

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**HIDROXIAPATITA SINTÉTICA ASSOCIADA A
FATORES DE CRESCIMENTO EM SUBCUTÂNEO
DE ORELHA EXTERNA DE COELHO
(*Oryctolagus cuniculus*)**

Juliana Martins da Silva
Médica Veterinária

**UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL
2006**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**HIDROXIAPATITA SINTÉTICA ASSOCIADA A
FATORES DE CRESCIMENTO EM SUBCUTÂNEO
DE ORELHA EXTERNA DE COELHO
(*Oryctolagus cuniculus*)**

Juliana Martins da Silva

Orientador: Prof. Dr. Hudson Armando Nunes Canabrava
Co-orientadora: Ms. Tânia Berbert Ferreira Lima

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária – UFU, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre
em Ciências Veterinárias (Clínica e Cirurgia).

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL
Maio de 2006

“Competência, planejamento, determinação,
espírito de equipe e amor são as qualidades
essenciais para ser dono do futuro.
Mas também é preciso ter fé e acreditar.”

Roberto Schinyashiki

Aos meus pais,
Humberto e Marta
e ao meu noivo,
Carlos,
dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade oferecida para a realização do presente trabalho.

A Pro - Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação pelo empenho na obtenção do material de consumo e dos animais, para a realização desta pesquisa.

A CAPES pela bolsa de fomento.

Ao JHS Laboratório Químico Ltda., Belo Horizonte – MG, por ter-nos gentilmente cedido a hidroxiapatita (HAP-91).

Aos queridos coelhos por tudo de bom que ganhei nesta convivência e também pelos ensinamentos que dela pude tirar.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Hudson Armando Nunes Canabrava, que com seu apoio, confiança e amizade, conduziu-me brilhantemente no percurso deste trabalho.

À minha co-orientadora, Ms. Tânia Berbert Ferreira Lima, pela contribuição, apoio e dedicação, além do tanto que contribuiu para o meu crescimento.

Ao Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti e a Profa. Dr. Paula Dechichi pelo indispensável e inestimável auxílio e sugestões durante a realização das análises histológicas.

Ao Laboratório de Histologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) pela oportunidade de processamento do material e análise das imagens, etapas imprescindíveis para obtenção dos dados deste trabalho.

Ao Hospital Veterinário da UFU, por ter cedido o espaço para a realização das cirurgias e alojamento dos coelhos.

As minhas amigas, Fernanda Mandim Crestana e Sabrina Vaz dos Santos e Silva, pelos finais de semana cedidos para a prática da cirurgia com os animais, além da ajuda na manutenção diária dos coelhos.

As minhas amigas Livia Maria F. Cunha e Ana Paula Bernardes, pelo apoio oferecido nas horas difíceis.

Aos meus pais, Humberto e Marta, por todas as oportunidades que me ofereceram tornado meus sonhos grandiosos e possíveis, além de me mostrarem que vale a pena lutar pela vida.

A meu noivo, Carlos Alberto, pelo carinho e compreensão.

As minhas irmãs, Flávia e Anelise, pelo apoio, amizade e companheirismo.

A minha cadelinha Quequeq, pelo companheirismo e dedicação durante toda minha jornada.

A todos que, embora não citados nominalmente e que, com ações ou palavras, contribuíram para a execução de todas as etapas deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
ABREVIATURAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE GRÁFICOS	xiii
LISTA DE QUADROS	xiv
LISTA DE TABELAS	xv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
I. INTRODUÇÃO	01
II. REVISÃO DA LITERATURA	03
1. Tecido Ósseo	03
2. Enxerto	06
3. Biomateriais	09
3.1. Hidroxiapatita	11
3.2. Medula Óssea e Células Mesenquimais Indiferenciadas	16
3.3. Proteína Morfogênica do Osso (BMP)	19
3.4. Plasma Rico em Plaquetas (PRP)	22
3.4.1. Fatores de Crescimento	24
III. MATERIAL E MÉTODO	28
1. Animais	28
2. Biomateriais	29
2.1. Hidroxiapatita	29
2.2. Proteína Morfogênica do Osso (BMP)	29
2.3. Medula Óssea (MO)	29
2.4. Plasma Rico em Plaquetas (PRP)	30
3. Técnica Operatória	32
4. Coleta do Material	35
5. Avaliação Macroscópica	36
6. Avaliação Histológica	36
7. Análise Estatística	37

	Página
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
1. Avaliação Macroscópica	39
2. Avaliação Histológica	40
2.1. Formação Óssea Ectópica	40
2.2. Reação Inflamatória	44
2.2.1. Polimorfonucleares	44
2.2.2. Linfócitos	45
2.2.3. Plasmócitos	46
2.3. Macrófagos	48
2.4. Células Gigantes Multinucleares Tipo Corpo Estranho	49
2.5. Fibroblastos	53
2.6. Neovascularização	55
2.7. Cápsula Fibrosa	58
2.8. Avaliação Geral	58
V. CONCLUSÃO	62
VI. REFERÊNCIAS	63

ABREVIATURAS

bBMP – proteína morfogênica óssea bovina
BM-MSC – células mesenquimais indiferenciadas da medula óssea
BMP - proteína morfogênica do osso
 β -TCP – beta tricálcio fosfato
CFU – unidades formadoras de colônia
CGMCE – células gigantes multinucleares tipo corpo estranho
cm - centímetros
DNA – ácido desoxirribonucléico
FA – fosfatase alcalina
FC – fatores de crescimento
FDA – “food and drug administration”
FOE – formação óssea ectópica
G – gauss
g – gramas
HA – hidroxiapatita
HE – hematoxilina e eosina
IGF – fator de crescimento semelhante a insulina
IM – intramuscular
IV - intravenosa
kDa – quilodaltons
kg - quilogramas
 μ g - micrograma
mg – miligramas
 μ l - microlitro
ml - mililitros
 μ m - micrômetro
MO – medula óssea
MSC – células mesenquimais indiferenciadas
ng – nanogramas
OP – tecido conjuntivo hiper celularizado com fibras colágenas desorganizadas, semelhante a osso primário

PDGF – fator de crescimento derivado das plaquetas

PI – pós-implantação

PMN - polimorfonucleares

PRP – plasma rico em plaquetas

rh-BMP – proteína morfogênica óssea recombinante humana

rpm – revoluções por minuto

SC - subcutânea

TGF- β – fator de crescimento transformador beta

TRAP – fosfatase tartarato ácido resistente

U - unidades

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Inserção da agulha no tubérculo maior do úmero esquerdo e aspiração da medula óssea.	30
Figura 2: Separação obtida após primeira centrifugação.	31
Figura 3: Separação obtida após segunda centrifugação.	32
Figura 4: Confecção do túnel subcutâneo, com agulha Peridural de Thuoy.	34
Figura 5: Inserção do cateter 10 G (C) pelo túnel subcutâneo (T), para o implante do biomaterial sólido (S).	34
Figura 6: Colocação do cateter (C) pelo túnel subcutâneo (T) para inserção do biomaterial líquido (L).	35
Figura 7: Biópsia dos biomateriais.	36
Figura 8: Visualização em microscopia de luz da formação Óssea ectópica (estrela branca), próximo à cartilagem elástica da orelha (estrela amarela). HE. 72X. Departamento de Histologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia – MG.	42
Figura 9: Visualização em microscopia de luz, do tecido conjuntivo hipercelularizado com fibras colágenas desorganizadas, semelhante a osso primário (cruz amarela). HE. 10 X. Laboratório de Neurociências (LANEC) Universidade Federal de São João Del Rei (UFSJ), São João Del Rei, MG	43

- Figura 10:** Reabsorção do implante (estrela) mediada por células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho. (setas). HE. 90X. Departamento de Histologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG. 50
- Figura 11:** Borda em escova (seta). HE. 40 X. Laboratório de Neurociências (LANEC) Universidade Federal de São João Del Rei (UFSJ), São João Del Rei, MG. 53
- Figura 12:** Reparação do tecido subcutâneo enxertado. Notar grande quantidade de fibroblastos (setas) ao redor dos biomateriais (estrela). HE. 40 X. Laboratório de Neurociências (LANEC), Universidade Federal de São João Del Rei (UFSJ), São João Del Rei, MG. 55
- Figura 13:** Vasos (setas amarelas) ao redor dos biomateriais implantados (estrelas), e próximos à cartilagem elástica (seta branca) da orelha externa dos coelhos. HE. 40 X. Laboratório de Neurociências (LANEC) Universidade Federal de São João Del Rei (UFSJ), São João Del Rei, MG. 56

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1: Marcas, origem e referências aos autores que fizeram uso da hidroxiapatita (HA).	12
Quadro 2: Pontuação adotada para avaliação do exame histológico dos fragmentos de orelha dos coelhos, aos 30 e 45 dias do período pós-implante.	38

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Número de amostras encontradas na avaliação histológica referente formação óssea ectópica (FOE) e tecido conjuntivo com fibras colágenas desorganizadas, semelhante a osso primário (OP), aos 30 e 45 dias após o período de implantação. Uberlândia, MG.	44
Tabela 2: Avaliação histológica da reação inflamatória aos 30 dias após o período de implantação. Uberlândia, MG.	48
Tabela 3: Avaliação histológica da reação inflamatória aos 45 dias após o período de implantação. Uberlândia, MG.	48
Tabela 4: Escores da quantidade de macrófagos aos 30 e 45 dias de pós-implante. Uberlândia, MG.	49
Tabela 5: Quantidade de células gigantes multinucleares tipo corpo estranho, por corte, aos 30 e 45 dias pós-implante. Uberlândia, MG.	51
Tabela 6: Escores de fibroblastos por corte, nos períodos pós-implante aos 30 e 45 dias. Uberlândia, MG.	54
Tabela 7: Escores de neovascularização aos 30 e 45 dias pós-implante. Uberlândia, MG.	57
Tabela 8: Escores da avaliação histológica referente à ausência e presença de cápsula fibrosa, aos 30 e 45 dias após o período de implantação. Uberlândia, MG.	58

**HIDROXIAPATITA SINTÉTICA ASSOCIADA A FATORES DE
CRESCIMENTO ÓSSEO EM SUBCUTÂNEO DE ORELHA EXTERNA DE
COELHO**
(Oryctolagus cuniculus)

RESUMO: Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a eficácia da hidroxiapatita sintética (HA), como carreadora de proteína morfogenética óssea bovina (BMP), plasma rico em plaquetas (PRP) e medula óssea (MO), na formação óssea ectópica, num modelo experimental em orelha externa de coelho. Dois túneis longitudinais subcutâneos foram feitos em cada face externa da orelha externa dos coelhos, abrindo, no seu final, uma loja levemente escarificada para a inserção de 5 combinações dos biomateriais: HA+BMP, HA+MO, HA+BMP+MO, HA+PRP e HA+BMP+PRP. Biópsias foram feitas aos 30 e 45 dias pós-implantação, para análise em microscopia de luz. Os biomateriais enxertados foram considerados biocompatíveis com o subcutâneo de orelha de coelhos, bem como lentamente reabsorvidos por meio de grande quantidade de células gigantes tipo corpo estranho. O PRP acrescido da BMP e da HA foi o que revelou melhor bioreabsorção. A neovascularização ocorreu em pequenas proporções e foi maior nos implantes de HA+PRP e HA+BMP+PRP. Concluiu-se que as associações de HA com BMP e PRP, bem como a HA mais BMP, foram capazes de formar osso ectópico no subcutâneo da orelha externa de coelhos.

PALAVRAS CHAVE: BMP, células gigantes, hidroxiapatita, medula óssea, PRP

**SYNTHETIC HYDROXYAPATITE ASSOCIATED WITH BONE GROWTH
FACTORS IN SUBCUTANEOUS EAR TISSUE OF RABBIT (*Oryctolagus
cuniculus*)**

ABSTRACT: The aim of this research was to evaluate the synthetic hydroxyapatite (HA) as a carrier by bovine bone morphogenetic protein (BMP), platelet-rich plasma (PRP) and bone marrow (BM) in the ectopic bone formation in a rabbit model. Two tunnels were made in the subcutaneous tissue of external face of each ear in the rabbit, opened in the end a scarified a large room to insert five types of associations of biomaterials: HA+BMP, HA+MO, HA+BMP+MO, HA+PRP and HA+BMP+PRP. In 30 and 45 days post-implantations, biopsies were made to light microscopy evaluation. All implants of these biomaterials were biocompatibility with subcutaneous ear tissue of rabbit, as well as the resorption of these materials implants occurred slowly and were mediated by giant cells. The PRP plus BMP and HA was better than others bioresorbable materials. The neovascularization occurred in little ratio and in implants with HA+PRP and HA+BMP+PRP was larger. It was possible to conclude that HA associated with BMP and PRP and HA plus BMP could produce ectopic bone formation in subcutaneous ear tissue of rabbits.

KEY WORDS: BMP, giant cell, hydroxyapatite, bone marrow, PRP

I. INTRODUÇÃO

O osso representa o principal elemento de sustentação do corpo. É um tecido mineralizado que possui propriedades mecânicas e capacidade de regeneração. Para a reparação de fraturas ou defeitos ósseos há produção de novo tecido com a mesma organização estrutural do original. No entanto, esta característica é limitada pelo tamanho da lesão, assim defeitos ósseos extensos, provocados por traumas, infecções, neoplasias e anomalias de desenvolvimento que, deixadas ao seu livre curso, não regenerariam ou o faria muito lentamente e de forma incompleta. O reparo destes defeitos representa um desafio em cirurgias ortopédicas e na odontologia (DUARTE DA SILVA et al., 2000, CALIXTO et al., 2001, DONG et al., 2001; HERCULIANI et al., 2000).

Para reconstrução, substituição ou preenchimento dos defeitos ósseos a solução pode ser obtida com a utilização dos enxertos ósseos de origem autógena, homogênea ou heterógena. O primeiro mostra disponibilidade limitada de material do local doador, além de muitas vezes requer hospitalização do indivíduo, aumentando, assim, os custos. Enquanto os dois últimos apresentam riscos de transmitir infecção e ativar reações imunológicas no hospedeiro (SCHENK, 1996; TONG et al., 1998; BAUER, MUSCHLER, 2000; DONG et al., 2001; LINDSEY, 2001; ANDRADE et al., 2002).

Em vista das limitações acima citadas, têm-se intensificado as pesquisas para o desenvolvimento de materiais aloplásticos que apresentem características adequadas de biocompatibilidade e osseointegração (CALIXTO et al., 2001; DONG et al., 2001; LINDSEY, 2001; BAUER, SMITH, 2002). Dentre estes, as hidroxiapatitas (HA) puras ou em combinação com outros materiais estão sendo usadas como biomaterial para implantes ósseos. Estas

não necessitam de um segundo local cirúrgico, além de serem biocompatíveis. Entretanto não apresentam características osteoindutoras e não contêm células osteoprogenitoras (DONG et al., 2001; BAUER, SMITH, 2002).

Uma alternativa para auxiliar no reparo dos defeitos ósseos seria a utilização de fatores de crescimento (FC) aliados a biomateriais aloplásticos (BARBANTINI, ZAVAGLIA, DUEK, 2005). Estes são mediadores biológicos que ocorrem naturalmente e regulam a estimulação, proliferação, migração, quimiotaxia, diferenciação e síntese da matriz, via ligação aos receptores específicos de superfície celular. Essas substâncias são liberadas ou ativadas quando da necessidade de divisão celular, ação que ocorre durante eventos como a cicatrização de feridas ou regeneração de tecidos ósseos (GIONNOBILE, 1996; BARTOLD et al., 1992). Dentre os FC mais usados em estudo experimental, estão o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e o fator de crescimento semelhante a insulina (IGF) (FENNIS, STOELINGA, JANSEN, 2004), que estão presentes em alta concentração no plasma rico em plaquetas (PRP) (LYNCH et al., 1991; MARX et al., 1998), e a proteína morfogênica óssea (BMP) .

A Medula Óssea (MO) apresenta em sua constituição células primordiais indiferenciadas, as células-tronco, que desempenham papel importante na osteogênese; por terem capacidade de auto-renovação e potencial para diferenciarem-se em várias linhagens (BARROS et al., 2001; CONNOLLY, 1995).

Esta pesquisa teve como objetivos avaliar, de forma comparada e controlada, em ensaio casualizado e cego, a eficácia da hidroxiapatita sintética obtida de calcita (HAP-91), como carreadora de BMP, PRP e MO, na formação óssea ectópica, num modelo experimental em orelha externa de coelho.

II. REVISÃO DE LITERATURA

01. TECIDO ÓSSEO:

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo, altamente vascularizado e celularizado, que desempenha papel importante na homeostasia mineral, na reserva de elementos hematopoiéticos e no suporte estrutural para os movimentos. É o único tecido capaz de reparar sem deixar cicatriz, além de viver em constante processo de remodelação (TAGA et al., 2000; DAVIES, 2003; DOBLARÉ, GARCIA, 2003; SALGADO, COUTINHO, REIS, 2004).

As células componentes deste tecido são osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. As primeiras são células mesenquimais indiferenciadas, capazes de se diferenciar em osteoblastos (SALGADO, COUTINHO, REIS, 2004), e podem ser sistemicamente recrutadas de sítios distantes da fratura via circulação e assim iniciar o reparo (SHIRLEY et al., 2005). As segundas localizam-se na superfície externa da matriz óssea e estão envolvidas na produção de proteínas, bem como na inicialização do processo de mineralização devido a sua capacidade de concentrar fosfato de cálcio (TAGA et al., 2000; DAVIES, 2003; SALGADO, COUTINHO, REIS, 2004), sendo a sua concentração dependente da aderência e da proliferação celular (HOTT et al., 1997). O osteóide é a matriz óssea recém-formada, adjacente aos osteoblastos ativos e que ainda não foi calcificada. Os osteócitos são osteoblastos circundados pelo tecido ósseo produzido, que têm metabolismo menos intenso (DAVIES, 2003; CROCI et al., 2004; SALGADO, COUTINHO, REIS, 2004). Já os osteoclastos são originados de células

hematopoiéticas da linhagem monócito-macrófago, após passagem pelas paredes dos capilares do osso. São células gigantes, multinucleadas, móveis, que estão situadas em contato com o osso, e participam do processo de remodelação através da reabsorção do tecido ósseo (TEZUKA et al., 1994; KANEKO et al., 2000; RAMALHO et al., 2000; RIMINUCCI, BIANCO, 2003; SALGADO, COUTINHO, REIS, 2004).

Para se fazer a distinção entre células gigantes multinucleares tipo corpo estranho (CGMCE) e osteoclastos, Gloawacki e Cox (1986) sugerem a verificação dos centríolos, que nos primeiros estão organizados em múltiplos pares, enquanto nos últimos são únicos. Siqueira Jr e Dantas (2000) disseram que a identificação da enzima anidrase carbônica e dos receptores para osteocalcina permitiram a diferenciação entre osteoclastos e células gigantes multinucleadas, formadas durante a reação de corpo estranho por fusão de macrófagos. Já Kelly e Schneider (1991) relataram que a análise histoquímica dos níveis de fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP), quando em altas concentrações e corado em vermelho intenso, é indicativo de osteoclastos, enquanto em baixas concentrações indica CGMCE. Estes autores acrescentaram ainda, que a vacuolização do citoplasma da borda em escova, adjacentes a superfície óssea, é sugestiva da presença de osteoclastos.

Uma das principais características do osteoclasto é apresentar projeções citoplasmáticas que permitem uma maior área de superfície da membrana e são denominadas de bordas pregueadas. A reabsorção óssea ocorre na região adjacente a estas bordas (REMÉDIOS, 1999) via liberação de ácidos e enzimas (TEZUKA et al., 1994; RAMALHO et al., 2000). Estas células também englobam por fagocitose partículas menores de matriz óssea e cristais, dissolvendo-as e liberando seus produtos para dentro da circulação sangüínea (GUYTON, HALL, 1996).

Pode-se dosar fosfatase alcalina (FA) sérica para saber se há formação óssea, pois os osteoblastos secretam grandes quantidades desta enzima quando estão depositando ativamente a matriz. A FA hidrolisa íons fosfato para formar cristais de hidroxiapatita e a mineralização (LUCARELLI et al., 2003).

O tecido ósseo é formado por 35% de matriz orgânica composta de água e principalmente por colágeno tipo I, além de outras proteínas como

osteopontina, osteocalcina, osteonectina e fibronectina. E também por uma parte inorgânica, mineral, representando 65%, composta principalmente de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, uma forma de fosfato de cálcio responsável por 99% do cálcio e 80% do fósforo do organismo (OLIVEIRA et al., 1999; DOBLARÉ, GARCIA, 2003; SALGADO, COUTINHO, REIS, 2004).

A osteogênese ocorre por processos de ossificação endocondral e intramembranosa. No primeiro tipo, a cartilagem é formada, calcificada e substituída por osso. Enquanto no segundo, o osso é formado diretamente pelos osteoblastos (HOTT et al, 1997; DOBLARÉ, GARCIA, 2003; RIMINUCCI, BIANCO, 2003), que surgem no interior das membranas de natureza conjuntiva.

Existem dois tipos de tecido ósseo, o primário, que é o tecido imaturo e fibroso, e o secundário, maduro e lamelar, os quais estão organizados em diversas configurações tais como osso esponjoso ou trabecular e osso compacto ou cortical. O osso primário é muito celularizado e tem lacunas grandes e arredondadas, apresentando feixes de fibras colágenas sem orientação definida e sob circunstâncias normais, sempre é substituído pelo secundário. As células do osso secundário são mais alongadas que no osso primário e as fibras colágenas estão dispostas num arranjo helicoidal de ângulos variados, em lamelas sucessivas, portanto num padrão muito ordenado (BANKS, 1991). O osso cortical é sólido, tem 10% de porosidade e está presente nos ossos longos, curtos e planos, enquanto o trabecular tem alta porosidade (50-90%), está configurado em forma de esponja com presença de trabéculas em forma de favo e comumente é encontrado nas metáfises de ossos longos e nos corpos vertebrais (DAVIES, 2003; DOBLARÉ, GARCIA, 2003; SALGADO, COUTINHO, REIS, 2004).

No processo de consolidação óssea estão presentes três etapas, granulação, proliferação e remodelação. A fase de granulação caracteriza-se pela formação do hematoma e presença de células inflamatórias como neutrófilos polimorfonucleares (PMN), linfócitos, plasmócitos e macrófagos, que além do papel de defesa, também liberam fatores angiogênicos e de crescimento (REMÉDIOS, 1999). O processo inflamatório crônico inibe a formação óssea (URIST, 1965). Já a proliferação se distingue pela marcante

presença de células pluripotentes no local da lesão. Variações na pressão de oxigênio influenciam a diferenciação destas, pois baixas tensões favorecem os condroblastos, ao contrário dos osteoblastos (URIST, 1965; WOODARD, RISER, 1991; DAVIES, 2003). Enquanto a remodelação óssea consiste no processo de renovação com manutenção da arquitetura e da competência fisiológica das unidades esqueléticas individuais (TEZUKA et al., 1994; KIRKPATRICK et al, 2002; DOBLARÉ, GARCIA, 2003; CROCI et al, 2004; CURCELLI et al., 2005).

02. ENXERTO

Desde o século XIX o homem vem realizando transplantes ósseos orgânicos. A primeira grande descoberta foi o enxerto autólogo e, conseqüentemente, com pesquisas posteriores na área de ortopedia e cirurgias buco-maxilo-faciais, foram acrescentados os isógenos, alógenos e xenógenos ou heterólogos. Àquele, ou seja, o autoenxerto trata-se da coleta e implante ósseo no mesmo indivíduo, que, no entanto, apresente risco potencial de morbidade cirúrgica e da disponibilidade limitada de material do local doador. Nos enxertos isógenos, o osso é removido de um indivíduo da mesma espécie e está geneticamente relacionado com o receptor, tendo, por exemplo, gêmeos idênticos. Os alógenos consistem da remoção do tecido de indivíduo da mesma espécie, porém, geneticamente não relacionado com o receptor, todavia, há a desvantagem do risco de transmissão de doença e do potencial de antigenicidade. Por fim, os xenógenos são originados de tecido retirado de um doador de espécie diferente do receptor, como por exemplo, tecido animal implantado em humano (BAUER, MUSCHLER, 2000; DONG et al., 2001; BAPTISTA et al, 2003; GRAGEDA, 2004; SALGADO, COUTINHO, REIS, 2004).

A busca de outros materiais para o aprimoramento de tal técnica, resultou em limitações logísticas como relação custo/benefício, facilidade de obtenção, disponibilidade de fonte doadora, local apropriado e tempo

disponível para o tratamento (FIGUEIREDO et al, 2004). Considerando este fato, alguns estudiosos buscaram como fonte para substitutos ósseos, materiais de origem sintética, nomeados de implantes aloplásticos. Estes são conhecidos por cerâmicas e polímeros, como a hidroxiapatita, fosfato tricálcio e sulfato de cálcio. As vantagens apresentadas por esses biomateriais são biocompatibilidade e ausência de resposta imunogênica, além de facilitar a avaliação radiográfica pós-uso (BAUER, MUSCHLER, 2000; DONG et al., 2001; LINDSEY, 2001; BAPTISTA et al, 2003; GRAGEDA, 2004).

Com exceção dos autoenxertos que são osteoindutores, todos os demais são considerados apenas osteocondutores (CAFFESSE, CHAVES, 2001). Os primeiros são aqueles capazes de induzir a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos ou condroblastos, aumentando a formação óssea no local, ou mesmo estimulando a formação de osso em um sítio ectópico (URIST, 1965; CAVASSANI, MORAES, PADILHA FILHO, 2001; SALGADO, COUTINHO, REIS, 2004). Eles produzem suporte e proteção para o crescimento de novos vasos para restaurar o fornecimento de sangue medular; células para a osteogênese e antigenicidade reduzida (SCHMAEDECKE et al., 2003; SAKATA, ALBERTO-RINCON, DUEK, 2004). Já os osteocondutores, geralmente inorgânicos, permitem a aposição de um novo tecido ósseo em sua superfície, bem como requerem a presença de tecido pré-existente como fonte de células osteoprogenitoras, além de orientarem e acelerarem a proliferação celular (ANDRADE, BORGES, BICALHO, 2002; SANADA et al, 2003). Do ponto de vista biológico, o osteoindutor é biologicamente ativo enquanto o osteocondutor é apenas um material de preenchimento (TAGA, 1996; MAGALHÃES, MENEZES, OLIVEIRA, 2000).

O sucesso da enxertia está diretamente ligado à participação ativa do implante no processo da osteogênese reparadora, assim como sua imobilidade; biocompatibilidade; previsibilidade; aplicação clínica sem riscos trans-operatórios; seqüelas mínimas com ausência de dor, infecção, neuropatias e parestesia; enfatizando a satisfação do paciente e do cirurgião com a restauração (OLIVEIRA et al, 1999; SICCA et al, 2000; FIGUEIREDO et al., 2004; HUANG et al., 2004). As possíveis reações de rejeição aos enxertos são caracterizadas pelos seguintes eventos, reabsorção da periferia do

implante sem a substituição pelo tecido reparador, processo inflamatório com predominância de linfócitos, tecido fibroso encapsulando o implante e oclusão de neovasos com necrose progressiva (ZILIOTTO et al, 2003; FENNIS, STOELINGA, JANSEN, 2004).

Um dos fatores determinantes para realização ou não dos implantes está relacionado com a disponibilidade de material carreador eficaz. Este deve aumentar a exposição dos tecidos hospedeiros aos fatores de crescimento e assegurar uma distribuição uniforme, sem permitir que o material implantado ultrapasse os limites do sítio. Ao mesmo tempo em que for ocorrendo a formação óssea faz-se necessário a absorção do carreador, pois uma rápida bioreabsorção determinará aumento do espaço ocupado pelo material, deixando-o livre para a interposição indesejada de outros tecidos, comprometendo a estabilidade mecânica da construção do mesmo, além de aumentar o nível de cálcio e fósforo extracelular (MAGALHÃES, MENEZES, OLIVEIRA, 2000; SANTOS et al, 2005). Para Bonachela et al. (1992), Oliveira et al., (1999) e Riminucci e Bianco (2003) esse aumento considerável do nível extracelular de cálcio e fósforo, é essencial para a neoformação do tecido ósseo. Confrontando esta assertiva, Zambuzzi et al., (2005), defendem a inibição da capacidade osteoindutiva. Todavia, a lentidão de reabsorção do material implicará em atraso da formação óssea (SYKARAS, OPPERMAN, 2003; SALGADO, COUTINHO, REIS, 2004).

Lu e colaboradores (2003) revelaram que o material ideal para enxertia óssea deve ser biocompatível e biodegradável. Sendo o primeiro definido pela boa integração entre o tecido hospedeiro e o material de implante, sem o aparecimento de respostas imunes, e o segundo pela dispersão *in vivo* sofrida pela degradação macromolecular dos polímeros e dispositivos sólidos (SALGADO, COUTINHO, REIS, 2004).

Em função do tempo de permanência no organismo, os implantes podem ser classificados permanentes ou temporários. Os permanentes em sua maioria geram fenômenos crônicos de inflamação tipo corpo estranho, que podem conduzir a complicações clínicas mais severas, como a contração dos tecidos (BARBANTINI, ZAVAGLIA, DUEK, 2005). Já os temporários pelo próprio termo se auto definem.

Alguns requisitos são essenciais para a formação óssea no sítio enxertado, como celularidade, boa nutrição e estímulo satisfatório. Davies (2003) comentou que a angiogênese é responsável pela nutrição do implante/osso durante o processo de reparação. Já Baptista et al (2003), disseram que os enxertos ósseos não dependem de células vivas para terem utilidade clínica, mas sim da matriz óssea, onde estão as proteínas morfogenéticas. Em contrapartida, Andrade e co-participantes (2002), mencionaram que o implante deve ser posicionado próximo ao osso viável, já que o contato íntimo entre estes leva a produção e aceleração do crescimento ósseo.

Segundo Hott et al (1997) e Salgado, Coutinho e Reis (2004), é essencial verificar porosidade, tamanho do poro e propriedades da superfície do implante ao se utilizar um material como enxerto. Os primeiros devem possuir vários poros abertos e completamente interconectados geometricamente dentro de uma grande estrutura, com superfície de área e volume proporcionais ao crescimento celular, além de facilitar a neovascularização ao redor do tecido hospedeiro. Quanto maior o tamanho do poro do material maior será a taxa de crescimento celular, devido a facilidade de difusão dos nutrientes dos fluidos orgânicos locais. Já nas propriedades da superfície, tanto a química quanto a topográfica, podem controlar e afetar a adesão e a proliferação celular (DAVIES, 2003; SALGADO, COUTINHO, REIS, 2004; BARBANTINI, ZAVAGLIA, DUEK, 2005).

03. BIOMATERIAIS:

Biomateriais são compostos que auxiliam no reparo ósseo e devem apresentar biocompatibilidade, previsibilidade, aplicação sem riscos trans-operatórios e ínfimas seqüelas pós-cirúrgicas, além da boa adaptação relacionada ao paciente (MAGALHÃES, MENEZES, OLIVEIRA, 2000; TEIXEIRA, 2001; ZAMBUZZI et al, 2005). Deduz-se isto através de testes de

biocompatibilidade em animais de laboratório, sem os quais nenhum biomaterial poderia vigorar (TAGA, 1996).

Quatro grupos de biomateriais são descritos; as ligas metálicas, os cerâmicos, os polímeros sintéticos e os materiais naturais (TEIXEIRA, 2001; SALGADO, COUTINHO, REIS, 2004). Os biomateriais cerâmicos empregados em implantodontia podem ser divididos em dois grandes grupos: os derivados de fosfato de cálcio e os não-derivados. Dentre os derivados de fosfato de cálcio destacam-se a hidroxiapatita sintética $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, o tri-cálcio fosfato $[Ca_{10}(PO_4)_3(OH)_2]$, e o penta-cálcio-hidroxi-tri-fosfato. No grupo dos não-derivados, destacam-se as cerâmicas de alumina (Al_2O_3), a cerâmica de zircônia (ZrO_2) e o cristal de safira (AlO_2) (TEIXEIRA, 2001).

Os materiais compostos de fosfato de cálcio aceleram a cicatrização e se aderem ao osso. Estes adsorvem proteínas em suas superfícies, esperando-se então, que o fibrinogênio aumente a camada de adesão plaquetária e resulte possivelmente num aumento da ativação das plaquetas para acelerar a cicatrização da ferida. Com este aumento, ocorre, por conseguinte, uma elevação da fibrina na superfície do enxerto, resultando no estabelecimento prematuro da matriz tri-dimensional, com migração de células osteogênicas para reagir com a superfície do implante (DARIMONT et al., 2002; DAVIES, 2003).

Os cerâmicos apresentam como principais características: biocompatibilidade, atoxicidade e baixa solubilidade em meio orgânico (TEIXEIRA, 2001). Tais características influenciam no recrutamento de células, na modulação do processo inflamatório e na promoção do reparo, por cicatrização ou regeneração (ZAMBUZZI et al, 2005). Têm por desvantagens a baixa resistência à tração e ao cisalhamento, além de serem friáveis (TEIXEIRA, 2001; SALGADO, COUTINHO, REIS, 2004), o que limita seu uso a áreas de baixa carga mecânica (SALIH et al., 2001).

Segundo Andrade e colaboradores (2002), estudos científicos identificaram que certos biomateriais possuem reações, aparentemente limitadas, pelos mecanismos de defesa do organismo. Estas reações vão desde a não-reatividade até a reatividade. Para evitar possíveis conseqüências, alguns cientistas propuseram o uso de implantes com

características químicas semelhantes àsquelas existentes no organismo. Possuindo uma composição química semelhante a do osso e a do dente, a hidroxiapatita se destaca como o biomaterial mais apropriado a ser utilizado em ortopedia e odontologia (GRAGEDA, 2004; SALGADO, COUTINHO, REIS, 2004).

3.1. HIDROXIAPATITA

A hidroxiapatita (HA) pura ou em combinação com outros materiais é usada na enxertia óssea, e estão disponíveis em forma de blocos sólidos ou porosos, partículas sintéticas ou naturais, absorvíveis ou não, com poros de diferentes calibres e com diferentes marcas entradas no mercado (Quadro 1). Tem como vantagem não necessitarem de um segundo local cirúrgico, além de poderem ser utilizadas como carreadores de antibióticos na profilaxia e terapêutica da infecção óssea (CANABRAVA, 2002). As desvantagens consistem na ausência de células progenitoras e falta de características osteoindutoras (DONG et al., 2001; BAUER, SMITH, 2002; RIMINUCCI, BIANCO, 2003).

Quadro 1: Marcas, origem e referências aos autores que fizeram uso da hidroxiapatita (HA).

MARCAS DE HA	ORIGEM	AUTORES
OSTEOGEN	Norte Americana	TAGA (1996)
BIOHAPATITA	Dpto.de Bioquímica da FOB	TAGA (1996)
BIOHIDROXI-INODON	Dpto de Bioquímica da FOB, com < granulação que a anterior	GRANJEIRO et al (1992)
OSTEOSYBNT	Laboratório Einco Ltda.	GRANJEIRO et al (1992)
HA-40	Homus Indústria e Comércio Ltda	GRANJEIRO et al (1992)
OSTEOGEN	GBD Marketing Group Inc.	GRANJEIRO et al (1992)
HA-Padrão	Sigma Corporations	GRANJEIRO et al (1992)
BIOSYNTH LTDA		DÓREA NETO et al. (2004)
CERAMED LAKEWOOD	Norte Americana Hidroxiapatita sintética	DARIMONTE et al (2002)
GEN-OX	Baumer- SP, Brasil Osso cortical ou medular descalcificado bovino	SICCA et al. (2000) SANADA et al. (2003)
GEN-PHOS	Baumer – SP, Brasil Hidroxiapatita sintética	MOREIRA et al. (2003)
HAP-91	JHS Laboratório Químico Ltda., Belo Horizonte – MG Hidroxiapatita obtida da calcita	BORGES et al. (1997) REZENDE et al. (1998) BORGES et al. (2000) FRANCO et al. (2001) ANDRADE et al. (2002) CANABRAVA (2002) LIMA (2003)

Nota: Dpto = departamento, FOB = Faculdade de Odontologia de Bauru

No que se refere à assimilação, as HAs reabsorvíveis são indicadas nos casos em que há necessidade da substituição desta pelo tecido ósseo. Têm como características microgranulometria; alta biocompatibilidade; total ausência de antigenicidade devido ao fato de ser um material inorgânico constituinte mineral do tecido ósseo; alta solubilidade nos líquidos fisiológicos e velocidade bastante lenta de reabsorção pelo organismo (TAGA, 1996; BORGES et al, 2000; ANDRADE, 2002). As não reabsorvíveis são indicadas nos casos cirúrgicos onde há necessidade de preencher cavidades com grandes perdas de tecido ósseo. Ela passa por um processo denominado sinterização, sendo este um tratamento térmico da cerâmica próximo ao seu ponto de fusão (ANDRADE et al, 2002; MOREIRA et al, 2003), a fim de torná-la mais lisa e insolúvel em água. Elas podem ser microgranular ou macrogranular, sendo que esta pode apresentar forma porosa, cuja finalidade é a permissão da invaginação e neoformação dos vasos sanguíneos, obtendo com isto a integração como o tecido ósseo. E não porosa que é conhecida como hidroxiapatita densa, sendo frequentemente associada a casos de encapsulamento por tecido fibroso e expulsão das partículas pelo organismo (TAGA, 1996).

Andrade et al (2002) e Dórea Neto et al (2004) disseram que a HA serve de arcabouço para a migração de vasos sanguíneos e deposição de novo osso, pois devido à interconexão dos poros, ela permite que os tecidos cresçam dentro de sua estrutura, produzindo uma continuidade com o osso em volta, reduzindo a encapsulação. Os poros da hidroxiapatita facilitam o crescimento das células, o crescimento fibrovascular, a formação de osteóide e o crescimento do osso mineralizado (ANDRADE et al, 2002). Webster et al (2000) observaram que o aumento da adesão dos osteoblastos, *in vitro*, foi independente da superfície química e da forma do material, mas foi dependente da superfície topográfica, especialmente sobre a granulação e o tamanho do poro da hidroxiapatita. De acordo com Rovira e colaboradores (1996) os poros de HA carregados com células da medula óssea permitiram a formação de tecido ósseo em sítio heterotrópico.

Moreira e colaboradores (2003) em estudo sobre a influência das dimensões dos grânulos de hidroxiapatita na integração óssea, perceberam

satisfatório preenchimento da falha óssea em fêmur de ratos Wistar, após seis meses. Concluíram que não houve diferença entre os três tamanhos (212 μm , 500 μm , e 1000 μm), mas notaram que a reparação da lesão ocorreu em menor período de tempo com a utilização de grânulos menores (212 μm). Já os grânulos com dimensões entre 10 a 50 μm , devido ao seu volume reduzido, podem ser fagocitados por células como macrófagos ou fibroblastos (GRANJEIRO et al., 1992; MOREIRA et al., 2003).

A hidroxiapatita sintética possui microestrutura e tamanho do cristal diferentes do osso natural, o que pode produzir resposta biológica indesejada (SICCA et al., 2000; SANADA et al., 2003). Ao passo que a natural tem similaridade com a porção inorgânica da matriz óssea e com o tamanho dos poros em particular (SALIH et al., 2001). Após a inserção da HA sintética, o implante torna-se rodeado por uma variedade de compostos fluidos, fibroblastos e células livres com características semelhantes aos dos tecidos encontrados nos processos de cicatrização natural. No estado não infectado, a HA é retirada intensamente pela atividade dos macrófagos (ANDRADE, BERGE, BICALHO, 2002; RIMINUCCI, BIANCO, 2003).

Andrade, Borges e Bicalho (2002) avaliaram as reações subcutâneas em coelhos, através de testes biológicos de irritação, referentes ao uso de hidroxiapatita sintética. Ao comparar áreas onde foram injetadas solução de hidroxiapatita (3,5 mg/ml) a locais em que se injetou solução salina, verificou-se ausência de irritação local subcutânea, após 24, 48 e 72 horas.

Lima (2003) objetivou avaliar a formação óssea no subcutâneo da face externa da orelha de coelhos com implante de hidroxiapatita sintética porosa, associada ou não a proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) e concluiu que este biomaterial ligado ou não a BMP não induziu a formação óssea ectópica.

Para Darimont et al. (2002) o processo de degradação da HA pode ser mediado por monócitos e em menor escala por células polimorfonucleares. Rezende et al. (1998) verificaram que a HA pode ser considerada um substituto ósseo, além de não causar reação inflamatória tipo corpo estranho. Borges et al. (2000) avaliaram o processo de osseointegração da HA sintética em defeito provocado no terço proximal de tíbia em cães e concordaram com o exposto por Rezende et al. (1998). Observaram ainda a ausência de linfócitos e células

plasmáticas, sugerindo a biocompatibilidade desta. Enquanto Heikkilla et al. (1993) descreveram a presença de reação inflamatória branda ao redor do implante de HA, com presença de linfócitos e macrófagos. Já Franco et al. (2001) observaram, em apenas um animal tratado com a cerâmica sintética pura, a presença do material no tecido mole adjacente ao defeito ósseo rodeado por uma fina cápsula de tecido fibroso e numerosas células mononucleares, após 30 dias de cirurgia, sugerindo reação do tipo corpo estranho.

Oliveira et al. (2004) observaram que partículas de HA natural induziram uma reação inflamatória crônica, com presença de CGMCE e fibrose quando implantadas no tecido subcutâneo de ratos. Em áreas implantadas com osso mineralizado, as CGMCE não tinham morfologia similar a osteoclastos, ao passo que naquelas com enxerto desmineralizado estas células apresentaram morfologia similar aos osteoclastos.

A biodegradação da HA sintética foi confirmada por Borges e colaboradores (1997), devido a observação de atividade osteoclástica sobre o enxerto e pela diferença na quantidade relativa de HA entre as amostras analisadas. Constataram ainda, que a absorção era lenta devido a presença de grânulos em amostras processadas aos 120 dias após o implante. Benqué et al. (1997) constataram, através de análise histológica, a completa reabsorção desse biomaterial e sua total substituição por tecido ósseo em biópsias colhidas após 240 dias de implantação.

Darimont et al. (2002) citaram que a formação óssea pode ser acelerada com a presença de hidroxiapatita. Enquanto Moreira e colaboradores (2003) estudando falhas ósseas preenchidas com estas cerâmicas, constataram que o crescimento do tecido ósseo neoformado ocorreu mais tardiamente, quando comparado com o grupo controle, onde a falha óssea não foi preenchida com o biomaterial.

Figueiredo et al. (2004) verificaram que o enxerto de osso autógeno e a hidroxiapatita porosa de coral promovem uma osteogênese mais precoce. Braz et al. (2003), em seu trabalho, cujo objetivo foi observar a resposta biológica e o poder osteoindutor da combinação matriz óssea orgânica bovina e hidroxiapatita no reparo de defeito induzido em crânio de ratos, não verificaram

macroscopicamente, durante o período pós-operatório, sinais de infecção ou de lesões neurológicas. Esta associação estimulou a produção de fibroblastos responsáveis pelo fornecimento de procolágeno, não causou reações adversas e favoreceu a reparação óssea.

Hott et al (1997) constataram, em análise histológica de cultura de osso trabecular humano em HA, a baixa deposição de colágeno neste biomaterial, o que implica em formação óssea fraca, já que o colágeno é importante para diferenciação óssea e ativação dos fatores de crescimento do plasam rico em plaquetas (PRP).

3.2. MEDULA ÓSSEA E CÉLULAS MESENQUIMAIS INDIFERENCIADAS

O tecido medular é uma forma hipercelular e altamente vascularizada de tecido conjuntivo, contido dentro da cavidade óssea. Os limites periféricos da medula contêm elementos do endóstio cortical, enquanto o endóstio trabecular pode estar contido dentro da substância dos tecidos medulares (PROCKOP, 1997). É a fonte mais abundante e disponível de células osteoprogenitoras (MUSCHLER, BOEHM, EASLEY, 1997).

Na medula óssea (MO) vermelha são produzidos os eritrócitos, granulócitos, plaquetas e agranulócitos. Ela está presente nos animais jovens e pode ser dividida em dois compartimentos, um vascular e outro hematopoético, constituído por ilhas irregulares de tecido entre os leitos vasculares e inclui os fibroblastos, o estroma de fibras reticulares, as células reticulares, as unidades formadoras de colônia (CFUs), as células fagocitárias, as formas intermediárias e maduras das células sanguíneas, o tecido adiposo e outras células típicas do conjuntivo, como plasmócitos e mastócitos (KREBSBACH, ROBEY, 2002). A quantidade de MO vermelha ativa é apreciavelmente reduzida no início da vida adulta. O tecido adiposo substitui a maioria dos elementos produtores de células do compartimento hematopoético, formando a MO amarela, o que pode estar relacionado ao potencial de células mesenquimais indiferenciadas (MSCs) se diferenciaram em adipócitos (PROCKOP, 1997). No tecido maduro,

as MSCs têm como principal função a homeostasia e reparação de tecidos (KREBSBACH, ROBEY, 2002), além de uma maior plasticidade (MINGUELL, CONGET, ERICES, 2000).

As MSCs são células progenitoras embrionárias, pequenas, com poucas organelas e alta proporção núcleo/citoplasma (SIQUEIRA Jr., DANTAS, 2000). Localizam-se predominantemente, na MO, originam-se do endósteo do espaço medular e são conduzidas para o sítio de reparo via sistema circulatório (SYKARAS, OPPERMAN, 2003). Apresentam alta capacidade proliferativa e de auto-renovação, bem como potencial para se diferenciarem em várias linhagens (CONNOLLY, 1995; BIANCO et al, 2001; KREBSBACH, ROBEY, 2002; SALGADO, COUTINHO, REIS, 2004). Quando adicionada a locais com condições adequadas elas podem ser diferenciadas em células que darão origem a osso, cartilagem, musculatura esquelética, tendão e outros tecidos de origem mesenquimal (PROCKOP, 1997; RAMALHO et al, 2000; DOBLARÉ, GARCIA, 2003).

Segundo Kim, Lee e Suh (2003) as células mesenquimais indiferenciadas da medula óssea (BM-MSCs) em humanos, macacos e ratos, podem se diferenciar em três tipos de linhagens deferentes: osteogênica, condrogênica e adipogênica. Mas em coelhos estas células são pobremente caracterizadas quanto a sua diferenciação potencial dentro dessas três linhagens, e particularmente só é considerada a diferenciação adipogênica.

Nos mamíferos as MSC reparadoras presentes na MO, são em pequeno número, que vai decrescendo com a idade: 1/100.000 nos jovens, 1/250.000 em adultos até 35 anos, 1/400.000 em adultos com até 50 anos e 1/1.200.000 para idosos (MARX et al., 1998).

Bianco et al. (2001) citam que bilhões de BM-MSCs podem ser geradas, *in vitro*, a partir de uma amostra limitada de um material inicial, como 1,0 ml de aspirado de MO, pois elas são fáceis de se expandir em meio de cultura (PROCKOP, 1997).

Estudos *in vitro*, de Huang et al. (2004), demonstram que a condrogênese das BM-MSCs podem ser induzidas com o tratamento a base de citocinas como fator de crescimento transformador β (TGF- β) e proteínas morfogenéticas ósseas (BMP).

A MO por si só é um enxerto ósseo efetivo, sendo assim, as MSCs podem ser distribuídas diretamente sobre o local lesado nas formas injetável ou misturadas a biomateriais que serão implantados, ou ainda, por infusões sistêmicas. De qualquer forma, elas irão aumentar a reparação local ou a regeneração óssea, cartilaginosa ou do tendão (MUSCHLER, BOEHM, EASLEY, 1997; MINGUELL, CONGET, ERICES, 2000).

Para Croci et al (2004), o uso da MO para acelerar a consolidação óssea é considerado um método simples e de fácil obtenção. Shirley et al (2005) não identificaram nenhuma toxicidade durante o processo de re-implantação de células fonte *in vivo*. A infusão sistêmica de MSCs autólogas, de acordo com Prockop (1997), parecem ser bem toleradas.

Através da técnica para anticorpo monoclonal, foram encontrados, na medula óssea, receptores para fator de crescimento transformador beta um (TGF- β 1), TGF- β 2 e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (ANITUA, 1999; ANITUA, 2001). Marx e colaboradores (1998), usando a mesma técnica, identificaram a presença de TGF- β mas não encontraram PDGF nas células fonte da MO nem nos osteoblastos endosteais.

De acordo com Lucarelli et al (2003) os enxertos carregados com BM- MSC implantados em subcutâneo, formam osso em poucas semanas pós-implantação (PI). Segundo Krebsbach e Robey (2002) a osteogênese não ocorre quando a suspensão de MO é injetada subcutaneamente (SC) ou intramuscularmente (IM), o que foi verificado em implantes de BMSCs associados a “pélets” celulares sem veículo ou integradas a veículos de rápida absorção. Kim, Lee e Suh (2003) e Shirley et al, (2005) escreveram que o transplante dessas células requer a presença de um arcabouço organizado no qual possam se aderir e proliferar por longos períodos, para assegurar diferenciação e formação óssea, pois só assim ocorrerá interação célula a célula entre os osteoblastos.

Barros et al. (2001) concluíram que o processo de reparação óssea em coelhos, induzido pela aplicação de medula óssea pela via percutânea, é um fenômeno precoce. Este resultou em formação direta de tecido ósseo, nas falhas segmentares produzidas no rádio, principalmente nas primeiras semanas. Croci et al (2004) concluíram que o uso do aspirado de medula

óssea de íliaco, colocado em falhas ósseas de fêmures de camundongos, não levou a estimulação da formação do calo ósseo, e que não houve aumento do processo inflamatório no local das falhas óssea.

3.3. PROTEÍNA MORFOGÊNICA DO OSSO (BMP)

Urist descobriu, em 1965, que a matriz óssea desmineralizada podia induzir a formação óssea ectópica em tecido subcutâneo. Essa característica, mais tarde, foi atribuída a proteína morfogênica do osso (BMP), as quais são glicoproteínas hidrofóbicas e osteoindutoras, pertencentes à superfamília TGF- β (LINDSEY, 2001; YOON, BONDEN, 2002; CHUBINSKAYA, KUETTNER, 2003; LU et al, 2003; SALGADO, COUTINHO, REIS, 2004; KAITO et al, 2005).

Em virtude de sua baixa massa molecular, que varia de 16 a 30 kDa, estas proteínas induzem a nenhuma ou fraca resposta imune, sendo bem toleradas pelo organismo (PINTO et al, 2000; MARX, 2001; ZAMBUZZI et al, 2005). Johnson et al (1989) demonstraram o efeito espécie específica das BMPs. Aparentemente uma única dose de BMP xenogênica, maior que 100 mg, é segura e não produz resposta imune detectável, mas Nilsson e Urist (1991) mostraram que um segundo implante deste peptídeo resulta em intensificação da resposta imune e reduz a eficácia da BMP xenogênica no tratamento de lesões extensas em cães. Para Granjeiro e co-autores (2005), os implantes alogênicos ou xenogênicos dessas proteínas promoveram o recrutamento de macrófagos, linfócitos e células plasmáticas, além da produção de anticorpos, que inibiram a osteogênese.

As BMP's são indicadas para uso em grandes perdas ósseas, as quais podem ser decorrentes de anomalias de desenvolvimento, bem como defeitos causados por trauma na estrutura óssea, além de doenças infecciosas e inflamatórias (SANTOS et al, 2005), pois ela é importante na regulação normal do crescimento ósseo endocondral, na remodelação e facilitação da reparação óssea (SIPE et al, 2004). Vários meios de utilização das BMPs estão sendo avaliados, dentre eles a administração sistêmica, a terapia celular, a

transferência de genes, o tratamento a base de citocinas e a implantação local (GONÇALVES, GUIMARÃES, GARCIA, 1998; KIRKER-HEAD, 2000; MA et al., 2000; BAUER, SMITH, 2002; YOON, BODEN, 2002; KAITO et al, 2005). De acordo com Huang e colaboradores (2004) existe um sinergismo entre a BMP e as BM-MS. Estas, segundo Kaito e co-autores (2005), podem ser diferenciadas por aquelas através da terapia celular, em osteoblastos. Já a transferência gênica envolve a transdução da codificação genética do BMP, dentro das células no sítio reparador. Enquanto o tratamento com citocinas, envolve a proteína morfogênica óssea recombinante humana (rhBMP) e carreadores que concentram e liberam esta proteína quando necessário (KAITO et al, 2005).

Um substrato carreador ideal para BMP deve apresentar relativa insolubilidade sobre condições fisiológicas, biodegradabilidade, proteção contra digestão proteolítica, atuação como uma armagem para adesão e proliferação celular, bem como inércia imunológica e baixa liberação de BMPs (PEKKARINEM et al., 2005), além de ser osteocondutivo, prático e de fácil manipulação (MARX et al., 1998).

Pinto et al. (2000), Taga (1996) e Kaito et al. (2005) afirmaram que a adsorção das BMP's às HA's garantem um maior tempo de permanência dessas proteínas na área enxertada. Aun et al. (2005) observaram significativa aceleração da regeneração óssea, com essa combinação, em defeitos criados em tíbias de ratos. De acordo com Sykaras e Opperman (2003) essa união (HA-BMP) induziu a ossificação intramembranosa. Mas para Yoneda et al. (2005), a HA não tem habilidade de conservar essa proteína, sendo necessárias altas doses de BMP para aceleração do processo de reparo ósseo, apesar de ter obtido sucesso com esse carreador para formação de tecido ósseo *in vivo*. Brandão et al. (2002) verificaram por meio de análise histológica e histométrica, que essa associação não trouxe benefícios à formação óssea no período normal de reparação alveolar de ratos. Ferreira et al. (2004) sugeriram que a HA sintética microgranular não é bom carreador para as bBMP's expressarem seu potencial indutor, pois utilização destas no tratamento de defeitos ósseos cranianos em ratos, promoveu reação granulomatosa tipo corpo estranho, o que inibiu a neoformação óssea.

O potencial osteogênico das BMPs, em comparação aos outros fatores de crescimento, é maior (SCHMAEDECKE et al, 2003). Ma et al (2000), Moran e Tourret (2001), Croci e colaboradores (2003), Granjeiro et al (2005) e Zambuzzi e co-autores (2005) citaram que a BMP tem ação, ectópica, sobre a diferenciação citoespecífica óssea, com ativação e proliferação de células mesenquimais, formação de cartilagem, desenvolvimento de osso primitivo e constituição do osso lamelar, além de estimularem a neovascularização. Enquanto para Sykaras e Opperman (2003) a diferenciação de células mesenquimais em pré-condroblastos é induzida por BMPs, mas a coordenação progressiva da transformação de condroblastos em subsequentemente linhagens osteoblásticas é regulada por outros fatores de crescimento (FC).

Kaneko et al (2000) disseram que as BMPs são capazes de promover a ossificação endocondral, quando implantadas em sítios ectópicos. Afirmaram também que esta proteína atua diretamente sobre os progenitores dos osteoclastos para estimular sua diferenciação in vitro, além de ser quimiotático para monócitos. Behnam et al (2005) verificaram, no exame histológico, calcificação distrófica associada ao tecido adiposo intra-muscular, em ratos implantados com o peptídeo (BMP), no músculo quadríceps. O mesmo não foi observado nos animais controle.

A quantidade de osso neoformado é diretamente proporcional à quantidade de proteína morfogênica óssea (NILSSON, URIST, 1991; CROCI et al, 2003). A dose de BMP aplicada no local da implantação, assim como, as respostas celulares na área/local do enxerto, a vascularização e a natureza do material carreador, são fatores responsáveis pela determinação do tipo de ossificação (SYKARAS, OPPERMAN, 2003; SANTOS et al, 2005). Baixas quantidades desta proteína induzem a diferenciação de MSC em linhagens de adipócitos, enquanto altas doses, em linhagens condrogênicas e osteogênicas (SYKARAS, OPPERMAN, 2003). Lu et al (2003) mencionaram que ao se utilizar polímero biodegradável como carreador, deve-se reduzir a proporção necessária de BMPs para formação óssea.

Nilsson e Urist (1991) implantaram 50 mg de BMP de origem bovina (bBMP) em defeitos em crânio de cães, obtiveram regeneração óssea média de 96%. Sykaras e Opperman (2003) induziram formação óssea em

subcutâneo de ratos com 0,15 µg de rhBMP-2 associada a matriz, enquanto um mínimo de 75µg é requerido na ausência de matriz. Huang et al (2004) utilizou 5 µg de BMP *in vivo*, o qual serviu como núcleo para nova formação óssea. Machado et al (2005) utilizou a dosagem de 1,0 mg de bBMP em seu experimento. Segundo recomendações de Damien et al (2002) para modelos experimentais em coelhos devem ser utilizadas doses mínimas de 0,15 mg de BMP bovina (bBMP). Kaito et al (2005) implantaram 5 ou 20 µg de BMP associada a HA, biodegradável em modelo de rádio de coelhos. Concluíram que o polímero é um excelente carreador para rhBMP e aumenta a regeneração do tecido ósseo. Observaram que de duas a quatro semanas, pós-implante (PI) a alta dose de BMP produziu formação óssea superior. Contudo oito semanas PI, os dois tratamentos obtiveram os mesmos achados histológicos.

Para Pinto e colaboradores (2000) a BMP comportou-se como excelente material de enxerto, com qualidade evidenciada clinicamente pela manutenção do rebordo, e histologicamente com a aceleração do processo de reparo, otimizando tanto qualitativamente quanto quantitativamente o processo de restauração óssea do alvéolo enxertado.

3.4. PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)

O plasma rico em plaquetas (PRP) é derivado de sangue autólogo, obtido por punção venosa, acondicionado em tubos a vácuo ou sistema de bolsa com citrato de sódio e submetido à centrifugação. É colhido em período pré-operatório, além de ser rico em fatores de crescimento (FC) originários dos grânulos α -plaquetários. Seu produto final é composto por plasma, alta concentração de plaquetas, precursores de plaquetas e leucócitos (MARX et al., 1998; ANITUA, 1999; DUGRILLON et al., 2002; WEIBRICH et al., 2002; AJZEN et al, 2005). A concentração mínima de plaquetas após a centrifugação deve ficar em torno de 1.000.000 de plaquetas/µl (MARX, 2001; FERREIRA, 2004; GRAGEDA, 2004). Ele também contém três proteínas moleculares de adesão, que são a fibrina, fibronectina e vitronectina, que auxiliam na formação

de matriz óssea, tecido conectivo e migração epitelial (FERREIRA, 2004; MARX, 2004). A ação do PRP sobre a cicatrização está ligada a sua capacidade de aumentar a mitogênese e estimular a angiogênese (MARX, 2001).

Nas áreas de cirurgia reconstrutiva, maxilofacial e implantodontia, têm-se utilizado o PRP, com aparente sucesso, em associação com enxertos ósseos (LYNCH et al, 1989; ANITUA, 2001; TÖZÜM, DEMIRALP, 2003; KAWASE, OKUDA, YOSHIE, 2003; YAZAWA et al, 2004). É um produto atóxico, não imunoreativo, sem risco de transmissão de doenças (MARX, 2001; YAZAWA et al, 2004; FERREIRA et al., 2005), de baixo custo, fácil manipulação, e aprovado pela FDA (MARX, 2004), que deve ser utilizado em curto espaço de tempo, devido a sua rápida desvitalização (ANITUA, 1999; MARX, 2001; DUGRILLON et al., 2002; TISCHLER, 2002; FERREIRA, 2004).

De acordo com Anitua (2001) e Marx (2001 e 2004) o PRP tem propriedade osteocondutiva, promove a osseointegração, não contém BMP e não é osteoindutivo. Já Tsay et al (2005) dizem que ele sozinho não apresenta efeitos osteocondutivos ou osteoindutivo na regeneração óssea e habitualmente é usado em conjunto com substitutos ósseos. Dugrillon et al. (2002) verificaram que a matriz de fibrina é essencial para osteocondução, pois penetram completamente nos poros do biomaterial. Para Croci e co-participantes (2003) não há aumento do processo inflamatório, com o uso do concentrado de plasma, no local das falhas ósseas.

A propriedade adesiva do gel de PRP, segundo Landesberg et al. (2005), oferece vantagens mecânicas, quando usados com substitutos ósseos. Este, de acordo com Lucarelli e colaboradores (2003), aumenta a cicatrização de tecidos moles, pois estimula a vascularização local, e quando adicionado a biomateriais para enxerto, reduz significativamente o tempo requerido para promover a consolidação, maturação e aumento a densidade do osso trabecular. Anitua (1999) não encontrou efeitos negativos produzidos com o uso deste gel, e concluiu que a epitelização em 100% dos casos foi completa e significativamente melhor do que nas áreas não tratadas com PRP. Para Croci e co-autores (2000) e Kawase (2003) existe uma tendência de formar matriz óssea com o uso de concentrado de plasma, pois, como descrito por Marx e

colaboradores (2004) o PRP aumenta as células osteoprogenitoras no osso hospedeiro e nos enxertos ósseos. Quando associado a implantes autógenos, ele aumenta a taxa de reabsorção, formação e a densidade óssea (MARX et al, 1998; FENNIS, STOELINGA, JANSEN, 2004).

Santana (2003) verificou que o preenchimento de lesões ósseas com PRP foi satisfatório, no processo de reparo, aos 28 dias de pós-operatório (PO). Em contraste com Croci et al (2003), que relataram que o uso de concentrado de plasma em falhas ósseas de fêmures de camundongos, não levou a estimulação de formação do calo ósseo. Choi e colaboradores (2004) avaliaram o efeito do PRP sobre a regeneração óssea em defeito mandibular com osso autógeno em modelo canino, e também concluíram que o PRP não aumentou a formação óssea.

Lucarelli et al. (2003) investigando a proliferação de BM-MSC em meio de cultura suplementada com PRP, verificaram que o uso de 10% deste produto foi suficiente para acelerar a mineralização. Estes juntamente com Ferreira e colaboradores (2005) concluíram que o PRP promove o aumento da proliferação de osteoblastos *in vitro*.

3.4.1. FATORES DE CRESCIMENTO SECRETADOS PELOS GRÂNULOS α -PLAQUETÁRIOS

Na década de 80, os grandes laboratórios de pesquisa procuraram investigar a possibilidade de utilização de mediadores químicos na modulação do processo de reparo dos enxertos ósseos. Então os fatores de crescimento (FC) foram identificados, isolados e testados quanto à sua capacidade osteoindutora (LYNCH et al, 1989). Eles agem nas células osteoprogenitoras diferenciando-as e auxiliando o trabalho das células presentes no osso pré-existente (YOUNG et al, 2003). Desta forma, nos defeitos ósseos maiores onde as células remanescentes não são suficientes para induzir o reparo, os FCs desempenham um papel fundamental (LYNCH et al., 1991), além disso eles ainda apresentam um efeito sinérgico entre si (YAZAWA et al, 2004).

Os fatores de crescimento são mediadores biológicos naturais que exercem vários efeitos sobre processos de reparo e regeneração (FERREIRA, 2004). São os iniciadores universais de quase todo o processo de cicatrização (MARX et al, 1998; AJZEN et al, 2005; FERREIRA et al, 2005). Estes polipeptídeos são responsáveis pela regulação de diversos eventos celulares tais como síntese de DNA (LYNCH et al., 1989; OKUDA et al., 2003), quimiotaxia, citodiferenciação e produção de matriz (MARX et al, 1998; TÖZÜM, DEMIRALP, 2003; FERREIRA, 2004), bem como a síntese de proteínas colágenas e não colágenas (LYNCH et al, 1989) e morfogênese dos tecidos e órgãos (TÖZÜM, DEMIRALP, 2003; FERREIRA, 2004).

Três importantes fatores de crescimento são derivados dos grânulos α -plaquetários, o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e o fator de crescimento similar a insulina (IGF) (LYNCH, 1991; ANITUA, 1999 e 2001; DUGRILLON et al., 2002; EFEUGLU, AKÇAY, ERTÜRK, 2004; FERREIRA, 2004; YAZAWA et al, 2004). Durante o processo de degranulação plaquetária há também a liberação de fatores vasoativos como serotonina e histamina (DAVIES, 2003).

O PDGF é uma glicoproteína de massa molecular com aproximadamente 30kDa e tem estrutura formada por duas cadeias básicas de aminoácidos A e B (MARX et al, 1998; ANITUA, 1999; TÖZÜM, DEMIRALP, 2003; GRAGEDA, 2004; TSAY et al., 2005). Além de ser sintetizado pelas plaquetas, ele também pode ser produzido e secretado pelos macrófagos, células endoteliais, monócitos, fibroblastos e matriz óssea (ANITUA, 2001; OKUDA et al., 2003; FERREIRA, 2004; SALGADO, COUTINHO, REIS, 2004). Ele não apenas estimula a proliferação de osteoblastos, apresentando também capacidade para recrutamento, migração e proliferação de BM-MS (DAVIES, 2003; GRAGEDA, 2004; TSAY et al., 2005). Este FC também estimula a reabsorção óssea, pois aumenta o número de osteoclastos, levando a uma rápida remodelação (GRAGEDA, 2004). Em 1.000.000 de plaquetas são encontrados 0,06 ng de PDGF (YAZAWA et al, 2004).

A superfamília do TGF- β , em média com 24 kDa (TSAY et al., 2005), inclui o TGF- β propriamente dito, as proteínas morfogênicas do osso (MARX et al, 1998; FERREIRA, 2004) e as ativinas. O fator de crescimento transformador

beta é uma citocina produzida por linfócitos T, macrófagos e plaquetas (SIQUEIRA Jr., DANTAS, 2000). Foi primeiramente isolado de tecidos neoplásicos, como os sarcomas (ANITUA, 1999; FERREIRA, 2004) e apresenta três estruturas diferentes: TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 (ANITUA, 1999). As duas primeiras agem a favor da formação óssea aumentando a proliferação das MSC (MARX et al., 1998; ANITUA, 1999; FERREIRA, 2004). São potentes estimuladores do crescimento e diferenciação de osteoblastos (SALGADO, COUTINHO, REIS, 2004; TSAY et al., 2005) além de produzirem colágeno (TÖZÜM, DEMIRALP, 2003; GRAGEDA, 2004). Podem também estimular a síntese de matriz extracelular e atrair células ósseas por quimiotaxia (MARX et al., 1998; TÖZÜM, DEMIRALP, 2003; YAZAWA et al., 2004). Outros autores citam a ocorrência de inibição da formação dos osteoclastos e sua reabsorção óssea (MARX et al., 1998; ANITUA, 1999), através da indução de apoptose destas células (KANAKO et al., 2000; GREGEDA, 2004). Para Kawase et al (2003) ele é o principal e mais potente modulador contido no PRP, pois regula a proliferação celular no sítio enxertado.

Os IGFs têm 7,6 kDa (TSAY et al., 2005) e são encontrados em duas formas: IGF-1 e IGF-2 (TÖZÜM, DEMIRALP, 2003; GRAGEDA, 2004) os quais possuem efeitos similares sobre o metabolismo ósseo, mas o primeiro é mais potente que o último (GRAGEDA, 2004; SALGADO, COUTINHO, REIS, 2004). O IGF-1 é o maior estimulador sistêmico da síntese óssea de colágeno (LYNCH et al., 1989; GRAGEDA, 2004; SALGADO, COUTINHO, REIS, 2004), e está relacionado com o reparo tecidual, possuindo habilidade de facilitar a síntese de DNA e a multiplicação celular (SIQUEIRA Jr, DANTAS, 2000). Eles estimulam a osteogênese a partir dos osteoblastos diferenciados já existentes e possuem atividades de quimiotaxia para fibroblastos, osteoblastos e células progenitoras dos osteoclastos (LYNCH, 1989; TÖZÜM, DEMIRALP, 2003).

Segundo Tischler et al (2005) o local da cicatrização óssea segue a seguinte seqüência de eventos: inicialmente é desejável que estejam presentes PDGF e TGF- β , seguido por TGF- β na fase intermediária, e IGF-1 e BMPs durante a fase final da diferenciação e maturação óssea.

A eficácia dos fatores de crescimento no avanço da regeneração óssea é proporcionalmente dependente da dosagem, distribuição espacial e da

disponibilidade de tempo que estes fatores terão no sítio lesado (TSAY et al., 2005). A secreção ativa desses fatores é iniciada pelo processo de coagulação sangüínea e começa aproximadamente em 10 minutos após a formação do coágulo, sendo que próximo de uma hora, mais de 95% destes polipeptídios foram eliminados. As plaquetas secretam esses mediadores biológicos durante 5 a 7 dias, quando então chegam a exaustão e morrem. A partir deste momento, os macrófagos atingem a região por via vascular e assumem a função de cicatrização da ferida regulando a secreção destes FCs (TISCHLER, 2002; MARX, 2004).

III. MATERIAL E MÉTODO

1. ANIMAIS

Utilizou-se 51 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), machos, da raça Nova Zelândia, brancos, com idade entre 3 e 5 meses e que pesavam entre 1,5 a 2,5kg. Os animais foram alojados em um galpão do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), com circulação natural de ar e em temperatura ambiente. Foram submetidos a um período de um (1) mês de adaptação ao ambiente, permanecendo alojados em gaiolas individuais, recebendo água *ad libitum* e 100 gramas (g) diários de ração comercial (Agroceres Nutrição Animal, Piracicaba, SP) até o término do experimento. Também foi ministrado tratamento profilático, para sarna otodécica e parasitos intestinais, a base de ivermectina 1% na dose de 0,3 mg/kg, por via subcutânea (SC), a cada 21 dias, além da inspeção clínica diária.

Foram formados cinco grupos de dez (10) animais cada, excetuando-se o último formado por onze (11), submetidos aos seguintes implantes:

Tratamento 1 – HA + BMP

Tratamento 2 – HA + MO

Tratamento 3 – HA + BMP + MO

Tratamento 4 – HA + PRP

Tratamento 5 – HA + BMP + PRP

Cada animal foi numerado, de um (1) a cinquenta e um (51), na face interna das orelhas.

2. BIOMATERIAIS

2.1. HIDROXIAPATITA

A hidroxiapatita sintética (HA) foi disponibilizada pelo JHS Laboratório Químico Ltda., Belo Horizonte – MG, e foi patenteada sob o nome de HAP-91. Esta foi sintetizada a partir do calcário, preparada com granulometria média de 50 mesh (grânulos de 200 a 300 μm) e constituída de 70% de hidroxiapatita e 30% de β -trifosfato de cálcio (ANDRADE et al., 2002).

2.2. PROTEÍNA MORFOGÊNICA BOVINA (BMP)

A BMP é um conjunto de proteínas originárias do osso cortical fetal bovino, obtidas pela técnica de Taga e Mulatinho (1999), e está disponível comercialmente com o nome de Gen-Pro[®] da Baumer S.A. – Divisão Biomateriais - Brasil. Esta vem associada à hidroxiapatita sintética na proporção de uma (1) parte de BMP para dez (10) partes de hidroxiapatita (HA).

Neste experimento a HA (HAP-91) foi associada a BMP (Gen-Pro) na proporção de 5 mg para 2,5 mg, respectivamente, pois com este volume evitou-se manipulação desnecessária preservando a técnica asséptica de utilização desse biomateriais.

2.3. MEDULA ÓSSEA (MO)

Realizou-se tricotomia na região da extremidade proximal do úmero esquerdo e posterior assepsia local com álcool 70°. Aspirou-se 1,0 ml de medula óssea (MO) no tubérculo maior do úmero, com o auxílio de uma agulha hipodermica 18G, acoplada a uma seringa de 10 ml, contendo 0,5ml (1000 U/ml) de heparina sódica (Figura 1). Procurou-se aspirar a MO o mais próximo da superfície endosteal, pois as células mesenquimais indiferenciadas se encontram mais concentradas nesta região (ASHTON et al., 1984; TIEDEMAN et al., 1991).



Figura 1: Inserção da agulha no tubérculo maior do úmero esquerdo e aspiração da medula óssea.

2.4. PLASMA RICO EM PLAQUETAS

O plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido pela coleta de 4,5 ml de sangue a partir da veia jugular externa, num tubo estéril contendo 0,5 ml do anticoagulante citrato de sódio que posteriormente foi centrifugado, em uma centrífuga de bancada, conforme protocolo proposto por Sonnleitner, Huemer e Sullivan (2000):

1. Cada tubo foi centrifugado por 20 minutos a 1200 rpm (160g), onde houve a separação celular através de gradiente de concentração:
 - A porção celular (leucócitos e hemácias) sedimentada na porção final do tubo (Figura 2).
 - Uma fração superior, turva, amarelo palha, com plasma e plaquetas (Figura 2).

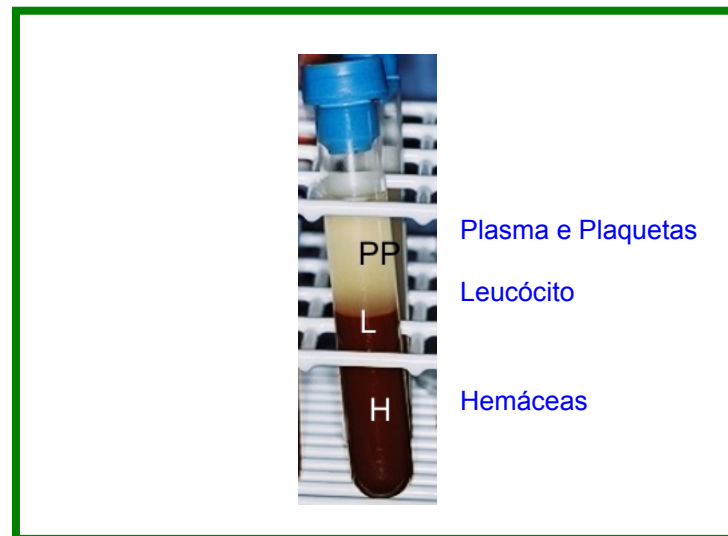


Figura 2: Separação obtida após primeira centrifugação.

2. Um ponto de 6 mm abaixo da linha de divisão entre estas duas fases, foi marcado.
3. Toda porção superior até este ponto foi pipetada e colocada em um tubo estéril e sem anticoagulante.
4. Os tubos foram centrifugados novamente por 15 minutos a 2000 rpm (400g):
 - O componente superior do soro foi removido. A substância restante, aproximadamente 0,5 ml no fundo do tubo, foi considerado o PRP disponível (Figura 3).

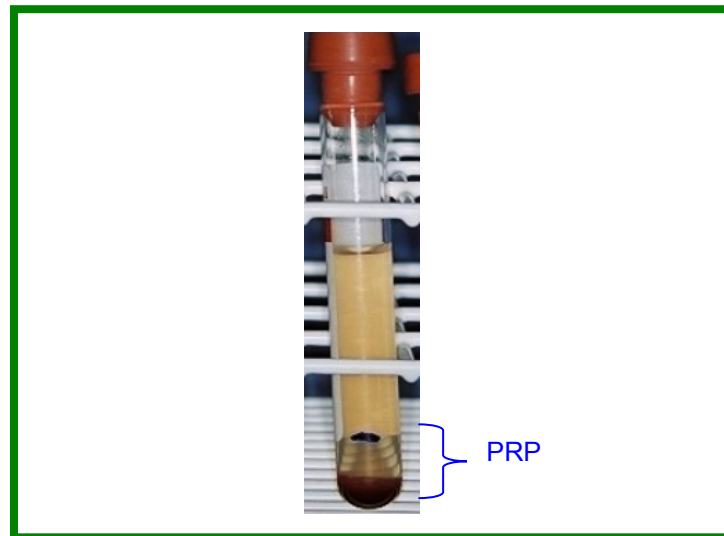


Figura 3: Separação obtida após segunda centrifugação.

Nota: PRP = plasma rico em plaquetas.

5. Geração gel de PRP

- Para obtenção do gel de PRP adicionou-se, com o auxílio de uma pipeta de Eppendorf, 25 µl de solução de cloreto de cálcio 10% ao concentrado obtido (ANITUA,1999).
- Esperou-se em média 10 minutos para a formação do gel dentro de uma seringa estéril de 1 ml acoplada a um cateter de 16G.

3. TÉCNICA OPERATÓRIA

As cirurgias foram realizadas em ambiente controlado, na sala de cirurgia experimental da Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da UFU, sob anestesia geral, seguindo-se rigorosamente técnicas de assepsia. Obedeceu-se a prática didático-científica de vivisseção de animais segundo o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os animais foram operados pelo mesmo cirurgião.

Após jejum de 12 horas e tricotomia da face externa das orelhas direita e esquerda, os coelhos de todos os grupos foram anestesiados com uma associação, na mesma seringa, composta por acepromazina 1% (1mg/kg), midazolan (5mg/kg), quetamina (25mg/kg) e xilazina 2% (10mg/kg), aplicada por via intramuscular (IM) profunda, na região glútea.

Os animais receberam o anti-inflamatório flumexina meglumina (Banamine® - Shering Plought do Brasil) na dose de 1mg/kg por via subcutânea (SC), para controle da dor e o antibiótico cefazolina sódica (Cezolin®) na dose de 30mg/kg por via intravenosa (IV), para profilaxia, como medicações pré-anestésicas. O anti-inflamatório continuou sendo administrado na mesma dose e via, uma vez ao dia durante 3 dias consecutivos de pós-implante (PI).

No pós-operatório imediato, mantiveram-se os animais em ambiente aquecido e confortável até a recuperação total, quando então foram recolocados em suas gaiolas, onde houve a liberação de ração e água.

Para a anti-sepsia do campo operatório, usou-se solução polivinil pirrolidona iodada seguida de álcool 70°.

Com o auxílio de uma agulha peridural Tuohy 18G estéril e descartável, foram feitos dois túneis longitudinais subcutâneos, medindo aproximadamente 2,5 cm de comprimento, em cada face externa da orelha dos coelhos, sendo um medial e outro lateral a artéria auricular média, e abriu-se, em seu final, uma loja levemente escarificada (Figura 4).



Figura 4: Confecção do túnel subcutâneo, com agulha peridural de Thuoy

Com o subsídio de um cateter intravenoso 16G, também estéril e descartável (BD, São Paulo – SP, Brasil), introduzido pelo túnel subcutâneo, implantou-se em sua porção final $\pm 0,01$ mg dos biomateriais sólidos, HA ou HA + BMP (Figura 5) e 0,2 ml dos líquidos (MO ou PRP), de acordo com o que foi preconizado para cada tratamento (Figura 6).

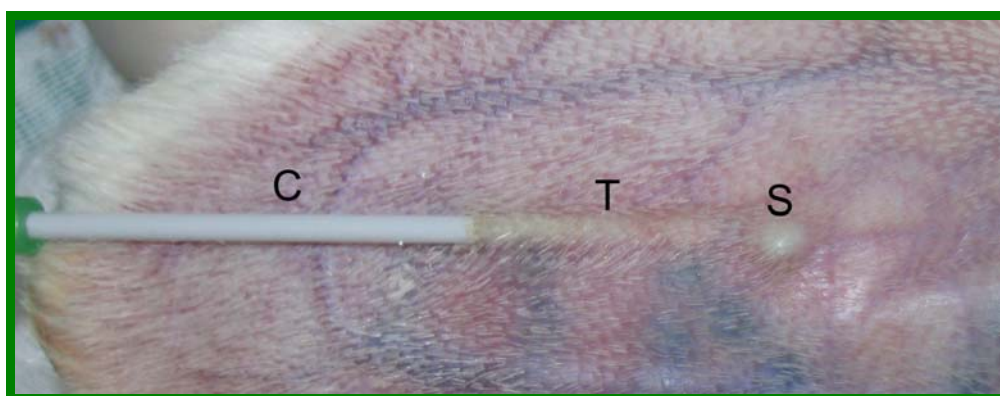


Figura 5 Inserção do cateter 16 G (C) pelo túnel subcutâneo (T), para o implante do biomaterial sólido (S).



Figura 6: Colocação do cateter (C) pelo túnel subcutâneo (T) para inserção do biomaterial líquido (L).

4. COLETA DO MATERIAL

A coleta do material foi realizada aos 30 e 45 dias pós-implante, em ambiente cirúrgico, seguindo-se as técnicas de assepsia. Após anestesia geral com a associação descrita anteriormente, de quetamina, xilazina, acepromazina e midazolan, usou-se um trépano com diâmetro 0,5cm, para excisar um fragmento, o qual continha pele externa, material, cartilagem e pele interna da orelha (Figura 7).

Para padronização das coletas das amostras, os implantes laterais foram retirados com 30 dias e os mediais com 45 dias. Foram coletados dois fragmentos de orelha de cada coelho e em cada período estudado (30 e 45 dias), num total de quatro amostras por animal.

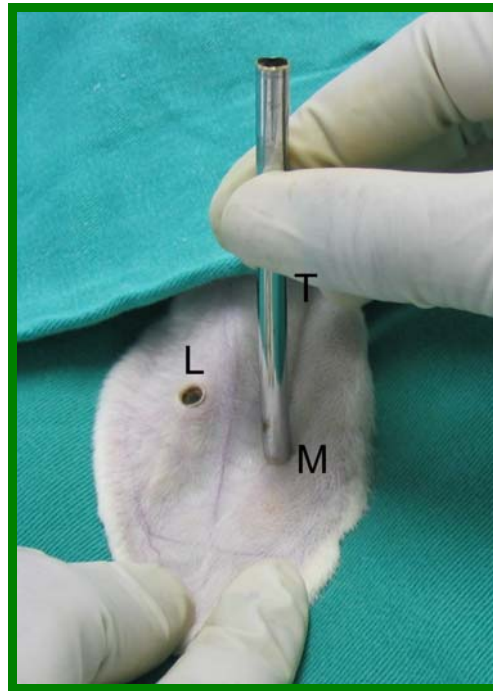


Figura 7: Biópsia dos biomateriais. L = implante lateral retirado aos 30 dias.
M = implante medial, retirado aos 45 dias. T = trépano

5. AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

Os coelhos foram avaliados diariamente até o término do experimento, por um só observador, quanto à presença (1) ou ausência (0) dos sinais cardeais da reação inflamatória (dor, calor, rubor e edemaciação) e de úlceras sobre a pele do local de implante dos biomateriais.

6. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

As avaliações histológicas foram analisadas pelo mesmo observador e realizadas de forma cega, sem que o avaliador tivesse conhecimento do tipo de tratamento a que foi submetido o espécime. Realizaram-se análises qualitativas e quantitativas do material visualizado microscopicamente.

Os fragmentos de orelha coletados foram fixados em formol a 10%, processados em parafina, cortados com 5 µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina (HE) para análise em microscopia de luz, no Laboratório de Histologia da UFU.

O estudo dos fragmentos consistiu da contagem de células inflamatórias (polimorfonucleares (PMN), linfócitos e plasmócitos), células gigantes multinucleares tipo corpo estranho (CGMCE) e células de reparação como os fibroblastos. Além da observação quanto à presença (1) ou ausência (0) de formação óssea ectópica (FOE), tecido conjuntivo com fibras colágenas desorganizadas, semelhante a osso primário (OP) e cápsula fibrosa, bem como a mensuração da intensidade da angiogênese (SANADA et al., 2003; FERREIRA et al., 2004). Foram analisados 16 campos por corte, ou seja, analisou-se todo o fragmento da orelha. Usaram-se objetivas de 10X e 40X. A descrição da análise histológica se encontra no Quadro 2.

7. ANALISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos ao teste estatístico não paramétrico de Wilcoxon Signed Rank-Sum Test, através de ranqueamento, conforme descrito por Doria Filho (1999). Fixou-se em 0,05 o nível para rejeição da hipótese de nulidade.

Quadro 2 – Pontuação adotada para avaliação do exame histológico dos fragmentos de orelha dos coelhos, aos 30 e 45 dias do período pós-implante.

Achados ao Exame Histológico	Pontuação Adotada para a Avaliação	Objetivas
Fibroblastos (fibroblastos por campo)	1 – de 10 a 15 2 – de 16 a 25 3 – mais de 26	40X
Neovascularização (vasos por corte histológico)	1 – até 15 2 – de 16 a 20 3 – mais de 21	10X
Reação Célula Gigante Tipo Corpo Estranho (CGMCE)	0 – ausente 1 – pouco presente (até 5 CGMCE por corte), fragmentos de implante bem espalhados pela lâmina, demonstrando que o tecido já está em recuperação. 2 – presença moderada (de 6 a 25 CGMCE por corte), presença de tecido conjuntivo com fibras colágenas infiltradas entre os fragmentos do implante. 3 – presença intensa (mais de 26 CGMCE por corte), grande quantidade de células gigantes que se sobrepõe entre os fragmentos do implante, dificultando a sua individualização.	10X
Reação Inflamatória: Polimorfonucleares (PMN), Linfócitos, Plasmócitos (células por corte histológico)	0 – ausente 1 – presença de 1 a 5 2 – presença de 6 a 10 3 – presença de 10 a 20 4 – presença de mais de 20	40X
Macrófagos (células por corte histológico)	0 – ausente 1 – presença de 1 a 5 2 – presença de 6 a 10 3 – presença de 10 a 20 4 – presença de mais de 20	40X
Formação Óssea (FO)	0 – ausente 1 - presente	10X
Tecido Conjuntivo com Fibras Colágenas Desorganizadas, Semelhante a Osso Primário (OP)	0 – ausente 1 - presente	10X
Cápsula Fibrosa e Fina	0 – ausente 1 - presente	10X

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

O coelho foi selecionado como animal de experimentação por ser dócil, de fácil aquisição e manuseio, além de baixo custo (KALLAS et al., 2001; MATOS, GONÇALVES, ARAÚJO, 2001; SCHNAIDER, SOUZA, 2003; FIGUEREDO et al., 2004).

A anestesia foi adequada, embora tenha ocorrido a morte de dois animais do tratamento 5, quando da biopsia realizada aos 30 dias. Estes animais foram considerados para análise estatística das excisões dos fragmentos apenas neste período.

O uso de anti-inflamatório e a profilaxia antimicrobiana mostraram-se adequados, já que não foram observadas infecção do sítio cirúrgico, bem como os animais não tiveram alteração no comportamento e se alimentaram normalmente durante todo o experimento.

A técnica utilizada para implantação dos biomateriais foi simples e de fácil execução, apresentando baixa morbidade para os coelhos. Além disso, as características físicas da orelha externa destes animais facilitaram a obtenção de volumes adequados de fragmentos, limitando o trauma, sem necessidade de sacrifício dos mesmos, o que concorda com apreciações feitas por Lima (2003).

Na avaliação diária, os animais mostraram-se hígidos, cresceram e ganharam peso. Em julgamento subjetivo da dor, isto é, resposta ao toque digital no local de implante nas orelhas externas dos coelhos, verificou-se que estes não apresentavam sensibilidade dolorosa. Não foram visualizadas formações de úlceras de pele no local do implante, pois se confeccionou um

túnel, fazendo-se em seu final, uma loja levemente escarificada. Assim, os materiais tiveram mais espaço para se alojarem, o que provavelmente não prejudicou a vascularização local. Estes achados estão em desacordo com Lima (2003), provavelmente porque este autor compactou os materiais na porção final do túnel, o que pode ter interferido negativamente no suprimento vascular da área do enxerto, ocasionando, desta forma, as úlceras de pele.

O método de coleta da medula óssea (MO) através de aspirado do trocater maior do úmero, bem como o processo de preparo do gel de plasma rico em plaquetas (PRP), foram simples e apropriados.

2. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Escolheu-se a análise histológica em microscopia de luz, com coloração de hematoxilina e eosina (HE), pois as mesmas garantem uma boa avaliação celular do tecido subcutâneo auricular, com os biomateriais (SICCA et al., 2000; ANDRADE et al., 2002; BRAZ et al., 2003).

2.1. FORMAÇÃO ÓSSEA ECTÓPICA

A escolha pela não desmineralização do fragmento de orelha externa, para preservação dos biomateriais, dificultou a obtenção dos cortes. Muitos destes rasgaram-se e durante a microtomia ocorreu perda parcial de material, o que poderia ser sugestivo de presença de tecido mineralizado. Lima (2003) e Sanada et al. (2003) também optaram pela não desmineralização do material, ao passo que Heikkilä et al. (1993), Braz et al. (2003), Hamata et al. (2004) e Kaito et al. (2005) preferiram a desmineralização óssea.

Foi observada a presença de osso ectópico em duas lâminas, uma pertencente ao tratamento 5 (HA+BMP+PRP) e a outra ao tratamento 1 (HA+BMP), nos períodos de 30 e 45 pós-implantação (PI), respectivamente (Tabela 1, Figura 8). Estes, provavelmente, se originaram devido à deposição dos biomateriais nas adjacências da cartilagem auricular. Observou-se que nestes grupos havia a presença de BMP. Acredita-se que a formação óssea

ectópica tenha ocorrido em virtude da existência desta proteína no sítio de implantação. Corroborando com descrições feitas por Kaneko et al. (2000), Lindsey (2001), Yoon e Bonden (2002), Chubinskaya e Kuettner (2003), Lu et al. (2003), Salgado, Coutinho e Reis (2004), Sipe et al., (2004), Behnam et al. (2005) e Kaito et al. (2005).

Notou-se que a FOE foi mais intensa no tratamento 5 (HA+BMP+PRP), possivelmente devido a presença de maior quantidade de fatores de crescimento (FC) presentes no PRP, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) que tem ação mitogênica e de quimiotaxia dos osteoblastos (ANITUA, 1999; DAVIES, 2003; OKUDA et al., 2004), otimizando o anabolismo e o crescimento do tecido ósseo (SCARSO FILHO et al., 2001). E do fator de crescimento transformador beta ($TGF-\beta$), que é potente estimulador de crescimento e diferenciação de osteoblastos (SALGADO, COUTINHO, REIS, 2004; TSAY et al., 2005) além de estimular a produção de colágeno (TÖZÜM, DEMIRALP, 2003; GRAGEDA, 2004). Para Croci et al. (2000) e Kawase et al. (2003) existe uma tendência de formar matriz óssea com o uso de concentrado de plasma. Conforme descrição de Marx et al. (2004) o PRP estimula a produção de células osteoprogenitoras no osso hospedeiro e nos enxertos ósseos, além de aumentar a densidade óssea (MARX et al., 1998; FENNIS, STOELINGA, JANSEN, 2004).

Somada aos FCs do PRP, no tratamento 5 (HA+BMP+PRP), havia a proteína morfogênica óssea, que provavelmente incrementou esta FOE, pois segundo Schmaedecke et al. (2003), a BMP tem potencial osteogênico superior quando comparada a outros fatores de crescimento. Já para Sykaras e Opperman (2003) a diferenciação de células mesenquimais em pré-condroblastos é induzida por BMPs, mas a coordenação progressiva dos condroblastos e subsequentemente linhagens osteoblásticas é regulada por outros FCs. Percebe-se assim, que este processo só foi possível devido ao sinergismo destes fatores de crescimento.

A presença do cálcio e fósforo, oriundos da hidroxiapatita (HA), talvez tenha interferido na formação óssea subcutânea, pois para Bonachela et al. (1992), Oliveira et al., (1999) e Riminucci e Bianco (2003) esse aumento considerável do nível extracelular de cálcio e fósforo, é essencial para a

neoformação do tecido ósseo. Enquanto que de acordo com relatos de Glowacki e Cox (1986), Oliveira et al. (1999), Cavassani, Moraes e Padilha Filho (2001), e Zambuzzi et al., (2005) a implantação de matriz óssea mineralizada no tecido subcutâneo ou intramuscular inibiu a osteogênese em sítio ectópico.

Não foi verificada a presença de formação óssea ectópica nos grupos 2 e 3 que continham medula óssea (MO) em sua composição (Tabela 1). Entretanto, Noshi et al. (2000) e Lucarelli et al. (2003) verificaram que os enxertos carregados com células mesenquimais originárias da medula óssea (BM-MS), quando implantados em subcutâneo, mostravam formação de osso em poucas semanas pós-implantação. Já para Kim, Lee e Suh (2003), a diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas (MSC), nos coelhos, é maior para linhagem adipogênica. E de acordo com citações de Marx et al., (1998), Salgado, Coutinho e Reis (2004) e Shirley et al (2005), as BM-MS que se diferenciam em osteoblastos, nos mamíferos, são expressas somente em baixo número, como na proporção de 1/100.000.

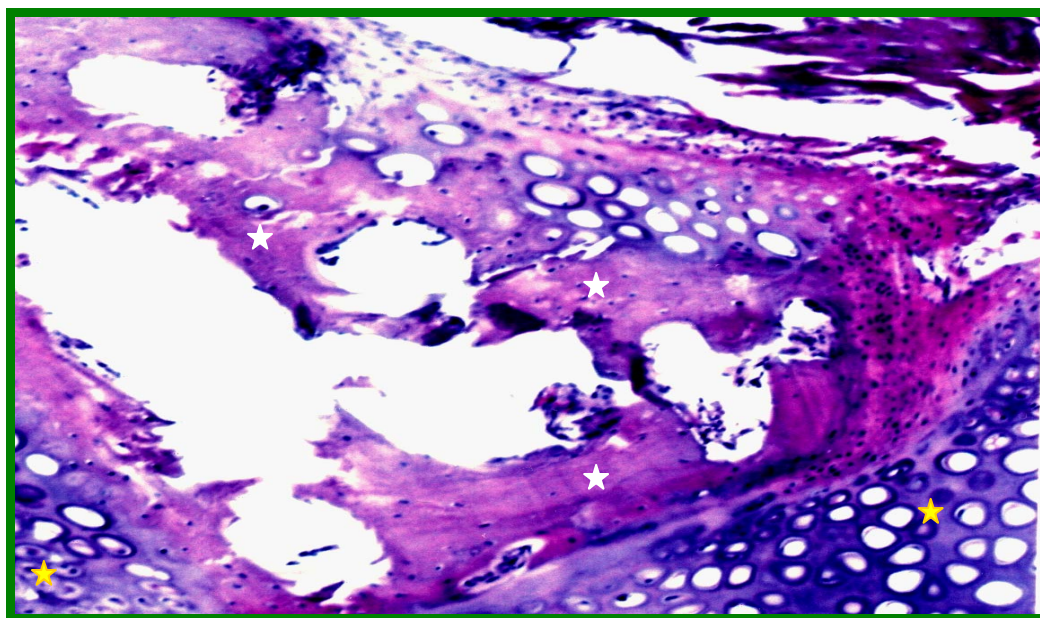


FIGURA 8: Visualização em microscopia de luz da formação óssea ectópica (estrela branca), próximo à cartilagem elástica da orelha (estrela amarela). HE. 72X. Departamento de Histologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia – MG.

Tecido conjuntivo hipercelularizado com fibras colágenas desorganizadas, semelhante a osso primário (Figura 9), conforme descrição de Banks (1991), esteve presente em apenas uma amostra do grupo 5 (HA + BMP + PRP) no período de 30 dias pós-implante. Já no tempo de 45 dias pós-implante, notou-se que a mesma apareceu homogeneamente em todos os tratamentos, mas em pequena quantidade de lâminas (Tabela 1). A osteogênese provavelmente seria conseguida se o material permanecesse na área de implante por mais 15 a 30 dias.

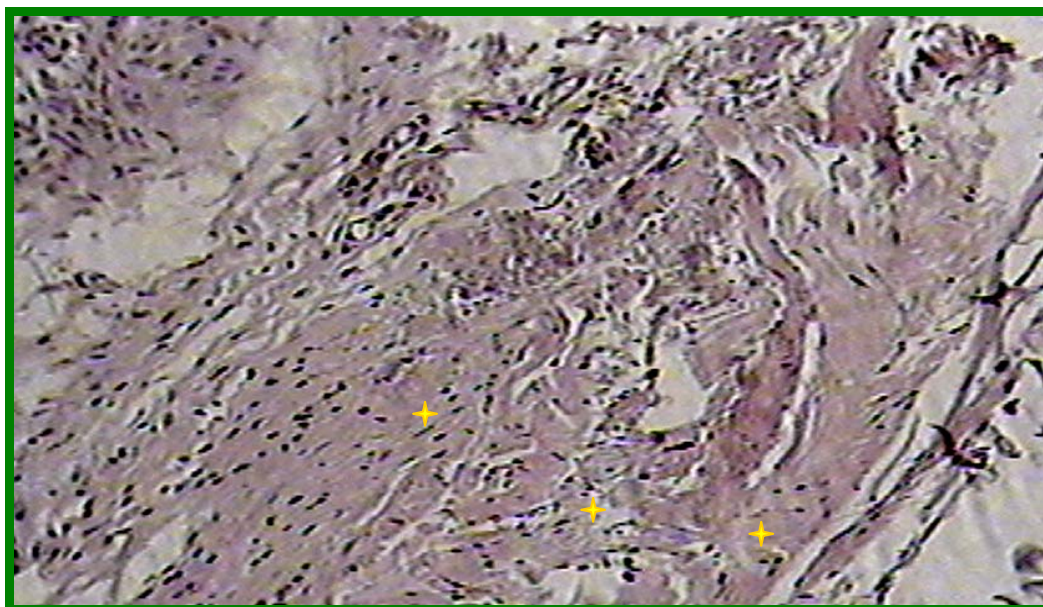


FIGURA 9: Visualização em microscopia de luz, do tecido conjuntivo hipercelularizado com fibras colágenas desorganizadas, semelhante a osso primário (cruz amarela). HE. 10 X. Laboratório de Neurociências (LANEC), Universidade Federal de São João Del Rei (UFSJ), São João Del Rei, MG.

Tabela 1: Número de amostras encontradas na avaliação histológica referente formação óssea ectópica (FOE) e tecido conjuntivo com fibras colágenas desorganizadas semelhante a osso primário (OP), aos 30 e 45 dias após o período de implantação. Uberlândia, MG.

GRUPO	30 DIAS					45 DIAS				
	N	FOE		OP		N	FOE		OP	
		A	P	A	P		A	P	A	P
(1) HA+BMP	20	20	00	20	00	20	19	01	19	01
(2) HA+MO	20	20	00	20	00	20	20	00	18	02
(3) HA+BMP+MO	20	20	00	20	00	20	20	00	18	02
(4) HA+PRP	20	20	00	20	00	20	20	00	18	02
(5)HA+BMP+PRP	22	21	01	21	01	18	18	00	16	02
TOTAL	102	101	01	101	01	98	97	01	79	09

Nota: N = número de amostras

Os escores adotados foram A = ausência e P = presença.

2.2. REAÇÃO INFLAMATÓRIA

Ocorreu reação inflamatória com presença de células polimorfonucleares (PMN), linfócitos e plasmócitos, nas lâminas analisadas. A quantidade de amostras observadas, bem como os escores celulares, estão apresentados nas tabelas 2 e 3, aos 30 e 45 dias pós-implante, respectivamente.

2.2.1. POLIMORFONUCLEARES

Através de comparações entre os grupos e com a mesma duração de implantação, notou-se que o tratamento 3 (HA+BMP+MO) foi o que mais apresentou PMN aos 30 dias (Tabela 2), revelando uma maior reação inflamatória para estes biomateriais (T1 30 dias X T3 30 dias, $p = 0,035$; T3 30 dias X T4 30 dias, $p = 0$; T3 30 dias X T5 30 dias, $p = 0$), enquanto o tratamento 5 (HA+BMP+PRP) foi o menor (T1 30 dias X T5 30 dias, $p = 0,0007$; T2 30 dias X T5 30 dias, $p = 0$; T3 30 dias X T5 30 dias, $p = 0$; T4 30 dias X T5 30 dias, $p = 0,0348$), seguido pelo tratamento 4 (HA+PRP) (T2 30 dias X T4 30 dias, $p = 0,0018$; T3 30 dias X T4 30 dias, $p = 0$).

Aos 45 dias (Tabela 3) o tratamento 1 (HA+BMP) foi numericamente mais significativo, referente a maior presença de PMN (T1 45 dias X T4 45 dias, $p = 0,0499$; T1 45 dias X T5 45 dias, $p = 0,0254$).

Houve decréscimo de PMN, no período de 45 dias quando comparado ao de 30 dias (Tabelas 2 e 3). Apenas foram significantes as análises dos tratamentos 2 (HA+MO) e 3 (HA+BMP+MO) quando confrontadas nos tempos de 30 e 45 dias, com maior concentração de PMN aos 30 dias (T2 30 dias X T2 45 dias, $p = 0,0373$ e T3 30 dias X T3 45 dias, $p = 0$).

Verificou-se que ocorreu escassa presença de PMN nas lâminas analisadas, os quais decresceram com o término de 45 dias pós-implante (Tabelas 2 e 3), o que está de acordo com Sanada et al. (2003) e Hamata et al. (2004), os quais citaram que, geralmente os PMN são encontrados na área de enxerto em grande número nos primeiro sete (7) dias pós-implantação, que decrescem com o tempo, tendo em vista que a existência destes é típica de inflamação aguda (SIQUEIRA Jr., DANTAS, 2000; DAVIES, 2003).

A maior proporção de PMN, variou entre 0 a 5 células por corte (escores 0 e 1), o que provavelmente é visto na população normal de uma orelha externa sem implantes. A literatura consultada não apresentou dados a respeito deste fato.

A associação de HA com BMP e MO (T3) foi a que mais apresentou PMN aos 30 dias, enquanto a agregação dessa cerâmica com o PRP produziu menor reação inflamatória no mesmo período. O que está de acordo com Brandão et al. (2002) que atribuíram a HA reabsorvível agrupada a BMP, uma intensa reação inflamatória quando comparada à cerâmica não reabsorvível e sem a proteína, principalmente após 21 dias.

2.2.2. LINFÓCITOS

Os tratamentos 2 (HA+MO) e 3 (HA+BMP+MO) foram os que mais apresentaram linfócitos aos 30 dias (Tabela 2), quando comparados com outros tratamentos do mesmo período [(T1 30 dias X T2 30 dias, $p = 0,0406$;

T2 30 dias X T5 30 dias, $p = 0,0079$) e (T1 30 dias X T3 30 dias, $p = 0,0243$; T3 30 dias X T5 30 dias, $p = 0,0137$), respectivamente].

No período de 45 dias pós-implante (Tabela 3) o tratamento 4 (HA+PRP) foi o mais significativo em quantidade de linfócitos (T1 45 dias X T4 45 dias, $p = 0,0459$; T2 45 dias X T4 45 dias, $p = 0,0369$; T3 45 dias X T4 45 dias, $p = 0,0004$).

A reação linfocítica com maior intensidade, característica de inflamação crônica (KIRKPATRICK et al, 2002), esteve mais presente nos tratamentos 2 (HA+MO) e 3 (HA+BMP+MO) no período de 30 dias quando comparada com 45 dias (T2 30 dias X T2 45 dias, $p = 0,0201$ e T3 30 dias X T3 45 dias, $p = 0$) (Tabelas 2 e 3).

Houve um aumento de linfócitos no tratamento 4 (HA+PRP) aos 45 dias. Nos demais tratamentos ocorreram um decréscimo, no mesmo período. A concentração de linfócitos foi maior quando comparada a de PMN, o que caracteriza uma reação inflamatória crônica (SIQUEIRA Jr., DANTAS, 2000).

De modo geral, o número de linfócitos variou de 1 a 5 (escore1, Tabelas 2 e 3) por fragmento de orelha externa analisado, o que é sugestivo de pequena característica antigênica, semelhantemente aos achados de Taga et al. (1996) e Carneiro et al. (2005). Provavelmente a presença destas células no sítio implantado, foi com o intuito de auxiliar na reabsorção dos biomateriais.

2.2.3. PLASMÓCITOS

Os tratamentos 3 (HA+BMP+MO) e 4 (HA+PRP) mostraram maior quantidade de plasmócitos dentro do período de 30 dias [(T2 30 dias X T3 30 dias, $p = 0,0349$; T3 30 dias X T5 30 dias, $p = 0,0139$) e (T1 30 dias X T4 30 dias, $p = 0,0387$; T2 30 dias X T4 30 dias, $p = 0,0048$; T4 30 dias X T5 30 dias, $p = 0,0029$), respectivamente] (Tabela 2).

Os tratamentos 2 (HA+MO) e 4 (HA+PRP) tiveram maior concentração de plasmócitos aos 45 dias [(T2 45 dias X T5 45 dias, $p = 0,0122$) e (T4 45 dias X T5 45 dias; $p = 0,0436$) respectivamente] (Tabela 3).

Na comparação entre os períodos, 30 e 45 dias (Tabelas 2 e 3), o único tratamento a apresentar significância foi o 2 (HA+MO) com maior quantidade de plasmócitos (T2 30 dias X T2 45 dias, $p = 0,0336$).

Foram encontrados em média, de 1 a 5 plasmócitos (escore 1) por fragmento de orelha externa analisado, em ambos os tempos estudados, o que caracterizou uma mínima reação de antígeno-anticorpo. Notou-se que o PRP foi o biomaterial que apresentou maior quantidade de plasmócitos. Estes são originários dos linfócitos, e ao comparar a concentração linfocítica-plasmocítica entre os grupos e períodos, notou-se que a MO aos 30 dias e o PRP aos 45 dias, foram os que apresentaram maior reação inflamatória crônica. Yazawa et al. (2004) observaram, após sete (7) dias pós-implante, a migração de neutrófilos, linfócitos e macrófagos nos defeitos de calvária de coelhos, onde foram implantados PRP com β -TCP, e aos dois (2) meses, a coloração de hematoxilina-eosina (HE) mostrou tecido de granulação com macrófagos e linfócitos remanescentes no centro do defeito.

Para Banks (1991) se não houver inflamação, não haverá reparação. Caso a mesma seja excessiva, então pode haver atraso da recuperação ou até mesmo sua ausência. Enquanto as reações inflamatórias insuficientes podem retardar o processo de reparação. Hamata et al. (2004) acrescentaram que a interação da reação inflamatória com a o material enxertado representa um fator crítico para a ativação da cascata de eventos condutores da osteogênese. Devido a esta interação eles questionaram o uso de medicamentos antiinflamatórios durante o período inicial do implante, pois essas drogas reduzem a resposta inflamatória inicial e consequentemente a migração e diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas, essenciais a osteoindução e diferenciação do osteoblasto. Na presente pesquisa foi utilizada medicação antiinflamatória com o intuito de promover analgesia, o que talvez tenha atuado como um fator inibitório para a diferenciação das células óssea no sítio dos implantes.

Tabela 2: Avaliação histológica da reação inflamatória aos 30 dias após o período de implantação. Uberlândia, MG.

GRUPO (nº amostras)	REAÇÃO INFLAMATÓRIA														
	PMN					LINFÓCITOS					PLASMÓCITOS				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
1. HA+BMP (20)	6	7	5	2	0	3	9	6	2	0	9	6	4	1	0
2. HA+MO (20)	2	12	2	2	2	0	8	4	8	0	6	13	1	0	0
3. HA+BMP+MO (20)	0	8	9	1	2	0	5	11	4	0	2	13	4	1	0
4. HA+PRP (20)	10	10	0	0	0	1	8	5	4	2	2	9	8	0	1
5. HA+BMP+PRP(22)	17	5	0	0	0	4	11	7	0	0	10	10	1	1	0
TOTAL (102)	35	42	16	05	04	08	41	33	18	02	29	51	18	03	01

Nota : PMN = polimorfonucleares

Os escores adotados de células por corte foram: 0 = ausência; 1 = 1 a 5; 2 = 6 a 10; 3 = 11 a 20; e 4 = mais de 21.

Tabela 3: Avaliação histológica da reação inflamatória aos 45 dias após o período de implantação. Uberlândia, MG.

GRUPO (nº amostras)	REAÇÃO INFLAMATÓRIA														
	PMN					LINFÓCITOS					PLASMÓCITOS				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
1. HA+BMP (20)	7	9	2	2	0	3	10	6	1	0	4	12	2	1	1
2. HA+MO (20)	8	9	2	0	1	3	12	2	2	1	2	13	3	0	2
3. HA+BMP+MO(20)	9	11	0	0	0	8	11	1	0	0	4	15	1	0	0
4. HA+PRP (20)	12	8	0	0	0	2	5	7	2	4	5	8	3	2	2
5. HA+BMP+PRP(18)	13	4	0	1	0	6	4	6	1	0	9	7	2	0	0
TOTAL (98)	49	41	04	03	01	22	42	22	06	05	24	55	11	03	05

Nota : PMN = polimorfonucleares

Os escores adotados de células por corte foram: 0 = ausência; 1 = 1 a 5; 2 = 6 a 10; 3 = 11 a 20; e 4 = mais de 21.

2.3. MACRÓFAGOS

Os macrófagos com presença de substâncias em seu interior, foram vistos em pequenas quantidades que variaram de 0 a 5 células (escores 0 e 1) por fragmento de orelha externa analisado, nos dois períodos pós-implante (Tabela 4), provavelmente devido a fusão destes para formar as CGMCE (SANADA et al., 2003). O material fagocítico oriundo do implante dentro destas

células, provavelmente está relacionado ao processo de biodegradação do enxerto (CANABRAVA, 2002).

Tabela 4: Escores da quantidade de macrófagos aos 30 e 45 dias do pós-implante. Uberlândia, MG.

GRUPO	30 DIAS						45 DIAS					
	N	0	1	2	3	4	N	0	1	2	3	4
(1) HA+BMP	20	17	03	00	00	00	20	12	06	01	01	00
(2) HA+MO	20	18	02	00	00	00	20	13	05	01	00	01
(3) HA+BMP+MO	20	16	03	01	00	00	20	12	06	01	00	01
(4) HA+PRP	20	14	02	04	00	00	20	12	04	02	02	00
(5)HA+BMP+PRP	22	16	06	00	00	00	18	15	03	00	00	00
TOTAL	102	81	16	05	00	00	98	64	24	05	03	02

Nota : N = número de amostras

Os escores adotados de células por corte foram: 0 = ausência; 1 = 1 a 5; 2 = 6 a 10; 3 = 11 a 20; e 4 = mais de 21.

2.4. CÉLULAS GIGANTES MULTINUCLEARES TIPO CORPO ESTRANHO

As células gigantes multinucleares tipo corpo estranho (CGMCE) apareceram em grande quantidade em todos os grupos e períodos, percebendo-se um ligeiro decréscimo, aos 45 dias pós-implante. Mas estas células tiveram um menor número de amostras nos tratamentos 4 (HA+PRP) e 5 (HA+BMP+PRP), em comparação aos demais enxertos (Tabela 5).

Encontrou-se maior quantidade de CGMCE nos tratamentos 2 (HA+MO) e 3 (HA+BMP+MO) aos 30 dias PI (Tabela 5), com nível de significância a favor destes (T2 30 dias X T4 30 dias, $p = 0,0032$; T2 30 dias X T5 30 dias, $p = 0,0038$; T3 30 dias X T4 30 dias, $p = 0,0065$ e T3 30 dias X T5 30 dias $p = 0,0083$).

No período de 45 dias destacaram-se, significativamente, os tratamentos 1 (HA+BMP) e 2 (HA+MO) (T1 45 dias X T5 45 dias, $p = 0,0348$ e T2 45 dias X T5 45 dias, $p = 0,0159$) (Tabela 5).

Observou-se abundante reação de corpo estranho caracterizada pela presença de CGMCE (Figura 10) em contato direto com o biomaterial, provavelmente da tentativa de reabsorvê-lo. De acordo com Van der Meulen e Korten (1994), a degradação de materiais cerâmicos a base de fosfato e cálcio, é mediada por células gigantes e osteoclastos.

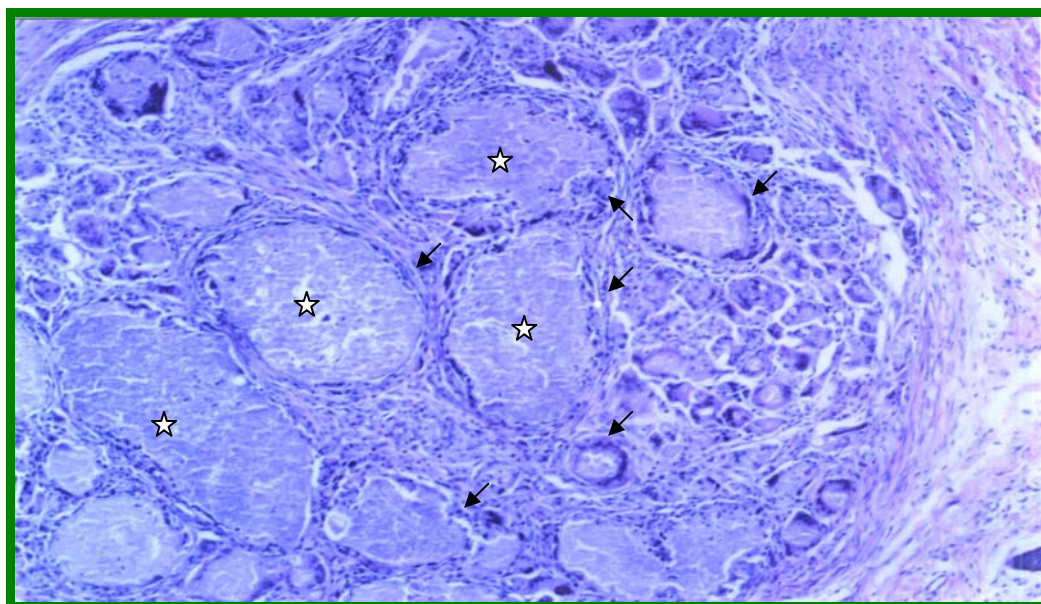


Figura 10: Reabsorção do implante (estrela) mediada por células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho. (setas). HE. 90X. Departamento de Histologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG.

De um modo geral, a quantidade de CGMCE manteve-se constante ao redor dos fragmentos dos implantes, em todos os tratamentos examinados, enquanto onde a reabsorção foi mais intensa, havia um menor número destas células, e entre os fragmentos foram observados presença de fibras colágenas, conferindo a reparação da lesão causada pelo enxerto. A partir da análise dos dados contidos na Tabela 5, verificou-se que a associação de biomateriais no grupo 5 causaram menor reação CGMCE, o que é sugestivo de melhor reabsorção e, conseqüentemente, reparação do sítio enxertado, provavelmente devido aos fatores de crescimento contidos no plasma rico em plaquetas.

Tabela 5: Quantidade de células gigantes multinucleares tipo corpo estranho por corte, aos 30 e 45 dias pós-implante. Uberlândia, MG.

GRUPO	30 DIAS					45 DIAS				
	N	0	1	2	3	N	0	1	2	3
(1) HA+BMP	20	0	4	3	13	20	4	1	1	14
(2) HA+MO	20	0	1	3	16	20	3	2	0	15
(3) HA+BMP+MO	20	0	1	4	15	20	1	6	3	10
(4) HA+PRP	20	0	7	6	7	20	4	2	7	7
(5)HA+BMP+PRP	22	4	2	8	8	18	4	3	7	4
TOTAL	102	4	15	24	59	98	16	14	18	50

Nota: N = Número de amostras.

Os escores adotados foram: 0 = ausência, 1 = pouca, 2 = moderada e 3 = intensa quantidade de CGMCE por corte analisado.

Reparou-se, que a reabsorção dos biomateriais ocorreu de forma lenta, pelas CGMCE, tendo em vista a presença marcante destes na análise dos fragmentos aos 45 dias. Averiguações semelhantes foram feitas por Borges et al. (1997), Benqué et al. (1997), Oliveira et al. (2004), Barbantini, Zavaglia e Duek, (2005) e Carneiro et al. (2005), que responsabilizaram a HA sintética por este efeito. Seguindo a mesma linha, Ferreira et al. (2004) e Liu et al. (2005) sugeriram que carreadores pouco biocompatíveis associados às BMPs levam a um aumento de CGMCE, e para Ferreira et al. (2004), a HA sintética não é bom carreador para as proteínas morfogênicas ósseas bovinas (bBMPs) expressarem seu potencial indutor. Já Oliveira et al. (1999) encontraram baixa taxa de renovação de macrófagos e células gigantes multinucleares em contato com o enxerto a base de osso cortical bovino no subcutâneo de ratos. Enquanto Sanada et al. (2003) e Carneiro et al. (2005) atribuíram essa reação granulomatosa tipo corpo estranho a falhas na desmineralização do material enxertado.

A coloração de HE mostrou as CGMCE coradas em tons de azul. Observou-se também, a presença de células coradas em tons de vermelho adjacentes aos implantes, apresentando bordas pregueadas semelhantes às dos osteoclastos (Figura 11). Porém não foi possível fazer a distinção entre estas células, neste experimento, tendo em vista que ambas são multinucleadas e derivadas dos monócitos-macrófagos (RAMALHO et al,

2000). Relatos parecidos foram feitos por Sicca et al. (2000) e Oliveira et al. (2004). Os primeiros autores relataram à existência de dois tipos de células multinucleadas ao redor do implante mineralizados, sendo que um tinha aspecto de CGMCE e o outro com aparência microscópica de osteoclastos, mas sem a borda em escova característica. Já os últimos pesquisadores observaram que em implantes mineralizados, as CGMCE não tinham morfologia semelhante aos osteoclastos, ao passo que nos enxertos desmineralizados estas células apresentaram aspecto similar aos osteoclastos.

Por outro lado, esta diferença de coloração poderia indicar, simplesmente, uma área de intensa atividade reabsortiva, provavelmente através da liberação dos ácidos orgânicos das CGMCE, devido ao íntimo contato destas com a superfície das partículas enxertadas, o que confere com análises feitas por Carneiro et al. (2005) e Zambuzzi et al. (2005).

Em algumas lâminas foram observadas presença de vacúolos citoplasmáticos nas CGMCE, o que confere com citações feitas por Kelly e Schneider (1991), que encontraram presença destes vacúolos nas adjacências das bordas pregueadas dos osteoclastos.

Toda essa semelhança entre essas células multinucleadas, exposta anteriormente, gera muita confusão com a reabsorção óssea realizada pelos osteoclastos. Por isso, seria necessário fazer a análise histoquímica das biópsias dos biomateriais com a fosfatase tartarato ácido-resistente (TRAP) (KELLY, SCHNEIDER, 1991), bem como a identificação da enzima anidrase carbônica e dos receptores para osteocalcina (SIQUEIRA Jr., DANTAS, 2000), além da análise em microscopia eletrônica para a avaliação dos centríolos (GLOAWACKI, COX, 1986), tendo em vistas serem estes métodos adequados para a caracterização de CGMCE e osteoclastos, pois a microscopia de luz, com coloração de HE não foi suficiente para fazer tal distinção.

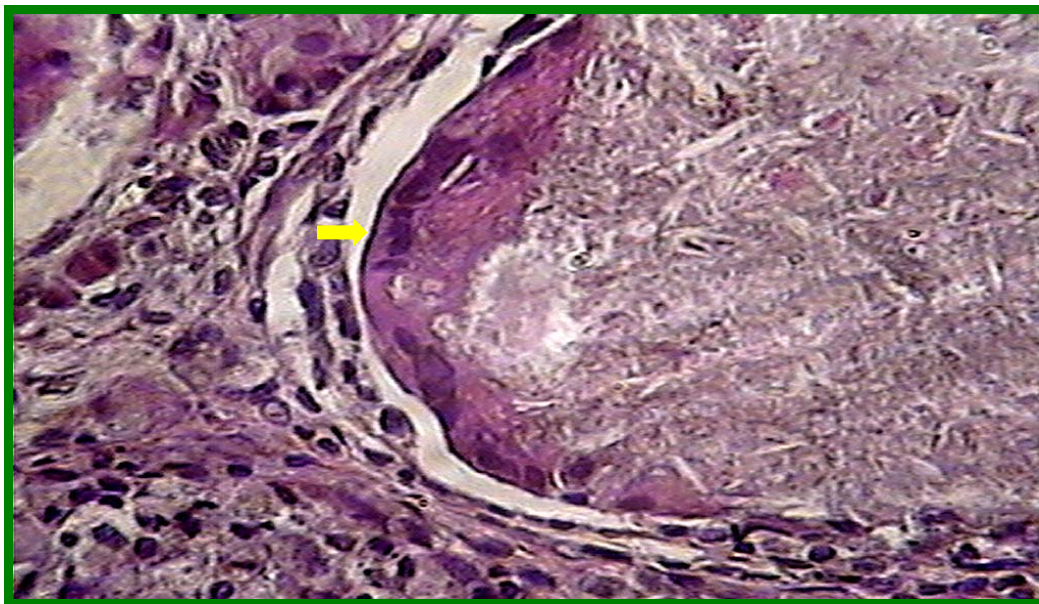


Figura 11: Borda em escova (seta). HE. 40 X. Laboratório de Neurociências (LANEC) Universidade Federal de São João Del Rei (UFSJ), São João Del Rei, MG.

2.5. FIBROBLASTOS

Foram observadas algumas diferenças significantes, para os tratamentos 4 (HA+PRP) e 5 (HA+BMP+PRP) aos 30 dias, com maior quantidade de fibroblastos presentes no grupo 4 ($p = 0,0137$) (Tabela 6).

No tempo referente a 45 dias pós-implante, verificou-se diferenças significativas entre o tratamento 5 (HA+BMP+PRP) com os demais, observando-se menor quantidade de fibroblasto para o tratamento 5 (T1 45 dias X T5 45 dias, $p = 0,0095$; T2 45 dias X T5 45 dias, $p = 0,0015$; T3 45 dias X T5 45 dias, $p = 0,0435$; T4 45 dias X T5 45 dias, $p = 0,0435$) (Tabela 6).

Tabela 6: Escores de fibroblastos por corte, nos períodos pós-implante aos 30 e 45 dias. Uberlândia, MG.

GRUPO	30 DIAS				45 DIAS			
	N	1	2	3	N	1	2	3
(1) HA+BMP	20	2	2	16	20	2	1	17
(2) HA+MO	20	0	3	17	20	1	1	18
(3) HA+BMP+MO	20	1	1	18	20	2	3	15
(4) HA+PRP	20	0	1	19	20	2	3	15
(5)HA+BMP+PRP	22	3	5	14	18	3	8	7
TOTAL	102	6	12	84	98	10	16	72

Nota: N = número de amostras.

Os escores adotados foram: 1 = pouca, 2 = moderada e 3 = intensa quantidade de fibroblastos por corte analisado.

De modo geral, a quantidade de fibroblastos, em todos os tratamentos, manteve-se homogeneamente elevada durante os períodos analisados, provavelmente, na tentativa de reparar o tecido subcutâneo enxertado (Figura 12). Observou-se que a presença destas células foi um pouco menor no grupo 5 (HA+BMP+PRP) e que houve um decréscimo acentuado entre os períodos pós-implantação, com menor concentração destas células aos 45 dias. Evento este explicado, pelo fato deste tratamento conter muitos fatores de crescimento responsáveis pela cicatrização e regeneração de tecidos moles e duros, os quais provavelmente foram atraídos precocemente para a área de implante, adiantando, assim, a reparação de tecido subcutâneo da orelha externa dos coelhos. De acordo com Lynch (1989), Davies (2003); Tözüm e Demiralp (2003) e Ferreira (2004), o PDGF e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) funcionam como agentes quimiotáticos e quimiocinéticos para fibroblasto. Enquanto para Kawase et al. (2003) e Okuda et al. (2003), o TGF- β ativa os fibroblastos para produzirem colágeno, além de ser o principal e mais potente modulador contido no PRP, pois regula a proliferação celular no sítio enxertado. Porém Andrade et al. (2002) e Braz et al. (2003), citaram que após a inserção de HA sintética, o enxerto torna-se rodeado por uma variedade de compostos fluidos, fibroblastos e células livres com características semelhantes aos tecidos encontrados nos processos de cicatrização natural.



Figura 12: Reparação do tecido subcutâneo enxertado. Notar grande quantidade de fibroblastos (setas) ao redor dos biomateriais (estrela). HE. 40 X. Laboratório de Neurociências (LANEC) Universidade Federal de São João Del Rei (UFSJ), São João Del Rei, MG.

2.6. NEOVASCULARIZAÇÃO

No presente estudo foi contado o número de vasos em toda extensão do fragmento observado, similar à análise feita de Hisatome et al. (2005).

A angiogênese ocorreu de forma sutil, com presença de um moderado incremento no número de vasos ao redor do implante (Figura 13), o que confere com achados de Sicca et al. (2000), porém difere de observações feitas por Hisatome et al. (2005), os quais relatam que o implante autólogo de BMP aumentou a neovascularização.

Poucos capilares neoformados foram visualizados no centro dos fragmentos dos biomateriais implantados. Os mesmos estavam mais concentrados na periferia do complexo enxertado, o que confere com os achados de Sanada et al. (2003).

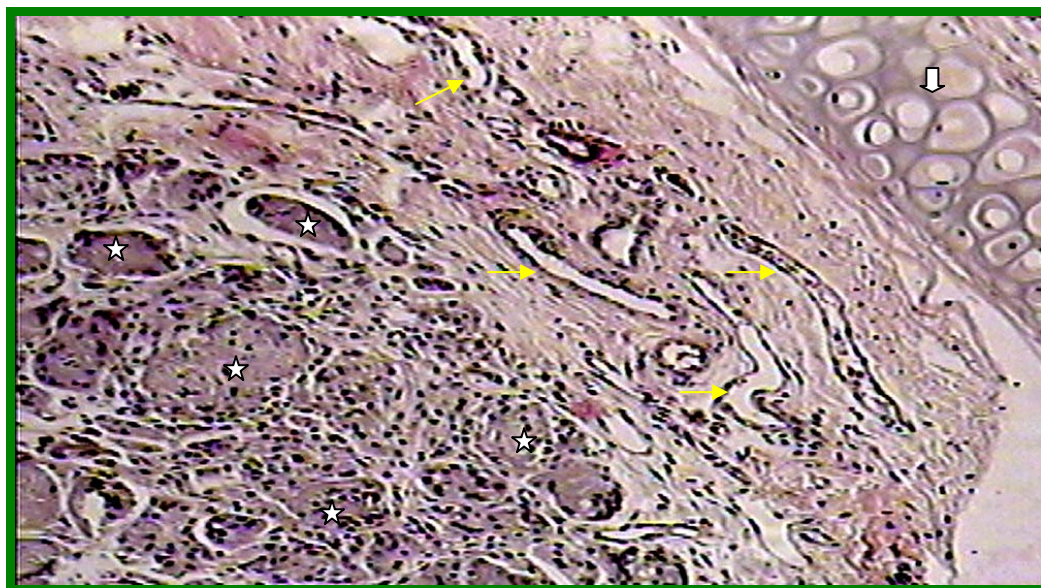


Figura 13: Vasos (setas amarelas) ao redor dos biomateriais implantados (estrelas), e próximos à cartilagem elástica (seta branca) da orelha externa dos coelhos. HE. 40 X. Laboratório de Neurociências (LANEC) Universidade Federal de São João Del Rei (UFSJ), São João Del Rei, MG.

Percebeu-se que o tratamento 1 (HA+BMP) foi o que menos formou novos vasos, talvez pelo fato de terem sido apenas enxertados biomateriais sólidos, que podem ter sido compactados de forma mais intensa, o que interfere no suprimento vascular local, de acordo com relato de Lima (2003).

Aos 30 dias foi significativa o aumento da angiogênese para os tratamentos 3 (HA+BMP+MO) e 4 (HA+PRP) [(T1 30 dias X T3 30 dias, $p = 0,0004$; T2 30 dias X T3 30 dias, $p = 0,0086$; T3 30 dias X T5 30 dias, $p = 0,0313$) e (T1 30 dias X T4 30 dias, $p = 0,017$), respectivamente] (Tabela 7).

Houve maior significância para os tratamentos 3 (HA+BMP+MO), 4 (HA+PRP) e 5 (HA+BMP+PRP), aos 45 dias pós-implante [(T1 45 dias X T3 45 dias, $p = 0,0139$), (T1 45 dias X T4 45 dias, $p = 0,0002$; T2 45 dias X T4 45 dias, $p = 0,0138$) e (T1 45 dias X T5 45 dias, $p = 0,0367$) respectivamente] (Tabela 7).

Ao se comparar os períodos, notou-se que o tratamento 4 (HA+PRP) obteve nível de significancia, com aumento do número de capilares aos 45 dias (T4 30 dias X T4 45 dias, $p = 0,0138$) (Tabela 7).

Tabela 7: Escores de neovascularização aos 30 e 45 dias pós-implante. Uberlândia, MG.

GRUPO	30 DIAS				45 DIAS			
	N	1	2	3	N	1	2	3
(1) HA+BMP	20	13	6	1	20	13	2	5
(2) HA+MO	20	12	4	4	20	7	5	8
(3) HA+BMP+MO	20	3	8	9	20	4	6	10
(4) HA+PRP	20	7	5	8	20	1	4	15
(5)HA+BMP+PRP	22	12	4	6	18	5	4	9
TOTAL	102	47	27	28	98	30	21	47

Nota: N = número de amostras.

Os escores adotados foram: 1 = até 15 , 2 = de 16 a 20 e 3 = mais de 21.

Sendo assim, a presença de PRP e seus fatores de crescimento associados a HA, foram os que melhor estimularam a angiogênese, seguidos pela BMP e MO. Para Marx (2001) e Lucarelli et al. (2003), a ação do PRP sobre a cicatrização está ligada a sua capacidade de aumentar a mitogênese e estimular a angiogênese. De acordo com Davies (2003), Tözüm e Demiralp (2003) e Ferreira (2004) o PDGF, fator de crescimento contido nos grânulos α -plaquetários, funciona como agente quimiotático e quimiocinético para as células endoteliais. Yazawa et al. (2004) implantou PRP associado a beta trifosfato de cálcio (β -TPC) em defeito de calvária, verificando que a angiogênese ocorreu aos 30 dias pós-implantação. Já para Fenis, Stoelinga e Jansen (2004) o crescimento vascular deve ocorrer nas fases iniciais do reparo ósseo. Segundo Andrade et al. (2002) e Dórea Neto et al. (2004) a HA serve de arcabouço para a migração de vasos sanguíneos. Enquanto Ma et al. (2000), Moran e Turret (2001), Croci et al. (2003), Granjeiro et al. (2005) e Zambuzzi et al. (2005) citaram que a BMP é a responsável pela estimulação da neovascularização.

2.7. CÁPSULA FIBROSA

Foi significativamente maior a quantidade de cápsulas fibrosas no tratamento 5 (HA+BMP+PRP), quando comparada ao tratamento 2 (HA+MO) (T2 45 dias X T5 45 dias, $p = 0,0051$), no período de 45 dias pós-implante (Tabela 8). Mas, de maneira geral, raras cápsulas fibrosas foram observadas ao redor dos biomateriais, o que está de acordo com Kurashina et al. (1997), Franco et al (2001), Andrade et al. (2002) e Kirkpatrick et al. (2002). Mas, Silva et al. (1998) não encontraram formação de cápsula fibrosa em implantes de hidroxiapatita quando em contato com tecidos moles.

Tabela 8: Escores da avaliação histológica referente à ausência e presença de cápsula fibrosa, aos 30 e 45 dias após o período de implantação. Uberlândia, MG.

GRUPO	30 DIAS			45DIAS		
	N	Ausência	Presença	N	Ausência	Presença
(1) HA+BMP	20	17	03	20	17	03
(2) HA+MO	20	17	03	20	19	01
(3) HA+BMP+MO	20	15	05	20	17	03
(4) HA+PRP	20	14	06	20	12	08
(5)HA+BMP+PRP	22	14	08	18	10	08
TOTAL	102	77	25	98	75	23

Nota: N = número de amostras.

2.8. AVALIAÇÃO GERAL

A análise histológica demonstrou abundante reação de corpo estranho caracterizada pela presença de CGMCE em contato direto com o biomaterial, aliado a hiper celularidade do tecido conjuntivo na região circunvizinha com presença de células semelhantes a fibroblastos, além de pouca neovascularização, mínima reação inflamatória e baixa antigenicidade, as últimas foram caracterizadas pela presença de PMN, linfócitos e plasmócitos.

Houve formação óssea ectópica na associação da HA à BMP, no período de 45 dias PI. Observou-se também, o desenvolvimento de tecido conjuntivo hiper celularizado com fibras colágenas desorganizadas semelhante a osso primário, intensa quantidade de CGMCE e maior quantidade de PMN aos 45 dias PI, além de menor angiogênese quando comparados aos outros biomateriais. Porém, Lima (2003), ao correlacionar os efeitos causados em subcutâneo com o uso de HA sintética pura e em agregação à BMP, verificou que as reações destes biomateriais foram muito parecidas, com pouca neovascularização, moderada reação CGMCE, pequena reação inflamatória, alta quantidade de cápsula fibrosa circundando os implantes e ausência de formação óssea ectópica, aos 30 dias pós-implante. Aparentemente, a pequena neoformação de capilares é uma característica da HA, que pode ser notada ao se comparar o presente trabalho com o de Lima (2003). Talvez, devido a uma pequena diferença de metodologia empregada nesse estudo, que foi a construção de uma loja levemente escarificada no final do túnel, conseguiu-se obter uma menor formação de cápsula fibrosa, pois os biomateriais tiveram maior espaço e menor comprometimento vascular para se alojarem.

Verificou-se que a mistura de HA a MO revelou presença de tecido conjuntivo hiper celularizado com fibras colágenas desorganizadas, semelhante a osso primário, aos 45 dias pós-implante. Maiores quantidades de linfócitos e plasmócitos, aos 30 e 45 dias pós-implante, respectivamente, caracterizaram uma pequena reação local de antígeno-anticorpo. As CGMCE se mantiveram em grandes quantidades durante os períodos analisados, o que demonstra uma bioreabsorção lenta.

Tecido conjuntivo hiper celularizado com fibras colágenas desorganizadas, semelhante a osso primário, também foi observado no período de 45 dias PI, na associação de HA com BMP e MO. Esta composição teve maior angiogênese do que a HA com apenas a MO, sem a proteína BMP, o que faz supor que a adição de BMP promova um acréscimo da neovascularização. Notou-se que os linfócitos e plasmócitos, aumentaram, também, aos 30 e 45 dias pós-implante, respectivamente, causando uma leve reação imunogênica. Isso, provavelmente, pode ter ocorrido em virtude da presença de MO, que é responsável pela hematopoese e precursora dessas

células, e quando associada aos implantes aloplásticos e xenogênicos pode causar um incremento da produção de linfócitos, os quais são os precursores dos plasmócitos.

A HA integrado ao PRP, apresentou menor quantidade de PMN, aos 30 dias, e aumento do número de linfócitos, aos 45 dias, revelando intensificação da reação inflamatória crônica. A angiogênese presente nesta associação foi, numericamente, maior que nos outros implantes durante os períodos estudados. Houve aumento de capilares, bem como menores quantidades de CGMCE e fibroblastos, porém com maior frequência de cápsula fibrosa aos 45 dias pós-implante. O tecido conjuntivo hipercelularizado com fibras colágenas desorganizadas, semelhante a osso primário, também foi observado no período de 45 dias PI.

O efeito da associação de HA a BMP e ao PRP foi benéfico, pois formou osso ectópico aos 30 dias pós-implante, e promoveu uma reparação tecidual mais rápida quando comparada aos outros tratamentos, provavelmente devido a maior concentração de fatores de crescimento. A agregação desses biomateriais promoveu aumento da angiogênese, aos 45 dias. Observou-se presença de pouquíssimas cápsulas, mas estas estavam em maior quantidade quando comparadas aos outros enxertos. O processo de bioreabsorção tecidual obteve resultado satisfatório, considerando-se a existência de menor presença de biomateriais, CGMCE e fibroblastos, com moderada quantidade de fibras colágenas, entremeados com o enxerto, aos 45 dias.

Os resultados sugerem ausência de reações de rejeição aos implantes, mas sim uma intensa reabsorção destes, uma vez que a rejeição é caracterizada pela reabsorção da periferia do implante sem a substituição por tecido reparador, resposta inflamatória com predominância de linfócitos e tecido fibroso encapsulando o implante, além de oclusão de neovasos com necrose progressiva, bem como pela dor, edema e vermelhidão (ZILIOTO et al., 2003).

Semelhante a citações de Silva et al. (1998), os biomateriais implantados no presente trabalho, mostraram boa biocompatibilidade entre si e com o meio, apesar da presença de reação de corpo estranho.

A bioreabsorção foi satisfatória, apesar de lenta, pois o processo ainda era intenso aos 45 dias de pós-implantação. Provavelmente esse foi um fator que pode ter gerado atraso na formação óssea como sugeriram Sykaras e Opperman (2003) e Salgado, Coutinho e Reis (2004), tendo em que vista que foram visualizados tecidos conjuntivos hiper celularizados, semelhantes a osso primário, em maior quantidade aos 45 dias pós-implante.

A hidroxiapatita associada a fatores de crescimento pode formar osso em sítio ectópico, como na orelha externa de coelhos. Esta cerâmica ofereceu uma aceitável armação para o crescimento ósseo, e juntamente com a BMP e o PRP mostraram-se como substitutos ósseos razoáveis, pois foram biotoleráveis, biodegradáveis, osteoindutivos e de natureza osteogênica.

V. CONCLUSÃO

A combinação de hidroxiapatita sintética mais proteína morfogenética óssea bovina e plasma rico em plaquetas, bem como a associação de hidroxiapatita sintética e proteína morfogenética óssea bovina foram capazes de formar osso ectópico em orelha externa de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*).

V. REFERÊNCIAS

AJZEN, S.A.; MOSCATIELLO, R.A.; LIMA, A.M.C.; MOSCATIELLO, V.A.M.; MOSCATIELLO, R.M.; NISHIGUCHI, C.I.; ALVES, M.T.S.; YAMASHITA, H.K. Análise por tomografia computadorizada do enxerto autógeno na cirurgia de “sinus lift”. **Radiologia Brasileira**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 25-31, 2005.

ANDRADE, A.L.; BORGES, A.P.B.; BICALHO, S.M.C.M. **HAP-91: síntese, caracterização e aplicações**. 3. ed. Belo Horizonte: JHS Laboratório Químico, 2002. 146p.

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

ANITUA, E. The use of plasma rich growth factors (PRGF) in oral surgery. **Practical Procedures & Aesthetic Dentistry**, Mahwah, v. 13, n. 6, p. 487-493, 2001.

AUN, C.A.; BEZERRA, A.G.; GAVINI, G.; MARQUES, M.M. Avaliação histológica da reparação óssea em tíbias de ratos utilizando-se enxertos comerciais osteoindutores. **Brazilian Oral Research**, São Paulo, v. 19, p. 204, 2005. Supplement. Trabalho apresentado no 22nd Annual SBPqO Meeting.

BANKS, W.J. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed., São Paulo: Manole, 1991. 629p.

BAPTISTA, A.D.; SORRILHA, A.; TORMES, T.A.M.; ABDOUNE, Y.A.; CROCI, A.T.; CAMARGO, O.P.; OLIVEIRA, C.R.G.C.M. A histological study of human allografts. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v. 11, n. 4, p. 220-224, Oct./Dec. 2003.

BARBANTI, S.H.; ZAVAGLIA, C.A.C.; DUEK, E.A.R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, Bauru, v. 15, n. 1, p. 13-21, 2005.

BARROS, S.V.S.G.; CARLO, R.J.D.; VARGAS, M.I.; GALVÃO, S.R.; MAIA FILHO, A. Auto-enxerto percutâneo de medula óssea II. Reparação de falhas segmentares produzidas no rádio de coelhos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 4, p. 627-632, 2001.

BARTOLD, P.M.; NARAYANAN, A.S.; PACE, R. Platelet derived growth factor reduces the inhibitory effects of lipopolysaccharide on gingival fibroblast proliferation. **Journal of Periodontal Research**, Copenhagen, v. 27, p. 449-505, 1992.

BAUER, T.W.; MUSCHLER, G.F. Bone graft materials: an overview of the basic science. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v. 371, p.10-27, Feb. 2000.

BAUER, T.W.; SMITH, S.T. Bioactive materials in orthopaedic surgery: overview and regulatory considerations. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v. 395, p.11-32, 2002.

BEHNAM, K.; PHILLIPS, M.L.; SILVA, J.D.P.; BROCHMANN, E.J.; DUARTE, M.E.L.; MURRAY, S.S. BMP binding peptide: a BMP-2 enhancing factor deduced from the sequence of native bovine morphogenetic protein/non-collagenous protein. **Journal of Orthopaedic Research**, New York, v. 23, p. 175-180, 2005.

BENQUÉ, E.; ZAHEDI, S.; BROCARD, D.; OSCABY, F.; JUSTUMUS, P.; BRUNEL, G. Combined collagen membrane and hydroxyapatite/collagen chondroitin-sulfate spacer placement in the treatment of 2-wall intrabony defects in chronic adult and rapidly progressive periodontitis patients. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 24, n. 8, p. 550-556, 1997.

BIANCO, P.; RIMINUCCI, M.; GRONTHOS, S.; ROBEY, P.G. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. **Stem Cells**, Switzerland, v. 19, p. 180-192, 2001.

BONACHELA, W.C.; MOLO Jr, F.A., TAGA, E.M., GRANJEIRO, J.M. Manutenção do rebordo alveolar com hidroxiapatita microgranular. **RGO**, Porto Alegre, v. 40, n. 3, maio/jun. 1992.

BORGES, A.P.B.; FRANCH, J.; MANZANARES, M.C.; CALEROS, M.I.; REZENDE, C.M.F.; BERNJA, W.O. Hidroxiapatita sintética na diáfise proximal da tíbia de cães (*Canis familiares*). Avaliação histológica por microscopia de retrodispersão. In: **Jornadas Internacionales de la Sociedad Espanola De Cirurgia**, v. 4, 1997.

BORGES, A.P.B.; REZENDE, C.M.F.; RIBEIRO, M.F.B.R.; MELO, E.G.; NOBREGA NETO, P.I. Hidroxiapatita sintética – HAP-91 como substituto ósseo em defeito experimental provocado no terço proximal da tíbia em cão: aspectos à microscópica eletrônica de transmissão. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n. 6, p. 616-620, 2000.

BRANDÃO, A. C.; BRENTGANI, L. G.; NOVAES Jr., A. B.; GRISI;M. F. M.; SOUZA, S. L. S.; TABA Jr., M.; SALATA, L.A. Histomorphometric analysis of rat alveolar wound healing with hydroxyapatite alone or associated to BMPs. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v. 13, n. 3, p.147-154, 2002.

BRAZ, F.; RAHAL, S. C.; ROCHA, N. S.; TAGA, E.; BIASI, F. Emprego de matriz óssea orgânica bovina e hidroxiapatita no reparo de defeito induzido em crânio de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 01-12, 2003.

CAFFESSE, R.; CHAVES, R.H. Como aumentar as possibilidades de êxito em osseointegração em condições desfavoráveis. In: DINATO, J.C.; POLIDO, W.D. **Implantes osseointegrados: cirurgia e prótese**. São Paulo: Artes Médicas, 2001. cap. 21, p. 441-464.

CALIXTO, R.F.E.; TEÓFILO, J.M.; BRENTGANI, L.G.; LAMANO CARVALHO, T.L. Implante de um floculado de resina de manona em alvéolo dental de rato. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 257-262, 2001.

CANABRAVA, H.A.N. **Estudo da hidroxiapatita sintética associada ao colágeno como veículo de antimicrobiano na profilaxia da infecção óssea pós-traumática experimental em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

CARNEIRO, E.; GARCIA, R.B.; OLIVEIRA, R.C.; MORAES, F.G.; MENEZES, R.; LETRA, A.; CANOVA, G.C.; CESTARI, T. M.; GRANJEIRO, J.M. Microscopic and radiographic analysis of the effect of particle size of demineralized bovine cancellous bone matrix on the repair of bone defects in femurs of rabbits. **Journal of Applied Oral Science**, Bauru, v. 13, n. 2, p. 157-162, 2005.

CAVASSANI, M.M.; MORAES, J.R.E.; PADILHA FILHO, J.P. Função osteoindutora de fragmentos de ossos conservados em glicerina a 98%. Estudo experimental em ratos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 3, p. 445-448, 2001.

CHOI, B.H.; IM, C.J.; HUH, J.Y.; SUH, J.J.; LEE, S.H. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. **International Journal of Oral And Maxillofacial Surgery**, Copenhagen, v. 33, p. 56–59, 2004.

CHUBINSKAYA, S.; KUETTNER, K.E. Regulation of osteogenic proteins by chondrocytes. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Exeter, v. 35, p. 1323–1340, 2003.

COELHO, H.E. Inflamação. In. COELHO, H.E. **Patologia geral veterinária**, 2 ed., Uberlândia: Gráfica e Editora Impresso, p. 89-104, 2000.

CONNOLLY, J.F. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenesis repair. **Clinical Orthopaedics**, Philadelphia, n. 313, p. 8-18, 1995.

CROCI, A.T.; CAMARGO, O.P.; BITAR, G.; PEREIRA, S.L.B.; FREIRE, T.M.; CARDOSO, S.C.I. The use of inhaled bone marrow of ileum in bone failures of femurs of rats: experimental study. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v. 12, n. 1, p. 40-47, Jan./Mar. 2004.

CROCI, A.T., CAMARGO, O.P., BITAR, G.; PEREIRA, S.L.B.; MOREIRA, M.; FREITAS Jr., S. Effect of plasma concentrate on bone defects induced in mice fêmurs via stimulation of bone formation: an experimental study. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v. 11, n. 4, p. 230-239, Oct./Dec. 2003.

CURCELLI, E.C.; MÜLLER, S.S.; UEDA, A.K.; PADOVANI, C.R.; MAFFEI, F.H.A.; HOSSNE, W.S. Efeito da heparina sódica e da enoxaparina na consolidação de fratura da tíbia no rato: avaliação clínica e anatomopatológica e biomecânica. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 13-16, 2005.

DAMIEN, C.J.; GROB, D.; BODEN, S.D.; BENEDICT, J.J. Purified bovine BMP extract and collagen for spine arthrodesis. **Spine**, Philadelphia, v. 27, n. 16S, p. S50-S58, 2002.

DARIMONT, G.L.; CLOOTS, R.; HEINEN, E.; SEIDEL, L; LEGRAND, R. In vivo behaviour of hydroxyapatite coatings on titanium implants: a quantitative study in the rabbit. **Biomaterials**, Surrey, v. 23, p. 2569–2575, 2002.

DAVIES, J.E. Understanding peri-implant endosseous healing. **Journal of Dental Education**, Washington, v. 67, n. 8, p. 932-949, August, 2003.

DOBLARÉ, M.; GARCIA, J.M. On the modelling bone tissue fracture and healing of the bone tissue. **Acta Científica Venezolana**, Caracas, v. 54, n. 1, p. 58-75, 2003.

DONG, J.; KOJIMA, H.; UEMURA, T.; KIKUCHI, M.; TATEISHI, T.; TANAKA, J. In vivo evaluation of a novel porous hydroxyapatite to sustain osteogenesis of trasplaned bone marrow-derived osteoblastic cells. **Journal of Biomedical Materials Research**, Hoboken, v. 57, n. 2, p. 208-216, 2001.

DÓREA NETO, F.A.; PADILHA FILHO, J.G.; ORIÁ, A.P.; FURLANI, J.M.; SANTOS, L.A. Artrodese do carpo em gatos associada à hidroxiapatita. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 3, 2004.

DORIA FILHO, U. **Introdução à bioestatística**: para simples mortais. São Paulo: Negócios, p. 101-110, 1999.

DUARTE DA SILVA, A.B.; RODRIGUES, L.; JORGETT, W.; BESTEIRO, J.M.; FERREIRA, M.C.; GOLÇALVES, C.G; DOS REIS, L.M. Alterações histológicas em enxerto de osso homogêneo preparado e armazenado com duas técnicas diferentes. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 15, p. 74-77, 2000, Suplemento 13.

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

EFGU, C.; AKÇAY, Y.D.; ERTÜRK, S. A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 62, p. 1403-1407, 2004.

FAGUNDES, D.J.; TAHA, M.O. Animal disease model: choices criteria and current animals specimens. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 59-65, 2004.

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 & Maxillofacial Surgery**, Copenhagen, v. 33, p. 48–55, 2004.

FERREIRA, L.F. **Viabilidade no uso de gel de PRP na cicatrização de feridas cutâneas em coelhos**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2004.

FERREIRA, G.R.; CESTARI, T.M.; GRANJEIRO, J.M.; TAGA, R. Lack of repair of rat skull critical size defect treated with bovine morphometric protein bound to microgranular bioabsorbable hydroxyapatite. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v. 15, n. 3, p. 175-180, 2004.

FERREIRA, C.F.; GOMES, M.C.C.; SCARSO FILHO, J.; GRANJEIRO, J.M.; SIMÕES, C.M.O.; MAGINI, R.S. Platelet-rich plasma influence on human osteoblasts growth. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 16, p. 456-460, 2005.

FIGUEIREDO, A.S.; FAGUNDES, D.J.; NOVO, N.F.; INOUE, C.M.; TAKITA, L.C.; SASSIOTO, M.C.P. Osteointegração de osso bovino desvitalizado, hidroxiapatita de coral, poliuretana de mamona e enxerto ósseo autógeno em coelhos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 19, n. 4, p. 370-381, 2004.

FRANCO, K.L.; BORGES, A.P.B.; VILÓRIA, M.V.; FERNANDES, E.S.; FEHLBERG, A.F. Hidroxiapatita sintética (HAP-91), hidroxiapatita sintética associada ao colágeno (COL.HAP-91) e hidroxiapatita sintética associada a lipossoma (INT.HAP-91) como substitutos ósseos em defeitos provocados na tíbia de cães: aspectos da osteointegração à microscopia de luz transmitida. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n. 4, p. 431-436, 2001.

GIONNOBILE, W.V. Periodontal tissue engineering by growth factors. **Bone**, New York, v. 19, p. 235-275, 1996.

GLOWACKI, J.; COX, K.A. Osteoclastic features of cells that resorb bone implants in rats. **Calcified Tissue International**, New York, v. 39, p. 97-103, 1986.

GONÇALVES, E.A.L.; GUIMARÃES, S.A.C.; GARCIA, R.B. Proteínas morfogenéticas ósseas: terapêutica molecular no processo de reparo tecidual. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 12, n. 3, p. 299-304, 1998.

GRAGEDA, E. Platelet-rich plasma and bone graft materials: a review and standardized research protocol. **Implant Dentistry**, Baltimore, v. 13, n. 4, p. 301-309, 2004.

GRANJEIRO, J.M., OLIVEIRA, R.C., BUSTOS-VALENZUELA, J.C.; SOGAYAR, M.C.; TAGA, R. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 10, p. 1463-1473, Out. 2005.

GRANJEIRO, J.M.; TAGA, E.M.; FONSECA, M.; MAEDA, L.; TAGA, M.L.; TREBACCHETTI, C.R.; NEGRATO, M.L.A.B. Hidroxiapatita para uso clínico. **RGO**, Porto Alegre, v. 40, n. 2, p. 130-134, Mar./Abr. 1992.

GUYTON, A.C.; HALL, I.E. **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. cap. 79, p. 895-910.

HAMATA, M.M.; YUNOMAE, A.; CESTARI, T.M.; ASSIS, G.F.; TADA, R. A stereological analysis of the heterotopic osteogenesis induced by allogenic bone matrix grafts in rat subcutaneous tissue. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 81-88, 2004.

HEIKKILLÄ, J.T.; AHO, A.J.; YLI-URPO, A.; ANDERSSON, Ö.H.; AHO, H.J.; HAPPONEN, R-P. Bioactive glass versus hydroxyapatite in reconstruction of osteochondral defects in the rabbit. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, Basingstoke, v. 64, n. 6, p. 678-682, 1993.

HERCULIANI, P.P.; CESTARI, T.M.; TAGA, E.M.; TAGA, R. Tratamento de defeitos ósseos perene em calvária de cobaia com membrana de cortical óssea bovina liofilizada associada ou não a enxertos ósseo bovino desmineralizado. **Revista Brasileira de Implantodontia**, Rio de Janeiro, abr./jun., 2000.

HISATOME, T.; YASUNAGA, Y.; YANADA, S.; TABATA, Y.; IKADA, Y.; OCHI, M. Neovascularization and bone regeneration by implantation of autologous bone marrow mononuclear cells. **Biomaterials**, Surrey, v. 26, p. 4550-4556, 2005.

HOTT, M.; NOEL, B.; BERNACHE-ASSOLANT, D.; REY, C.; MARIE, P.J. Proliferation and differentiation of human trabecular osteoblastic cells on hydroxyapatite. **Journal of Biomedical Materials Research**, Hoboken, v. 37, p. 508-516, 1997.

HUANG, W.; CARLSEN, B.; WULUR, I.; RUDKIN, G.; ISHIDA, K.; WU, B.; YAMAGUCHI, D.T.; MILLER, T.A. BMP-2 exerts differential effects on differentiation of rabbit bone marrow stromal cells grown in two-dimensional and three-dimensional systems and is required for in vitro bone formation in a PLGA scaffold. **Experimental Cell Research**, New York, v. 299, p. 325-334, 2004.

JOHNSON, E.E.; URIST, M.R.; SCHMALZRIED, T.P.; CHOTIVICHIT, A.; HUANG, H.K.; FINERMAN, G.A.M. Autogenic cancellous bone grafts in extensive segmental ulnar defects in dogs. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, n. 243, p. 254-265, June 1989.

KAITO, T.; MYOUI, A.; TAKAOKA, K.; SAITO, N.; NISHIKAWA, M.; TAMAI, N.; OHGUSHI, H.; YOSHIKAWA, H. Potentiation of the activity of bone

morphogenetic protein-2 in bone regeneration by a PLA–PEG/hydroxyapatite composite. **Biomaterials**, Surrey, v. 26, p. 73-79, 2005.

KALLAS, E.; SCHNAIDER, T.B.; JULIANO, Y.; NOVO, N.F.; KALLAS, I.E.; ENGELMAN, I.E.; KALLÁS, A.C.; CASTRO, L.F. Anesthesia model in rabbits for thoracic surgery. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 91-96, Apr./June 2001.

KANEKO, H.; ARAKAWA, T.; MANO, H.; KANEDA, T.; OGASAWARA, A.; NAKAGAWA, M.; TOYAMA, Y.; YABE, Y.; KUMEGAWA, M.; HAKEDA, Y. Direct stimulation of osteoclastic bone resorption by bone morphogenetic protein (BMP)-2 and expression of BMP receptors in mature osteoclasts. **Bone**, New York, v. 27, n. 4, p. 479–486, 2000.

KAWASE, T.; OKUDA, K.; WOLFF, L.F.; YOSHIE, H. Platelet-rich plasma-derived fibrin clot formation stimulates and osteoblastic cells in vitro. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 74, n. 6, p. 858-864, June 2003.

KELLY, J.D.; SCHNEIDER, G.B. Morphological and histochemical comparison of the cells elicited by ectopic bone implants and tibial osteoclasts. **The American Journal of Anatomy**, New York, v. 192, n. 1, p. 45-54, 1991.

KIM, H.; LEE, J.H.; SUH, H. Interaction of mesenchymal stem cells and osteoblasts for in vitro osteogenesis. **Yonsei Medical Journal**, Seoul, v. 44, n. 2, p. 187-197, 2003.

KIRKER-HEAD, C.A. Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 43, p. 65-92, 2000.

KIRKPATRICK, C.J.; KRUMP-KONVALINKOVA, V.; UNGER, R.E.; BITTINGER, F.; OTTO, M.; PETERS, K. Tissue response and biomaterial integration: the efficacy of in vitro methods. **Biomolecular Engineering**, New York, v. 19, p. 211-217, 2002.

KREBSBACH, P.H.; ROBEY, P.G. Dental and skeletal stem cells: potential cellular therapeutics for craniofacial regeneration. **Journal of Dental Education**, Washington, v. 66, n. 6, p. 766-773, 2002.

KURASHINA, K.; KURITA, H.; HIRANO, M.; KOTANI, A.; KLEIN, C.P.A.T.; GROOT, K. In vivo study of calcium phosphate cements: implantation of an α -tricalcium phosphate/dicalcium phosphate dibasic/tetracalcium phosphate monoxide cement paste. **Biomaterials**, Surrey, v. 18, p. 539-543, 1997.

LANDESBURG, R.; BURKE, A.; PINSKY, D.; KATZ, R.; VO, J.; EISIG, S.B.; LU, H.H. Activation of platelet-rich plasma using thrombin receptor agonist peptide. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 63, p. 529-535, 2005.

LIMA, T.B.F. **Implante de hidroxiapatita sintética, associada ou não a proteínas morfogenéticas ósseas, no subcutâneo da face externa da orelha de coelhos**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2003.

LINDSEY, W.H. Osseous tissue engineering with gene therapy for facial bone reconstruction. **The Laryngoscope**, St. Louis, v. 111, p. 1128-1136, 2001.

LIU, Y.; DE GROOT, K.; HUNZIKER, E.B. BMP-2 liberated from biomimetic implant coatings induces and sustains direct ossification in an ectopic rat model. **Bone**, New York, v. 36, p. 745– 757, 2005.

LU, H.H.; KOFRON, M.D.; EL-AMIN, S.F.; ATTAWIA, M.A.; LAURENCIN, C.T. In vitro bone formation using muscle-derived cells: a new paradigm for bone tissue engineering using polymer–bone morphogenetic protein matrices. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 305, p. 882–889, 2003.

LUCARELLI, E.; BECCHERONI, A.; DONAT, D.; SANGIORGI, L.; CENACCHI, A.; DEL VENTO, A.M.; MEOTTI, C.; BERTOJA, A.Z.; GIARDINO, R.; FORNASARI, P.M.; MERCURI, M.; PICCI, P. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. **Biomaterials**, Surrey, v. 24, p. 3095–3100, 2003.

LYNCH, S.E.; WILLIAMS, R.C.; POLSON, A.M.; HOWELL, T.H.; REDDY, M.S.; ZAPPA, U.E.; ANTONIADES, H.N. A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 16, p. 545-548, 1989.

LYNCH, S.E.; DE CASTILLA, G.R.; WILLIAMS, R.C. The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 62, p. 458-467, 1991.

MA, Q.; MAO, T.; LIU, B.; ZHAO, J.; CHEN, F.; WANG, H.; ZHAO, M. Vascular osteomuscular autograft prefabrication using coral, type I collagen and recombinant human bone morphogenetic protein-2. **The British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, Edinburgh, v. 38, n. 5, p. 561-564, 2000.

MACHADO, P.R.M.; PUERTAS, E.B.; TAGA, E.; NONOSE, N. Utilização da densiometria óssea como método de avaliação dos resultados da utilização de BMP bovina em artrodese de coluna em coelhos. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 42-45, 2005.

MAGALHÃES, D.; MENEZES, H.H.M.; OLIVEIRA, S.R. Reparação óssea e reconstrução periodontal. **Jornal Brasileiro de Endo/ Periodontia**, Curitiba, v. 1, n. 1, p. 72-77, 2000.

MARX, R.E. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? **Implant Dentistry**, Baltimore, v. 10, n. 4, p. 225-2228, 2001.

MARX, R.E. Platelet-rich plasma: evidence to support it use. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia , v. 62, p. 489-496, 2004.

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

MATOS, M.A.; GONCALVES, R.R.; ARAÚJO, F.P. Experimental model for osteotomy in immature rabbit. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v. 9, n. 4, p. 21-26, Oct./Dec. 2001.

MINGUELL, J.J.; CONGET, P.; ERICES, A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 8, p. 881-887, 2000.

MORAN, C.G.; TOURET, L.J. Recent advances: orthopaedics. **British Medical Journal**, Edinburgh, v. 322, p. 902-905, 2001.

MOREIRA, A.S.B.; PASTORELI, M.T.; DAMASCENO, L.H.F.; DEFINO, H.L.A. Influence of dimensions of hydroxiapatite granules upon bone integration: an

experimental study. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v. 11, n. 4, p. 240-250, 2003

MUSCHLER, G.F.; BOEHM, C.; EASLEY, K. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, Boston, v. 79A, n. 11, p. 1699-1709, 1997.

NILSSON, O.S.; URIST, M.R. Immune inhibition of repair of canine skull trephine defects implanted with partially purified bovine morphogenetic protein. **International Orthopaedics**, Berlin, v. 15, p. 257-263, 1991.

NOSHI, T.; YOSHIKAWA, T.; IKEUCHI, M.; DOHI, Y.; OHGUSHI, H.; HORIUCHI, K.; ICHIJIMA, K.; SUGIMURA, M.; ICHIJIMA, K.; YONEMASU, K. Enhancement of the in vivo osteogenic potential of marrow/hydroxyapatite composites by bovine bone morphogenetic protein. **Journal of Biomedical Materials Research**, Hoboken, v. 52, n. 4, p. 621-630, 2000.

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

OLIVEIRA, R.C.; MENEZES, R.; CESTARI, T.M.; TAGA, E.T.; BUZALAF, M.A.R.; GRANJEIRO, J.M. Tissue response to a membrane of desmineralized bovine cortical bone implanted in the subcutaneous tissue of rats. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v. 15, n. 1, p. 3-8, 2004.

OLIVEIRA RC, SICCA CM, SILVA TL, CESTARI TM, OLIVEIRA DT, BUZALAF AR, TAGA R, TAGA EM, GRANJEIRO JM. Efeito da temperatura de

desproteínização no preparo de osso cortical bovino microgranular. avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular em subcutâneo de ratos. **Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru**, Bauru, v. 7, n. 3/4, p. 85-93, 1999.

PEKKARINEN, T.; LINDHOLM, T.S.; HIETALA, E.O.; JALOVAARA, P. The effect of different mineral frames on ectopic bone formation in mouse hind leg muscles induced by native reindeer bone morphogenetic protein. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, Berlim, v. 125, p. 10-15, 2005.

PINTO, L.P.; BROSCO, H.B.; TAGA, R.; TAGA, E.M. Regeneração óssea guiada de alvéolos de extração dentária: por que fazê-la? **Revista Brasileira de Implantodontia**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 12, 2000.

PROCKOP, D.J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science**, Washington, v. 276, n. 4, p. 71-74, 1997.

RAMALHO, A.C.R.; LAZARETTI-CASTRO, M.; COHEN-SOLAL, M.E.; VERNEJOUL, M.C. Por que estrógeno e raloxifeno melhoram a densidade mineral óssea?: mecanismo de ação do estrógeno e de um modulador seletivo do receptor de estrógeno (SERM) no osso. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v. 44, n. 6, p. 471-482, 2000.

REMEDIOS, A. Bone and bone healing. **Vetrinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 29, n. 5, Sept. 1999.

REZENDE, C.M.F.; BORGES, A.P.B.; BERNIS, W.O.; MELO, E.G.; NOBREGA NETO, P.I.; SILVA, M.C. Aspéctos clínicos e radiográficos da hidroxiapatita sintética na diáfise proximal da tíbia de cães. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 50, p. 537-545, 1998.

RIMINUCCI, M.; BIANCO, P. Building bone tissue: matrices and scaffolds in physiology and biotechnology. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 36, n. 8, p. 1027-1036, 2003.

ROVIRA, A.; AMEDEE, J.; BAREILLE, R.; RABAUD, M. Colonization of a calcium phosphate/elastin-solubilized peptide-collagen composite material by human osteoblasts. **Biomaterials**, Surrey, v. 17, n. 15, p. 1535-1540, 1996.

SAKATA, M.M.; ALBERTO-RINCON, M.C.; DUEK, E.A.R. Estudo da interação polímero/cartilagem/osso utilizando poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) e poli (p-dioxanona) em condilo femural de coelhos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 14, n. 3, p. 176-180, 2004.

SALGADO, A.J.; COUTINHO, O.P.; REIS, R.L. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. **Macromolecular Bioscience**, Weinheim, v. 4, p. 743-765, 2004.

SALIH, V.; GEORGIU, G.; KNOWLES, J.C.; OLSEN, I. Glass reinforced hydroxyapatite for hard tissue surgery – part II: in vitro evaluation of bone cell growth and function. **Biomaterials**, Surrey, v. 22, n. 20, p. 2817-2824, 2001.

SANADA, J. F.; RODRIGUES, J.G.R.; CANOVA, G.C.; CESTARI, T.M.; TAGA, E.M.; TAGA, R.; BUZALAF, M.A.R.; GRANJEIRO, J.M. Análise histológica, radiográfica e do perfil de imunoglobulinas após implantação de enxerto de osso esponjoso bovino desmineralizado em bloco em músculo de ratos. **Journal of Applied Oral Science**, Bauru, v. 11, n. 3, p. 209-215, 2003.

SANTANA, S.I. **Processo de reparo de cavidade óssea cirúrgica preenchida ou não por plasma rico em plaquetas: estudo radiográfico em calvária de coelhos**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2003.

SANTOS, A.A.; MIRANDA, C.D.O.; ALVES, M.T.S.; FALOPPA, F. The role of bone morphogenetic protein on bone tissue repair. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v. 13, n. 4, p. 194-195, 2005.

SCARSO FILHO, J.; BARRETO, M.A.; MENDONÇA, R.G.; DINATO, J.C. Plasma rico em plaquetas. In: DINATO, I.C.; POLÍDO, W.D. **Implantes osteointegrados. cirurgia e prótese**. São Paulo: Artes Médicas, cap. 16, p. 315-342, 2001.

SCHENK, R.K. Regeneração óssea: bases biológicas. In: BUSER, D.; DAHLIN, C.; SCHENK, R.K. **Regeneração óssea guiada na implantodontia**. São Paulo: Quintessence, p.49-100, 1996.

SCHMAEDECKE, A.; ACETO, M.L.; QUEIRÓZ, G.F.; TATARUNAS, A.C.; ZERWES, M.B.C.; MASTROCINQUE, S.; FERRIGMO, C.R.A. Tratamento cirúrgico de união retardada e não união de fraturas em cães: revisão de literatura. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, São Paulo, v. 6, n. 1/3, p. 74-82, 2003.

SCHNAIDER, T.B.; SOUZA, C. Ethics and animal experiments. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 2, p. 278-285, 2003.

SHIRLEY, D.; MARSH, D.; JORDAN, G.; MCQUAID, S.; LI, G. Systemic recruitment of osteoblastic cells in fracture healing. **Journal of Orthopaedic Research**, New York, v. 23, p. 1013–1021, 2005.

SICCA, C.M.; OLIVEIRA, R.C.; SILVA, T.L.; CESTARY, T.M.; OLIVEIRA, D.T.; BUZALAF, M.A.R.; TAGA, R.; TAGA, E.M.; GRANJEIRO, J.M.; KINA, J.R. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso

cortical bovino em subcutâneo de ratos. Efeito do tamanho da partícula. **Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru**, Bauru, v. 8, n. 1/2, p. 1-10, 2000

SILVA, C.M.F.; MAIA, F.A.S.; VIAS, R.B.; ROSSA, R. Estudo comparativo entre silicona e silicona revestida com hidroxiapatita com fins de inclusão. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 12, n. 3, p. 293-297, 1998.

SIPE, J.B.; ZHANG, J.; WAITS, C.; SKIKNE, B.; GARIMELLA, R.; ANDERSON, H.C. Localization of bone morphogenetic proteins (BMPs)-2, -4, and -6 within megakaryocytes and platelets. **Bone**, New York, v. 35, p. 1316–1322, 2004.

SIQUEIRA Jr., J.F.; DANTAS, C.J.S. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. Rio de Janeiro: MEDSI, 2000.

SONNLEITNER, D.; HUEMER, P.; SULLIVAN, D.Y. A simplified technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate for intraoral bone grafting techniques: a technical note. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 15, n. 6, p. 879-882, 2000.

SYKARAS, N.; OPPERMAN, L.A. Bone morphogenetic proteins (BMPs): how do they function and what can they offer the clinician? **Journal of Oral Science**, Tóquio, v. 45, n. 2, p. 57-73, 2003.

TAGA, E.M. Biomateriais para uso em clínica médico-odontológica. **Revista Brasileira de Cirurgia e Implantodontia**, Curitiba, v. 3, n. 1, p. 59-69, 1996.

TAGA, R.; CESTARI, T.M.; TAGA, E.M.; TAVANO, O.; GRANJEIRO, J.M. Evolução de enxertos ósseos autógenos e alógenos colocados em defeitos

ósseos de tamanhos críticos em calvária de cobaias. **BCI – Revista Brasileira de Cirurgia e Implantodontia**, Curitiba, v. 7, n. 26, p. 37-44, 2000.

TAGA, E.M.; MULATINHO, J. Biomateriais para uso em odontologia médico-odontológica. 3 ed. **Dentoflex**: São Paulo, 1999. 16p.

TAGA, E.M.; TAGA, R.; PINTO, L.P.; BROSCO, H.B. Regeneração óssea guiada de alvéolos de extração dentária: por quê fazê-la?. **Revista Brasileira de Implantodontia**, Rio de Janeiro, p. 9-12, 2000.

TEIXEIRA, E.R. Superfícies dos implantes: o estágio atual, In: DINATO, J.C.; POLIDO, W.D. **Implantes osseointegrados**: cirurgia e prótese. São Paulo: Artes Médicas, 2001. cap. 05, p. 63-80.

TEZUKA, K.; NEMOTO, K.; TEZUKA, Y.; SATO, T.; IKEDA, Y.; KOBORI, M.; KAWASHIMA, H.; EGUCHI, H.; HAKEDA, Y.; KUMEGAWA, M. Identification of matrix metalloproteinase 9 in rabbit osteoclasts. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, n. 21, p. 15006-15009, 1994.

TISCHLER, M. Platelet rich plasma: the use of autologous growth factors to enhance bone and soft tissue grafts. **NYSDJ – The New York State dental Journal**, New York, v. 68, n. 3, p. 22-24, Mar. 2002.

TONG, D.C.; RIOUX, K.; DRANGSHOLT, M.; BEIRNE, O.R. A review of survival rates for implants placed in grafted maxillary sinuses using meta-analysis. **The International Oral & Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 13, n. 2, p. 175-182, 1998.

TÖZÜM, T.F.; DEMIRALP, B. Platelet-rich plasma: a promising innovation in dentistry. [Journal Canadian Dental Association](#), Ottawa, v. 69, n. 10, p. 664–664h, Nov. 2003.

TSAY, R.C.; VO, J.; BURKE, A.; EISIG, S.B.; LU, H.H.; LANDESBURG, R. Differential growth factor retention by platelet-rich plasma composites. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 63, p. 521-528, 2005.

URIST, M.R. Bone formation by autoinduction. **Science**, Washington, v. 150, p. 893-899, 1965.

VAN DER MEULEN, J.; KOERTEN, H.K. Inflammatory response and degradation of types of calcium phosphate ceramic in a non-osseous environment. **Journal of Biomedical Materials Research**, Hoboken, v. 28, p. 1455-1463, 1994.

WEBSTER, T.J.; ERGUN, C.; DOREMUS, R.H.; SIEGEL, R.W.; BIZIOS, R. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. **Journal of Biomedical Materials Research**, Hoboken, v. 51, p. 475-483, 2000.

WEIBRICH, G.; KLEIS, W.K.G.; HAFNER, G.; HITZLER, W.E. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, Kidlington, v. 30, p. 97-102, 2002.

WOODARD, J.C.; RISER, W.H. Morphology of fracture nonunion and osteomyelitis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 21, n. 4, July, 1991.

WORTHINGTON, P.; LANG, B.R.; LAVELLE, W.E. **Osseointegração na odontologia: uma introdução**. São Paulo: Quintessence Books, 1997. 123 p.

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

YONEDA, M.; TERAJ, H.; IMAI, Y.; OKADA, T.; NOZAKI, K.; INOUE, H.; MIYAMOTO, S.; TAKAOKA, K. Repair of an intercalated long bone defect with a synthetic biodegradable bone-inducing implant. **Biomaterials**, Surrey, v. 26, p. 5145-5152, 2005.

YOON, S T.; BODEN, S.D. Osteoinductive molecules in orthopaedics: basic science and preclinical studies. **Clinical Orthopaedics And Related Research**, Philadelphia, v. 1, n. 395, p.33-43, 2002.

YOUNG, H.E.; DUPLAA, C.; YOST, M.J.; HENSON, N.L.; FLOYD, J.A.; DETMER, K.; THOMPSON, A.J.; POWELL, S.W.; GAMBLIN, T.C.; KIZZIAH, K.; HOLLAND, B.J.; BOEV, A.; VAN DE WATER, J.M.; GODBEE, D.C.; JACKSON, S.; RIMANDO, M.; EDWARDS, C.R.; WU, E.; CAWLEY, C.; EDWARDS, P.D.; MACGREGOR, A.; BOZOF, R.; THOMPSON, T.M.; PETRO Jr, G.J.; SHELTON, H.M.; McCAMPBELL, B.L.; MILLS, J.C.; FLYNT, F.L.; STEELE, T.A.; KEARNEY, M.; KIRINCICH-GREATHEAD, A.; HARDY, W.; YOUNG, P.R.; AMIN, A.V.; WILLIAMS, R.S.; HORTON, M.M.; MCGUINN, S.; HAWKINS, K.C.; ERICSON, K.; TERRACIO, L.; MOREAU, C.; HIXSON, D.; TOBIN, B.W.; HUDSON, J.; BOWYER III, F.P.; BLACK Jr, A.C. Clonogenic Analysis Reveals Reserve Stem Cells in Postnatal Mammals: I. Pluripotent Mesenchymal stemcells. **The Anatomical Record**, New York, v. 263, p. 350–360, 2001.

ZAMBUZZI, W.F.; NEVES, M.C.M.; OLIVEIRA, R.C.; SILVA, T.L.; CESTARI, T.M.; BUZALAF, M.A.R.; GRANJEIRO, J.M.; TAGA, R.; TAGA, E.M. Reação tecidual e perfil de fosfatases após o implante de matriz óssea desmineralizada xenogênica em músculo de ratos. **Ciência Odontológica Brasileira**, São José dos Campos, v. 8, n. 2, p. 90-98, abr./jun. 2005.

ZILIOOTTO, L.; DALECK, C.R.; PADILHA FILHO, J.G.; SOUZA, A.P.; DINIZ, P.P.V.P. A limb sparing surgery with the use of a cortical allograft preserved in glicerín: an experimental study in dogs. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 107-115, 2003.