

O PDGF estimula a mitogênese de células mesenquimais e a angiogênese por indução de mitose de células endoteliais. O TGF- β ativa os fibroblastos e pré-osteoblastos para iniciar a mitose e promover a diferenciação em osteoblastos (Lynch *et al.*, 1999).

A extensão e a atividade do reparo ósseo dependem da proliferação e diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, que irão secretar TGF- β e o IGF e da quimiotaxia e ativação de macrófagos, que irão substituir as plaquetas na liberação de fatores de crescimento. O macrófago é atraído pelo PDGF e pelo gradiente de oxigenação entre o espaço morto e o tecido adjacente. As células mesenquimais irão secretar o TGF- β e o IGF para continuar a auto-estimulação da formação óssea. A partir da fase inicial de osso imaturo ocorre um processo de reabsorção e aposição ósseas, levando a formação de um osso maduro (Lynch *et al.*, 1999).

Assim, o tecido ósseo quando lesado por trauma ou por procedimentos cirúrgicos passa por fase inflamatória inicial, seguida de reparo e remodelação (Ten Cate, 2001).

O reparo é um processo complexo com eventos celulares e extracelulares, sendo influenciado por vários fatores tais, como: tipo de osso (cortical ou trabecular), local e severidade da lesão, presença de infecção, fixação durante o reparo, idade, estado de saúde geral e nutricional dos indivíduos. O reparo bem sucedido é aquele com reconstituição da continuidade e funções teciduais originais (Davies, 2000; Ten Cate, 2001).

2.3 Enxertos Ósseos.

Apesar do tecido ósseo apresentar alto potencial de regeneração, este aspecto pode não se apresentar em defeitos de grandes dimensões. Nestes casos é necessária a utilização de enxertos para favorecer a regeneração óssea (Gleizal & Beziat, 2007).

Os enxertos podem promover a formação de novo osso através de três mecanismos: osteogênese, osteoindução e osteocondução. Osteogênese é a propriedade de formação de novo tecido ósseo por células ósseas transplantadas. Osteoindução é a propriedade de formação de novo osso pelas

células osteoprogenitoras do leito receptor sob a influência de um agente indutivo do enxerto. Osteocondução é a propriedade de produção de novo osso por proliferação e migração de células ósseas do leito receptor através da superfície do enxerto, que age como arcabouço (Marx & Stevens, 1997; Gao *et al.*, 2006).

Os enxertos, quanto à sua origem podem ser autógenos, homogêneos (alógenos), heterogêneos (xenogêneos) e aloplásticos. O enxerto autógeno é retirado do próprio indivíduo e apresenta propriedades de osteogênese, osteoindução e osteocondução. Este enxerto fornece células ósseas imunocompatíveis, essenciais à fase da osteogênese, sendo o de melhor previsibilidade (Ellis, 1996; Pradel *et al.*, 2006). Porém, procedimentos de enxertia autógena aumentam o tempo e o custo da cirurgia e requerem um segundo local cirúrgico, aumentando a morbidade (Sanchez *et al.*, 2003).

Os enxertos homogêneos são obtidos de outro indivíduo da mesma espécie, sendo os mais utilizados o enxerto ósseo homogêneo seco congelado e o enxerto homogêneo desmineralizado seco congelado. Estes enxertos são osteocondutores, mas há controvérsias quanto ao seu potencial osteoindutivo (Ellis, 1996), além do risco de contaminação/infecção (Marthy & Richter, 1998).

Os enxertos xenogêneos são obtidos de uma espécie e transplantados à outra. Esses enxertos são osteocondutores e as diferenças antigênicas são mais pronunciadas do que no enxerto homogêneo (Ellis, 1996).

Os materiais aloplásticos têm origem sintética ou quase totalmente sintética, são osteocondutores. Sua composição varia entre cerâmicas, vidros bioativos e polímeros (Barboza & Caúla, 2002).

Enxertos xenogêneos e materiais aloplásticos têm mostrado boa biocompatibilidade e potencial osteocondutivo, mas os resultados clínicos com estes substitutos ósseos são pouco previsíveis (Sanchez *et al.*, 2003).

O avanço nas pesquisas sobre cicatrização tecidual e o desenvolvimento das técnicas reconstrutivas transformaram os transplantes ósseos autógenos em procedimentos previsíveis e passíveis de aplicação clínica (Bezerra & Lenharo, 2002). Esses enxertos são considerados padrão-ouro para as técnicas reconstrutivas devido o seu excelente potencial de revascularização, compatibilidade imunológica e capacidade osteogênica efetiva (Block *et al.*, 1998; Simion & Fontana, 2004).

Os enxertos autógenos são geralmente removidos da crista ilíaca, costela, calvária, tibia e sítios intrabucais como túber da maxila e região retromolar da mandíbula (Boyne, 1997). A forma de utilização dos enxertos é direcionada ao aproveitamento clínico e permite sua classificação em enxertos em bloco e particulado.

Os enxertos em bloco ainda podem ser classificados em cortical, cortico-esponjoso e esponjoso dependendo da proporção de osso cortical e medular que o bloco ósseo possui (Topazian, 1975).

Os enxertos particulados estão associados ao uso dos princípios da regeneração óssea guiada, assim como o conhecimento e manejo adequados de membranas, telas de titânio e estabilizadores (tachas/parafusos) (Bezerra & Lenharo, 2002).

A forma de apresentação dos enxertos tem relevância clínica, mas não determina a seleção da técnica de utilização, pois tanto os enxertos particulados quanto os em bloco podem ser aproveitados em técnicas semelhantes, a depender da morfologia do defeito ósseo em tratamento (Bezerra & Lenharo, 2002).

Independente da forma de enxerto utilizada (bloco ou particulado), células vivas transplantadas desempenham um papel importante na osteogênese (Burwell, 1964; Gray & Elves, 1979; 1981), tanto no interior como na superfície do enxerto (Gray & Elves, 1979).

Enxertos desprovidos de células ósseas, implantados em sítios subcutâneo ou muscular, produzem pouco ou nenhum tecido ósseo nas primeiras semanas, quando comparados a enxertos com células ósseas viáveis (Gray & Elves, 1979).

2.4 Conservação de Enxerto no Período Trans-Cirúrgico.

O enxerto e seu leito receptor devem ser preparados de modo a possibilitarem máxima sobrevivência e proliferação das células ósseas para que estas promovam o reparo. O tamanho e forma do enxerto também são importantes (Bassett, 1972). Durante o procedimento cirúrgico, entre a remoção do enxerto e sua fixação no leito receptor geralmente transcorre um período, que varia de minutos a horas (Gray & Elves, 1981).

O tempo que o enxerto permanece fora do organismo deve ser o menor possível para minimizar a morte das células ósseas. Entretanto, determinados procedimentos cirúrgicos podem requerer maior tempo de armazenagem antes da implantação no leito receptor (Mcanulty, 1999).

Diversos meios de conservação são pesquisados como meios de armazenamento, tais como: solução salina (Bohr *et al.*, 1968; Marx *et al.*, 1979; Gray & Elves, 1981; Steiner & Ramp, 1988; Mcanulty, 1999; Laursen *et al.*, 2003; Dechichi *et al.*, 2004; Moura *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2006), água destilada (Marx *et al.*, 1979; Steiner & Ramp, 1988), plasma (Marx *et al.*, 1979), sangue (Mcanulty, 1999; Ramos *et al.*, 2006), plasma pobre em plaquetas (Dechichi *et al.*, 2004; Ramos *et al.*, 2006), solução de dextrose lactato 5% (Marx *et al.*, 1979; Steiner & Ramp, 1988; Ramos *et al.*, 2006), no próprio ar (meio seco) (Puranen, 1966; Bohr *et al.*, 1968; Gray & Elves, 1981; Laursen *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2006) e diversos meios de cultura (Marx *et al.*, 1979; Gray & Elves, 1981; Steiner & Ramp, 1988; Mcanulty, 1999).

Estudos *in vitro* têm mostrado que o armazenamento do enxerto em soro reduz o número de células viáveis (Marx *et al.*, 1979; Mcanulty, 1999; Dechichi *et al.*, 2004; Moura *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2006) e o metabolismo celular (Steiner & Ramp, 1988), porém estudos avaliando a neoformação óssea *in vivo* (Bohr *et al.*, 1968) e a proliferação de osteoblastos *in vitro* (Laursen *et al.*, 2003) não observaram diferenças em relação ao enxerto controle.

O armazenamento em meio seco reduz a proliferação de osteoblastos *in vitro* (Laursen *et al.*, 2003) e a neoformação óssea *in vivo* (Bohr *et al.*, 1968), porém Gray e Elves (1981) não observaram diferença na incorporação de cloreto de estrôncio pelo osteócitos em 3 horas de armazenagem.

O plasma pobre em plaquetas é composto por plasma acelular, formado por moléculas plasmáticas (principalmente fibrinogênio), um número reduzido de plaquetas e constitui 40% do volume total do sangue (Dohan *et al.*, 2006). É um derivado da centrifugação do sangue na obtenção do PRP que estimula a proliferação celular em meios de cultura (Seher A, 2003) porém, geralmente não é utilizado em procedimentos regenerativos.

A utilização do PPP, derivado da centrifugação para obtenção do PRP, foi sugerida como meio alternativo de armazenagem de enxertos. Enxertos armazenados em PPP apresentaram valores de osteócitos próximos ao

enxerto controle, preservando um maior número destas células quando comparado ao grupo soro (Dechichi *et al.*, 2004; Ramos *et al.*, 2006).

Outros meios de armazenamento de enxertos têm sido estudados, tais como água destilada (Steiner & Ramp, 1988), ringer lactato (Marx *et al.*, 1979; Steiner & Ramp, 1988; Ramos *et al.*, 2006), soluções e meios de cultura diversos (Marx *et al.*, 1979; Gray & Elves, 1981; Steiner & Ramp, 1988; Mcanulty, 1999) e sangue (Mcanulty, 1999; Ramos *et al.*, 2006). Os resultados destes estudos não têm justificado a aplicação clínica desses meios no armazenamento de enxertos.

O comportamento biológico *in vivo* de enxertos armazenados em diferentes meios no período trans-cirúrgico ainda está pouco esclarecido, principalmente quanto à revascularização, redução de células viáveis transplantadas e ao efeito destes fatores na ativação de osteoclastos e conseqüente redução da área do enxerto.

3. PROPOSIÇÃO:

O objetivo deste estudo foi realizar análise histomorfométrica de enxertos ósseos autógenos *in vivo*, mantidos em soro, meio seco e PPP no período trans-cirúrgico.

4. MATERIAL E MÉTODOS:

4.1 Animais

Neste estudo foram utilizados 18 coelhos fêmeas (*Oryctolagus cuniculus*), da raça Nova Zelândia, com 5 meses de idade, pesando entre 3000g e 4500g. De cada animal foram removidos 2 fragmentos ósseos, um do parietal direito e outro do esquerdo. Um fragmento removido foi imediatamente fixado na região de ângulo mandibular direito (grupo controle). O outro foi armazenado por 30 minutos em um dos seguintes meios: soro fisiológico (NaCl 0,9%)(grupo soro), meio seco (grupo seco) e plasma pobre em plaquetas (grupo PPP) e, em seguida, parafusado em local simétrico ao enxerto controle, no mesmo animal.

Os coelhos foram mantidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia – UFU e tratados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (Cardoso, 2003), durante todo o experimento.

4.2 Obtenção do plasma pobre em plaquetas

O plasma pobre em plaquetas (PPP) foi obtido através do protocolo de obtenção do PRP da UFSC (Gasperini, 2003). Através de um escalpe à vácuo foi feita a punção na artéria auricular média, obtendo 5 mL de sangue em um tubo com anticoagulante (citrato de sódio). O tubo foi submetido a uma centrifugação de 10 minutos a 236G em centrífuga (Excelsa - modelo 206-BL-Fanem). Ocorreu uma divisão dos elementos constituintes do sangue em duas partes, uma superior de cor amarelada (plasma) e outra inferior de cor vermelha (eritrócitos). Todo o plasma e 2 mm da porção mais superficial da zona vermelha foram pipetados e acondicionados em tubos de ensaio estéreis. Este tubo foi submetido a uma segunda centrifugação de 10 minutos a 236G. Em seguida, removeu-se 80% da parte superior do plasma correspondente ao plasma pobre em plaquetas, que foi utilizado para armazenar o enxerto ósseo. Os 20% restantes, correspondentes ao PRP, foram dispensados.

4.3 Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados por via intramuscular com ketamina (25mg/kg) / xylazina à 2% (10mg/kg) / acepran (0,2mg/kg) / midazolan (0,2mg/kg) e anestesia local com 0,9 ml de prilocaína com felipressina. Dose única profilática de antibiótico com enrofloxacin (0,1mg/kg) foi administrada por via intravenosa.

Com o coelho em decúbito ventral, foi realizada tricotomia e antissepsia com solução de Povidine tópico® na região da calvária. Esta região recebeu anestesia local e foi feita uma incisão na linha média (Figura 1), que se estendeu do osso frontal ao occipital. O músculo e periósteo foram descolados, expondo apenas o osso parietal direito (Figura 2). Utilizando uma broca trefina de 8 mm, sob irrigação abundante com soro fisiológico (Figura 3), foi removido um fragmento do osso parietal, que permaneceu por 30 minutos em um dos seguintes meios: solução salina (grupo soro), meio seco (grupo seco) e plasma pobre em plaquetas (grupo PPP). Os dois leitos receptores (mandíbula – lados esquerdo e direito) foram preparados através de incisões bilaterais na região submandibular, desde a borda posterior da mandíbula até a depressão da veia facial profunda (Figura 4), sendo descolados músculo e periósteo (Figura 5).

O periósteo do osso parietal esquerdo foi descolado e outro fragmento foi removido e imediatamente fixado no ângulo da hemi-mandíbula esquerda (lado controle) com parafuso de titânio de 1.2 mm (Figura 6). Decorridos 30 minutos de armazenamento, o outro fragmento ósseo foi fixado no ângulo da hemi-mandíbula direita (lado experimental) no mesmo animal. Os sítios cirúrgicos foram suturados com fio Nylon 5-0 (Figura 7 e 8).

Após 4 semanas da cirurgia, os animais foram anestesiados com tiopental 2,5% e sacrificados com dose excessiva endovenosa de cloreto de potássio a 19%. As áreas do leito receptor com enxerto foram removidas com broca 702 em alta rotação sob irrigação abundante com soro fisiológico e fixadas em formol a 10% em PBS por, 48 horas.

4.4 Processamento Histológico e Análise Histomorfométrica

As áreas removidas foram desmineralizadas em EDTA a 4,13% por 30 dias. Em seguida, o parafuso de titânio foi removido e as peças foram processadas pela técnica de rotina para inclusão em parafina. Com o auxílio de um micrótomo foram obtidos cortes semi-seriados com 5 µm de espessura a partir da região central da perfuração. De cada espécime, foram obtidos 12 cortes corados alternadamente em Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricrômico de Mallory. Destes, foram selecionadas 3 lâminas em cada coloração, sendo analisadas 6 lâminas do lado controle e 6 do lado experimental. Os osteoclastos da superfície do enxerto, os vasos na matriz óssea e a área total do enxerto foram quantificados.

Os osteoclastos presentes na superfície do enxerto foram contados utilizando objetiva de 40X, nas lâminas coradas em HE. Os vasos da matriz óssea do enxerto foram contados com objetiva 10X nas lâminas coradas em HE. As imagens histológicas das lâminas coradas em Mallory foram capturadas com objetiva de 4X utilizando o microscópio binocular Olympus BX 40 acoplado a câmera Olympus OLY 200 ligada a um computador PC através de uma placa digitalizadora Data Translation 3153. As imagens parciais do enxerto foram unidas e foram removidas as áreas de tecido mole e osso do leito receptor através do software Photoshop CS2 ® (Figura 9).

Com o auxílio do programa HL Image 2005++ a área do enxerto foi delimitada com a ferramenta *drawn* e foi medida com a ferramenta *measurement* (Figura 10).

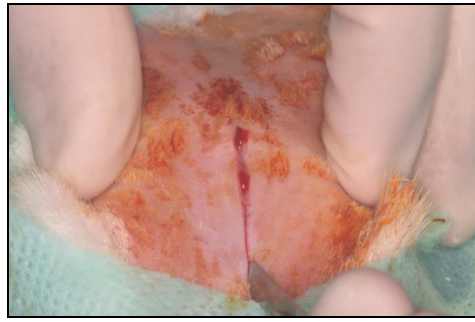


Figura 1. Incisão na linha média.

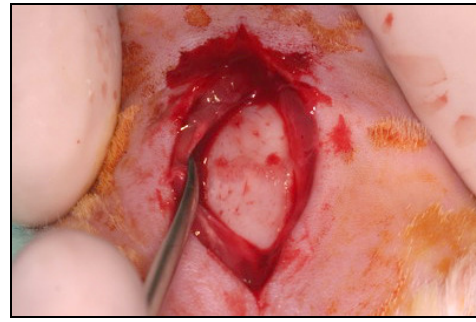


Figura 2. Exposição do osso parietal.

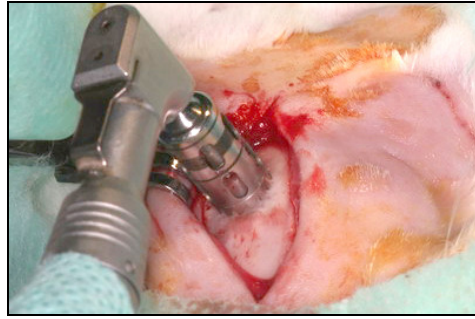


Figura 3. Remoção do fragmento com broca trefina de 8 mm.



Figura 4. Incisão na região submandibular.

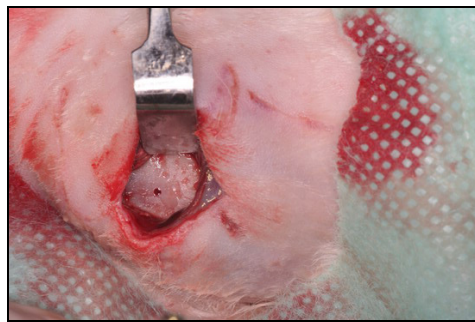


Figura 5. Leito receptor após descolamento do periósteo e preparado para receber o enxerto.

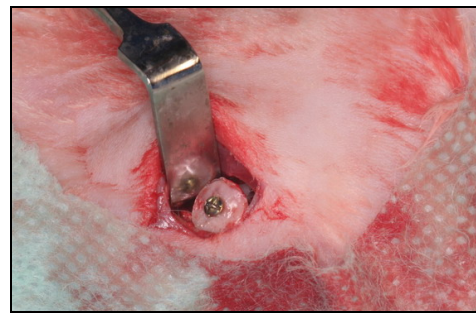


Figura 6. Enxerto fixado no leito receptor com parafuso de 1.2 mm.



Figura 7. Sutura do plano muscular.

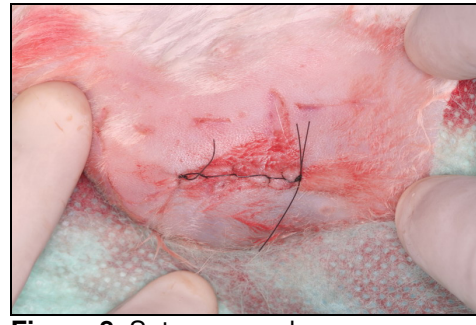


Figura 8. Sutura em pele.

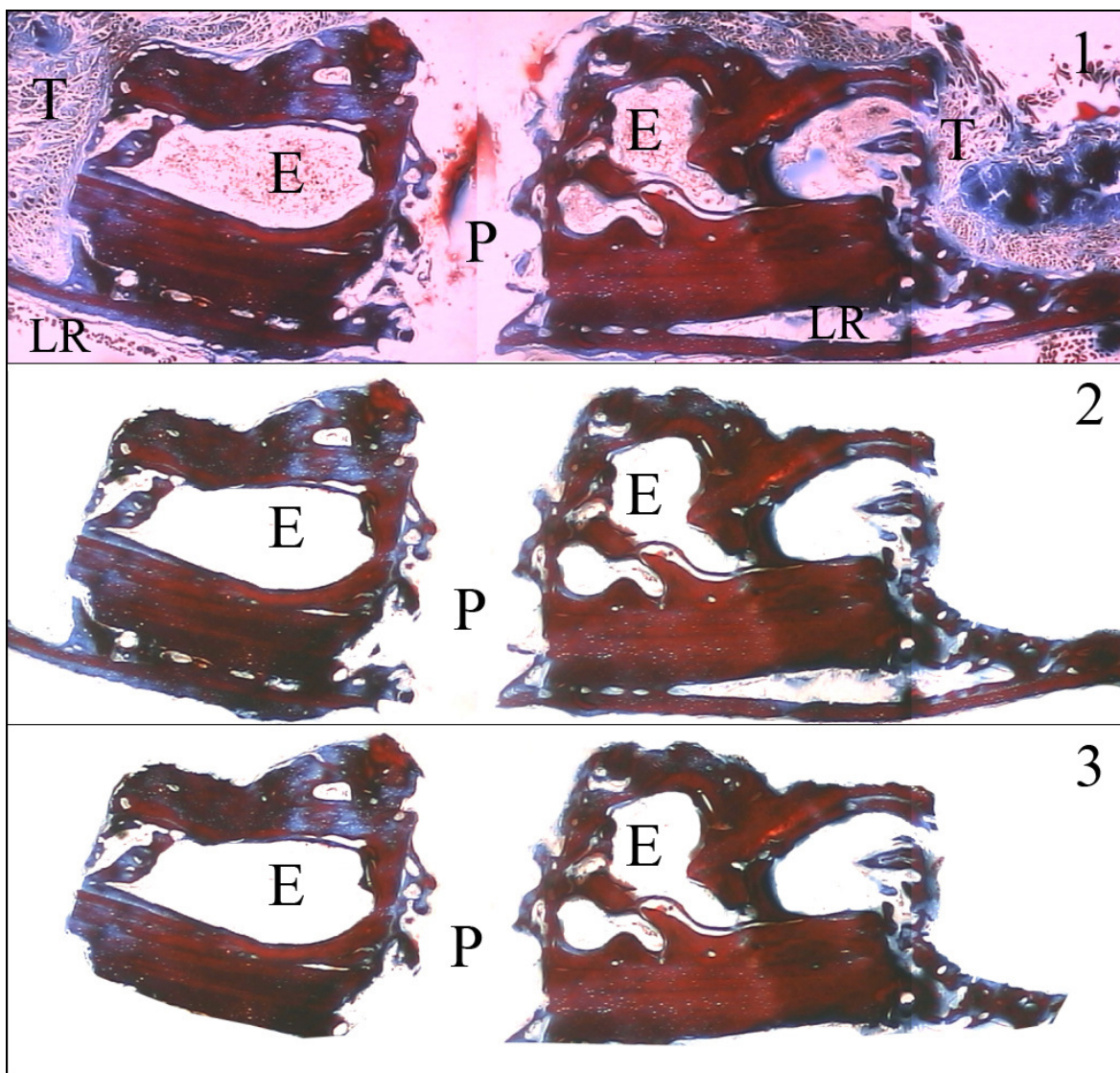


Figura 9. Fotomicrografia do enxerto após união das imagens evidenciando tecido mole (T), enxerto (E), área do parafuso (P) e leito receptor (LR) (1), após a remoção do tecido mole (2) e após remoção do osso do leito receptor (3).

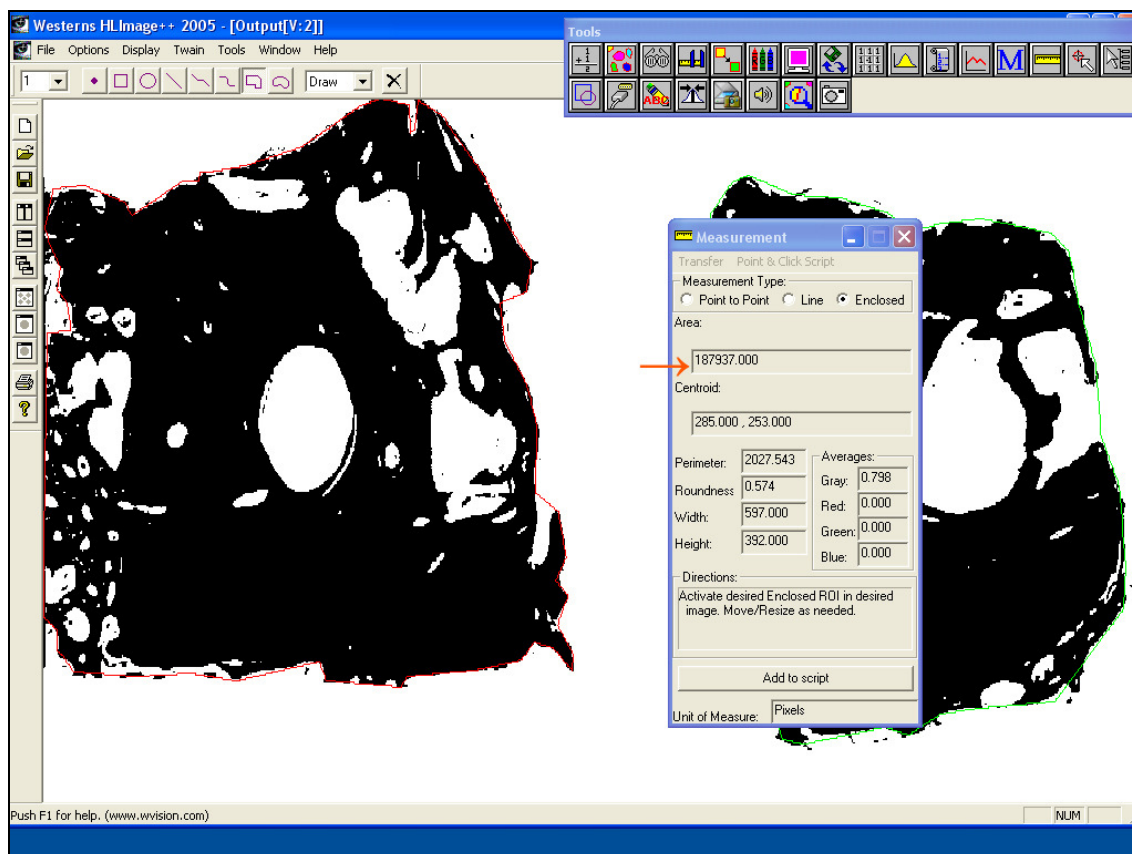


Figura 10. Imagem com delimitação da área da matriz do enxerto (em vermelho) com a ferramenta drawn e valor em pixel da área (seta).

4.5 Análise estatística

Os valores médios obtidos da contagem das 3 lâminas em cada um dos parâmetros analisados (osteoclastos, vasos e área total do enxerto) foram analisados utilizando o teste de ANOVA 1 (1 critério) verificando que a distribuição foi normal. Em seguida, os dados foram analisados pelo teste t pareado para as comparações entre os grupos experimental e controle e o teste ANOVA 1 (1 critério), com pós-teste de Tukey foram utilizados para a comparação entre os grupos experimentais, considerando significativas as probabilidades estatísticas de igualdade entre os grupos menores que 5%.

5. RESULTADOS

A análise histológica em todos os grupos apresentou enxerto revascularizado, preservado e integrado ao leito receptor com presença de neoformação óssea, nos lados controle e experimental (Figura 11, 12, 13, 14).

O número médio de osteoclastos do grupo soro foi maior ($p=0,02$), quando comparado ao grupo controle (Tabela 1). Não houve diferença estatística significativa no número de osteoclastos entre os grupos experimental e controle no PPP ($p=0,24$) e seco ($p=0,97$). Também não houve diferença estatística significativa ($p=0,67$) no número de osteoclastos entre os grupos experimentais.

O número médio de vasos no grupo soro foi menor ($p=0,03$) quando comparado ao grupo controle. Não houve diferença estatística significativa no número médio de vasos do grupo PPP ($p=0,39$) e seco ($p=0,06$) em relação ao grupo controle. O grupo PPP apresentou maior média de número de vasos ($p<0,001$) que os lados experimentais dos grupos soro e seco, que não apresentaram diferenças entre si (Tabela 1).

A área total do enxerto não mostrou diferença entre o grupo controle e o grupos soro ($p=0,29$), seco ($p=0,06$) e PPP ($p=0,97$). O grupo PPP apresentou maior área de enxerto que os grupos seco e soro ($p<0,001$), que não apresentaram diferenças entre si (Tabela 1).

I

Tabela 1 – Valores médios da contagem do número de osteoclastos, vasos e área do enxerto. Resultados expressos em média e desvio padrão.

Grupos	Osteoclastos		Vasos		Área do enxerto (pixels)	
	Experimental	Controle	Experimental	Controle	Experimental	Controle
Seco (n=6)	8,4 ± 3,8 ^a	8,3 ± 4,9 ^b	46,9 ± 8,7 ^c	62,2 ± 18,2 ^d	199.158.306 ± 39.484.300 ^e	280.723.556 ± 45.639.061 ^f
Soro (n=6)	8 ± 2,1 ^a	6,4 ± 1,9 ^b	50,7 ± 12,5 ⁱ	60,7 ± 10,6 ^j	236.775.556 ± 41.941.510 ^k	249.063.111 ± 35.784.380 ^l
PPP (n=6)	6,6 ± 4,2 ^m	4,8 ± 3,5 ⁿ	91,4 ± 20,5 ^o	74,0 ± 30,2 ^p	331.481.833 ± 53.746.975 ^q	330.036.500 ± 85.579.560 ^r

*Diferenças estatisticamente significantes foram obtidas com as seguintes comparações: g versus h (p=0,02); i versus j (p=0,03); o versus i (p=0,01); o versus c (p=0,01); q versus k (p=0,001); q versus e (p=0,001).

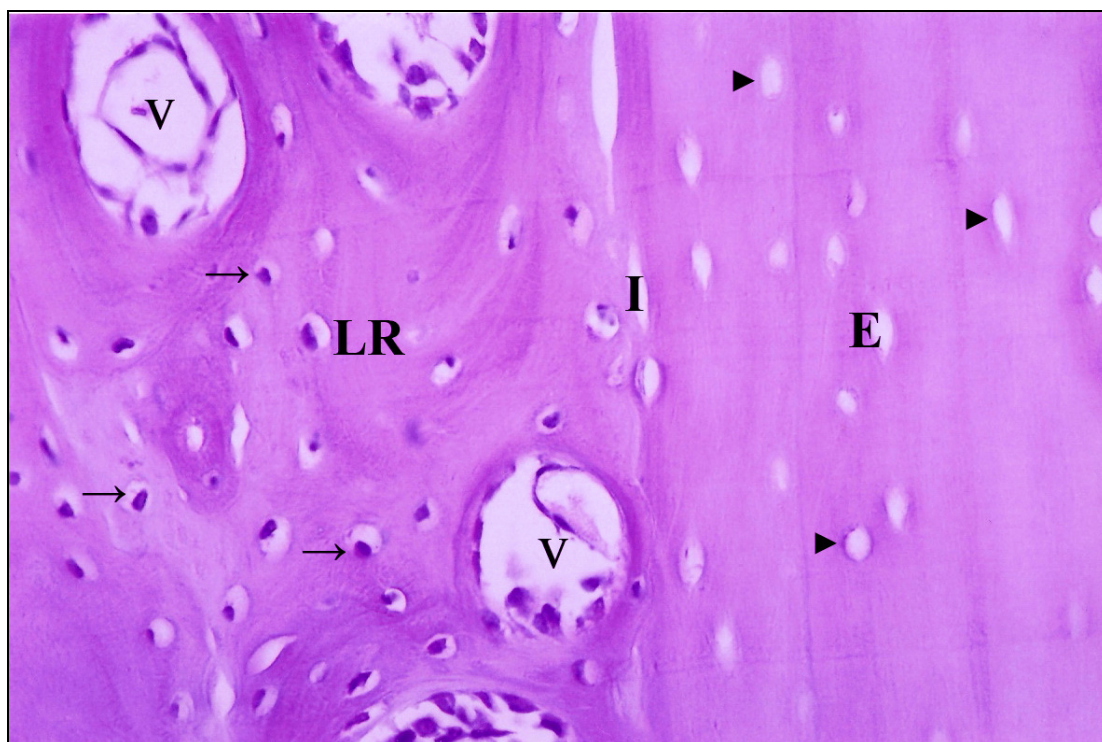


Figura 11. Fotomicrografia da interface (I), enxerto (E) e leito receptor (LR), evidenciando a integração do enxerto, canais vasculares (V), osteócitos (setas) lacunas de osteócitos (cabeça de seta). Hematoxilina e Eosina, ampliação original – 40x.

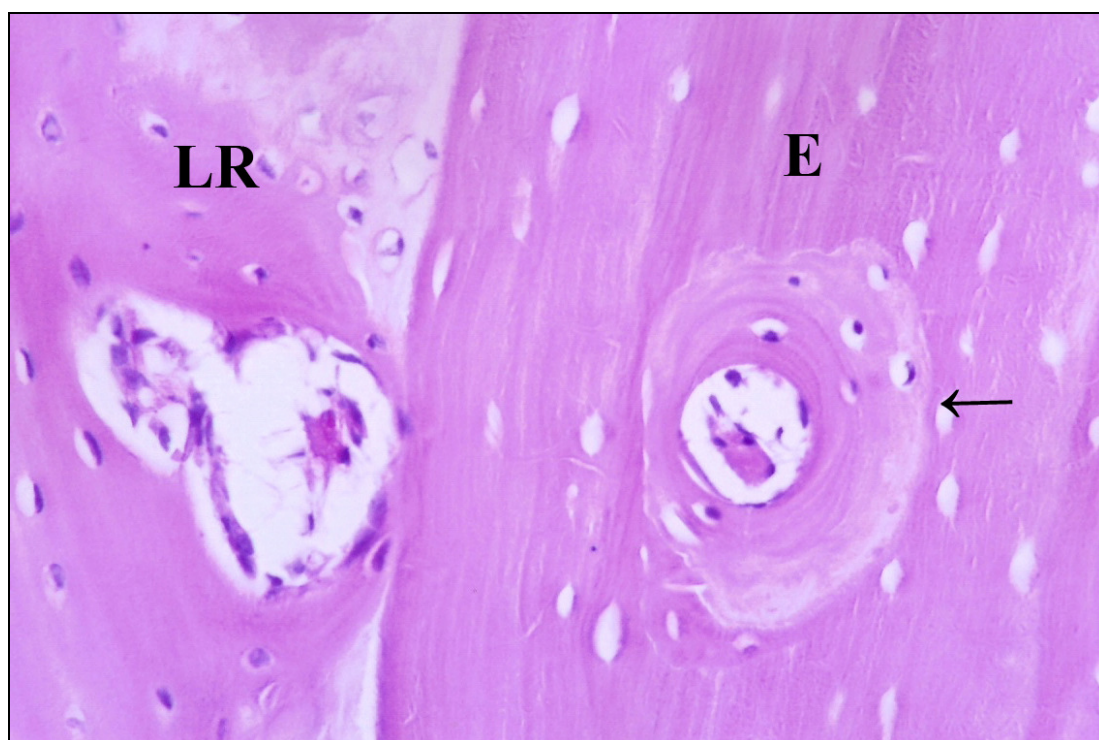


Figura 12. Fotomicrografia da interface enxerto (E) leito receptor (LR), evidenciando a revascularização do enxerto, constituindo pequeno sistema de Havers (seta). Hematoxilina e Eosina, ampliação original – 40x.

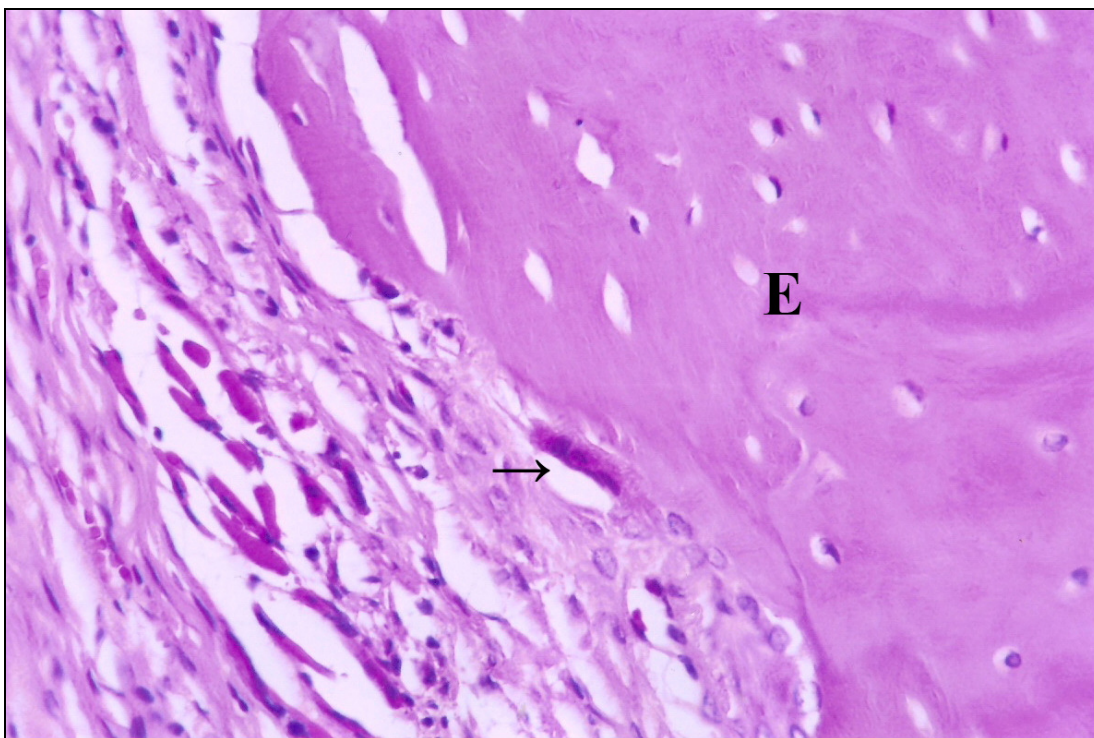


Figura 13. Fotomicrografia da superfície do enxerto (E) com presença de osteoclasto (seta). Hematoxilina e Eosina, ampliação original 40x.

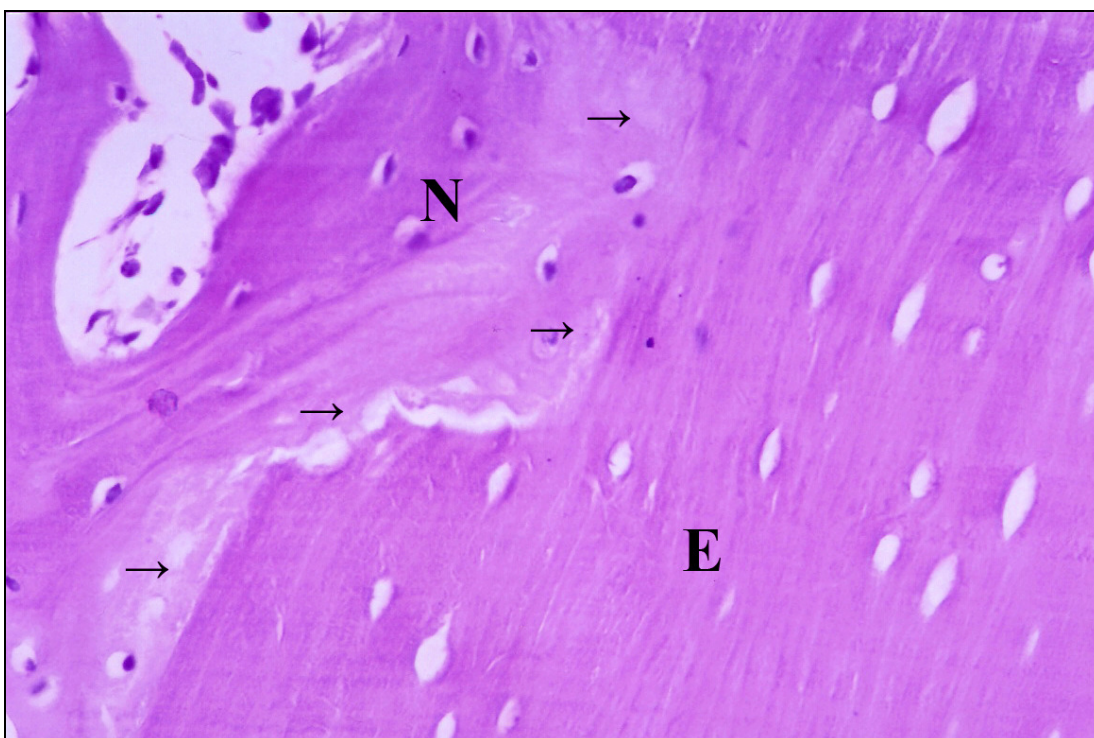


Figura 13. Fotomicrografia da cortical do enxerto evidenciando remodelação (setas) do enxerto (E) com áreas de neoformação óssea (N). Hematoxilina e Eosina, ampliação original 40x.

6. DISCUSSÃO

A manipulação cuidadosa do enxerto autógeno durante o período cirúrgico é importante para que ele mantenha suas características biológicas, em especial a propriedade de osteogênese (Burwell, 1964). O presente estudo avaliou a influência do meio de armazenagem, durante o período trans-cirúrgico, sobre a quantidade de osteoclastos, vascularização e área total do enxerto. Os coelhos foram escolhidos como modelos experimentais pois são de fácil manipulação e possuem volume suficiente de sangue para a obtenção do PRP e PPP (Kim *et al.*, 2001).

A manutenção do volume e a remodelação precoce do enxerto são fatores importantes que confirmam o sucesso do procedimento cirúrgico. A perda precoce de volume implica em grande possibilidade de uma nova intervenção (Alberius *et al.*, 1996). O meio de armazenagem e o tempo que o enxerto permanece fora do organismo podem interferir em seu comportamento biológico (Bohr *et al.*, 1968; Laursen *et al.*, 2003).

O armazenamento do enxerto em soro reduz o número de osteócitos (Dechichi *et al.*, 2004; Moura *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2006) e a morte de osteócitos *in vivo* induz o recrutamento de osteoclastos, células responsáveis pela reabsorção do enxerto (Gu *et al.*, 2005). No presente estudo, o grupo soro apresentou maior número de osteoclastos e menor quantidade de vasos em relação ao grupo controle, porém esses fatores não interferiram de forma significativa na área total do enxerto. O armazenamento em soro por períodos inferiores a 2 horas parece não interferir na proliferação *in vitro* de osteoblastos (Laursen *et al.*, 2003) e na osteogênese *in vivo* (Bohr *et al.*, 1968), assim a preservação de osteoblastos pode ter contribuído na manutenção do enxerto.

O grupo seco mostrou tendência na redução da área total do enxerto ($p=0,06$) e no número de vasos ($p=0,06$) quando comparado ao grupo controle, sugerindo que o meio seco pode causar prejuízos à manutenção do volume do enxerto *in vivo*. Este fato pode estar relacionado à redução de células ósseas transplantadas (Ramos *et al.*, 2006).

O PPP é um derivado da centrifugação do sangue na obtenção do PRP que, geralmente, não é utilizado em procedimentos regenerativos, apesar de estimular a proliferação celular em meios de cultura (Seher A, 2003) e preservar os osteócitos *in vitro* (Dechichi *et al.*, 2004).

Na análise da área do enxerto, o PPP preservou melhor o enxerto que as demais soluções analisadas. Também foi o meio que apresentou maior número de vasos quando comparado aos outros grupos experimentais. Essa relação entre volume e vascularização do enxerto já foi relatada por diversos autores (Lin *et al.*, 1990; Sullivan & Szwajkun, 1991; Chen *et al.*, 1994) indicando que a vascularização precoce favorece a manutenção do enxerto (Kusiak *et al.*, 1985).

O armazenamento do enxerto em PPP produz pequena redução de osteócitos (Dechichi *et al.*, 2004; Ramos *et al.*, 2006), o que poderia *in vivo* reduzir a reabsorção do enxerto (Gu *et al.*, 2005), favorecendo sua manutenção.

As comparações entre grupos experimentais e controle não apresentaram diferenças estatisticamente significantes, com exceção do grupo soro que mostrou diferença entre número de osteoclastos e vasos, que não resultou em redução do área total do enxerto.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o armazenamento do enxerto por curto prazo em soro e meio seco não interferem de forma significativa na integração do enxerto ao leito receptor, bem como na área do enxerto.

O grupo PPP apesar de não ter apresentado diferença significativa em relação ao grupo controle em nenhum dos parâmetros, mostrou-se melhor que os outros grupos (soro e seco). Assim, em procedimentos cirúrgicos com enxertos utilizando PRP, o PPP pode ser uma alternativa interessante como meio de armazenagem do enxerto no período trans-cirúrgico.

7. CONCLUSÃO

O plasma pobre em plaquetas favoreceu a revascularização e manutenção do enxerto, sendo um meio de armazenagem no período trans-cirúrgico melhores que os meios seco e soro.

8. REFERÊNCIAS

- Alberius P, Gordh M, Lindberg L, Johnell O. Influence of surrounding soft tissues on onlay bone graft incorporation. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 1996; 82(1):22-33.
- Albrektsson T. Repair of bone grafts. A vital microscopic and histological investigation in the rabbit. **Scand J Plast Reconstr Surg**. 1980; 14(1):1-12.
- Barboza E, Caúla Al. Regeneração tecidual e óssea guiada. In: R. J. A. Cardoso e E. A. N. Gonçalves (Ed.). **Periodontia, Cirurgia para Implante, Cirurgia, Anestesiologia**. São Paulo: Artes Médicas; 2002, p.137-57.
- Bassett Ca. Clinical implications of cell function in bone grafting. **Clin Orthop Relat Res**. 1972; 87:49-59.
- Bezerra Jfb, Lenharo A. Terapia Clínica Avançada em Implantodontia. São Paulo: Artes Médicas, v.1. 2002. 36-38 (313) p.
- Block Ms, Kent Jn, Kallukaran Fu, Thunthy K, Weinberg R. Bone maintenance 5 to 10 years after sinus grafting. **J Oral Maxillofac Surg**. 1998; 56(6):706-14; discussion 714-5.
- Bohr H, Ravn Ho, Werner H. The osteogenic effect of bone transplants in rabbits. **J Bone Joint Surg Br**. 1968; 50(4):866-73.
- Boyne Pj. Osseous Reconstruction of the Maxilla and Mandible. Chicago: Quintessence, v.1. 1997. 105 p.
- Burwell Rg. Studies in the Transplantation of Bone. Vii. the Fresh Composite Homograft-Autograft of Cancellous Bone; an Analysis of Factors Leading to Osteogenesis in Marrow Transplants and in Marrow-Containing Bone Grafts. **J Bone Joint Surg Br**. 1964; 46:110-40.
- Cardoso Cvp. Leis Referentes à Experimentação Animal no Brasil - Situação Atual 2003.
- Chen Nt, Glowacki J, Bucky Lp, Hong Hz, Kim Wk, Yaremchuk Mj. The roles of revascularization and resorption on endurance of craniofacial onlay bone grafts in the rabbit. **Plast Reconstr Surg**. 1994; 93(4):714-22; discussion 723-4.
- Davies Je. Histodynamics of endosseous wound healing IN : Bone Engineering. Toronto. 2000. 435-40 p.
- Dechichi P, Moura Ccg, Santana Si, Zanetta-Barbosa D. Histomorphometric analyses of bone storage in saline solution or PPP. **Journal of Dental**

Research. 2004; 85(The 21st Annual Meeting of the Brazilian Society for Oral Research).

Dohan Dm, Choukroun J, Diss A, Dohan SI, Dohan Aj, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2006; 101(3):e37-44.

Ellis E. Cirurgia oral e maxilofacial contemporânea. Rio de Janeiro: Guanabara. 1996. 583-605 p.

Foitzik C, Staus H. Le Fort I osteotomy in atrophied maxilla and bone regeneration with pure-phase beta-tricalcium phosphate and PRP. **Implant Dent.** 2003; 12(2):132-9.

Gao Y, Cao Wl, Wang Xy, Gong Yd, Tian Jm, Zhao Nm, et al. Characterization and osteoblast-like cell compatibility of porous scaffolds: bovine hydroxyapatite and novel hydroxyapatite artificial bone. **J Mater Sci Mater Med.** 2006; 17(9):815-23.

Gasperini G. Avaliação do protocolo de obtenção do Plasma Rico em Plaquetas. 2003.

Gleizal Am, Beziat JI. Maxillary and mandibular reconstruction using bicortical calvarial bone grafts: a retrospective study of 122 reconstructions in 73 patients. **Plast Reconstr Surg.** 2007; 119(2):542-8; discussion 549-50.

Gray Jc, Elves Mw. Early osteogenesis in compact bone isografts: a quantitative study of contributions of the different graft cells. **Calcif Tissue Int.** 1979; 29(3):225-37.

Gray Jc, Elves Mw. Osteogenesis in bone grafts after short-term storage and topical antibiotic treatment. An experimental study in rats. **J Bone Joint Surg Br.** 1981; 63-B(3):441-5.

Gu G, Mulari M, Peng Z, Hentunen Ta, Vaananen Hk. Death of osteocytes turns off the inhibition of osteoclasts and triggers local bone resorption. **Biochem Biophys Res Commun.** 2005; 335(4):1095-101.

Hardesty Ra, Marsh JI. Craniofacial onlay bone grafting: a prospective evaluation of graft morphology, orientation, and embryonic origin. **Plast Reconstr Surg.** 1990; 85(1):5-14; discussion 15.

Junqueira Lc, Carneiro J. Histologia Básica. Rio de Janeiro: Guanabara. 2004. 136-53 p.

Katchburian E, Arana Chaves V. Histologia e Embriologia Oral. Rio de Janeiro: Guanabara. 2004

Khan Sn, Cammisa Fp, Jr., Sandhu Hs, Diwan Ad, Girardi Fp, Lane Jm. The biology of bone grafting. **J Am Acad Orthop Surg**. 2005; 13(1):77-86.

Kim Es, Park Ej, Choung Ph. Platelet concentration and its effect on bone formation in calvarial defects: an experimental study in rabbits. **J Prosthet Dent**. 2001; 86(4):428-33.

Kusiak Jf, Zins Je, Whitaker La. The early revascularization of membranous bone. **Plast Reconstr Surg**. 1985; 76(4):510-6.

Latrenta Gs, Mccarthy Jg, Breitbart As, May M, Sissons Ha. The role of rigid skeletal fixation in bone-graft augmentation of the craniofacial skeleton. **Plast Reconstr Surg**. 1989; 84(4):578-88.

Laursen M, Christensen Fb, Bunger C, Lind M. Optimal handling of fresh cancellous bone graft: different peroperative storing techniques evaluated by in vitro osteoblast-like cell metabolism. **Acta Orthop Scand**. 2003; 74(4):490-6.

Lin Ky, Bartlett Sp, Yaremchuk Mj, Fallon M, Grossman Rf, Whitaker La. The effect of rigid fixation on the survival of onlay bone grafts: an experimental study. **Plast Reconstr Surg**. 1990; 86(3):449-56.

Lynch Se, Genco Rj, Marx Re. Platelet-Rich Plasma: A Source of Multiple Autologous Growth Factors for Bone Grafts: in Tissue Engineering, Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics. Illinois: Quintessence. 1999. 71-101 p.

Marthy S, Richter M. Human immunodeficiency virus activity in rib allografts. **J Oral Maxillofac Surg**. 1998; 56(4):474-6.

Marx Re, Snyder Rm, Kline Sn. Cellular survival of human marrow during placement of marrow-cancellous bone grafts. **J Oral Surg**. 1979; 37(10):712-8.

Marx Re, Stevens Mr. Oral and maxillofacial trauma. Philadelphia: W.B Saunders. 1997. 1101-203 p.

Mcanulty Jf. Effect of various short-term storage methods on viability of cancellous bone fragments. **Am J Vet Res**. 1999; 60(1):63-7.

Moura Ccg, Betoni-Júnior W, Dechichi P. Análise histomorfométrica de tecido ósseo mantido em solução fisiológica. **Cienc Odontol Bras**. 2005; 8(1):23-28.

Phillips Jh, Rahn Ba. Fixation effects on membranous and endochondral onlay bone graft revascularization and bone deposition. **Plast Reconstr Surg**. 1990; 85(6):891-7.

Pradel W, Eckelt U, Lauer G. Bone regeneration after enucleation of mandibular cysts: comparing autogenous grafts from tissue-engineered bone and iliac bone. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2006; 101(3):285-90.

Puranen J. Reorganization of fresh and preserved bone transplants. An experimental study in rabbits using tetracycline labelling. **Acta Orthop Scand.** 1966:Suppl 92:1-75.

Ramos Lma, Dechichi P, Moura Ccg, Vieira Ae. Análise histomorfométrica de osteócitos em fragmentos de tíbiade coelho mantidos em diferentes meios de armazenagem. **Braz Oral Res.** 2006; 20(Proceedings of the 23rd Annual SBPqO Meeting):96.

Sanchez Ar, Sheridan Pj, Kupp Li. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 2003; 18(1):93-103.

Seher a Ad, Geis-Gertorfer J, Weber H, Scheideler L. Stimulation of cell proliferation by platelet rich plasma (PRP). Internationales Symposium "Interface Biology of Implants". Rostock, 2003 p.

Simion M, Fontana F. Autogenous and xenogeneic bone grafts for the bone regeneration. A literature review. **Minerva Stomatol.** 2004; 53(5):191-206.

Smith Jd, Abramson M. Membranous vs endochondrial bone autografts. **Arch Otolaryngol.** 1974; 99(3):203-5.

Steiner M, Ramp Wk. Short-term storage of freshly harvested bone. **J Oral Maxillofac Surg.** 1988; 46(10):868-71.

Sullivan Wg, Szwajkun Pr. Revascularization of cranial versus iliac crest bone grafts in the rat. **Plast Reconstr Surg.** 1991; 87(6):1105-9.

Ten Cate Ar. Histologia Bucal - Desenvolvimento, Estrutura e Função. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001. 101-22 p.

Topazian Rg. Rehabilitation of the atrophic edentulous maxilla by bone grafting. **J Am Dent Assoc.** 1975; 90(3):625-31.

Zins Je, Whitaker La. Membranous versus endochondral bone: implications for craniofacial reconstruction. **Plast Reconstr Surg.** 1983; 72(6):778-85.