$ ). Já nos lados sem PRP, essa propriedade foi marcante nos enxertos alógenos ( $p < 0,05$ ). Em ambos tipos de enxerto, a presença do PRP não modificou a atividade dos macrófagos contra o tecido quando comparado ao lado sem PRP ( $p > 0,05$ ) – gráfico 5.

### 5.1.3.5 *Quinquagésimo sexto dia*

A área final de osso enxertado no grupo autógeno foi maior quando se acrescentou PRP ao meio. No grupo alógeno, com a adição de PRP, a área também esteve mais preservada. O osso alógeno apresentava uma área maior de matriz óssea que o osso autógeno no lado com PRP, enquanto que no lado sem PRP eles foram semelhantes – gráfico 1. Esta mesma análise pode ser aplicada para a espessura da cortical – gráfico 2 – e para a área neoformada – gráfico 3.

Neste dia, entretanto, as diferenças só foram significativas para a área ocupada pelos macrófagos – gráfico 5. A área dos macrófagos foi maior ao redor do osso alógeno que ao redor do autógeno, tanto no lado direito quanto no lado esquerdo ( $p < 0,05$ ). Em ambos os grupos, a área ocupada pelos macrófagos foi menor no lado com PRP, embora diferença para o lado sem PRP não ter revelado significância ( $p > 0,05$ ).



**Figura 8** – Aspecto do tecido após 56 dias da cirurgia evidenciando o enxerto (\*) e sua integração com o leito receptor (\*\*). Osso autógeno sem PRP. HE, 40X. Escala=0,3mm.

#### 5.1.4 Efeito do tempo sobre o enxerto aposicionado

No lado em que foi colocado o enxerto autógeno associado ao PRP, as diferenças observadas na área total de matriz óssea foram muito pequenas entre o 3° e o 28° dia ( $p>0,05$ ). A absorção iniciou entre o 28° e o 56° dia, mas os valores encontrados no último dia de observação apresentaram-se similares aos aferidos em qualquer outro dia do experimento ( $p>0,05$ ). No lado sem PRP, as diferenças entre os dias também não foram significativas ( $p>0,05$ ), mas um aspecto o diferencia do outro lado. A absorção que no lado com PRP ocorreu a partir do 28° dia, no lado sem PRP, foi mais precoce. Neste lado, a área diminuiu no 14° dia para um parâmetro que se manteve nos dias seguintes – gráfico 1.

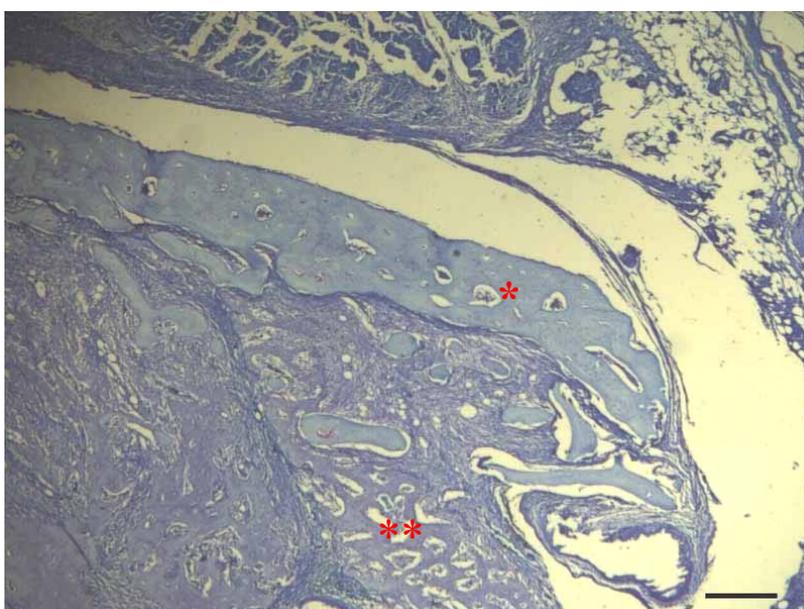
Nos animais enxertados com osso alógeno, observou-se uma uniformidade na quantidade do enxerto entre o primeiro e o último dia do experimento – figura 8 – no lado onde houve o recobrimento com PRP. No 28° dia, a quantidade de osso presente estava maior que nos demais dias de observação, contudo, a diferença observada nesse dia só foi estatisticamente significativa ( $p<0,05$ ) em relação ao 3° dia. Quando se analisou o lado sem PRP, percebeu-se uma tendência de aumento na quantidade de osso presente, entre o 3° e o 28° dia, exceto pelo 7° dia quando a área do enxerto estava menor que os demais. A diferença entre os dias não apresentou significância, exceto quando se comparou o aumento observado entre o 14° dia e o 28° dia, e a absorção que ocorreu entre o 28° ao 56° dia ( $p<0,05$ ) – gráfico 1.

A cortical dos enxertos ósseos autógenos tratados com PRP experimentou um aumento importante de sua espessura entre o 3° e o 7° dia ( $p<0,05$ ). A espessura diminuiu bruscamente até o 14° dia ( $p<0,05$ ) e se manteve no mesmo patamar até o 28° dia, quando se constatou uma nova diminuição. O valor mais baixo foi observado no 56° dia e embora não tenha se diferenciado do período anterior ( $p>0,05$ ), houve uma redução significativa entre a espessura da cortical aferida no 3° dia e a aferida no 56° ( $p<0,05$ ). No lado onde não foi colocado o PRP, a espessura no 3° dia foi muito semelhante à do 7° dia ( $p>0,05$ ). A partir desse dia, a espessura diminuiu lenta e gradativamente até o 56°. Os valores observados no 14°, 28° e 56° dias, apesar de decrescentes não se diferenciaram estatisticamente ( $p>0,05$ ), mas, no último dia, a cortical estava mais estreita que no 3° e no 7° dia ( $p>0,05$ ) – gráfico 2.

No grupo alógeno, a espessura da cortical se preservou ao longo dos dias, mas caiu de maneira significativa no 56° dia ( $p<0,05$ ), com a adição ou não do PRP. A diferença

observada no comportamento da cortical entre esses dois tratamentos foi um decréscimo entre o 7º e o 14º dia ( $p < 0,05$ ) no lado em que foi colocado o PRP – gráfico 2.

Nos coelhos que receberam osso autógeno, houve uma quantidade de matriz óssea recém secretada maior no 14º dia, em ambos os lados – figura 9. Nos lado em que o PRP não foi agregado ao enxerto, a quantidade de osso neoformado foi similar em todos dias ( $p > 0,05$ ). Entretanto, no lado que recebeu o PRP, no 14º dia, a neoformação foi exuberante e estatisticamente maior que todos os demais dias do experimento ( $p < 0,05$ ) – gráfico 3.

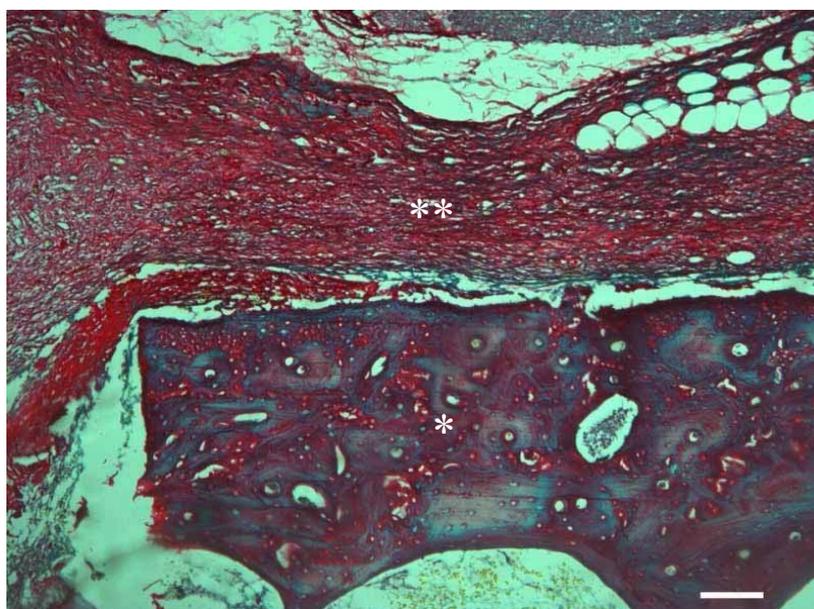


**Figura 9** – Área neoformada (\*\*\*) abaixo da cortical do enxerto (\*) no 14º dia. Osso autógeno com PRP. Azul de toluidina, 40X. Escala=0,3mm.

O pico de osteocondução atribuída aos enxertos alógenos foi maior no 28º dia, e esse aumento foi ocorrendo gradativamente. Entretanto, com a utilização do PRP, a quantidade neoformada no 14º dia já era maior que a do 3º dia ( $p < 0,05$ ), e no 28º dia foi tamanha que o diferenciou de todos os outros períodos avaliados ( $p < 0,05$ ). Entre o 28º e o 56º dia, o potencial de neoformar osso diminuiu, mas no último dia avaliado ele ainda foi estatisticamente superior ao 3º dia ( $p < 0,05$ ). Quando o PRP não foi adicionado, a quantidade de osso neoformada só se diferenciou no 28º dia ( $p < 0,05$ ), e ainda assim a diferença entre esse dia o 14º não foi significativa ( $p > 0,05$ ). Para os demais dias, a quantidade de osso neoformada foi semelhante ( $p > 0,05$ ) – gráfico 3.

A quantidade de colágeno presente no tecido acima do enxerto nos animais que receberam enxertos autógenos foi semelhante em todos os dias de observação ( $p>0,05$ ), independente da adição de PRP ao meio. Contudo, pôde-se depreender que a quantidade de colágeno nessa região foi incrementando até o 28° dia quando havia PRP no tecido, enquanto isso só ocorreu até o 14° dia se no microambiente ao redor do enxerto não houvesse PRP – gráfico 4.

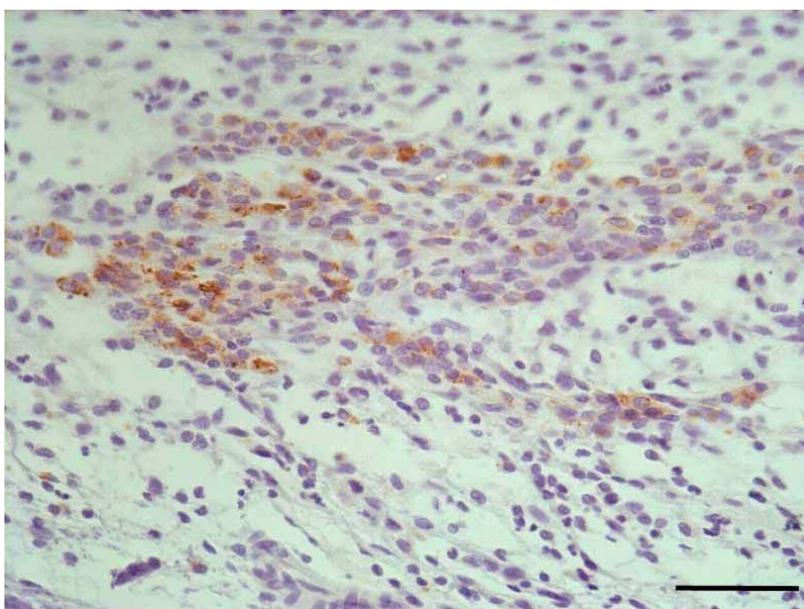
O enxerto alógeno induziu uma fibrogênese mais intensa no 7° dia – figura 10, quando já era maior que o 3° dia ( $p<0,05$ ). A quantidade de colágeno diminuiu gradativamente entre o 7° e o 56° dia ( $p<0,05$ ) quando voltou ao padrão observado no 3° dia ( $p>0,05$ ). Esse fato foi constatado tanto no lado com PRP quanto no outro lado – gráfico 4.



**Figura 10** – Fibrose (\*\*) ao redor do osso enxertado (\*) no 7° dia após a cirurgia. Osso alógeno com PRP. Picro-sirius, 100X. Escala=0,1mm.

No tecido mole sobre o enxerto autógeno, a área ocupada pelos macrófagos aumentou até o 7° dia no lado que recebeu PRP. No outro lado essa quantidade foi incrementada até o 14° dia. A partir desses dias, houve uma regressão nas quantidades. A área dos macrófagos ao redor do grupo autógeno só reduziu significativamente entre o 28° e 56° dia ( $p<0,05$ ), quando voltou a valores inferiores ao do 3° dia ( $p<0,05$ ). No lado esquerdo, entretanto, o incremento observado no 14° dia o diferenciou dos demais ( $p<0,05$ ). À proporção que os dias foram avançando, os macrófagos foram desaparecendo do tecido muito lentamente, de modo que a área de macrófagos no 28° dia foi semelhante à do 56° ( $p>0,05$ ) – gráfico 5.

A presença de macrófagos ao redor dos enxertos alógenos foi grande no 3º dia – figura 11 – e se manteve assim até o 14º dia, se o PRP tivesse sido usado. Neste lado, a quantidade de macrófagos só diminuiu no 28º dia ( $p < 0,05$ ), e essa diminuição impôs uma diferença significativa entre esse dia e qualquer um dos anteriores ( $p < 0,05$ ). Entre o 28º e o 56º dia, a diminuição da área de macrófagos prosseguiu de forma mais sutil ( $p > 0,05$ ). A quantidade de macrófagos no último dia foi muito menor que a observada 72 horas após a cirurgia ( $p < 0,05$ ). No lado sem PRP, a quantidade de macrófagos sobre o enxerto alógeno no 3º dia foi maior que todos os demais ( $p < 0,05$ ). Entre o 7º e o 14º dia, essas quantidades foram semelhantes ( $p > 0,05$ ). Entre o 14º e o 28º dia, ocorreu uma diminuição importante ( $p < 0,05$ ) que continuou progredindo de forma significativa até o 56º dia ( $p < 0,05$ ).



**Figura 11** – Imunomarcagem de células RAM 11 (macrófagos) no tecido mole sobre o enxerto no 3º dia. Osso alógeno com PRP. 400X. Escala=0,1mm.

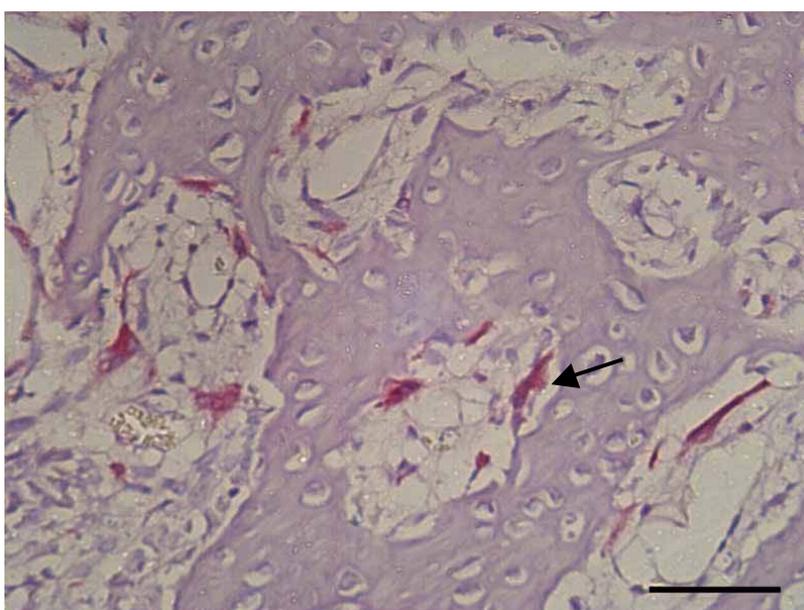
#### *5.1.5 Análise do comportamento dos osteoclastos no tecido*

As células TRAP positivas começaram a povoar o tecido entre o 3º e o 7º dia. Neste período do experimento, foi possível identificar, em alguns animais, o fluxo dessas células até o leito do enxerto. Os pré-osteoclastos, que também assumem a cor vermelha pela coloração, foram infiltrando os tecidos moles na porção lateral do enxerto. Nessa região elas começaram a

coalescer e formar as células multinucleadas que participaram do processo de homeostasia do osso.

No 7º dia, foi possível encontrar raras células multinucleadas positivas para a fosfatase ácida ocupando uma área muito discreta no tecido enxertado. Elas só se tornaram evidentes no 14º dia – figura 12, quando a área esteve bem maior que a observada no 7º. A partir desse dia, a quantidade foi diminuindo até que no 56º dia elas praticamente desapareceram do tecido. A diferença observada entre os valores de cada dia foi estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) tanto para a quantidade de osteoclastos quanto para a área ocupada por eles – tabela 3.

A comparação da quantidade e da área ocupada pelos osteoclastos no enxerto autógeno e alógeno, e no lado com PRP em função do lado sem PRP, mostrou que apesar da média ter sido maior nos tecidos alógenos ou nos lados sem PRP, a diferença não foi estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) – tabela 3.



**Figura 12** – Células multinucleadas TRAP-positivas (seta) em contato com o enxerto no 14º dia. Osso alógeno sem PRP. Coloração para a TRAP, 400X. Escala=0,1mm.

É importante salientar que a presença de osteoclastos no osso do corpo mandibular dos coelhos foi rara e estava mais associada ao periosteio. Um comportamento bastante frequente dessas células foi sua presença no ligamento periodontal ocupando as lacunas de Howship.

Esse dado foi importante para confirmar a positividade da reação naqueles coelhos que não exibiram osteoclastos em seus enxertos.

### 5.1.6 Imunomarcações de linfócitos T e B

Em todas as amostras estudadas não foram constatadas células CD79 $\alpha\gamma$ -positivas. Foram observados raras células positivas para o CD3 em alguns coelhos. Nestes raros casos, as células que se marcaram com o anticorpo contra essa molécula do linfócito T, encontravam-se distantes do enxerto e, portanto, foram desconsideradas.

Nas secções de baço de coelho, usadas como controle positivo, observou-se que a marcação desses anticorpos foi fidedigna com a posição esperada para os linfócitos B e T, na polpa branca. As células CD3-positivas ocupavam a bainha periarteriolar e as células CD79 $\alpha\gamma$ -positivas estavam presentes na zona marginal do centro germinativo.

Tabela 3 – Mediana, média e desvio padrão da quantidade de osteoclastos e da área ocupada por essas células em função do tipo de enxerto, do lado da mandíbula e dos dias de observação, n=40.

Observação	Categoria	Quantidade de osteoclastos		Área dos osteoclastos (X10 <sup>-3</sup> )	
		Mediana	Média±DP	Mediana	Média±DP
<b>Tipo de enxerto</b> <sup>1</sup>	<i>Autógeno</i>	0,5	20±33,57	0,15	2,83±4,85
	<i>Alógeno</i>	7	29±56,26	1,20	3,64±6,23
<b>Lado</b> <sup>2</sup>	<i>com PRP</i>	5	23±37	0,85	2,99±4,80
	<i>sem PRP</i>	3	27±55	0,40	3,47±6,31
<b>Dia de observação</b> <sup>3</sup>	3	0	0	0	0
	7	3	8±10	0,45	1,12±0,08
	14	62	76±71	8,00	9,40±7,80
	28	24	36±40	3,10	5,13±5,55
	56	0	4±9	0	0,52±1,05

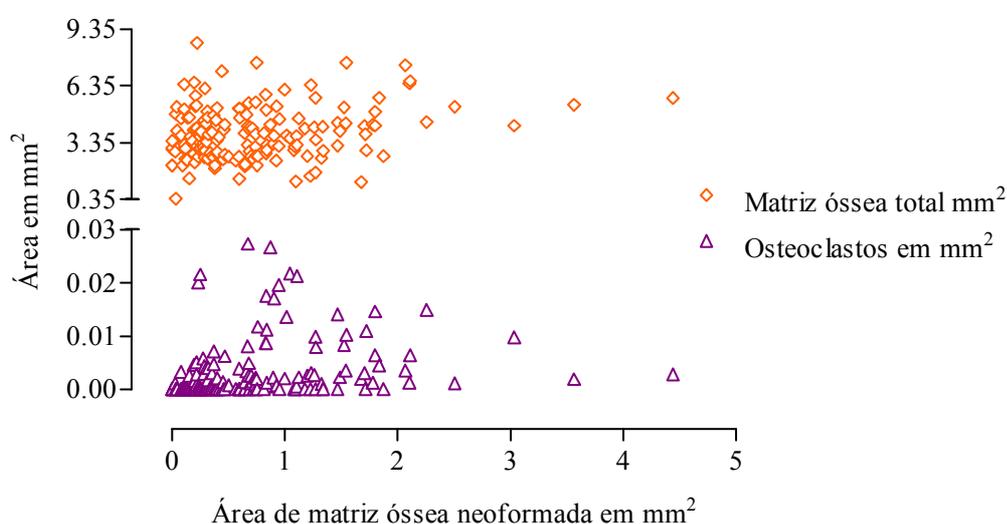
1. Teste de Mann-Whitney. Osteoclasto p<0,195; Área de osteoclastos p<0,173

2. Teste de Mann-Whitney. Osteoclasto p<0,950; Área de osteoclastos p<0,547

3. Teste de Kruskal-Wallis. Osteoclasto p<0,0001; Área de osteoclastos p<0,0001

### 5.1.7 Correlações entre as variáveis estudadas

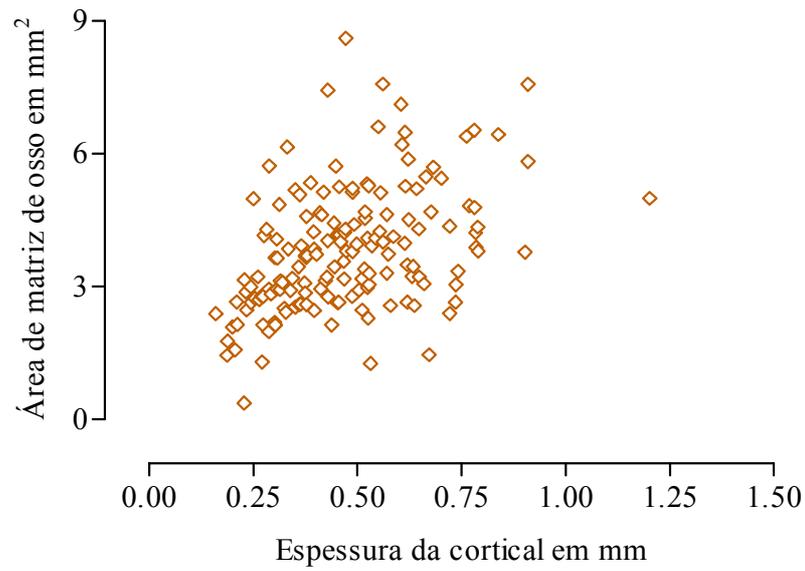
Pela análise das correlações que apresentaram plausibilidade biológica e relevância estatística, pôde-se constatar que quanto maior a área de matriz neoformada, maior a quantidade de matriz óssea presente no enxerto ( $r= 0,244$ ;  $p<0,002$ ) – gráfico 6. A quantidade de matriz neoformada estimulou também um maior aparecimento de osteoclastos ( $r= 0,439$ ;  $p<0,0001$ ) – gráfico 6.



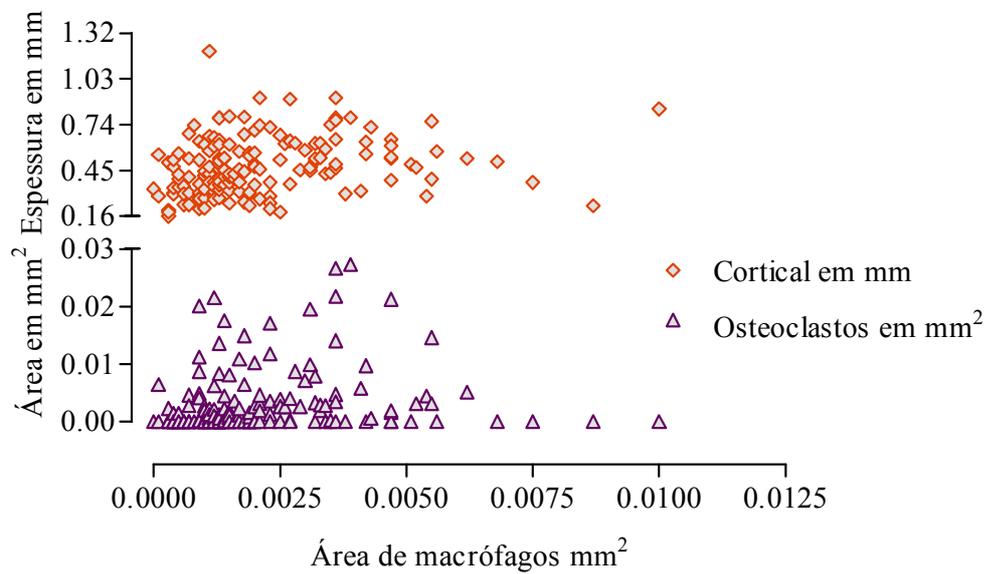
**Gráfico 6** – Associação da área total de matriz óssea presente e da área ocupada pelos osteoclastos com a área de matriz óssea neoformada,  $n=40$ .

Verificou-se também que a espessura da cortical participava da área total de matriz presente numa relação direta ( $r= 0,435$ ;  $p<0,0001$ ) – gráfico 7. Esta espessura ainda apresentou uma correlação direta com a área ocupada pelos macrófagos ( $r=0,205$ ;  $p<0,0001$ ) – gráfico 8.

A área que os osteoclastos ocupavam esteve diretamente relacionada com a área ocupada pelos macrófagos ( $r=0,257$ ;  $p<0,001$ ) – gráfico 8. É importante salientar que a plaquetometria do PRP não apresentou correlação significativa com nenhuma outra variável do estudo.



**Gráfico 7** – Associação da área total de matriz óssea presente no enxerto com a espessura da cortical, n=40.

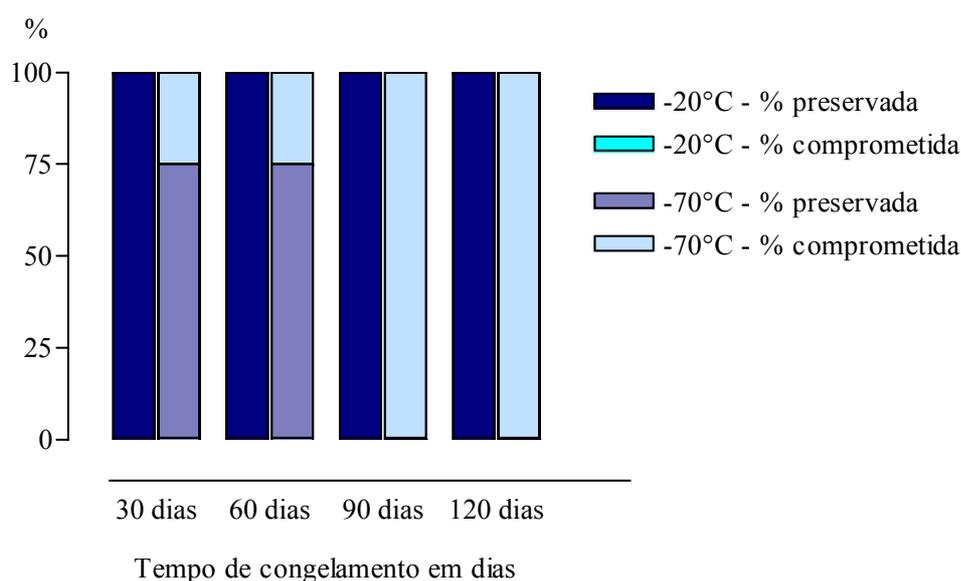


**Gráfico 8** – Associação da espessura da cortical e da área ocupada pelos osteoclastos com a área ocupada pelos macrófagos, n=40.

## 5.2 Congelamento do osso

### 5.2.1 Análise qualitativa

A análise qualitativa das porções medular e cortical do tecido ósseo mostrou que, após o congelamento por  $-20^{\circ}\text{C}$ , a morfologia do tecido preservou sua qualidade independente do tempo de congelamento. Foi identificado em 100% das amostras congeladas a essa temperatura que o tecido medular manteve sua arquitetura. O arcabouço celular e nuclear dos osteócitos e das células da medula também estavam preservados. O congelamento a  $-70^{\circ}\text{C}$ , alterou o aspecto do tecido em 25% das amostras tanto depois de 30 dias como depois de 60 dias de congelamento, enquanto a manutenção do tecido nessa temperatura por 90 ou 120 dias comprometeu seu aspecto morfológico em 100% das amostras - gráfico 9. A delimitação do arcabouço celular e nuclear estava mal definida resultando num aumento da área ocupada por eles no tecido.

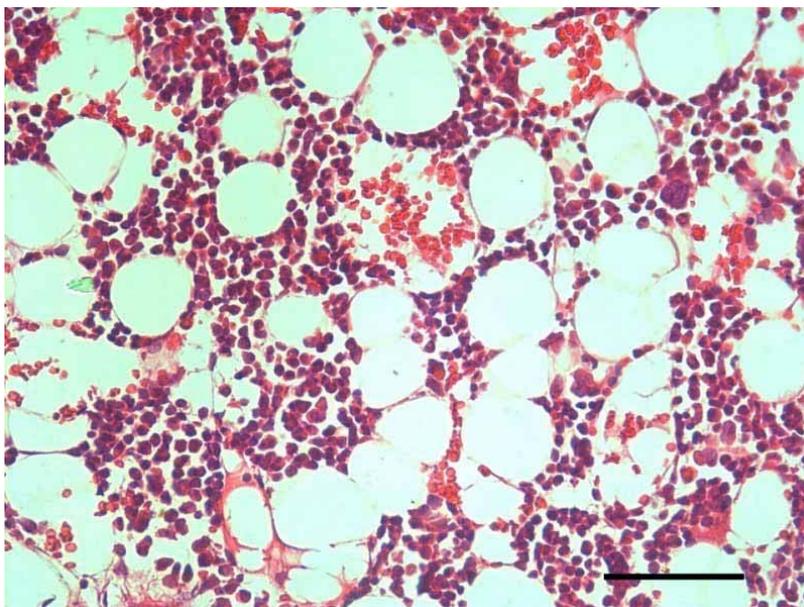


**Gráfico 9** – Análise qualitativa da morfologia do tecido ósseo nos diferentes dias de congelamento à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  e de  $-70^{\circ}\text{C}$ ,  $n=8$ .

## 5.2.2 Análise quantitativa das áreas estudadas

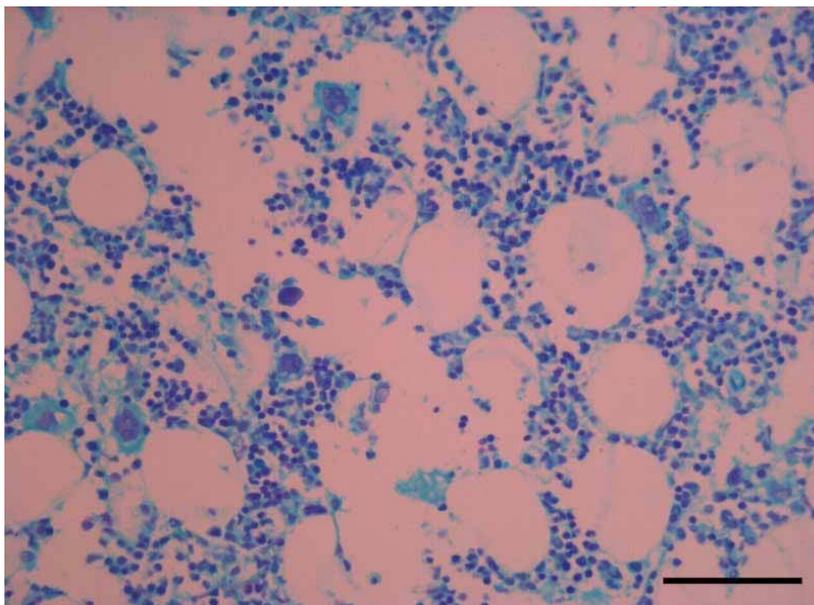
### 5.2.2.1. Efeito da temperatura de congelamento na área das células e núcleos presentes na medular

A diminuição da temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  para  $-70^{\circ}\text{C}$  promoveu um aumento na área que as células ocupavam no tecido medular nos primeiros 90 dias de congelamento. Esse aumento só foi significativo no 30° ( $p<0,0001$ ) e no 90° dia ( $p<0,013$ ). Com 120 dias, essas duas temperaturas não se diferenciaram com relação à área das células ( $p>0,596$ ). Em todos os períodos e temperaturas apreciadas, esta área sempre foi maior que o tecido normal – figura 13, mas não houve significância nos primeiros 30 dias à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  ou com 120 dias, nas duas temperaturas ( $p>0,053$ ) – gráfico 10.

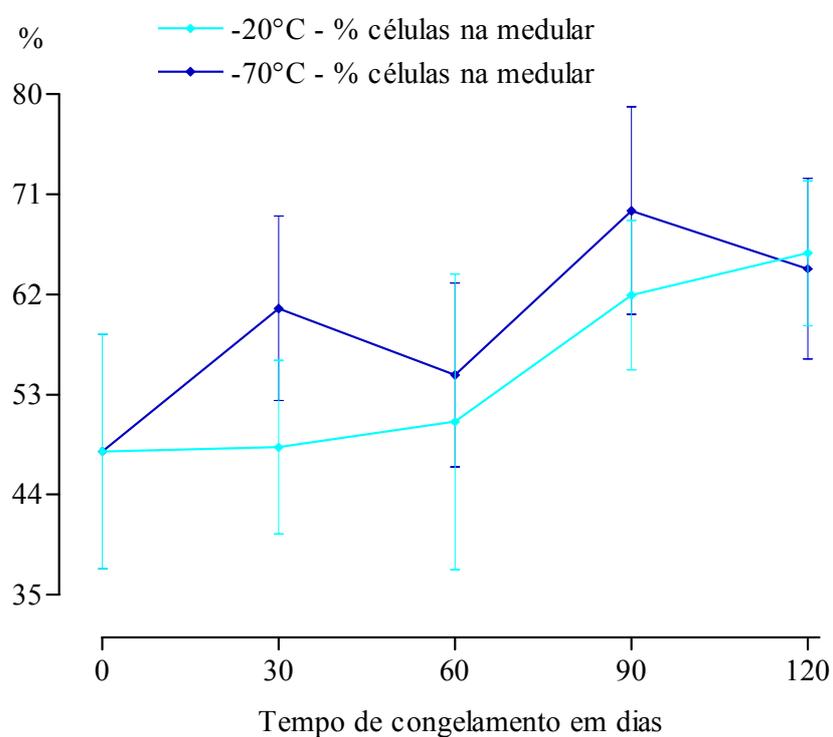


**Figura 13** – Aspecto da porção medular do osso ilíaco fresco. HE, 400X. Escala=0,1mm.

Em todos os períodos de observação, a diminuição da temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  para  $-70^{\circ}\text{C}$ , acarretou um significativo aumento na porcentagem que os núcleos representavam nas células ( $p<0,001$ ), inclusive em relação aos valores aferidos no osso fresco ( $p<0,0001$ ).



**Figura 14** – Aspecto do tecido medular do osso íliaco após 30 dias de congelamento à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ . Reação de Feulgen, 400X. Escala=0,1mm

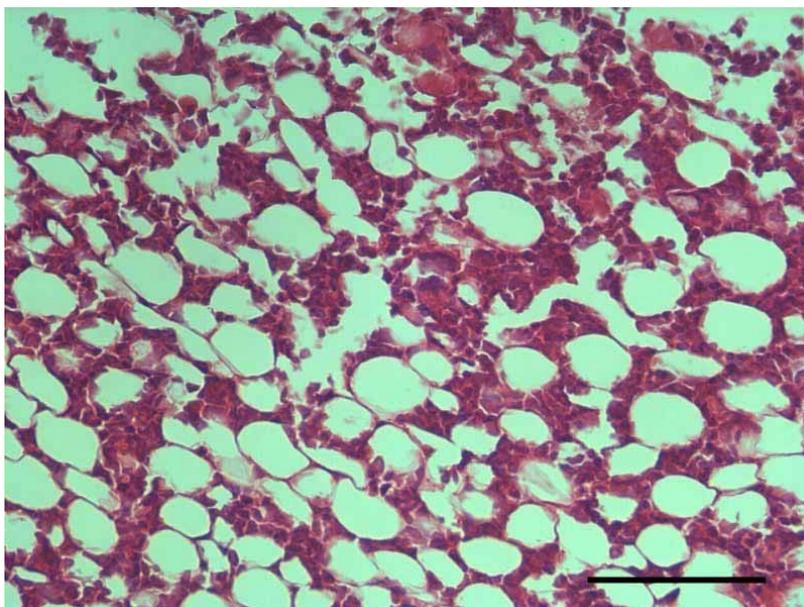


**Gráfico 10** – Percentual da área que as células ocupavam no tecido medular, em função do tempo e da temperatura de congelamento, analisada em secções coradas através da HE, n=12.

Nos primeiros 30 dias, entretanto, a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  não foi tão lesiva para o núcleo, e o aumento da área não foi suficiente para diferenciar do padrão do osso fresco ( $p>0,183$ ) – gráfico 11.

A área que os núcleos ocupavam na medular, conseqüentemente, se comportou de forma semelhante quando a temperatura diminuiu de  $-20^{\circ}\text{C}$  para  $-70^{\circ}\text{C}$  ( $p<0,0001$ ). A coloração pela HE ou pela reação de Feulgen – figura 14 – se confirmaram entre si com relação a este achado – gráficos 7 e 8.

A comparação com o tecido fresco, todavia, evidenciou que a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  só promoveu um aumento significativo na área do núcleo na medular a partir de 60 dias ( $p<0,027$ ) nas secções coradas pela HE – figura 15, e de 120 dias ( $p<0,034$ ) nas secções coradas pela reação de Feulgen. Na temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ , este aumento foi significativo independentemente do tempo ou da coloração analisada – gráficos 7 e 8.

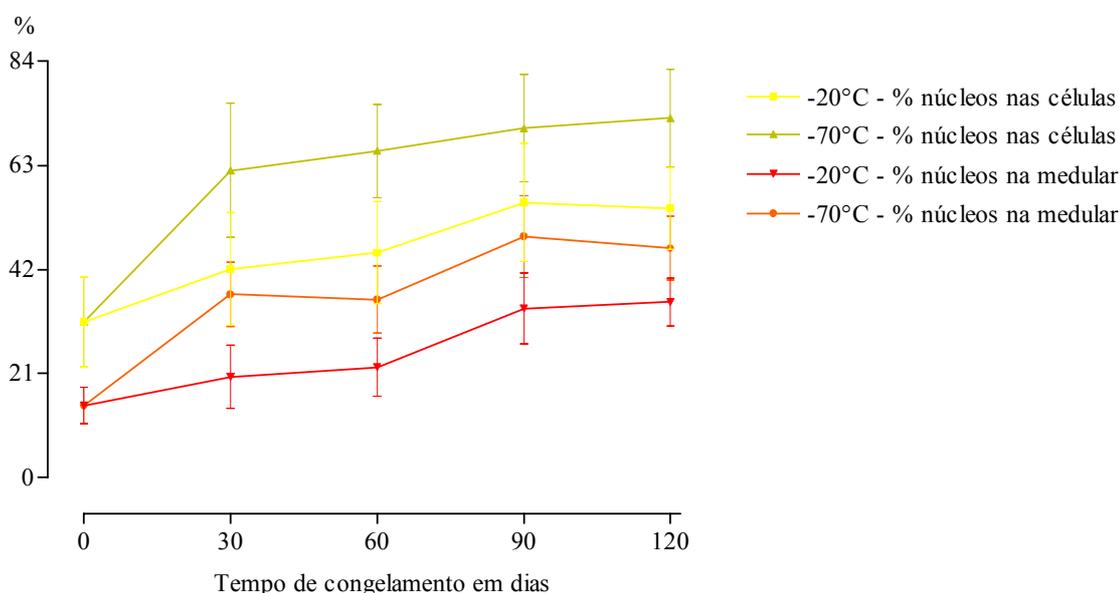


**Figura 15** – Aspecto do tecido medular do osso ilíaco após 60 dias de congelamento à temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ . HE, 400X. Escala=0,1mm.

### 5.2.2.2 Efeito do tempo de congelamento na área das células e dos núcleos presentes na medular

Na temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ , à proporção que o tempo de congelamento se prolongou, a área que as células ocupavam na medular foi gradativamente aumentando. Esse aumento só foi significativo quando se compararam 30 ou 60 dias com 90 ou 120 dias ( $p < 0,001$ ). Para a temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ , houve uma variação grande na área das células ao longo dos períodos estudados, e a diferença só foi significativa quando os resultados de 30 dias foram comparados aos de 90 ( $p < 0,005$ ), e os de 60 dias, aos de 90 dias ou 120 dias ( $p < 0,002$ ) – gráfico 10.

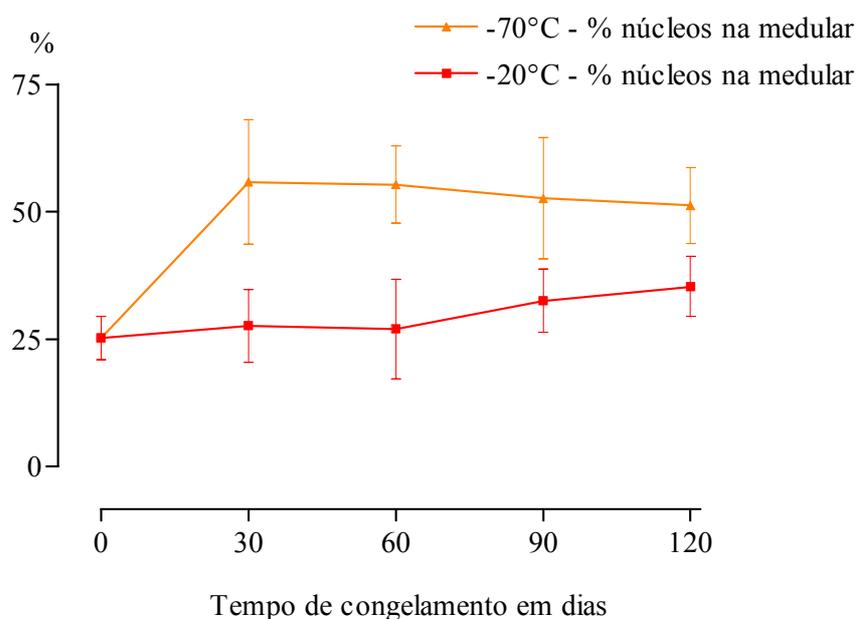
A área ocupada pelos núcleos nas células quando o tecido foi congelado a uma temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  também aumentou em função do tempo. Esse aumento só foi importante quando se compararam os períodos de 30 dias ou 60 dias com 90 ou 120 dias ( $p < 0,019$ ). À temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ , houve um aumento progressivo na área do núcleo nas células, mas que só foi relevante quando se compararam 30 dias a 90 ( $p < 0,033$ ) ou 120 dias ( $p < 0,009$ ) – gráfico 11.



**Gráfico 11** – Percentual da área que os núcleos ocupavam nas células e no tecido medular, em função do tempo e da temperatura de congelamento, analisada em secções coradas através da HE,  $n=12$ .

O aumento no percentual que o núcleo ocupava no tecido medular foi progressivo ao longo dos dias. A porcentagem da área dos núcleos na medular, contudo, só se diferenciou significativamente quando o 30° ou o 60° dia foram comparados aos dois últimos períodos de congelamento ( $p < 0,0001$ ). Essa análise foi constatada em qualquer temperatura estudada, mas esteve restrita às secções coradas pela HE – gráfico 11.

Pela reação de Feulgen, foi possível perceber que, na temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ , houve um progressivo aumento na área do núcleo dentro da medular, mas as diferenças entre os dias só foram significativas quando se comparou o 30° ao 120° dia ( $p < 0,005$ ), e o 60° ao 90° ( $p < 0,038$ ) ou 120° dia ( $p < 0,002$ ). Se a temperatura estudada foi de  $-70^{\circ}\text{C}$ , o aumento do núcleo na medular no 30° dia foi importante em relação ao valor aferido no osso fresco ( $p < 0,05$ ) e modificou pouco com o decorrer do tempo ( $p < 0,516$ ) – gráfico 12.



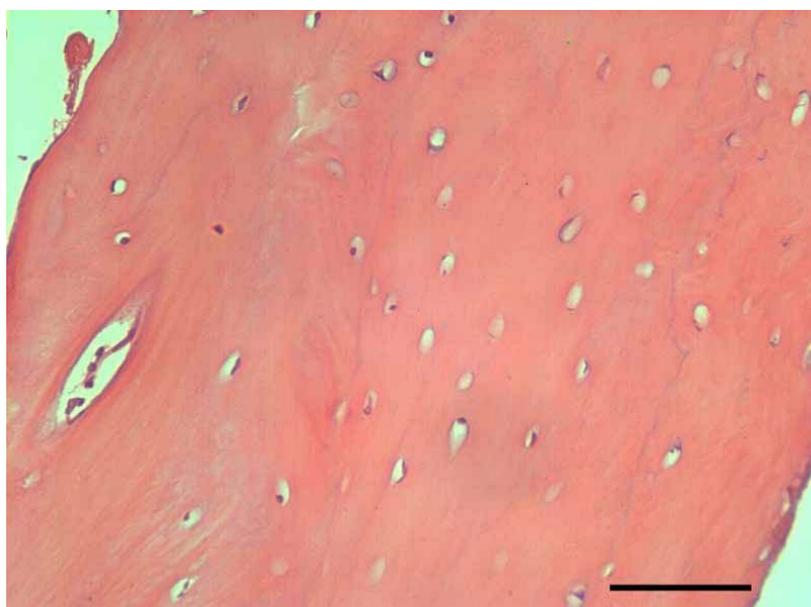
**Gráfico 12** – Percentual da área que os núcleos ocupavam no tecido medular, em função do tempo e da temperatura de congelamento, analisada em secções coradas através da reação de Feulgen,  $n=12$ .

### 5.2.2.3 Efeito da temperatura de congelamento na área dos núcleos dos osteócitos da cortical

Nas secções coradas pela HE, a área dos núcleos dos osteócitos apresentou uma contração quando comparada aos valores aferidos no tecido normal em qualquer temperatura e em qualquer dia ( $p < 0,001$ ). No 30° dia, a diminuição da temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  – figura 16 – para

-70°C promoveu uma contração ainda maior nessa área ( $p<0,022$ ). Depois de 60 dias, as duas temperaturas se equivaleram em relação a essa diminuição ( $p<0,259$ ) – gráfico 13.

Nas secções coradas pela reação de Feulgen, o congelamento a uma temperatura de -20°C promoveu uma diminuição na área dos núcleos dos osteócitos em relação aos do osso fresco no 30°, 60° e 120° dia ( $p<0,01$ ). Na temperatura de -70°C, este fato foi constatado em todos os dias de observação, mas só foi significativo no 30° e no 120° dia – figura 17. As temperaturas de -20°C e -70°C somente foram diferentes entre si no 90° dia e foi decorrente do aumento observado na área dos núcleos na temperatura mais alta ( $p<0,008$ ) – gráfico 13.



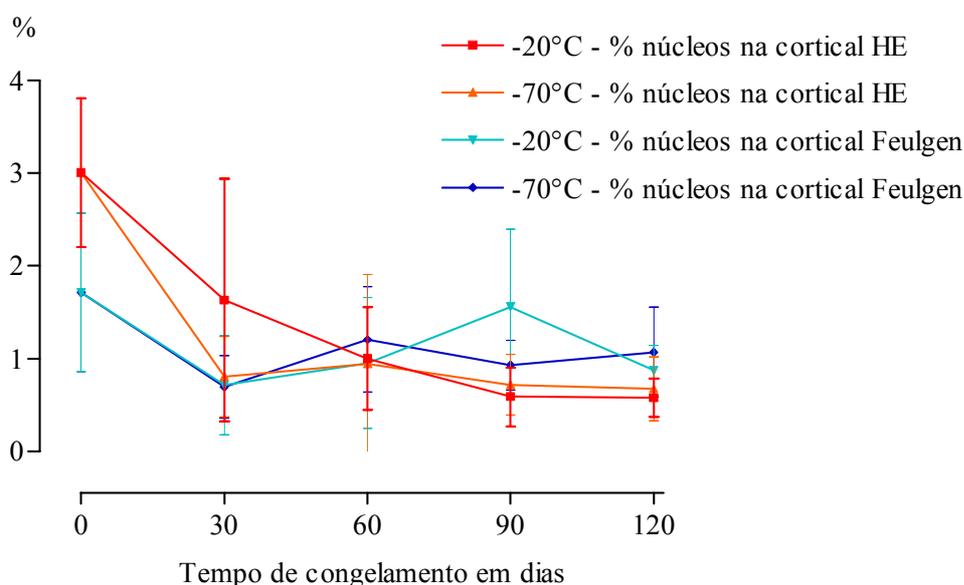
**Figura 16** – Aspecto da porção cortical do osso íliaco após o congelamento por 30 dias à temperatura de -20°C. HE, 400X. Escala=0,1mm.

#### *5.2.2.4 Efeito do tempo de congelamento na área dos núcleos dos osteócitos da cortical*

Nas secções coradas pela HE, a temperatura de -20°C promoveu uma diminuição progressiva no percentual que os núcleos dos osteócitos ocupavam na cortical ao longo dos dias. Entre o 30° e o 60° dia de congelamento, a diminuição foi significativa ( $p<0,018$ ). Esses dois períodos apresentaram valores menores que os do osso fresco ( $p<0,0001$ ). A área dos núcleos não se diferenciou estatisticamente entre 60, 90 ou 120 dias ( $p<0,117$ ). Na temperatura de -70°C, a diminuição na área dos núcleos ocorreu até os 30 dias de congelamento e manteve o

mesmo padrão nos demais dias de observação ( $p < 0,190$ ) – gráfico 13 – que foi sempre menor que o do aferido no osso fresco ( $p < 0,0001$ ).

A coloração pela reação de Feulgen evidenciou que o congelamento por  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 30 dias promoveu uma diminuição importante da área dos núcleos dos osteócitos quando comparada com o osso fresco ( $p < 0,0001$ ). A partir desse dia, ocorreu um aumento que diferenciou o período de 90 dias dos demais períodos de congelamento ( $p < 0,008$ ), e o assemelhou ao osso normal ( $p > 0,05$ ). À temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ , a diminuição verificada a partir do 30º dia diferiu apenas da observada para os períodos de 60 ( $p < 0,001$ ) ou 120 dias ( $p < 0,017$ ) que foram semelhantes aos do osso fresco – gráfico 13.



**Gráfico 13** – Percentual da área que os núcleos dos osteócitos ocupavam na porção cortical do osso íliaco, em função do tempo e da temperatura de congelamento, analisada em secções coradas através da HE e da reação de Feulgen,  $n=12$ .

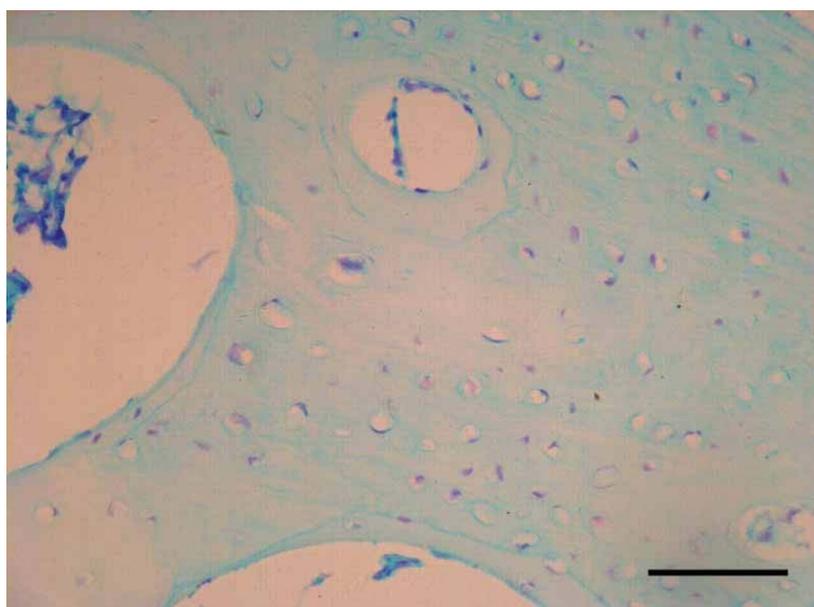
#### 5.2.2.5 Efeito da temperatura de congelamento na área ocupada pelo colágeno na porção cortical

Qualquer diminuição de temperatura, por menor que seja o tempo de congelamento, promoveu alterações no colágeno que foram suficientes para diferenciar do padrão normal ( $p < 0,0001$ ). A área do colágeno aferida a  $-70^{\circ}\text{C}$  foi menor do que a área aferida para a

temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  nos três primeiros períodos de congelamento ( $p<0,005$ ). No tempo de 120 dias, a diminuição promovida por esta temperatura foi suficientemente grande para equipará-la à temperatura menor ( $p<0,909$ ) – gráfico 14.

#### 5.2.2.6 Efeito do tempo de congelamento na área ocupada pelo colágeno na porção cortical

O congelamento por  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 120 dias – figura 18 – promoveu uma diminuição significativa na área ocupada pelo colágeno na cortical e a diferenciou da área mensurada em todos os demais tempos de congelamento avaliados ( $p<0,001$ ). A criopreservação por 60 dias promoveu um discreto aumento nessa área, que foi suficiente para diferenciá-la de todos os outros dias estudados ( $p<0,045$ ). A área do colágeno não diferiu significativamente entre o  $30^{\circ}$  e o  $90^{\circ}$  dia ( $p<0,177$ ) – gráfico 14.



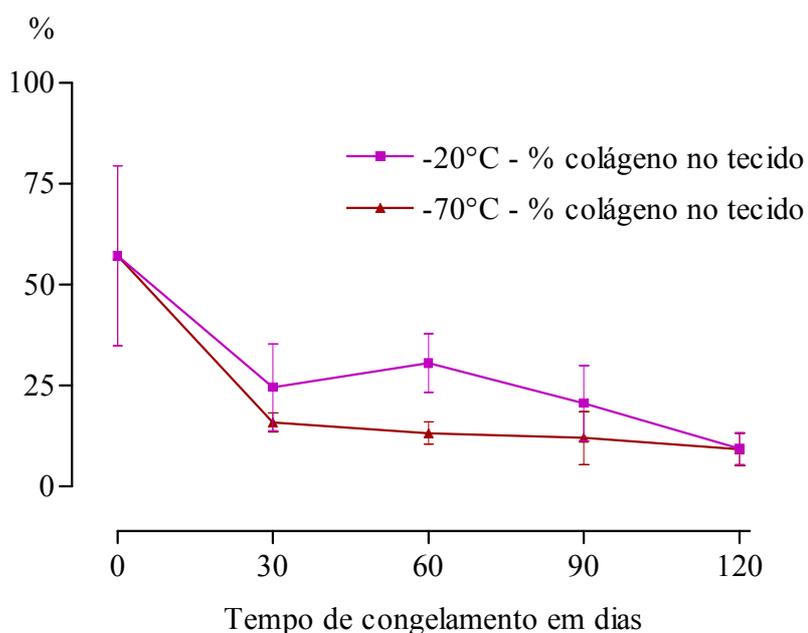
**Figura 17** – Aspecto da porção cortical do osso ilíaco após o congelamento por 120 dias à temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ . Reação de Feulgen, 400X. Escala=0,1mm.

Na temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ , a diferença de 30 dias entre os períodos de congelamento não promoveu alterações na área do colágeno. Assim, a área aferida para o colágeno só diferiu quando o congelamento por 30 dias foi comparado a 90 ( $p<0,012$ ) ou 120 dias ( $p<0,001$ ), ou quando o congelamento por 60 dias foi comparado ao de 120 dias ( $p<0,009$ ) – gráfico 14.

### 5.2.3 Diferença entre os dados obtidos para a coloração pela HE e pela reação de Feulgen

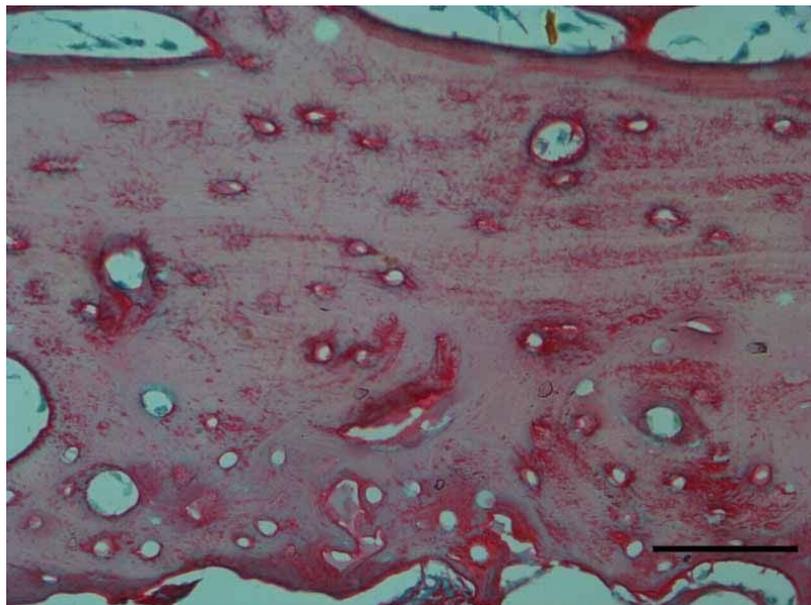
Os resultados da coloração pela reação de Feulgen em algumas categorias de variáveis mostraram diferenças para a coloração pela HE. Essas diferenças foram ponderadas para as porcentagens de núcleos na cortical e na medular em função do tempo da temperatura de congelamento.

Quando se avaliou a porcentagem de núcleos na medular, a diferença da reação de Feulgen para a coloração pela HE só se mostrou significativa para o tecido fresco e para o tecido congelado por  $-70^{\circ}\text{C}$  ( $p < 0,05$ ). A esta temperatura, as mensurações feitas na coloração pela HE apresentaram os maiores valores. Com relação ao tempo de congelamento, as diferenças foram estatisticamente significativas para o tempo de 30 e 60 dias ( $p < 0,005$ ).



**Gráfico 14** – Percentual da área que o colágeno ocupava na porção cortical do tecido ósseo, em função do tempo e da temperatura de congelamento, analisada em secções coradas através do picro-sirius,  $n=12$ .

Com relação à porcentagem de núcleos na cortical, as diferenças nas duas colorações foram significativas para o tecido fresco, para a temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  e para os tempos de observação de 30, 60 e 90 dias ( $p < 0,005$ ). Na cortical, apesar da significância, as diferenças foram mais brandas, e a reação de Feulgen apresentou os maiores valores.



**Figura 18** – Aspecto da porção cortical do osso ilíaco após o congelamento por 120 dias à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ , evidenciando o colágeno perivascular em vermelho. Picrosirius, 400X. Escala=0,1mm.

### ***5.3 Preparação do PRP***

Os valores obtidos através do levantamento das médias e medianas ilustram que o protocolo preconizado por EFEOGLU, 2004, e que foi utilizado nessa metodologia fornece uma concentração plaquetária ideal para considerar a solução final como PRP. As médias e medianas e o desvio padrão (DP) dos valores do hematócrito e da quantidade de plaquetas e leucócitos do sangue total e do PRP são apresentados na tabela 4 que também apresenta os valores do VCM e do VPM.

Através do protocolo utilizado, foi removida uma média de 2,68ml de hemácias (DP=0,73) e 5,72ml (DP=0,64) de PPP – tabela 5. A análise do desvio padrão mostra que essa remoção foi praticamente semelhante em todos os casos com poucas variações, que possivelmente ocorreram em função das variações no hematócrito do sangue total.

Verificou-se que quanto maior o hematócrito dessa solução maior a quantidade de hemácias ( $r=0,287$ ;  $p<0,43$ ) que se pôde remover dela e menor a quantidade de PPP ( $r=-0,527$ ;  $p<0,0001$ ) que foi extraído no preparo do PRP – gráfico 15 –. No entanto, a concentração das demais células do sangue, plaquetas – gráfico 16 – e leucócitos – gráfico 17 – não interferiram nesse processo.

**Tabela 4** – Mediana, média e desvio padrão da citometria do sangue total e do PRP, n=50.

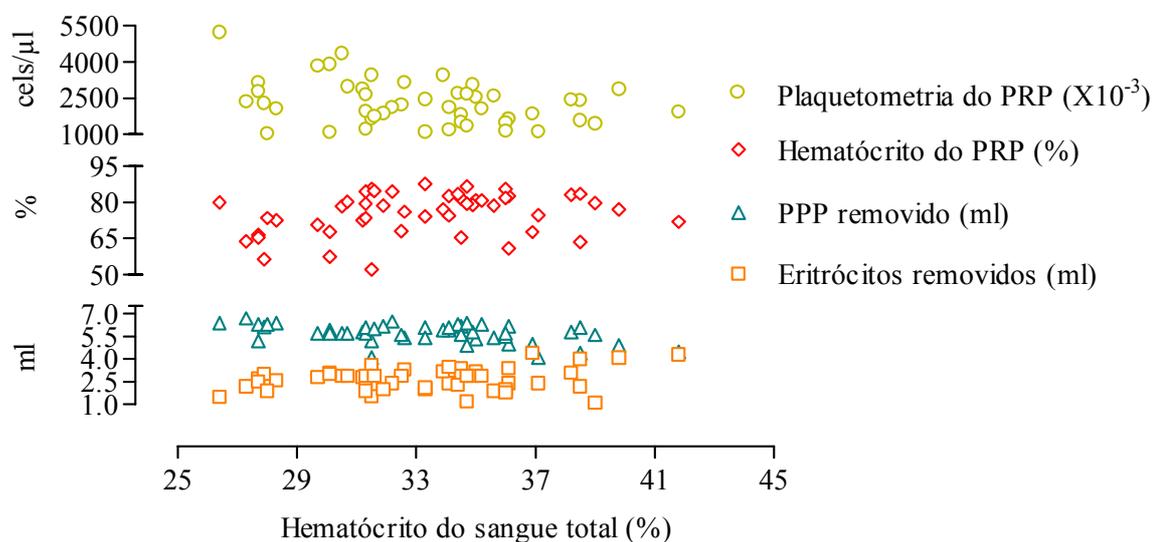
<b>Variável</b>	<b>Grupo</b>	<b>Mediana</b>	<b>Média±DP</b>	<b>p</b>
<i>Hematócrito (%)</i>	<i>Sangue total</i>	33,30	33,073,75	0,0001
	<i>PRP</i>	77,65	75,38±8,45	
<i>VCM (fl)</i>	<i>Sangue total</i>	67,90	66,74±11,14	0,320
	<i>PRP</i>	69,50	68,88±10,32	
<i>Leucometria (X10<sup>-3</sup>) células/μl</i>	<i>Sangue total</i>	7,28	7,86±3,07	0,0001
	<i>PRP</i>	20,50	22,71±9,18	
<i>Plaquetometria (X10<sup>-3</sup>) células /μl</i>	<i>Sangue total</i>	362,00	377,40±141,38	0,0001
	<i>PRP</i>	2172,50	2324,08±925,34	
<i>VPM (fl)</i>	<i>Sangue total</i>	6,6	6,72±0,57	0,001
	<i>PRP</i>	7,0	7,13±0,68	

**Tabela 5** – Mediana, média e desvio padrão da quantidade em ml de eritrócitos e PPP removidos, do tempo de coagulação do PRP e da concentração do hematócrito, da leucometria e da plaquetometria após a preparação do PRP, n=50.

<b>Variável</b>	<b>Mediana</b>	<b>Média±DP</b>
<i>Eritrócitos removidos (ml)</i>	0,73	2,68±2,80
<i>PPP removido (ml)</i>	0,64	5,72±5,80
<i>Tempo de coagulação do PRP (min)</i>	13,00	12,94±4,18
<i>Concentração do hematócrito (vezes)</i>	2,32	2,30±0,31
<i>Concentração dos leucócitos (vezes)</i>	2,87	2,93±0,66
<i>Concentração das plaquetas (vezes)</i>	6,78	6,51±2,18

Depois que essa quantidade de hemácias e PPP foi removida do sangue total, a média da quantidade de plaquetas obtidas no PRP foi de 2.324.080 células/μl (DP=925.340) – tabela 1. Quando se avaliaram os fatores responsáveis por essa concentração, verificou-se que a quantidade de hemácias aspiradas não interferiu nessa plaquetometria (r=0,17; p<0,226)

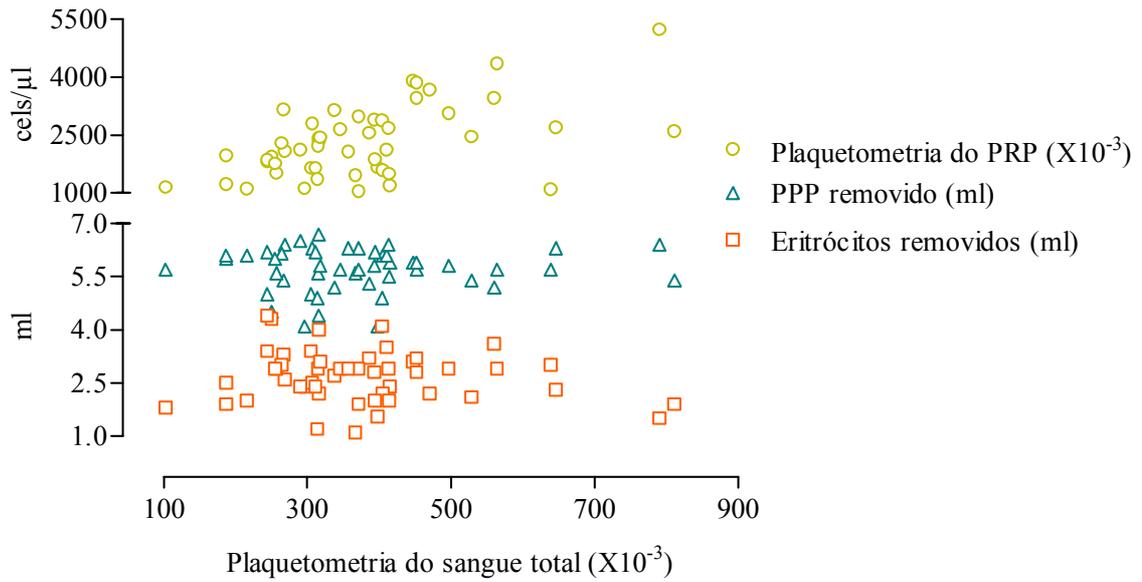
– gráfico 18 – como também a quantidade de PPP removida não apresentou correlação com a concentração dessas células ( $r=0,18$ ;  $p<0,195$ ) – gráfico 19.



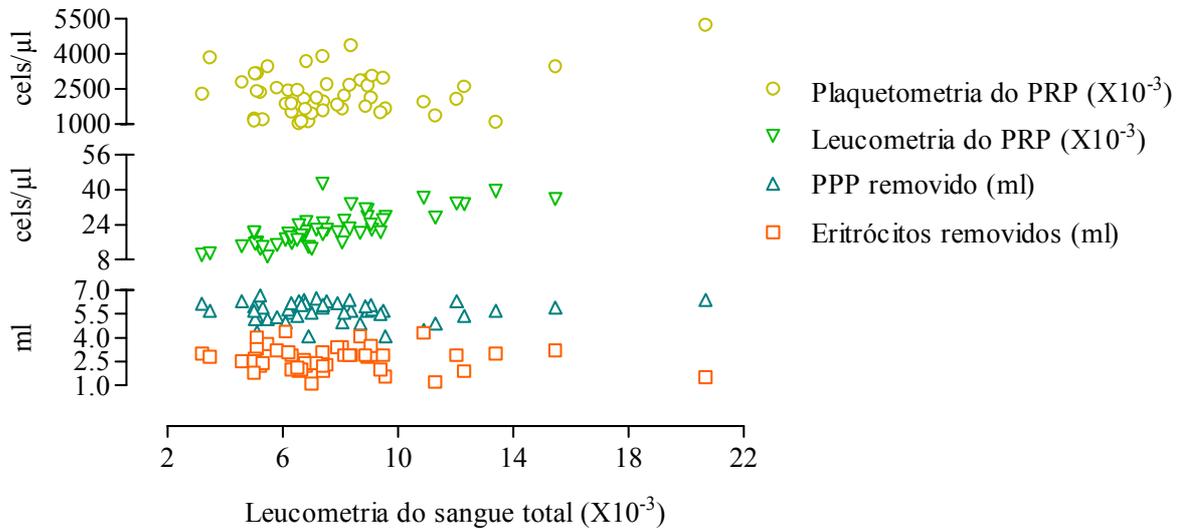
**Gráfico 15** – Associação da plaquetometria e hematócrito do PRP, da quantidade de eritrócitos e de PPP removidos com o hematócrito do sangue total, n=50.

Entretanto, a concentração que se obteve para as plaquetas está na razão direta da plaquetometria ( $r=0,53$ ;  $p<0,0001$ ) – gráfico 16 – e na razão inversa do hematócrito ( $r=-0,39$ ;  $p<0,004$ ) do sangue total – gráfico 15 e não sofre influência da leucometria do sangue total ( $r=0,258$ ;  $p<0,07$ ) – gráfico 17. O hematócrito do plasma rico em plaquetas também não interferiu em sua plaquetometria ( $r=-0,14$ ;  $p<0,32$ ) – gráfico 20.

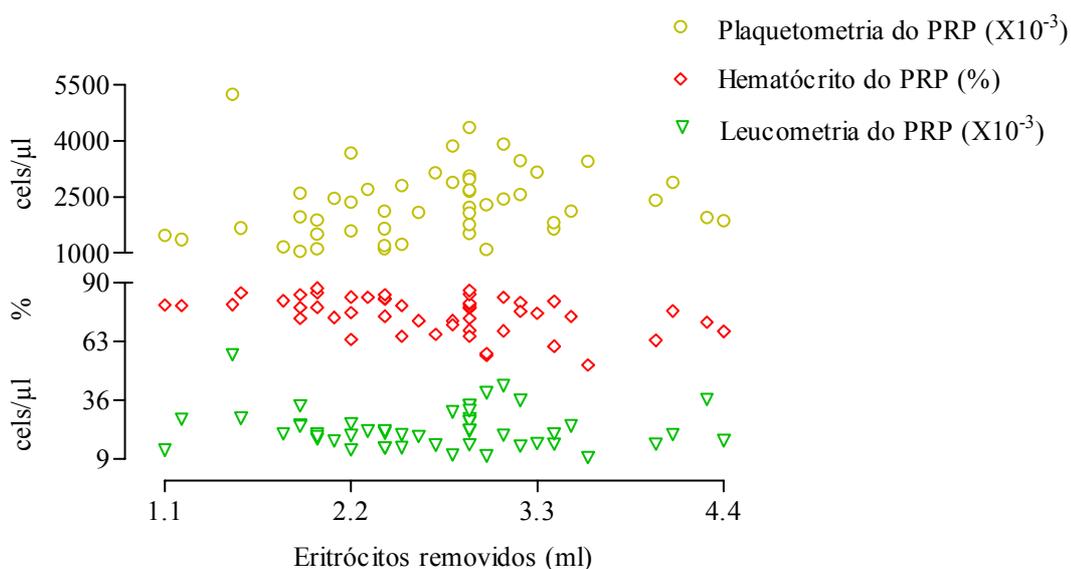
Esta metodologia de preparo, além de promover um incremento na quantidade de plaquetas no PRP, promoveu um aumento em seu hematócrito e na sua quantidade de leucócito – tabela 1. Quando se comparou a quantidade das células presentes na solução do sangue total anticoagulado, com a quantidade presente no PRP, observou-se que as plaquetas foram as células que mais se concentraram com a remoção das hemácias e de PPP, como foi o propósito desta metodologia. Essa concentração foi da ordem de 6,15 vezes para as plaquetas, enquanto que os leucócitos se concentraram 2,89 vezes e o hematócrito, 2,27 vezes – tabela 4.



**Gráfico 16** – Associação da plaquetometria do PRP, da quantidade de eritrócitos e de PPP removidos com a plaquetometria do sangue total, n=50.

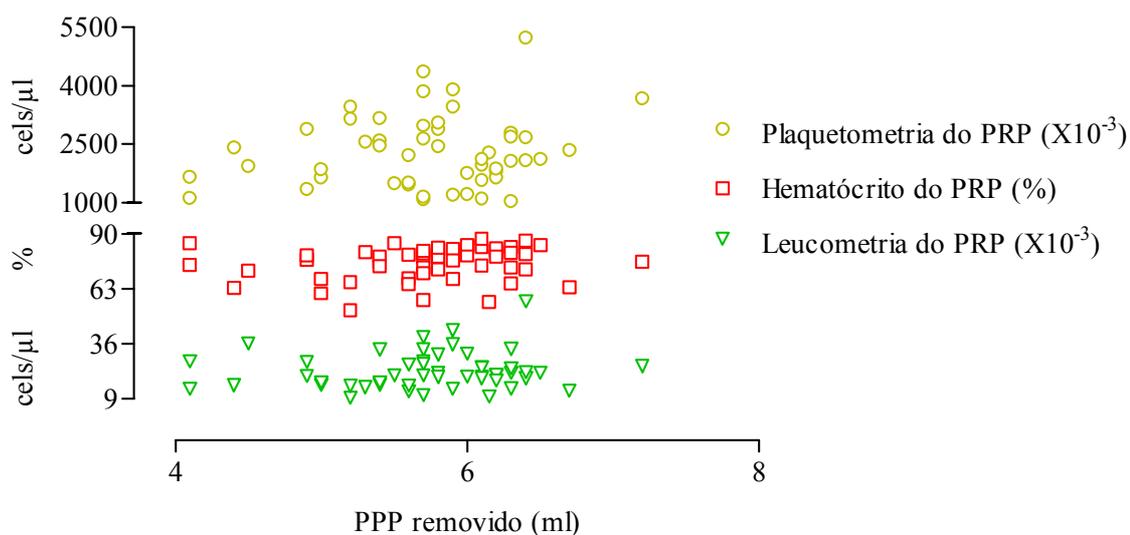


**Gráfico 17** – Associação da plaquetometria do PRP, da leucometria do PRP, da quantidade de eritrócitos e de PPP removidos com a leucometria do sangue total, n=50.



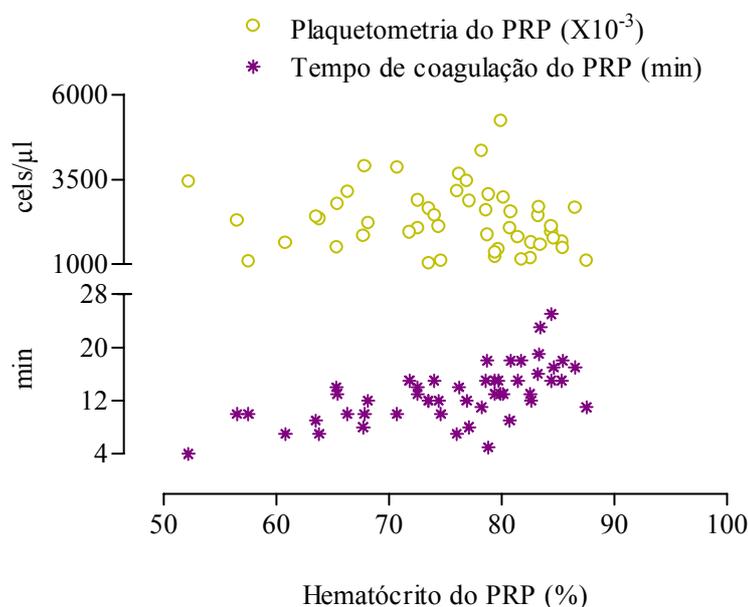
**Gráfico 18** – Associação da plaquetometria, do hematócrito e a leucometria do PRP com a quantidade de eritrócito removida, n=50.

O hematócrito obtido no PRP foi inversamente proporcional à quantidade de hemácias removida do sangue total ( $r=-0,43$ ;  $p<0,02$ ) – gráfico 18. Entretanto, nem o seu hematócrito ( $r=-0,26$ ;  $p<0,68$ ) – gráfico 15, nem a quantidade de PPP ( $r=0,19$ ;  $p<0,179$ ) removidos – gráfico 19 – exerceram influência sobre o hematócrito do PRP.



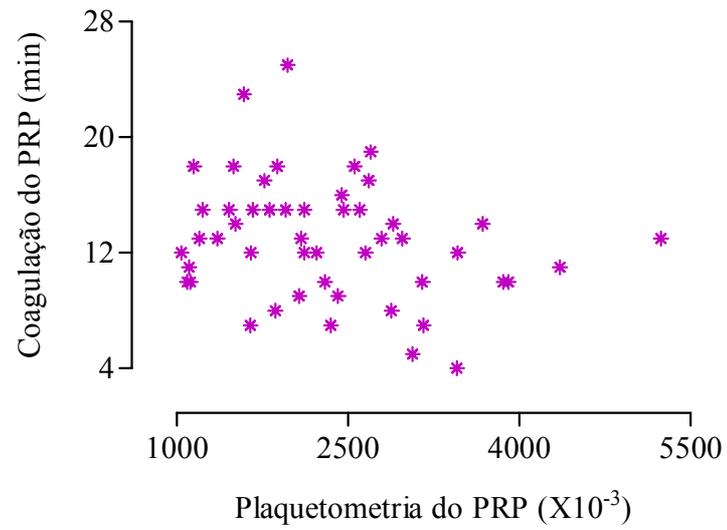
**Gráfico 19** – Associação da plaquetometria, do hematócrito e da leucometria do PRP com a quantidade de PPP removida, n=50.

Análise análoga pode ser feita em relação à sua leucometria. A quantidade de hemácias ( $r=-0,07$ ;  $p<0,586$ ) e de PPP ( $r=0,11$ ;  $p<0,424$ ) removida também não alterou a leucometria do PRP – gráficos 4 e 5 – que sofreu influência direta da leucometria inicial ( $r=0,85$ ;  $p\leq 0,001$ ) – gráfico 17.



**Gráfico 20** – Associação da plaquetometria e do tempo de coagulação do PRP com o seu hematócrito,  $n=50$ .

A coagulação do PRP foi realizada apenas com a adição de cloreto de cálcio a 10%. Após a homogeneização desses dois compostos, a média do tempo necessário para a coagulação foi de 12,94 minutos ( $DP=4,18$ ) – tabela 4. Um dado importante que se verificou nessa amostra foi que variações na plaquetometria do PRP não modificam esse tempo ( $r=-0,26$ ;  $p<0,072$ ) – gráfico 21. No entanto, observou-se quanto maior o seu hematócrito, maior o tempo necessário para que essa coagulação ocorra ( $r=0,610$ ;  $p<0,0001$ ) – gráfico 20.



**Gráfico 21** – Associação do tempo de coagulação do PRP com a sua plaquetometria, n=50.



## **6 Discussão**

Os enxertos aposicionados são uma excelente proposta quando há necessidade de adequar os maxilares para a colocação de implantes (PIKOS, 1995; CLAYMAN, 2006). Apesar disso, a literatura é carente de trabalhos que apreciem o processo de regeneração entre o leito receptor e o tecido ósseo enxertado conforme esse protocolo (ROLDÁN et al, 2004a). Entre os artigos encontrados na literatura, pode-se destacar o esforço de um autor que ao longo de 20 anos vem publicando sua experiência com o manejo dessa técnica (FOTOS; PIKOS; ROSE, 1985; PIKOS, 1992, 1995, 1996, 1999a, 1999b, 2000a, 2000b, 2005a). Todavia, suas observações são respaldadas em achados clínicos com pouca discussão sobre os fenômenos biológicos associados ao sucesso experimentado. Um dos poucos trabalhos que reservou alguma atenção para a biologia desse protocolo foi o de Chacon et al (2004), contudo sua preocupação não foi estudar os efeitos desse incremento de tecido ósseo no organismo, mas avaliar se a diferença no material usado para sua fixação comprometia a adesão do enxerto ao seu leito receptor.

Este trabalho, portanto, configura-se como uma pesquisa de singular contribuição científica. Além de reproduzir uma situação corriqueira da prática clínica, foi investigada a incorporação de um fragmento de osso adicionado a um outro cuja homeostasia estava plenamente estabilizada. Foram estudados diversos eventos nesse microambiente em reparo, desde a preservação do enxerto após a cirurgia até seu potencial osteocondutor. Os achados encontrados com essa investigação demonstraram que o tecido córtico-medular aposicionado apresenta uma integração natural na cortical externa da mandíbula e, mesmo nos enxertos alógenos, não houve envolvimento do sistema imunológico no sentido de promover sua rejeição.

As evidências aqui encontradas foram de que a aposição de osso autógeno ou alógeno foi uma técnica que contribuiu com segurança para o aumento nas dimensões dos maxilares tal como encontrou Clayman (2006). A porção cortical do enxerto funcionou como uma membrana biológica para que abaixo dela se instalasse um franco contexto de neoformação óssea (TSHMALA et al, 1999). A matriz neoformada nessa região foi amadurecendo e promovendo a adequada adesão do osso enxertado à cortical da mandíbula. Nas extremidades do fragmento de osso, ocorreu osteoindução. A cortical do enxerto estava preservada em toda a extensão e mostrava também uma continuidade com o leito receptor.

Ampliando ainda mais a preocupação em entender o processo de regeneração dos enxertos, o PRP foi introduzido nesse contexto considerando o seu potencial teórico em melhorar o reparo do osso (ANDRADE; BELTRÃO, 2001; GANDHI et al, 2006). Os resultados atribuídos a esse adjuvante são controversos na literatura (CHOI et al 2004, 2005; THORWARTH et al, 2005), embora a maioria dos artigos sinalize para esta sua qualidade. Como os enxertos aposicionados sofrerão uma perda na massa agregada (PIKOS, 2000a; CHACON et al, 2004), o PRP poderia diminuir esse efeito indesejado.

Nesta pesquisa, a presumível atividade biológica do PRP, em relação à quantidade de matriz óssea presente nos sítios onde o osso autógeno foi enxertado, só se confirmou no 14º e no 28º dias. Com relação ao osso alógeno, o lado com PRP só apresentou uma área de matriz significativamente maior no 7º dia. Em qualquer outro dia do experimento, observou-se apenas uma tendência para que o PRP representasse um elemento de melhora para a manutenção do enxerto, já que isso não se confirmou pela análise estatística. O incremento na área de matriz óssea foi traduzido por Yamada et al (2004) como aumento na densidade de osso presente no enxerto. Esse aspecto foi considerado um benefício do PRP, mas não foi evidente no trabalho de Jensen et al (2004) como também não foi na presente investigação.

Um importante dado quanto à quantidade de matriz óssea presente foi a semelhança encontrada entre os enxertos alógenos e os enxertos autógenos nos dias iniciais do experimento. Mesmo na presença do PRP, não foi possível observar uma diferença significativa entre eles. Os resultados encontrados sugerem que os enxertos alógenos atuaram como bons substitutos para as reconstruções dos maxilares. O enxerto desta natureza também apresentou um desempenho muito bom nas reconstruções do metatarso (LUCARELLI et al, 2005) e foi ainda melhor quando se utilizou o PRP. Nessa pesquisa, a eficácia do concentrado de fatores de crescimento foi questionável, uma vez que ele foi o veículo de células-tronco e colágeno.

No experimento aqui discutido, além da similaridade com o osso autógeno nos dias iniciais, os enxertos alógenos mostraram uma superioridade na área de matriz aferida nos dias finais. Ainda que não tenham apresentado significado estatístico, esses resultados sugerem que, depois de sua aposição, os enxertos alógenos ainda apresentaram a vantagem de resistir melhor ao processo de absorção que os enxertos autógenos. É importante considerar também que no momento da enxertia os fragmentos de osso autógeno foram discretamente mais espessos.

Kluger et al (2003) e Dumas et al (2006) propuseram os argumentos que defendem esse achado ao mostrarem que os osteoclastos cursam com dificuldade de se unir ao tecido depois que o osso foi submetido ao congelamento, numa relação direta com o tempo que durou esse tratamento. O congelamento promove a desnaturação de integrinas, especialmente, aquelas presentes na região medular, o que dificulta o processo de colonização dos tecidos pelos osteoclastos, diferenciados a partir de monócitos do sangue (KLUGER et al, 2003). Lewandrowski et al (2001) e Nordstrom et al (1999) determinaram que a absorção do osso é um critério clínico para considerar que um enxerto transplantado está sendo rejeitado. Aplicando este critério para a estabilidade observada nos enxertos alógenos, na presente pesquisa, confirma-se, portanto que eles são imunologicamente inertes e não suscitam rejeição como também os autores supracitados concluíram em seus achados.

As vantagens do PRP foram constatadas quando se ponderaram os efeitos do tempo sobre a quantidade de matriz de osso alógeno presente nos tecidos. Nos enxertos dessa natureza, houve um decréscimo entre o 28° e o 56° dia. No lado sem PRP, essa redução foi significativamente diferente entre esses dois dias, enquanto que no lado com PRP os dois últimos dias foram semelhantes em relação à área que foi aferida. Portanto, é possível inferir que o PRP ajudou a minimizar o efeito do tempo sobre a área dos enxertos alógenos. Há uma coerência entre esses achados e as proposições de Weibrich et al (2004) e Yazawa et al (2004a, 2004b) que observaram que no 21° e 42° dias o grupo tratado com PRP apresentava mais osso do que o grupo controle. Apesar disso, Gandhi et al (2006) e Gerard et al (2006) situaram que a liberação dos fatores de crescimento ocorre nos primeiros dias após a coagulação do PRP.

O PRP não agregou benefício ao osso autógeno quando se analisaram as diferenças intragrupo. A quantidade de osso foi semelhante em cada dia do experimento tanto no lado com PRP como no lado controle. Houve um decréscimo nos dias finais de observação, o que foi resultante da absorção. Em outros experimentos, ao contrário deste, o processo de absorção do osso autógeno foi mais nítido ao longo dos dias mesmo na presença do PRP (OHYA et al, 2005). Todavia, esse concentrado de fatores de crescimento assegurou uma maior quantidade de osso autógeno depois de iniciada a absorção (AGHALOO; MOY; FREYMILLER, 2002).

A absorção da matriz foi um evento previsível, pois um segmento do processo alveolar dos maxilares, não submetido a estresse fisiológico, apresenta uma disposição natural à sobreposição de fenômenos absorptivos (PELEG et al, 2004). Isso implicaria,

conseqüentemente, uma tendência do organismo em remodelar o osso enxertado adicionalmente na cortical, para os padrões do leito receptor (CLAYMAN, 2006). Ainda que discretamente, todos os enxertos foram absorvidos ao longo dos dias e, no último dia, a cortical, apesar de se manter preservada e contínua com o leito receptor, estava mais delgada que no 3º dia após a cirurgia.

O PRP representou, no 7º dia, um elemento de proteção para a cortical dos fragmentos enxertados. Neste período, a cortical do osso autógeno estava mais espessa, se no momento da cirurgia o PRP tivesse sido adicionado ao meio. Os enxertos alógenos experimentaram o mesmo evento. Na literatura, o espessamento da cortical só foi confirmado ao redor de implantes de titânio quando o PRP foi usado em associação com células-tronco. O PRP isolado não acarretou um melhor recobrimento do implante pela cortical (YAMADA et al, 2004). A contribuição do PRP ficou mais clara em relação à preservação exercida sobre a cortical, no presente experimento, quando se analisou o efeito do tempo de observação. Através dessa análise, constatou-se que nos lados onde foi agregado PRP no momento da cirurgia, a cortical resistiu mais tempo ao processo de absorção. Isso foi válido independente da natureza do enxerto.

A análise da espessura da cortical também concorreu para demonstrar o papel relevante que os enxertos alógenos congelados podem desempenhar nos protocolos de aposição dos maxilares. Esses enxertos apresentaram cortical mais espessa do que a aferida no osso autógeno, em qualquer dia do experimento, mesmo que a espessura total do enxerto autógeno tenha sido originalmente maior. Um dado interessante foi que, no 14º dia, a maior espessura do osso alógeno só foi significativa no lado sem PRP, o que sugere que, nesse período, o PRP colaborou para que enxertos de natureza diferente se assemelhassem. Isso, entretanto, não foi constatado no 28º dia, quando o osso alógeno obteve os maiores valores em ambos lados da mandíbula.

Assim, foi possível confirmar a superioridade da cortical dos enxertos desta natureza, o que já havia sido constatado para a manutenção da matriz óssea. Outros autores já haviam determinado que a cortical do osso congelado é efetivamente mais resistente à absorção do que a cortical do osso fresco (TSHAMALA et al, 1999; KLUGER et al, 2003).

A correlação realizada entre essas duas variáveis sugere que a cortical do enxerto representa um elemento importante para a manutenção da sua área. Os resultados encontrados para este teste demonstraram que quanto mais espessa estivesse a cortical, maior seria a área de matriz encontrada no enxerto. O que se depreende, da observação das lâminas, é que a cortical do

osso também atuou como uma membrana biológica valiosa para que o enxerto se consolidasse em seu leito receptor.

A análise descritiva do reparo dos enxertos córtico-medulares aposicionados evidenciou que o osso incorporou ao leito receptor através da neoformação que ocorreu abaixo da cortical e na periferia do fragmento. A análise de correlação também comprovou que esse osso neoformado contribuiu com a área de matriz presente no tecido. Isso é notório, pois a área total de matriz óssea consiste num somatório da matriz cortical e da matriz que forma o trabeculado ósseo abaixo dela.

Sobre essa área neoformada, a adição de fatores de crescimento através do PRP foi importante para que o osso autógeno fosse mais osteocondutor no 14º dia e que o osso alógeno apresentasse essa propriedade no 28º dia. A significância só foi expressa nesses dias quando a osteogênese realmente se tornou evidente. O PRP pode ter contribuído para que os osteoblastos já diferenciados, e presentes no microambiente do enxerto ósseo, aumentasse a síntese de matriz nesses dias (THORWARTH et al, 2005; LUCARELLI et al, 2003; GERARD et al, 2006). Nos demais dias de observação, mesmo sem significância estatística, o lado onde o PRP foi adicionado na hora da cirurgia sempre apresentou maior quantidade de osteóide que o outro lado.

Esses resultados refletiram exatamente uma peculiaridade do PRP. Esse concentrado de fatores de crescimento apresenta um alto potencial mitogênico que se encerra no fato de ser um pobre citodiferenciador (KIM et al, 2002; ARPORNMAEKLONG et al, 2004; MARX, 2001, 2004; JUNG et al, 2005). A maior quantidade de matriz óssea observada no tecido foi decorrente de uma maior quantidade de células presentes (OGINO et al, 2006). Como a diferenciação dessas células não se completou, o maior adensamento celular não foi também suficiente para que a quantidade de matriz estivesse estatisticamente mais expressiva nos lados onde se colocou o PRP. Existem comprovações de que mediante o PRP, a proliferação de pré-osteoblastos se tornou maior em culturas (ARPORNMAEKLONG et al, 2004; KANNO et al, 2005). Entretanto, a constante mitose não permitiu que as células findassem seu processo de diferenciação e aumentassem a secreção de colágeno I e fosfatase alcalina de maneira significativa.

Concordante com as outras variáveis analisadas, o osso alógeno foi mais osteogênico que o autógeno na maior parte do período de neoformação de matriz óssea, mesmo independente do PRP. Contudo a relevância estatística para essa diferença só apareceu no 28º dia e no lado com PRP. Pôde-se deduzir, portanto, que esse concentrado plaquetário foi eficaz em

incrementar ainda mais o potencial osteocondutor dos enxertos alógenos nestes dias. Resultados análogos foram obtidos em outras investigações (KITOH et al, 2004, 2007) que verificaram que o PRP, usado como veículo de células-tronco, incrementou a neoformação no traço da distração osteogênica.

Apesar do pico de osteogênese ter ocorrido mais tardiamente nos enxertos alógenos, esse fenômeno ocorreu de forma mais abundante e mais significativa nos enxertos dessa natureza do que nos autógenos. A introdução de PRP mascarou a discrepância observada nos picos de osteocondução entre enxertos de naturezas diferentes. Desde o 14º dia, o osso alógeno, frente ao PRP, foi tão osteogênico quanto o autógeno. O pico de osteocondução do osso alógeno ocorreu no 28º dia e no 56º dia, esse processo ainda se manteve ativo e semelhante. É válido ressaltar, inclusive, que o osso autógeno só apresentou um pico de osteocondução, no 14º dia, em virtude da ação do PRP, colocado no momento da cirurgia, e mesmo assim, a osteocondução foi diminuindo significativamente depois do pico. A inferência possível a partir desse achado, é que o osso autógeno apresentou picos de neoformação óssea enquanto no alógeno isso ocorreu com a formação de um platô. A influência do PRP também foi importante para melhorar o desempenho do osso autógeno na reconstrução de defeitos na calvária de coelhos (WILTFANG et al, 2004) e nos levantamentos da membrana sinusal (KLONGNOI et al, 2006a, 2006b).

A maior neoformação atribuída aos enxertos alógenos contraria as especulações de outros autores (KLUGER et al, 2003), que suscitam o debate de que o osso congelado seria mais resistente à absorção, entretanto, menos osteogênico. Os resultados observados para o aspecto histológico dos fragmentos de osso ilíaco após o congelamento, quando associados com as evidências teciduais presentes no 3º dia após a sua enxertia, sugerem que as baixas temperaturas promoveram uma necrose da parte medular do osso alógeno (DUMAS et al, 2006). Esse fato provavelmente foi decisivo para a maior neoformação óssea constatada. Moreau et al (2000) propuseram que a desbridagem da medula aumenta o potencial osteogênico do enxerto por alterar a composição do colesterol e de outros ácidos graxos presentes nos adipócitos.

A análise descritiva das secções e a avaliação morfométrica da quantidade de matriz presente, da espessura da cortical e da área neoformada, permitiram afirmar que a diferença imunogênica entre o enxerto e o leito receptor não representou um entrave para a adequada cicatrização de fragmentos de osso alógeno. Certamente, o congelamento do osso ilíaco por 120 dias a -70°C foi primordial para diminuir a imunogenicidade do tecido.

Conseqüentemente, a inércia do sistema imune foi clara nas secções estudadas com ausência de sinais que sugerissem rejeição do osso transplantado analogamente ao observado por outros autores (STEVENSON SHAFFER; GOLDBERG, 1996; KAWALLEC-CARROL et al, 2006; WARD et al, 2005). Em nenhum animal que recebeu enxerto alógeno, foi apreciado o seu encapsulamento por fibrose ou infiltrado inflamatório. Além disso, a osteogênese se fez sempre presente e abundante.

Com relação à fibrogênese ao redor dos fragmentos de osso enxertados não foram verificadas diferenças significativas na maior parte do estudo, tanto com relação à natureza dos enxertos, como com relação à utilização do PRP. Apenas no 7º dia, observou-se que, no lado sem PRP, os enxertos alógenos foram significativamente mais fibrogênicos que os autógenos. No geral, o lado com PRP, induziu uma maior fibrose sobre os dois tipos de enxerto a partir do 14º dia, mas as diferenças para o outro lado não foram significativas.

Uma maior síntese de colágeno por condrócitos foi atribuída ao PRP (AKEDA et al, 2006a, 2006b), entretanto estes trabalhos foram contraditórios em relação à significância dos resultados associados ao seu potencial fibrogênico. A maior fibrose induzida pelo PRP parece ter um significado clínico, pois diversos autores (ANITUA, 1999; OBARRIO et al, 2000; CARTER et al, 2003; KIMURA et al, 2005; VENDRAMINI et al, 2006; MÉNDEZ et al, 2006) notaram que, quando se utilizou esse concentrado de fatores de crescimento, o reparo dos tecidos moles ocorreu mais rapidamente e de forma mais segura.

Considerando que o mecanismo de absorção do enxerto adicionado é implacável, os critérios fundamentais para a perda do osso foram investigados nesta pesquisa. Os osteoclastos são as células primordiais do processo de absorção óssea (BLAIR; ROBINSON; ZAIDE, 2005; KIESLINGER et al, 2005; SATO; TAKAYANAGI, 2006; WINSLOW et al, 2006). Essas células foram estudadas através de uma análise não-paramétrica e seu comportamento foi avaliado de acordo com a natureza do enxerto e de acordo com a utilização de PRP. Os resultados das avaliações realizadas em relação aos osteoclastos não mostraram diferenças significativas entre o osso autógeno e o alógeno e entre os lados da mandíbula.

Entretanto, percebeu-se uma tendência de que os enxertos alógenos e o lado sem PRP apresentassem uma maior expressão de osteoclastos. A maior atividade osteoclástica nos leitões sem PRP foi respaldada pelas sugestões de que apesar dos fatores de crescimento serem mitogênicos, o TGF-beta inibe a osteoclastogênese (BLAIR, ROBINSON e ZAIDI, 2005; KACENA et al, 2006) por bloquear a atividade de moléculas estimulatórias desse processo (LARI et al, 2007), além de ser citotóxico para os osteoclastos já existentes (BEETON et al,

2006). As plaquetas ainda secretam osteoprotegerina que é um inibidor fisiológico do RANK-L (KACENA et al, 2006). A maior osteoclastogênese que se observou nos enxertos alógenos pode ser justificada pela maior presença de macrófagos no tecido ao redor deles já que essas células imunológicas são importantes elos de ligação entre o sistema imune e o sistema osteoarticular (LARI et al, 2007; SUDARAM et al, 2007; TAKANO et al, 2007).

A única relevância observada no estudo dos osteoclastos esteve associada ao efeito do tempo sobre a presença dessas células. O processo migratório dos osteoclastos para a região do enxerto só se iniciou entre o 3º e o 7º dia, tal como propuseram Winslow et al (2006) ao afirmarem que as células TRAP positivas só chegariam no tecido no 5º dia após a enxertia. Sua presença no tecido foi marcante no 14º dia, a partir de quando eles regrediram sua expressão.

O adensamento populacional dos osteoclastos esteve associado a uma maior quantidade de tecido neoformado no enxerto. A matriz recém secretada pode ser considerada um marcador indireto da presença de osteoblastos no tecido. A revisão de literatura demonstrou que o osteoblasto é a principal célula a estimular a osteoclastogênese através do RANK-L e do NFAT (PIOLETTI; KOTTELAT, 2004; KIESLINGER et al, 2005; TAKAYANAGI, 2005; KACENA et al, 2006; WINSLOW et al, 2006; NISHIGUCHI et al, 2007).

A confirmação direta da presença de osteoblasto no tecido é uma tarefa difícil pela ausência de marcadores específicos para essa célula. Na maioria dos trabalhos que estudaram essa célula, sua presença foi determinada pela ocorrência de produtos do seu metabolismo. Lucarelli et al (2003), Kitoh et al (2004, 2007) e Kanno et al (2005) adotaram a secreção de colágeno I e fosfatase alcalina como indicadores de que um grupo de células-tronco havia sofrido diferenciação em osteoblastos após o cultivo em meio contendo citrato e dexametasona.

A correlação positiva encontrada entre a área neoformada e a área dos osteoclastos foi, portanto, coerente. O princípio biológico dessa correlação fundamenta-se na necessidade de se manter a homeostasia dos tecidos (SATO; TAKAYANAGI, 2006). Uma neoformação óssea desequilibrada no processo de cicatrização de enxertos aposicionados poderia contribuir para deformidade de face e para efeitos indesejáveis, semelhantes aos experimentados na osteopetrose (BLAIR; ROBINSON; ZAIDI, 2005; WINSLOW et al, 2006; ASAGIRI; TAKAYANAGI, 2007). A proposta de espessamento dos rebordos maxilares objetiva a otimização de uma reabilitação e não pode trazer prejuízos ao paciente. Assim, a maior

presença de osteoclastos no momento que está ocorrendo neoformação óssea foi um fenômeno salutar.

No osso, os processos de absorção e neoformação são muito paralelos (SATO; TAKAYANAGI, 2006). A importante correlação existente entre os osteoclastos e a matriz óssea neoformada indica que a presença destas células no tecido funcionou como um indicador da ocorrência de um alto metabolismo ósseo. Isso foi comprovado pela análise descritiva que mostrou não haver osteoclastos na intimidade do osso mandibular, cujo metabolismo estava estável, mas constatou seu aparecimento na região periosteal e no ligamento periodontal. Essa relação entre o osteoclasto e o elevado metabolismo ósseo foi tão pertinente que quando ocorreu a diminuição da quantidade de osteoclastos no tecido a quantidade de matriz mais intensamente corada pelo azul de toluidina foi igualmente diminuindo.

Depois que o enxerto completou 28 dias de aposicionado, já havia ocorrido a primeira redução nos valores destas duas variáveis, e o enxerto começou a ser absorvido. Uma vez que os valores referentes aos osteoclastos diminuíram antes que ocorresse a diminuição mais significativa de área na matriz dos enxertos aposicionados, não foi possível correlacionar essa célula com os fenômenos absorptivos sofridos pelos fragmentos de osso nos últimos dias do experimento.

Como o processo de absorção do enxerto continuou ocorrendo mesmo após a diminuição dos osteoclastos, a absorção pode estar regida por outros mecanismos que não só as enzimas secretadas por essas células. Nesse sentido, foi levantada a hipótese de que o sistema imunológico poderia intervir diretamente nesse mecanismo. Apesar de ser reconhecido que o sistema imune atua de maneira muito discreta sobre um enxerto de osso, as células inflamatórias poderiam atuar indiretamente, regulando os osteoclastos, e, mesmo diretamente, de forma efetora, contra o osso enxertado.

A correlação entre os osteoclastos e os macrófagos foi evidente, confirmando a interrelação próxima existente entre o sistema ósseo e o sistema imunológico (SATO; TAKAYANAGI, 2006). Os macrófagos, depois dos osteoblastos, seriam as principais células a secretar RANK-L (STRAND; KAVANAUGH, 2004; MOREAU et al, 2007). Essas células ainda são potentes produtoras de IL-1 e IL-6 que representam importantes citocinas envolvidas com a osteoclastogênese (STRAND; KAVANAUGH, 2004; OKA et al, 2005). Dessa forma, a correlação positiva encontrada foi perfeitamente consistente com os princípios biológicos da osteoclastogênese. Entretanto, como se observou anteriormente, os osteoclastos estiveram

mais fortemente correlacionados com o aumento do metabolismo ósseo no enxerto, e os valores estatísticos mostraram uma relevância maior para esta correlação.

O PRP diminuiu a expressão dos macrófagos ao redor dos enxertos alógenos no 3º dia e ao redor dos enxertos autógenos no 7º dia. Apesar do processo inflamatório ter sido sempre muito brando ao redor dos enxertos, e desse efeito do PRP ter sido pontual, esse resultado propôs que os fatores de crescimento possam atuar modulando a inflamação (HARRISSON; CRAMER, 1993; DOHAN et al, 2006; GARDNER et al, 2006). Essa sugestão também foi proposta por Carter et al (2003), que discutiram que, nas feridas cutâneas tratadas com PRP, os sinais de inflamação reduziram-se mais rapidamente. Diversos outros autores atribuíram ao PRP a pouca inflamação encontrada em seus experimentos, quer seja através de observações clínicas (RODRIGEZ et al, 2003; RAGHOEBAR et al, 2005; MENDONÇA-CARIDAD; JUIZ-LOPEZ; RUBIO-RODRIGUEZ, 2006; THOR; WARFVINGE; FERNANDES, 2006) quer em estudos experimentais (ZHU et al, 2006; FENNIS; STOELINGA; JANSEN, 2002, 2004, 2005).

A quimiotaxia exercida para os macrófagos foi significativamente diferente entre enxertos de diferentes naturezas, em qualquer dia do experimento, se o PRP não tivesse sido colocado no meio. No lado onde o PRP foi agregado ao reparo, o enxerto alógeno só não se diferenciou do autógeno no 28º dia. A inter-relação entre o sistema imunológico e o sistema osteoarticular foi comprovada também por este achado. A maior quantidade de macrófagos foi obviamente detectada ao redor dos enxertos alógenos. Por menor que seja sua imunogenicidade, esses enxertos ainda podem apresentar epítomos que potencialmente serão fagocitados por estas células (DOHAN et al, 2006). Devido ao seu papel como célula apresentadora de antígenos, os macrófagos foram reconhecidos como células primordiais no mecanismo de rejeição de outros enxertos alógenos (CARPENTER; TOMASZEWSKI, 1998; TSHMALA et al, 1999).

Estas células foram genuinamente estudadas nesta pesquisa como importantes para o processo de absorção (TRAN; LUNDY; FOX, 2005). Postulou-se que a IL-1 e o TNF-alfa, secretados por macrófagos e células T, participariam da resposta efetora contra antígenos do enxerto ósseo, o que culminaria em sua absorção (NORDSTROM et al, 1999). Estas células apresentadoras de antígeno ainda secretam moléculas capazes de estimular a osteoclastogênese como o M-CSF e o RANK-L (STRAND; KAVANAUGH, 2004; PIOLETTI; KOTTELAT, 2004).

Entretanto, a contextualização dos macrófagos no presente estudo demonstrou que eles estiveram presentes exatamente sobre os enxertos alógenos que foram os enxertos menos

absorvidos e mais osteocondutores. Assim como as plaquetas, os macrófagos também atuam secretando fatores de crescimento que são importantes para estimular a osteogênese (ANITUA, 1999; MARX et al, 1998). Eles podem atuar sobre os osteoblastos estimulando sua proliferação, e estas células produtoras de osso amplificam o processo através da síntese de GM-CSF num feedback positivo com os macrófagos (HOROWITZ; GIANNASCA; WOODCOCK; 1990; NORDSTROM et al, 1999; GERVÁSIO et al, 2002). Essa cascata de eventos assevera o reparo e a incorporação do enxerto ósseo (NORDSTROM et al, 1999; MENDONÇA-CARIDAD; JUIZ-LOPEZ; RUBIO-RODRIGUEZ, 2006; LARI et al, 2007).

Além do mais, existem evidências de que os macrófagos também podem inibir a osteoclastogênese se o microambiente for propício para a síntese de citocinas anti-inflamatórias como a IL-4, IL-3 e IL-18 (SHINODA et al, 2003; STRAND; KAVANAUGH, 2004; KACENA et al, 2006). Dessa forma, concorda-se que a participação do sistema imunológico junto ao processo de remodelação óssea é complexa e regida por mecanismos diversos (WYZGA et al, 2004; SATO; TAKAYANAGI, 2006). O trabalho de Yin et al (2002) comprovou que os enxertos ósseos alógenos congelados foram eficazes em estimular a síntese de IL-10, outra citocina antiinflamatória e, portanto eles poderiam modificar o perfil da resposta de macrófagos.

O presente trabalho também comprovou o papel dos macrófagos na osteogênese ao mostrar que a correlação entre estas células e a área de tecido neoformado foi positiva e relevante. A análise do comportamento dos macrófagos, neste experimento, permitiu inferir a compreensão de que estas células não participaram no processo de reparo dos enxertos aposicionados colaborando com sua perda, mas sim intensificando sua consolidação.

A avaliação da atividade imunológica contra o enxerto também não apontou os linfócitos como células presentes nos tecidos ao seu redor. Esse achado já tinha sido observado na descrição das secções que sugeriram que a pouca inflamação presente foi conseqüência da manipulação cirúrgica dos tecidos e não de um processo de rejeição. A interface do enxerto com o leito receptor, em todas as etapas de observação, esteve sempre isenta de sinais inflamatórios. A negatividade na marcação imunohistoquímica para os linfócitos T e B foi importante para consolidar a suposição de que o osso alógeno congelado é muito pouco imunogênico.

O osso apresenta uma imunogenicidade ainda menor que outros tecidos (TSHAMALA et al, 1999; YIN et al, 2002, 2003), especialmente se for submetido ao congelamento prévio (NORDSTROM et al, 1999). O tecido medular, por menos que esteja presente, ainda pode

induzir um microquimerismo no repertório de células T, o que compete no sentido de induzir anergia desses linfócitos (YIN et al, 2002). Portanto, a probabilidade de encontrar células CD3-positivas ou CD79 $\alpha$  $\gamma$ -positivas, intimamente associadas ao enxerto, foi mínima.

A impossibilidade em se determinar a presença de linfócitos B no tecido tem sólido respaldo nas especulações de que o tratamento que o osso recebe, possibilita que as células imunológicas participem pouco do processo de perda dos enxertos. Essa proposição foi confirmada por Carpenter e Tomaszewski (1998) em transplantes da veia safena para revascularização cardíaca. A bainha perivascular do vaso alógeno congelado, que foi enxertado e demandou uma troca, não apresentou linfócitos B em sua celularidade. A atividade destas células é importante na absorção óssea secundária a doenças auto-imunes. Foi o que se constatou nos pacientes com artrite reumatóide (STRAND; KAVANAUGH, 2004; SATO; TAKAYANAGI, 2006) em quem as principais células no líquido sinovial das articulações foram macrófagos, fibroblastos e linfócitos (TRAN; LUNDY; FOX, 2005). Entretanto elas não se mostraram efêoras na resposta contra enxertos congelados (TSHAMALA et al, 1999; YIN et al, 2002, 2003; KAWALEC-CARROL et al, 2006).

Uma vez que a atividade de células B é dependente de citocinas liberadas por linfócitos T (DEIJKERS et al, 1999; YIN et al, 2002), a inexistência dessas células ao redor do enxerto foi coerente. Os resultados, portanto, se superpõem aos de outros autores que comprovaram que a atividade de linfócitos B contra o enxerto ósseo é irrelevante (TSHAMALA et al, 1999). O osso congelado pode inclusive induzir tolerância de células B (YIN et al, 2002). Os anticorpos só foram encontrados ao redor de enxertos frescos, e a presença de células inflamatórias no tecido foi atribuída à contaminação do enxerto por substâncias químicas como o óxido de etileno, usado na esterilização (TSHAMALA et al, 1999; MOREAU et al, 2000). Esse gás é reconhecido por diminuir a osteoindução e osteocondução (HIGUERRA et al, 2005).

O congelamento é o método mais utilizado para estocagem do enxerto até sua utilização nas reconstruções esqueléticas. Os protocolos sugerem que os tecidos se mantenham preservados a baixas temperaturas por um período superior a 90 dias, a partir de quando poderão ser utilizados por mais de seis anos (FARRINGTON et al, 1998). Esse protocolo está bem padronizado, mas ainda se conhecem pouco as modificações que as baixas temperaturas introduzem nos tecidos. Portanto, esse processo foi estudado na porção cortical e medular do osso ilíaco em duas temperaturas diferentes, por quatro períodos de congelamento distintos.

A análise subjetiva concluída a partir das impressões de um patologista experiente mostrou que o congelamento modificou o tamanho das células e dos núcleos, e que isso alterou o aspecto do tecido após 90 ou 120 dias de congelamento a uma temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ . A mensuração efetivada na área dos núcleos e das células evidenciou mais alterações do que a avaliação subjetiva, provavelmente porque as mensurações automáticas identificaram diferenças que passaram despercebidas ao olho humano.

É digno ressaltar que as diferenças morfométricas podem ser estatisticamente significativas, mas podem não se traduzir em um impacto biológico tão importante. Os tecidos, cuja morfologia foi classificada como mal preservada, corresponderam àqueles nos quais as alterações morfométricas também foram mais acentuadas. Os fragmentos de osso que exibiram esse perfil apresentaram uma desestruturação da porção medular que é um dos principais fatores na diminuição da imunogenicidade do enxerto. Assim, pareceu coerente que a avaliação subjetiva tivesse sido eficaz em identificar aqueles fragmentos de osso que, depois de congelados, estiveram aptos para a enxertia.

O congelamento promoveu uma expansão na área ocupada pelas células e na área ocupada pelos seus núcleos. A água presente no citosol celular e no núcleo sofreu uma dilatação térmica com a diminuição da temperatura, o que resultou na expansão e ruptura da membrana nuclear (CORCUERA et al, 2007). Outros pesquisadores também constataram que a criopreservação de espermatozoides também promoveu rupturas de sua membrana na região acrossomial (BLOTTNER et al, 2001). Essa ação das baixas temperaturas sobre as células tem fundamentado a aplicação da crioterapia com nitrogênio líquido como um método para assegurar a adequada margem cirúrgica após a curetagem de tumores odontogênicos (REIS et al, 2006b).

A diminuição da temperatura para  $-20^{\circ}\text{C}$  por um período de 60 dias foi suficiente para que seus efeitos sobre o arcabouço celular fossem similares aos verificados para a temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ . Os núcleos foram mais sensíveis a essa diminuição de temperatura, que promoveu uma expansão da membrana dessa importante organela, desde o primeiro período de observação.

As alterações que a diminuição de temperatura exerceu sobre as células presentes na porção cortical foram regidas pelos mesmos princípios aplicados ao tecido medular. Entretanto, a área dos núcleos dos osteócitos esteve sempre mais reduzida que nas células do osso fresco em qualquer dia do congelamento, mas não houve diferença significativa entre as diferentes temperaturas. Isso provavelmente ocorreu como consequência do desaparecimento dos osteócitos em algumas lacunas, após o congelamento, como também ocorreu em outros

tratamentos empregados com o objetivo de diminuir a antigenicidade do osso (DUMAS et al, 2006; KAWALLEC-CARROL et al, 2006). O desaparecimento dessas células mascarou o efeito que a expansão de volume, que a água experimenta durante o congelamento, promoveu sobre as células individualmente.

A necrose dessas células não deve ser entendida como um fenômeno maléfico uma vez que a principal função da cortical do osso é prover um arcabouço para a formação de um osso novo ao passo que também assegura a resistência mecânica do enxerto (TSHMALA et al, 1999). Os achados da avaliação biológica do tecido enxertado demonstraram que essa porção do osso cumpriu fidedignamente sua função, permitindo uma franca neoformação óssea abaixo dela.

O colágeno presente no tecido cortical foi sem dúvida o componente do osso mais sensível ao congelamento. A diminuição da temperatura para  $-20^{\circ}\text{C}$  promoveu alterações importantes na expressão dessa proteína no tecido, que se agravaram significativamente com o congelamento por  $-70^{\circ}\text{C}$ . Dentro da mesma temperatura, as alterações se agravaram após 60 dias de congelamento.

Esse tratamento é danoso para a matriz extracelular. Os efeitos prejudiciais à matriz também foram imputados à formação de gelo no tecido (LAOUAR et al, 2007). Identificou-se que as baixas temperaturas usadas na criopreservação de cartilagem promoveram perda de colágeno, condroitina sulfatada e proteoglicanas (MORENO; FORRIOL et al, 2002; LAOUAR et al, 2007). O tratamento com peróxido de hidrogênio promoveu alterações análogas. Houve ruptura do colágeno com formação de fibrilas que estavam desorganizadas e expostas acentuando o relevo da cortical (DUMAS et al, 2006). As alterações observadas através do exame da ultra-estrutura da cortical por microscopia eletrônica de varredura (DUMAS et al, 2006) foram correspondentes ao aspecto organizacional da matriz encontrado na coloração pelo picro-sirius neste experimento.

Kawallec-Carrol et al (2006) constataram que o colágeno tipo II isolado induziu altos títulos de IL-2, IL-4, IFN, IgG e IgM específicas. Certamente por conta das alterações que essa proteína exhibe após o tratamento, as imunoglobulinas, específicas contra o colágeno II, não foram detectadas no soro de ratos que receberam osso congelado ou submetido à fotooxidação. Essas especulações também fundamentaram o retardo do reparo de cavidades experimentais enxertadas com colágeno isolado ou em associação com o PRP (SCHLEGEL et al, 2004).

A reação de Feulgen foi adotada no presente estudo considerando a hipótese de que ela seria um marcador mais eficaz das proporções nucleares diante de diferentes temperaturas de congelamento. Pelos resultados desta técnica, observou-se que o diâmetro dessa organela variou pouco ao longo do período e em ambas temperaturas.

Essa coloração especial apresenta uma sensibilidade alta para corar o DNA celular. Ela é normalmente utilizada para avaliar alterações cromossômicas, como as conduzidas por Reis et al (2002, 2006). A linearidade dos valores observados para a área dos núcleos nesta coloração sugeriu que o DNA sofreria, menos que o núcleo como um todo, o impacto da diminuição da temperatura. Laouar et al (2007), estudando os efeitos da criopreservação sobre a cartilagem, e Blottner et al (2001), avaliando a criopreservação de espermatozoides, também encontraram que o DNA manteve-se preservado depois dos tratamentos empregados.

O DNA é uma estrutura altamente condensada devido ao seu nobre papel para a célula e para toda evolução. Essa condensação ocorre ao redor das histonas formando os nucleossomos. As dilatações térmicas que a água impõe influenciaram pouco essa característica dos ácidos desorribonucleicos. Numa temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ , as proteínas responsáveis pela condensação do DNA sofreram uma desnaturação mais evidente e acabaram promovendo uma dispersão maior da cromatina, como observado pela reação de Feulgen, concordando com outras investigações (CORCUERA et al, 2007). Horowitz, Giannasca e Woodcock (1990) constataram que o diâmetro da ultra-estrutura do complexo formado pela cromatina e pelas histonas foi aumentando progressivamente com a diminuição da temperatura. No entanto, esse nucleossomo se manteve praticamente semelhante ao do tecido fresco depois da exposição celular a distintas temperaturas de congelamento.

As diferenças entre a coloração pela HE e pela reação de Feulgen foram encontradas na maior parte das amostras estudadas. Outros trabalhos também compararam esta coloração com outras técnicas utilizadas para avaliar a incidência de alterações cromossômicas em espermatozoides (SPRECHER; COE, 1996; BELETTI; MELLO, 2004). De maneira concordante com este estudo, os achados obtidos com a coloração pela reação de Feulgen diferiram daqueles observados em outros protocolos de avaliação.

Os efeitos da temperatura encontrados no presente trabalho sobre o osso íliaco colaboraram significativamente para diminuição da antigenicidade do enxerto. As alterações celulares, que se processaram, promoveram necrose do tecido medular como foi observado ao se avaliar o comportamento biológico do enxerto. A desestruturação do tecido medular pelo congelamento foi sem dúvida um ponto crucial para que o tecido ósseo se tornasse inerte depois de

enxertado (MUSCOLO et al, 1996; STEVENSON; SHAFFER; GOLDBERG, 1996; LEWANDROWSKI et al, 2001).

Se esse processo não tivesse ocorrido adequadamente, a inflamação abaixo da cortical, e logicamente na interface com o leito receptor, teria sido pronunciada com o aparecimento de células gigantes multinucleadas (MOREAU et al, 2000). Como os protocolos sugeridos por Hou, Yang e Hou (2005) foram eficazes, a medular foi substituída rapidamente por um tecido com alto potencial osteogênico (MOREAU et al, 2000), sem que para isso o sistema imunológico fosse mobilizado.

Devido à baixa imunogenicidade do osso, tornou-se claro o preponderante papel que os enxertos alógenos congelados podem desempenhar no contexto das reconstruções dos maxilares. Devido a esse argumento e à necessidade de grande quantidade de enxerto para reconstruir outras partes do sistema musculoesquelético, o osso de banco se tornou uma realidade em outras áreas cirúrgicas (MUSCOLO et al, 1996; LEWANDROWSKI et al, 2001; WARD et al, 2005;) e está sendo incorporado às reabilitações dos maxilares (MOREAU et al, 2000; JENSEN et al, 2005).

A necessidade de se introduzir nesses protocolos a preocupação com a paridade do sistema HLA irá incrementar a segurança da utilização dos enxertos alógenos. Neste trabalho, como em muitos outros observados na literatura, nenhuma abordagem foi elaborada em relação à paridade do sistema HLA. Não se observou rejeição e os resultados dos enxertos alógenos foram ainda melhores que aqueles percebidos em relação ao osso autógeno. Dessa forma, a repercussão clínica da não paridade sobre a viabilidade do enxerto é pequena como também constataram algumas investigações (MUSCOLO et al, 1996; WARD et al, 2005). Contudo, é necessário estar atento ao princípio *slipery slope*, para não comprometer um potencial transplante de órgão num paciente que recebeu anteriormente enxertos ósseos alógenos sem essa preocupação (LEE et al, 1997).

O PRP, apesar de ter mostrada uma tendência a melhorar as variáveis envolvidas com a regeneração dos enxertos aposicionados neste trabalho, não comprovou de modo consistente sua eficácia na osteogênese e na capacidade de diminuir a absorção. As observações foram pontuais e, por conta disso, não se constatou um padrão que se reproduzisse entre os enxertos autógenos e alógenos ao longo dos dias. Uma crítica que os autores, entusiasmados com a técnica, têm atribuído a essa falha do PRP é a falta de padronização das suas características (MARX, 2004; FREYMILLER; AGHALOO, 2004; EPPLEY; WOODDEL; HIGGINS, 2005). Por conta disso, optou-se por pormenorizar os aspectos do PRP produzido.

A plaquetometria do PRP ainda não é um consenso na literatura. Marx (2004) postulou que a resposta biológica atribuída ao PRP ocorrerá quando sua concentração de plaquetas for superior a 1.000.000 de células/ $\mu$ l. Entretanto, diversos trabalhos realizaram inferências sobre a mediação do PRP no processo de reparo com plaquetometrias inferiores a esse padrão (OBARRIO et al, 2000; MAN; PLOSKER; WINLAND-BROWN, 2001; AGHALOO; MOY; FREYMILLER, 2002; LUCARELLI et al, 2003)

Na presente pesquisa, o protocolo utilizado nas centrifugações (EFEUGLU; AKÇAY; ERTÜRK, 2004) facultou a obtenção de um PRP com um número de plaquetas aproximadamente duas vezes maior que o proposto como valor terapêutico. Essa elevação plaquetária também foi utilizada em outros trabalhos (ROLDÁN et al, 2004a; CHOI et al, 2004). Os achados biológicos foram incongruentes. Enquanto Roldán et al (2004b) encontraram uma boa neoformação óssea com bom contato entre o implante e o osso, Choi et al (2004) constataram um retardo no reparo de alvéolos preenchidos com PRP.

Estes mesmos autores (CHOI et al, 2005) discutiram que o melhor efeito do PRP foi observado em plaquetometrias baixas, já que altas concentrações de fatores de crescimento seriam citotóxicas para as células do reparo (CHOI et al, 2004, 2005). Os baixos resultados encontrados por este grupo de pesquisadores em 2004 se justificaram pela forte interferência do tecido mole no reparo do osso, que talvez tenha representado um problema maior que a plaquetometria do PRP. É indiscutível que à proporção que a plaquetometria aumenta, a quantidade de fatores de crescimento disponíveis tende a aumentar (DUGRILLON et al, 2002; EPPLEY; WOODDELL; HIGGINS, 2004).

A despeito do baixo efeito do PRP no reparo do osso posicionado à mandíbula, em nenhum momento, a concentração plaquetária obtida foi inibitória para qualquer variável estudada. Descartou-se, portanto, a possibilidade de que uma alta concentração de fatores de crescimento pudesse apresentar efeito deletério sobre o reparo. A única inibição foi constatada para os osteoclastos para quem esse efeito é reconhecido por diversos autores (BLAIR; ROBINSON; ZAIDI, 2005; BEETON et al, 2006; KACENA et al, 2006; LARI et al, 2007).

A mais altas plaquetometria observada na literatura correspondeu a mais de 5 milhões de plaquetas/ $\mu$ l (KIMURA et al, 2005), e isso não comprometeu o reparo de feridas cutâneas tratadas com esse PRP. Estas feridas apresentaram epitelização precoce e um tecido conjuntivo mais colagenizado. A plaquetometria que Arpornmaeklong et al (2004) utilizaram em suas culturas de células também foi muito elevada e houve um aumento na proliferação celular atribuída aos fatores de crescimento plaquetários.

Outra possibilidade para o baixo efeito biológico do PRP aqui estudado poderia estar associada a uma alta taxa de plaquetas ativadas. Centrifugações muito pesadas resultam em força mecânica alta sobre as plaquetas e liberação precoce do conteúdo de seus grânulos alfa. As centrifugações utilizadas neste trabalho foram altas e consistiram de 300g por 10 minutos e 5000g por 5 minutos (EFEOGLU; AKÇAY; ERTÜRK, 2004). Outras investigações adotaram centrifugações com valores similares e produziram PRP com capacidade de aumentar a proliferação de células-tronco e de osteoblastos em culturas (LUCARELLI et al, 2003). Um fator que minimizou o efeito das altas ACR sobre as plaquetas nesta pesquisa, foi o período de aceleração e freamento da centrifuga utilizada, que evitou a exposição abrupta dessas células às forças de centrifugação.

Um dado que se observou do processo de análise da preparação do PRP aqui utilizado foi que o VPM do PRP foi mais elevado que o do sangue total. O PRP produzido por Vasconcelos Figueiredo e Seghatchian (2003) também apresentou a mesma característica. Portanto, descartou-se a possibilidade de que as centrifugações tenham induzido uma precoce ativação plaquetária já que nesse fenômeno ocorre retração no citoplasma das plaquetas e conseqüente diminuição do seu volume (OBARRIO et al, 2000). A elevação do VPM verificada sugeriu que os protocolos de centrifugação e pipetagem foram seletivos para as plaquetas de grande diâmetro. Outra proposta é que, devido à limitações técnicas, o analisador automático contou plaquetas agregadas como uma única plaqueta, sobrestimando o VPM (PIETRAZAK; EPPLEY, 2005).

A agregação plaquetária precoce é uma hipótese profundamente discutível por que o anticoagulante usado na coleta do sangue – o ACD-a – é reconhecido entre os autores como o mais adequado para essa finalidade (AGHALOO; MOY; FREYMILLER, 2002; PIETRAZAK; EPPLEY, 2005; TSAY et al, 2005). As características ideais para um anticoagulante incluem além de inibição da formação do coágulo, a nutrição celular e a preservação de sua integridade. O ACD-a encerra todas essas características (MARX, 2000, 2001).

O método de preparo do PRP aqui utilizado padronizou a quantidade de eritrócitos e PPP que se removeu do sangue total. As pequenas variações observadas resultaram de alterações no hematócrito do sangue total, e não houve interferência de qualquer outra célula. A mensuração desses valores foi preocupação de poucos autores (EFEOGLU; AKÇAY; ERTÜRK, 2004; MAN; PLOSKER; INLAND-BROWN, 2001) que correlacionaram seus dados apenas com a plaquetometria final obtida. Esses autores removeram quantidades

grosseiras de eritrócitos e PPP e encontraram correlações positivas com a quantidade de plaquetas no PRP.

A contagem de plaquetas aqui obtida não apresentou correlação com a quantidade de PPP ou eritrócitos removidos, possivelmente, porque pela metodologia utilizada removeu-se todo PRP possível, e as variações verificadas nessa quantidade foram mínimas impossibilitando correlações positivas com outros parâmetros do PRP. Isso também ocorreu em relação à leucometria do PRP, que só apresentou correlação significativa com a contagem de leucócitos do sangue total. A importância em se estudar a leucometria do PRP resulta da suposição de que os leucócitos dividem com as plaquetas a síntese de PDGF e sua liberação no meio em reparo (WEIBRICH et al, 2002a, 2002b, 2003a, 2003b; SERINOLLI et al, 2004; EVERTS et al, 2006).

A recomendação de diversos autores (MARX et al, 1998; ANITUA, 1999; OYAMA et al, 2004) para se obter um PRP com máxima concentração plaquetária é remover a porção superficial da camada de eritrócitos. Isso contribuiu para a alta plaquetometria do PRP deste experimento. O aumento no hematócrito observado nos resultados foi uma consequência desse cuidado. Este aumento foi menor que o observado para os leucócitos e que, por sua vez, foi ainda menor que o aumento observado na quantidade de plaquetas. Portanto, é factível concluir que esse protocolo foi sensível para concentrar as plaquetas, e o hematócrito elevado no PRP foi fruto dessa intenção (KANNO et al, 2005).

O alto hematócrito não impossibilitou, dessa forma, a concentração plaquetária. Weibrich et al (2003) ainda postularam que o hematócrito do PRP não inibe o processo de reparo. O hematócrito elevado aumentou o tempo de coagulação do PRP. Os eritrócitos diminuem a proximidade entre as plaquetas e retardam a formação do trombo. Esse fato pode ser traduzido como uma vantagem, pois o aumento do tempo de coagulação melhora o manuseio do PRP e sua retração final, o que prevê que a maior liberação de fatores de crescimento ocorrerá nos tecidos (SANCHEZ et al, 2003; ANITUA et al, 2006).

Considerando que o tempo de coagulação avalia os fatores de coagulação, não se encontrou correlação significativa entre essa variável e a plaquetometria do PRP. O tempo médio de 13 segundos, observado para a obtenção do coágulo, foi decorrente, principalmente, do mecanismo usado para induzir esse fenômeno. A opção de se usar apenas cloreto de cálcio já havia sido proposta por Anitua (1999), no que foi seguido por diversos outros autores (ROBIONNY et al, 2002; LUCARELLI et al, 2003; SANCHEZ et al, 2003; MENDÉZ et al, 2006). O protocolo clássico para coagular o PRP é a adição de trombina bovina que promove

uma coagulação em segundos (WHITMAN; BERRY; GREEN, 1997; MARX et al, 1998; YAMADA et al, 2004), entretanto esse fator de coagulação foi, outrora, associado com o aparecimento de coagulopatias (ZEHNDER; LEUNG, 1990; CHRISTIE; CARRINGTON; ALVING, 1997; LANDESBURG, 1998).

O comportamento biológico do PRP neste trabalho foi tão pouco linear como o observado em diversas outras pesquisas com animais (WILTFANG et al, 2004; THORWARTH et al, 2005; AGHALOO; MOY; FREYMILLER, 2005; AKEDA et al, 2006a, 2006b). Freymiller e Aghaloo (2004) analisaram que o metabolismo dos animais é mais acelerado, o que sugere que o reparo se processe rapidamente, independente do PRP, como foi aqui constatado. Por conta disso, os resultados de experiências clínicas com a utilização desse concentrado de fatores de crescimento sempre sinalizaram um comportamento do PRP melhor do que os trabalhos experimentais (RODRIGUEZ et al, 2003; MERKX; FENNIS; VERHAGEN, 2004; OYAMA et al, 2004; AJZEN et al, 2005; SAMMARTINO et al, 2005; MANAI, 2006; MENDEZ et al, 2006). Certamente as pequenas diferenças observadas nos parâmetros estabelecidos em diversas pesquisas laboratoriais, revestem-se de um impacto maior quando analisados cotidianamente sob a luz da relação paciente-profissional.

Uma questão importante é que uma das preocupações iniciais dessa pesquisa permaneceu como uma grande lacuna. Os mecanismos responsáveis pela absorção do enxerto ósseo empregado de forma aposicionada persistiram desconhecidos. As contribuições que este trabalho traz no sentido de entender esse fenômeno restringiram-se a afastar as variáveis que foram levantadas como hipoteticamente importantes para esse processo. Considerou-se inicialmente que os macrófagos, os osteoclastos e os linfócitos B e T seriam cruciais para a absorção do enxerto aposicionado. Ironicamente, o que se observou, com os presentes resultados, foi que estas células respectivamente contribuíram para neoformação óssea, só estiveram presentes quando esse fenômeno foi abundante ou não estiveram manifestadas no tecido mole ao redor do enxerto.

O melhor desempenho dos enxertos alógenos congelados no modelo de reconstrução estudado foi realmente um resultado digno de ser insistentemente frisado. Este resultado sinalizou para uma utilização mais confiável desse biomaterial na prática clínica. Para sua melhor aplicabilidade, o congelamento configurou-se como método prático e eficaz para diminuir sua antigenicidade. Entretanto, a utilização desses enxertos deve prever a investigação da paridade do sistema HLA e a certeza da ausência de contaminações. As vantagens do enxerto dessa natureza são inúmeras. O fato de que a opção pela utilização de osso alógeno congelado

elimina um segundo sítio cirúrgico, somado ao seu alto potencial osteogênico, a sua alta resistência à absorção e a sua inércia frente ao sistema imune, permite afirmar que os enxertos dessa natureza podem ser considerados um dos substitutos ósseos mais convenientes para a reconstrução dos maxilares.

As células presentes no enxerto ósseo estavam necrosadas e foram digeridas por enzimas teciduais. O arcabouço mineral do osso enxertado forneceu microambiente adequado para que as células-tronco presentes no osso suporte migrassem através das perfurações realizadas e se diferenciarem em osteoblastos sintetizando nova matriz óssea. O material mineralizado do osso enxertado foi inerte e não induziu reação imune mesmo que a natureza seja alógena. É possível que um tecido xenógeno congelado desempenhe este mesmo padrão de reatividade.



## **7 Conclusões**

### **7.1 Conclusões gerais**

- Os enxertos ósseos não sofreram um processo de rejeição específica.
- As células originais do tecido ósseo enxertado se tornaram necrosadas, foram digeridas e substituídas por tecido com potencial osteogênico
- A porção mineral do osso constituiu um arcabouço para guiar a neoformação óssea
- A remodelação que o enxerto sofre após a enxertia não compromete o objetivo da reconstrução
- O PRP parece melhorar o desempenho do enxerto

### **7.2 Conclusões específicas de cada experimento em particular**

#### **7.2.1 Alcançadas com a avaliação do comportamento biológico dos enxertos aposicionados**

- O osso aposicionado à cortical da mandíbula se incorporou ao seu leito receptor através da neoformação óssea abaixo da cortical e nas extremidades do enxerto. Não houve resposta inflamatória tardia nem fibrose evidente em qualquer microambiente desse processo.
- O enxerto alógeno foi superior ao autógeno no processo de reconstrução dos maxilares através de enxertia aposicionada. Neste experimento, ele foi mais osteogênico, fibrogênico e menos absorvido. O PRP mostrou apenas uma tendência para que esses eventos fossem mais intensos.
- Os enxertos aposicionados, autógenos ou alógenos, não foram reconhecidos pelo sistema imunológico, considerando a ausência de linfócitos T ou B no tecido sobre eles. Os macrófagos participaram do processo incrementado a regeneração dos enxertos. O PRP parece colaborar para a diminuição do processo inflamatório.
- Os macrófagos contribuíram para uma maior osteogênese e para uma maior preservação. A osteoclastogênese, neste experimento, esteve associada apenas com um aumento no metabolismo ósseo.

### *7.2.2 Alcançadas com o processo de congelamento do osso*

- O congelamento promoveu aumento na área das células e dos núcleos da medula do osso ilíaco e diminuição na área dos núcleos da cortical o que acarretaram necrose celular. O colágeno da cortical foi comprometido pelo processo de congelamento. Esses eventos foram importantes para diminuir ainda mais a antigênicidade do osso.
- As alterações observadas nas células e nos núcleos foram mais importantes à proporção que a temperatura diminuía e o tempo de congelamento aumentava. Ocorreu uma diminuição da área de colágeno no tecido nas mesmas proporções que as alterações celulares e nucleares

### *7.2.3 Alcançadas com o preparo do PRP*

- O processo de preparação do PRP de acordo com um protocolo padronizado não compromete suas características.
- As características citométricas do PRP foram dependentes apenas das características do sangue total e sofreram uma influência apenas da plaquetometria e da leucometria do sangue total.
- O hematócrito e a leucometria do PRP não modificaram sua plaquetometria. Apenas o hematócrito do PRP apresentou correlação com seu tempo de coagulação.



## 8 Referências

ACOSTA-FERIA, M. et al. Obliteración del seno frontal mediante injerto de tibia y plasma rico en plaquetas para el tratamiento de la osteomielitis crónica. **Neurocirugía**, v. 17, n. 4, p. 351-356, Bogotá, Ago. 2006.

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, Philadelphia, Out. 2002.

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, Copenhagen, Abr. 2005.

AJZEN, S.A. et al. Análise por tomografia computadorizada do enxerto autógeno na cirurgia de “sinus lifting”. **Radiologia Brasileira**, v. 38, n. 1, p. 25-31, Rio de Janeiro, Jan.-Fev. 2005.

AKEDA, K. et al. Platelet-rich plasma (PRP) stimulates the extracellular matrix metabolism of porcine nucleus pulposus and anulus fibrosus cells cultured in alginate beads. **Spine**, v. 31, n. 9, p. 959-966, Philadelphia, Abr. 2006a.

AKEDA, K. et al. Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 14, n. 22, p. 1272-1280, Londres, Dez. 2006b.

ANDRADE, M.G.S.; BELTRÃO, G.C. Aspectos biológicos da utilização do gel de plasma rico em plaquetas nas reconstruções maxilares com enxertos. **Revista Brasileira de Cirurgia e Implantodontia**, v. 8, n. 30, p. 324-328, Curitiba, Abr.-Jun. 2001.

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

ANITUA, E. et al. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 23, n. 2, p. 281-286, New York, Mar. 2005.

ANITUA, E. et al. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 227-234, Amsterdam, Maio 2006.

ARPORNMAEKLONG, P. et al. Influence of platelet-rich plasma (PRP) on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. An in vitro study. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 33, n. 1, p. 6-70, Copenhagen, Jan. 2004.

ASAGIRI, M.; TAKAYANAGI, H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. **Bone**, v. 40, n. 2, p. 251-264, New York, Feb. 2007.

ASAWA, Y. et al. Histochemical evaluation for the biological effect of menatetrenone on metaphyseal trabeculae of ovariectomized rats. **Bone**, v. 35, n. 4, p. 870-80, New York, Oct. 2004.

BEETON, C.A. et al. Osteoclast formation and bone resorption are inhibited by megakaryocytes. **Bone**, v. 389, n. 5, p. 985-990, New York, Nov. 2006.

BELETTI, M.E.; MELLO, M.L. Comparison between the toluidine blue stain and the Feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology. **Theriogenology**, v. 62, n. 3-4, p. 398-402, Stoneham MA, Ago. 2004.

BLAIR, H.C.; ROBINSON, L.J.; ZAIDI, M. Osteoclast signalling pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 328, n. 3, p. 718-738, New York, Mar. 2005.

BLOTTNER, S. et al. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. **Animal Reproduction Science**, v. 65, n. 1-2, p. 75-88, Amsterdam, Jan 2001.

BUTTERFIELD, K.J. et al. 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, Philadelphia, Mar. 2005.

CARLSON, N.E.; ROACH JR, R.B. Platelet-rich plasma. Clinical applications in dentistry. **Journal of American Dental Association**, v. 133, n. 10, p. 1383-1386, Thorofare NJ, Oct. 2002.

CARPENTER, J.P.; TOMASZEWSKI, J.E. Human saphenous vein allograft bypass grafts: Immune response. **Journal of Vascular Surgery**, v. 3, n. 27, p. 492-499, St Louis, Mar. 1998.

CARTER, C.A. et al. Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 74, n. 3, p. 244-245, New York, Jun. 2003.

CARTER, G. Harvesting and implanting allograft bone. **Association of Operating Room Nurses Journal**, v. 70, n. 4, p. 660-670, Denver, Out. 1999.

CASATI, M.Z. et al. Platelet-rich plasma does not improve bone regeneration around peri-implant bone defects—A pilot study in dogs **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 36, n. 2, p. 132-136, Conpenhagen, Fev. 2007.

CLAYMAN, L. Implant reconstruction of the bone-grafted maxilla: review of the literature and presentation of 8 cases. **Journal of Oral and Maxillofacial Sugery**, v. 64, n. 4, p. 674-682, Copenhagen, Abr. 2006.

CORCUERA, B.D. et al. Effect of lactose and glycerol on the motility, normal apical ridge, chromatin condensation and chromatin stability of frozen boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 67, n. 6, p. 1150-1157, Stoneham MA, Abr. 2007.

CHACON, G.E. et al. Using resorbable screws for fixation of cortical onlay bone grafts: an in vivo. Study in rabbits. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 62, n. 11, p. 88-93, Copenhagen, Jan. 2004.

CHOI, B.H. et al. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 33, n. 1, p. 56-59, Copenhagen, Jan. 2004.

CHOI, B.H. et al. Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: an in vitro study. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 34, n. 4, p. 420-424, Conpenhagen, Jun. 2005.

CHRISTIE, R.J.; CARRINGTON, L.; ALVING, B. Postoperative bleeding induced by topical bovine thrombin: report of two cases. **Surgery**, v. 121, n. 6, p. 708-710, St Louis, Jun. 1997.

DEIJKERS, R.L.M. et al. Human bone allografts can induce T cells with high affinity for donor antigens, **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 81, n. 3, p. 538-544, Boston, May 1999.

DELLA VALLE, A. et al. Prevention of postoperative bleeding in anticoagulated patients undergoing oral surgery: use of platelet-rich plasma gel. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 61, n. 11, p. 1275-1278, Philadelphia, Nov. 2003.

DOHAN, D.M. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 101, n. 3, p. 45-50, St Louis, Mar. 2006.

DUGRILLON, A. et al. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 31, n. 5, p. 613-619, Conpenhagen, Dez. 2002.

DUMAS, A. et al. The influence of processes for the purification of human bone allografts on the matrix surface and cytocompatibility. **Biomaterials**, v. 27, n. 23, p. 4204-4211, Guildford, Ago. 2006.

EFEOGLU, C.; AKÇAY, Y.D.; ERTÜRK, S. A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 62, n. 11, p. 1403-1407, Conpenhagen, Nov. 2002.

EPPLEY. B.L.; WOODSELL, J.E.; HIGGINS, J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 114, n. 6, p. 1502-1508, Baltimore, Nov. 2004.

EPPLEY. B.L.; WOODSELL, J.E.; HIGGINS, J. Platelet-Rich Plasma: A Review of Biology and Applications in Plastic Surgery. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 118, n. 6, p. 147e-159e, Baltimore, Nov. 2006.

EVERTS, P.A. et al. Differences in platelet growth factor release and leucocyte kinetics during autologous platelet gel formation. **Transfusion Medicine**, v. 16, n. 5, p. 363-368, Oxford, Out. 2006.

FARRINGTON, M. et al. Microbiological monitoring of bone grafts: two years' experience at a tissue bank. **Journal of Hospital Infection**, v. 38, n. 4, p. 261-271, London, Abr. 1998.

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 and Maxillofacial Surgery**, v. 31, n. 3, p. 281-286, Conpenhagen, Jun. 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 goats. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 33, n. 1, p. 48-55, Conpenhagen, Jan. 2004.

FENNIS, J.P.M.; STOELINGA, P.J.W.; JANSEN, J.A. Reconstruction of the mandible with an autogenous irradiated cortical scaffold, autogenous corticocancellous bone-graft and autogenous platelet-rich-plasma: an animal experiment. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 343, n. 2, p. 158-166, Conpenhagen, Mar. 2005.

FERNANDES, A.C.S. Análise morfométrica em áreas de interesse cirúrgico do osso parietal e sua relação com o índice crânico horizontal. 2002. 67f. Tese (Doutorado em Morfologia) – Escola Paulista de Medicina. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

FOTOS, P.G.; PIKOS, M.A.; ROSE, M.W. Case 57: multiple enlargements of the premaxilla and mandible. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 43, n. 10, p. 822-826, Copenhagen, Out. 1983.

FREYMILLER, E.G.; AGHALOO, T.L. Platelet-rich plasma: ready or not? **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 64, n. 2, p. 484-488, Conpenhagen, Abr. 2004.

FUSEGAWA, Y. et al. Platelet spontaneous aggregation in platelet-rich plasma is increased in habitual smokers. **Thrombosis Research**, v. 93, n. 6, p. 271-278, Elmsford, Mar. 1999.

GANDHI, A. et al. The effects of local platelet rich plasma delivery on diabetic fracture healing. **Bone**, v. 28, n. 4, p. 540-546, New York, Abr. 2006.

GARCIA, V.; CORRAL, I.; BASCONES MARTINEZ, A. Plasma rico en plaquetas y su utilizacion en implantologia dental. **Avances en Periodoncia**, v. 16, n. 2, p. 81-92, Madrid, Ago. 2004.

GARDNER, M.J. et al. The efficacy of autologous platelet gel in pain control and blood loss in total knee arthroplasty : An analysis of the haemoglobin, narcotic requirement and range of motion. **International Orthopaedics**, doi: 10.1007/s00264-006-0174-z, Berlin, Jul. 2006.

GERARD, D. et al. Effects of platelet-rich plasma on the healing of autologous bone grafted mandibular defects in dogs. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 64, n. 3, p. 443-451, Conpenhagen, Mar. 2006.

GERVASIO, A.M. et al. Levels of GM-CSF, IL-3, and IL-6 in fluid and tissue from human radicular cysts. **Journal of Dental Research**, v. 81, n. 1, p. 64-68, Washington, Out. 2005.

GIMENEZ, J.V.C.; GONZALEZ, J.A.; ALBANDEA, N. Tratamiento del envejecimiento cutáneo mediante bioestimulación con factores de crecimiento autógenos. **International Journal of Cosmetic Medicine and Surgery**, v. 7, n. 2, p. 8-14, Barcelona, Maio 2005.

HARRISON, P.; CRAMER, E.M. Platelet a-Granules. **Blood Reviews**, v. 71, n. 5, p. 52-62, Edinburgh, Mar. 1993.

HERNANDEZ, H.; ROSSANI, G. Plasma rico en plaquetas como inductor de reparación en la paniculopatía edematofibroesclerótica. **Internacional Journal of Cosmetic Medicine and Surgery**, v. 7, n. 2, p. 18-24, Barcelona, Maio 2005.

HIGUERA, C.A. et al. Tendon reattachment to a metallic implant using an allogenic bone plate augmented with rhOP-1 vs. autogenous cancellous bone and marrow in a canine model. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 23, n. 5, p. 1091-1099, New York, Set. 2005.

HOROWITZ, R.A.; GIANNASCA, P.J.; WOODCOCK, C.L. Ultrastructural preservation of nuclei and chromatin: improvement with low-temperature methods. **Journal of Microscopy**, v. 157, n. Pt2, p. 205-204, Oxford, Fev. 1990.

HOU, C.H.; YANG, R.S.; HOU, S.M. Hospital-based allogenic bone bank – 10 – year experience. **Journal of Hospital Infection**, v. 59, n. 1, p. 41-45, London, Jan. 2005.

ITO, K. et al. Simultaneous implant placement and bone regeneration around dental implants using tissue-engineered bone with fibrin glue, mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma. **Clinical Oral Implants Research**, v. 17, n. 5, p. 579-586, Copenhagen, Out. 2006.

JENSEN, T.B.; et al. Platelet rich plasma and fresh frozen bone allograft as enhancement of implant fixation An experimental study in dogs. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 22, n. 3, p. 653-658, New York, Maio 2004.

JENSEN, T.B. et al. No effect of platelet-rich plasma with frozen or processed bone allograft around noncemented implants. **International Orthopaedics**, v. 29, n. 2, p. 67-72, Berlin, Abr. 2005.

JUNG, R.E. et al. Platelet-rich plasma and fibrin as delivery systems for rhBMP-2. **Clinical Oral Implants Research**, v. 16, n. 6, p. 676–682, Copenhagen, Dez. 2005.

KACENA, M.A. et al. Megakaryocyte-mediated inhibition of osteoclast development. **Bone**, v. 39, n. 5, p. 991-999, New York, Nov 2006.

KANNO, T.; et al. Platelet-rich plasma enhances human osteoblast-like cell proliferation and differentiation. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 63, n. 3, p. 362-369, Copenhagen, Mar. 2005.

KAWALEC-CARROLL, J.S. et al. Immunogenicity of unprocessed and photooxidized bovine and human osteochondral grafts in collagen-sensitive mice. **BioMed Central Musculoskeletal Disorders**, v. 17, n. 7, p. 32, London, Mar. 2007.

KIESLINGER, M. et al. EBF2 regulates osteoblast-dependent differentiation of osteoclasts. **Developmental Cell**, v. 9, n. 6, p. 757-767, Cambridge, Dez. 2005.

KIM, E.S.; PARK, E.J.; CHOUNG, P.H. Platelet concentration and its effect on bone formation in calvarial defects: An experimental study in rabbits. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 86, n. 4, p. 428-433, St Louis, Out. 2001.

KIM, S.G. et al. 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, Copenhagen, Set. 2002.

KIMURA, A. et al. The effects of platelet-rich plasma on cutaneous insicional wound healing in rats. **Journal of Dermatological Science**, v. 40, n. 3, p. 205-208, Limerick, Dez. 2005.

KITOH, H. et al. Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis - a preliminary result of three cases. **Bone**, v. 35, n. 4, p. 892-898, New York, Out. 2004.

KITOH, H. et al. Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis. **Bone**, v. 40, n. 2, p. 522-528, New York, Fev. 2007.

KLEINHEINZ, J. VEGF-activated angiogenesis during bone regeneration. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 63, n. 9, p. 1310-1316, Copenhagen, Set. 2005.

KLONGNOI, B. et al. Influence of platelet-rich plasma on a bioglass and autogenous bone in sinus augmentation. An explorative study. **Clinical Oral Implants Research**, v. 17, n. 3, p. 312-320, Copenhagen, Jun. 2006a.

KLONGNOI, B. et al. Lack of beneficial effects of platelet-rich plasma on sinus augmentation using a fluorohydroxyapatite or autogenous bone: an explorative study. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 33, n. 7, p. 500-509, Munksgaard, Jun. 2006b.

KLUGER, R. et al. Removal of the surface layers of human cortical bone allografts restores in vitro osteoclast function reduced by processing and frozen storage. **Bone** v. 32, n. 3, p. 291-296, New York, Mar. 2003

KONDO, N. et al. Osteoinduction with highly purified beta-tricalcium phosphate in dog dorsal muscles and the proliferation of osteoclasts before heterotopic bone formation. **Biomaterial**, v. 27, n. 25, p. 4419-4427, Guildford, Set. 2006.

LANDESBURG, R. Risks of using platelet rich plasma gel. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 56, n. 9, p. 1116-1117, Conpenhagen, Set. 1998.

LANDESBURG, R. et al. Using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 58, n. 3, p. 297-300, Conpenhagen, Mar. 2000.

LANDESBURG, R. et al. Activation of Platelet-Rich Plasma Using Thrombin Receptor Agonist Peptide. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 63, n. 4, p. 529-535, Conpenhagen, Abr. 2005.

LAOUAR, L et al. Cryopreservation of porcine articular cartilage: MRI and biochemical results after different freezing protocols. **Cryobiology**, v. 54, n. 1, p. 36-43, New York, Fev. 2007.

LARI, R. et al. Macrophage lineage phenotypes and osteoclastogenesis – complexity in the control by GM-CSF and TGF-beta. **Bone**, v. 40, n. 2, p. 323-326, New York, Fev. 2007.

LEACH, J.K. et al. Coating of VEGF-releasing scaffolds with bioactive glass for angiogenesis and bone regeneration. **Biomaterials**, v. 27, n. 17, p. 3246-3255, Guildford, Jun. 2006.

LEE, M.Y. et al. Bone allografts are immunogenic and may preclude subsequent organ transplants. **Orthopaedics and Related Research**, v. 340, p. 215-219, Baltimore, Jul. 1997.

LEWANDROWSKI, K.U. et al. Immune response to perforated and partially demineralized bone allografts. **Journal of Orthopaedic Science**, v. 6, n. 6, p. 545-555, Tokyo, Dez. 2001.

LIU, J.W. et al. Experience with a bone bank operation and allograft bone infection in recipients at a medical centre in southern Taiwan. **Journal of Hospital Infection**, v. 50, n. 4, p. 293-297, London, Abr. 2002.

LIU, Y. et al. Fibroblast proliferation due to exposure to a platelet concentrate in vitro is pH dependent. **Wound Repair and Regeneration**, v. 10, n. 5, p. 336-340, Set.-Out., 2002.

LOZANO, M.L. et al. Evaluation of a new whole-blood filter that allows preparation of platelet concentrates by platelet-rich plasma methods. **Transfusion**, v. 43, n. 12, p. 1723-1728, Philadelphia, Dez. 2003.

LUCARELLI, E. et al. Stromal stem cells and platelet-rich plasma improve bone allograft integration. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 435, p. 62-68, Philadelphia, Jun. 2005 .

LUCARELLI, E. et al. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. **Biomaterials**, v. 24, n. 18, p. 3095-3100, Guildford, Ago. 2003.

MAN, D.; PLOSKER, H.; WINLAND-BROWN, J.E. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 107, n. 1, p. 229-237, Baltimore, Jan. 2001.

MANNAI, C. Early implant loading in severely resorbed maxilla using xenograft, autograft, and platelet-rich plasma in 97 patients. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 64, n. 9, p. 1420-1426, Copenhagen, Set. 2006.

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

MARX, R.E. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 58, n. 3, p. 300-301, Copenhagen, Mar. 2000.

MARX, R.E. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? **Implant Dentistry**, v. 10, n. 4, p. 225-228, Baltimore, Dez. 2001.

MARX, R.E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 62, n. 4, p. 489-496, Copenhagen, Abr. 2004.

MÉNDEZ, R. et al. Plasma enriquecido en plaquetas en la alveoloplastia de pacientes fisurados. **Cirugía pediátrica**, v. 19, n. 1, p. 23-26, Barcelona, Jan. 2006.

MENDONÇA-CARIDAD, 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 and Maxillofacial Surgery**, v. 35, n. 1, p. 88-91, Copenhagen, Jan. 2006.

MERKX, M.A.; FENNIS, J.P.M.; VERHAGEN, P.J.W. Reconstruction of the mandible using preshaped 2.3 mm titanium plates, autogenous particulate cortico-cancellous bone grafts and platelet rich plasma: a report on eight patients. **International Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 33, n. 8, p. 733-739, Copenhagen, Dez. 2004.

MONOV, G. et al. The effect of platelet-rich plasma upon implant stability measured by resonance frequency analysis in the lower anterior mandibles. A pilot study. **Clinical Oral Implants Research**, v. 16, n. 4, p. 461-465, Copenhagen, Ago. 2005.

MOREAU, F.M. Gamma irradiation of human bone allografts alters medullary lipids and releases toxic compounds for osteoblast-like cells. **Biomaterials**, v. 21, n. 4, p. 369-376, Guildford, Fev. 2000.

MOREAU, M.F. et al. Comparative effects of five bisphosphonates on apoptosis of macrophage cells in vitro. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 73, n. 5, p. 718-723, Mar. 2007.

MORENO, J.; FORRIOL, F. Effects of preservation on the mechanical strength and chemical composition of cortical bone: an experimental study in sheep femora. **Biomaterials**, v. 23, n. 12, p. 2615-2619, Guildford, Jun. 2002.

MUSCOLO, D.L. et al. Human leukocyte antigen matching, radiographic score, and histologic findings in massive frozen bone allografts. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 326, p. 115-126, Baltimore, Maio 1996.

NATHER, A. Musculoskeletal tissue banking in Singapore: 15 years of experience (1988-2003). **Journal of Orthopaedic Surgery (Hong Kong)**, v. 12, n. 2, p. 184-190, Hong Kong, Dez, 2004.

NISHIGUCHI, M. et al. Amelogenin is a negative regulator of osteoclastogenesis via downregulation of RANKL, M-CSF and fibronectin expression in osteoblasts. **Archives of Oral Biology**, v. 52, n. 3, p. 273-243, Oxford Mar. 2007.

NORDSTROM, D.C. et al. Immune responses to osteoarticular allografts of the knee--cytokine studies. **Archives of Orthopaedic and Traumatic Surgery**, v. 119, n. 3-4, p. 195-198, Berlin, 1999.

O'REGAN, A.W. et al. Osteopontin (Eta-1) in cell-mediated immunity: teaching an old dog new tricks. **Immunology Today**, v. 21, n. 10, p. 475-478, Cambridge, Out. 2000.

OBARRIO, J.J. et al. The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology--case reports. **International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry**, v. 20, n. 5, p. 486-497, Chicago, Out. 2000.

OGINO, Y. et al. The contribution of platelet-derived growth factor, transforming growth factor-b1, 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 Endodontology**, v. 101, n. 6, p. 724-729, St Louis, Jun. 2006.

OHYA, M. et al. Sinus floor elevation applied tissue-engineered bone. Comparative study between mesenchymal stem cells/platelet-rich plasma (PRP) and autogenous bone with PRP complexes in rabbits. **Clinical Oral Implants Research**, v. 16, n. 5, p. 622-629, Copenhagen, Oct. 2005.

OKA, S. et al. Effects of positive pressure in odontogenic keratocysts. **Journal of Dental Research**, v. 84, n. 10, p. 913-918, Washington, Oct. 2005.

OYAMA, T. et al. Efficacy of platelet-rich plasma in alveolar bone grafting. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 62, n. 5, p. 555-558, Copenhagen, Maio 2004.

PELEG, M. et al. Maxillary sinus and ridge augmentations using a surface-derived autogenous bone graft. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 62, n. 12, p. 1535-1544, Copenhagen, Dez. 2004.

PIETRZAK, W.S.; EPPLEY, B. Platelet rich plasma: biology and new technology. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 16, n. 6, p. 1043-1054, Boston, Nov. 2005.

PIKOS, M.A. Buccolingual expansion of the maxillary ridge. **Dental Implantology Update**, v. 3, n. 11, p. 85-87, Atlanta, Nov. 1992.

PIKOS, M.A. Facilitating implant placement with chin grafts as donor sites for maxillary bone augmentation – Part I. **Dental Implantology Update**. v. 6, n. 12, p. 89-92, Atlanta, Dez. 1995.

PIKOS, M.A. Chin grafts as donor sites for maxillary bone augmentation – Part II. **Dental Implantology Update**, v. 7, n. 1, p. 1-4, Atlanta, Jan. 1996.

PIKOS, M.A. Block autografts for localized ridge augmentation: Part I. The posterior maxilla. **Implant Dentistry**, v. 8, n. 3, p. 279-285, Baltimore, 1999a.

PIKOS, M.A. Alveolar ridge augmentation with ramus buccal shelf autografts and impacted third molar removal. **Dental Implantology Update**, v. 10, n. 4, p. 27-31, Atlanta, Abr. 1999b.

PIKOS, M.A. Alveolar ridge augmentation using mandibular block grafts: clinical update. **Alpha Omegan**, v. 93, n. 3, p. 14-21, Ago.-Set. New York 2000a .

PIKOS, M.A. Block autografts for localized ridge augmentation: Part II. The posterior mandible. **Implant Dentistry**, v. 9, n. 1, p.67-75, 2000b.

PIKOS, M.A. Mandibular block autografts for alveolar ridge augmentation. **Atlas of the Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, v. 13, n. 2, p. 91-107, Philadelphia, Set. 2005a.

PIKOS, M.A. Atrophic posterior maxilla and mandible: alveolar ridge reconstruction with mandibular block autografts. **Alpha Omegan**, v. 98, n. 3, p. 34-45, New York, Out. 2005b.

PIOLETTI, D.P.; KOTTELAT, A. The influence of wear particles in the expression of osteoclastogenesis factors by osteoblasts. **Biomaterials**, v. 25, n. 27, p. 5803-5808, Guildford, Dez. 2004.

RAGHOEBAR, G.M. et al. Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? **Clinical Oral Implants Research**, v. 16, n. 3, p. 349-356, Copenhagen, Jun. 2005.

REIS, S.R.A. et al. Genotoxic effect of ethanol on oral mucosa cells. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 16, n. 3, p. 221-225, São Paulo, Jul.-Set. 2002.

REIS, S.R.A. et al. Cytologic alterations in the oral mucosa after chronic exposure to ethanol. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 97-102, São Paulo, Abr.-Jun. 2006a.

REIS, S.R.A. et al. Mixoma odontogênico - avaliação imagiológica de um caso tratado com crioterapia. **Revista da Associação Brasileira de Radiologia Odontológica**, v. 7, n. 2, p. 163-168, Goiânia, Jul.-Dez, 2006b.

ROBIONY, M. et al. 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, Copenhagen, Jun. 2002.

RODRIGUEZ, A. et al. Maxillary sinus augmentation with deproteinated bovine bone and platelet rich plasma with simultaneous insertion of endosseous implants. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 61, n. 2, p. 157-163, Copenhagen, Fev. 2003.

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

ROLDÁN, J.C. et al. Sinus floor augmentation with simultaneous placement of dental implants in the presence of platelet-rich plasma or recombinant human bone morphogenetic protein-7. **Clinical Oral Implants Research**, v. 15, n. 6, p. 716-723, Copenhagen, Dez. 2004b.

SAMMARTINO, G. et al. Use of autologous platelet-rich plasma (PRP) in periodontal defect treatment after extraction of impacted mandibular third molars. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 63, n. 6, p. 766-770, Copenhagen, Jun. 2005.

SANCHEZ, M. et al. Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: a case report. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 35, n. 35, p. 1648-1652, Madison, Oct. 2003.

SARKAR, M.R. et al. Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold. **Biomaterials**, v. 27, n. 9, p. 1817-1823, Guildford, Mar. 2006.

SATO, K.; TAKAYANAGI, H. Osteoclasts, rheumatoid arthritis, and osteoimmunology. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 18, n. 4, p. 419-426, Philadelphia, Jul. 2006.

SCHLEGEL, K.A. et al. De novo bone formation using bovine collagen and platelet-rich plasma. **Biomaterials**, v. 25, n. 23, p. 5389-5393, Guildford, Oct. 2004.

SERINOLLI, M.I. et al. Estudo do método da extração da camada leucoplaquetária na produção de hemocomponentes – avaliação laboratorial. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 3, p. 167-176, São José do Rio Preto, Set. 2004.

SERRA RENOM, J.M.; MUÑOZ DEL OLMO, J.L.; GONZALO CABALLERO, C. Uso de factores de crecimiento plaquetar unidos a injertos de grasa para lipofiling facial en ritidectomía. **Cirugía Plástica Ibero-Latinoamericana**, v. 32, n. 3, p. 191-198, Madrid, Jul. – Set. 2006.

SHINODA, K. et al. Resting T cells negatively regulate osteoclast generation from peripheral blood monocytes. **Bone**, v. 33, n. 4, p. 711-720, New York, Oct. 2003.

SOARES, S. et al. Efeito de dois agentes tripanosomicidas, violeta de genciana e WR6026, na preservação de concentrado de plaquetas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 3, p. 248-251, Brasília, Mai.-Jun., 2004.

SPRECHER, D.J.; COE, P.H. Differences in bull spermograms using eosin-nigrosin stain, feulgen stain, and phase contrast microscopy methods. **Theriogenology**, v. 45, n. 4, p. 757-764, Stoneham MA, Mar. 1996.

STEVENSON, S.; SHAFFER, J.W.; GOLDBERG, V.M. The humoral response to vascular and nonvascular allografts of bone. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 326, p. 86-95, Baltimore, Maio 1996.

STRAND, V.; KAVANAUGH, A.F. The role of interleukin-1 in bone resorption in rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 43, n. Suppl, p. iii10-iii19, Oxford, Jun. 2004.

SUNDARAM, K. et al. RANK ligand signaling modulates the matrix metalloproteinase-9 gene expression during osteoclast differentiation. **Experimental Cell Research**, v. 313, n. 1, p. 455-459, New York, Jan. 2007.

TAKANO, H. et al. Induction of osteoclast-like cells derived from the synovial lavage fluids of patients with temporomandibular joint disorders. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 15, n. 3, p. 291-299, Mar. 2007.

TAKAYANAGI, H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. **Journal of Molecular Medicine**, v. 83, n. 3, p. 170-179, Heidelberg, Mar. 2005

TETTA, C. et al. Radiological assessment of bone segments for transplantation: experience at Rizzoli Orthopedic Institute. **European Journal of Radiology**, v. 57, n. 1, p. 115-118, Stuttgart, Jan. 2006.

THOR, A.; WARFVINGE, G.; FERNANDES, R. The course of a long-standing glandular odontogenic cyst: marginal resection and reconstruction with particulated bone graft, platelet-rich plasma, and additional vertical alveolar distraction. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 64, n. 7, p. 1121-1128, Copenhagen, Jul. 2006.

THORN, J.J. et al. Autologous fibrin glue with growth factors in reconstructive maxillofacial surgery. **International Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 33, n. 1, p. 95-100, Copenhagen, Jan. 2004.

THORWARTH, M. et al. Expression of bone matrix proteins during de novo bone formation using a bovine collagen and platelet-rich plasma (PRP) - an immunohistochemical analysis. **Biomaterials**, v. 26, n. 15, p. 2575-2584, Guildford, Maio 2005.

TÖZÜM, T.F. et al. Intentional replantation for a periodontally involved hopeless incisor by using autologous platelet-rich plasma. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology**, v. 101, n. 6, p. e119-e124, St Louis, Jun. 2006.

TRAN, C.N.; LUNDY, S.K.; FOX, D.A..Synovial biology and T cells in rheumatoid arthritis. **Pathophysiology**, v. 13, n. 3, p. 183-189, Amsterdam, Out. 2005.

TSAY, R.C. et al. Differential growth factor retention by platelet-rich plasma composites. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 63, n. 4, p. 521-528, Copenhagen, Abr. 2005.

TSHAMALA, M. et al. Antigenicity of cortical bone allografts in dogs and effect of ethylene oxide-sterilization. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 69, n. 1, p. 47-59, Amsterdam, Jul. 1999.

TUNES, U.R. Estudo da infecção e resposta imune a *Porphyromonas gingivalis* e do perfil imunogenético de mestiços brasileiros com periodontite crônica. 2006. 174f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

VASCONCELOS, E.; FIGUEIREDO, A.C.; SEGATCHIAN, J. Quality of platelet concentrates derived by platelet rich plasma, buffy coat and apheresis. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 29, n. 1, p. 13-16, Oxford, Ago. 2003.

VENDRAMINI, F.S. et al. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de preparo e utilização em cirurgia plástica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 33, n. 1, p. 24-28, Rio de Janeiro, Jan.-Fev. 2006.

WARD, W.G. et al. Human leukocyte antigen sensitization after structural cortical allograft implantations. **Orthopaedics and Related Research**, v. 435, p. 31-35, Philadelphia, Jun. 2005.

WEIBRICH, G. et al. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. **Journal Of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, v. 30, n. 2, p. 97-102, London, Abr 2002a.

WEIBRICH, G. et al. Curasan PRP kit vs. PCCS PRP system collection efficiency and platelet counts of two different methods for the preparation of platelet-rich plasma. **Clinical Oral Implants Research**, v. 13, n. 4, p. 437-443, Copenhagen, Ago. 2002b.

WEIBRICH, G. et al. The Harvest Smart PRP system versus the Friadent-Schutze platelet-rich plasma kit. **Clinical Oral Implants Research**, v. 14, n. 2, p. 233-239, Copenhagen, Abr. 2003a.

WEIBRICH, G. et al. Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. **Clinical Oral Implants Research**, v. 14, n. 3, p. 357-362, Copenhagen, Jun. 2003b.

WEIBRICH, G. et al. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. **Bone**, v. 34, n. 4, p. 665-671, New York, Abr 2004.

WEIN, M.N.; JONES, D.C.; GLIMCHER, L.H. Turning down the system: counter-regulatory mechanisms in bone and adaptive immunity. **Immunological Reviews**, v. 208, p. 66-79, Copenhagen, Dez. 2005.

WHITMAN, D.H.; BERRY, R.L. A technique for improving the handling of particulate cancellous bone and marrow grafts using platelet gel. **Journal Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 56, n. 10, p. 1217-1218, Copenhagen, Out. 1998.

WHITMAN, D.H.; BERRY, R.L.; GREEN, 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. 1294-1295, Copenhagen, Nov. 1997.

WILTFANG, J. et al. Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. An animal experiment. **Clinical Oral Implants Research**, v. 15, n. 2, p. 187-193, Copenhagen, Abr. 2004.

WINSLOW, M.M. et al. Calcineurin/NFAT signaling in osteoblasts regulates bone mass. **Developmental Cell**, v. 10, n. 6, p. 771-782, Cambridge, Jun. 2006.

WYZGA, N. et al. Effects of activated T cells on osteoclastogenesis depend on how they are activated. **Bone**, v. 35, n. 3, p. 614-620, New York, Set. 2004.

YAMADA, Y. et al. Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. **Clinical Oral Implants Research**, v. 15, n. 5, p. 589-597, Copenhagen, Out. 2004.

YAMAMOTO, K. et al. A comparative study of the effect of autologous platelet-rich plasma and fresh autologous whole blood on haemostasis after cardiac surgery. **Cardiovascular Surgery**, v. 4, n. 1, p. 9-14, Oxford, Fev. 1996.

YAZAWA, M. et al. Basic studies on the bone formation ability by platelet rich plasma in rabbits. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 15, n. 3, p. 439-446, Boston, Maio 2004a.

YAZAWA, M. et al. Influence of antiplatelet substances on platelet-rich plasma. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 62, n. 6, p. 714-718, Copenhagen, Jun. 2004b.

YIN, D. et al. IFN-gamma production is specifically regulated by IL-10 in mice made tolerant with anti-CD40 ligand antibody and intact active bone. **Journal of Immunology**, v. 170, n. 2, p. 853-860, Baltimore, Jan. 2003.

YIN, D. et al. Intact active bone transplantation synergizes with anti-CD40 ligand therapy to induce B cell tolerance. **Journal of Immunology**, v. 168, n. 10, p. 5352-5358, Baltimore, Maio 2002.

YUN-CHOI, H.S.; PARK, K.M.; PYO, M.K. Epinephrine induced platelet aggregation in rat platelet-rich plasma. **Thrombosis Research**, v. 100, n 6, p. 511-518, Elmsford, Dez. 2000.

ZEHNDER, J.L.; LEUNG, L.L. Development of antibodies to thrombin and factor V with recurrent bleeding in a patient exposed to topical bovine thrombin. **Blood**, v. 76, n. 19, p. 2011-2016, Washington DC , Nov. 1990.

ZHU, S.J. et al. A comparative histologic analysis of tissue-engineered bone using platelet-rich plasma and platelet-enriched fibrin glue. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 102, n. 2, p. 175-179, St Louis, Ago. 2006.



### ***APÊNDICE A - Produtos da tese (artigos escritos)***

Os artigos que seguem já foram enviados para as revistas citadas e estão em fase de tramitação.

#### ***Artigos de atualização***

***Título:*** Efeitos biológicos do plasma rico em plaquetas  
***Revista:*** Revista das Ciências Médicas e Biológicas  
***ISSN:*** 1677-5090

#### ***Artigos de revisão***

***Título:*** Osteoimunologia aplicada às reconstruções dos maxilares  
***Revista:*** Revista Odontociência  
***ISSN:*** 0102-9460

***Título:*** Análise dos diferentes protocolos para preparação do plasma rico em plaquetas  
***Revista:*** Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial  
***ISSN:*** 1807-8443

#### ***Artigos de pesquisa***

***Título:*** Evaluation of factors that can modify platelet rich plasma properties  
***Revista:*** Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics  
***ISSN:*** 1079-2104

Os artigos que seguem estão em finalização e serão encaminhados para as revistas citadas relacionadas.

#### ***Artigos de pesquisa***

***Tema:*** *Artigo desenvolvido a partir da análise do comportamento biológico dos enxertos aposicionados*  
***Revista:*** Journal of Oral and Maxillofacial Surgery  
***ISSN:*** 0278-2391

***Tema:*** *Artigo desenvolvido a partir da análise do congelamento do osso*  
***Revista:*** Bone  
***ISSN:*** 8756-3282

***APÊNDICE B - Produtos da tese (apresentações em congressos)***

***Os resultados do protocolo de padronização do PRP já foram apresentados nos seguintes eventos:***

ANDRADE, M.G.S.; SA, C.N.; NEVES, M.L.; RODRIGUES, L.E.; SADIGURSKY, M. Discussão de um protocolo para avaliação da plaquetometria do plasma rico em plaquetas. In: Vi Seminário Estudantil de Pesquisa de Pós-graduação XXIV Seminário Estudantil de Pesquisa, 2005, Salvador. Anais do Vi Seminário Estudantil de Pesquisa de Pós-graduação XXIV Seminário Estudantil de Pesquisa. Salvador : EDUFBA, 2005. p. 75-75.

ANDRADE, M.G.S.; MARCHIONNI, A.M.T.; SADIGURSKY, M. Discussão sobre a plaquetometria do plasma rico em plaquetas. In: XVIII Congresso Brasileiro de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, 2005, Ouro Preto. Revista Brasileira de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial. São Paulo : Colégio Brasileiro de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, 2005. v. 2. p. 84-84.

***Os resultados da avaliação do comportamento biológico do PRP e os efeitos do congelamento sobre a histologia do osso do íliaco foram aceitos pela comissão científica do seguinte congresso:***

<http://www.cobrac2007.com.br/>

XIX COBRAC – Congresso Brasileiro de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial  
15 a 18 de agosto de 2007  
Florianópolis – SC

*ANEXO - Parecer do comitê de ética*



**FUNDAÇÃO BAHIANA PARA DESENVOLVIMENTO DAS CIÊNCIAS**  
**ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Salvador, 20 de março de 2007

O projeto de pesquisa protocolado nesta comissão sob nº 02/2006, intitulado ***Avaliação da eficácia do plasma rico em plaquetas no processo de reparo ósseo em lagomorfos***, a ser desenvolvido pela professor ***Miguel Gustavo Setúbal Andrade*** foi aprovado pela ***Comissão de Ética no Uso de Animais*** da Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Miguel Gustavo Setúbal Andrade', is written over the printed name of the president of the ethics committee.

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação  
Bahiana para Desenvolvimento das Ciências