

Guilherme Romano Scartezini

**Reparo em osso irradiado utilizando enxerto ósseo
autógeno associado a plasma rico em plaquetas.
Análise histomorfométrica em coelhos.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade Federal de
Uberlândia, como requisito para obtenção
do título de Mestre em Odontologia: Área
de Concentração em Cirurgia e
Traumatologia Buco-Maxilo-Facial

Uberlândia
2008

Guilherme Romano Scartezini

**Reparo em osso irradiado utilizando enxerto ósseo
autógeno associado a plasma rico em plaquetas.
Análise histomorfométrica em coelhos.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade Federal de
Uberlândia, como requisito para obtenção
do título de Mestre em Odontologia: Área
de Concentração em Cirurgia e
Traumatologia Buco-Maxilo-Facial

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Paula Dechichi

Co-Orientador: Prof. Dr. Darcey Zanetta-Barbosa

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Paula Dechichi

Prof. Dr. Antônio Francisco Durighetto Júnior

Prof. Dr. Eduardo Hochuli Vieira

Uberlândia
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S287r Scartezini, Guilherme Romano, 1977-

Reparo em osso irradiado utilizando enxerto ósseo autógeno associado a plasma rico em plaquetas : análise histomorfométrica em coelhos / Guilherme Romano Scartezini. - 2008.

75 f. : il.

Orientadora: Paula Dechichi.

Co-orientador: Darceny Zanetta-Barbosa.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Inclui bibliografia.

1. Ossos - Enxerto - Teses. 2. Implantes dentários osseointegrados - Teses. I. Dechichi, Paula. II. Zanetta-Barbosa, Darceny. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

CDU: 616.71-033.3

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

A comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Odontologia, em sessão pública realizada em **17 de Dezembro de 2009**, considerou o candidato Guilherme Romano Scartezini ***aprovado***.

Prof^a. Dr^a. Darceny Zanetta Barbosa
Prof. Dr. Antônio Francisco Durighetto Júnior
Prof. Dr. Eduardo Hochuli Vieira

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, pelo apoio e exemplo dado nestes anos todos para concretização dos meus objetivos profissionais e a Deus por me permitir trilhar o caminho da dignidade com saúde e serenidade e me dando sabedoria nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

A Prof^a. Dr^a. Paula Dechichi, orientadora deste trabalho, pela orientação, pelo exemplo de mãe a qual o foi com sua filha recém nascida e assim mesmo dispensando tempo para me proporcionar a elaboração da minha dissertação, com distinção e profissionalismo.

Ao Prof. Dr. Darceny Zanetta-Barbosa, co-orientador deste trabalho, pela contribuição no custeio dos animais no início do trabalho, e incentivo como exemplo de cirurgião buco-maxilo-facial e docente;

Aos Professores do Mestrado Acadêmico de Odontologia, pelos conhecimentos adquiridos durante o curso;

Ao Prof. Dr. Durigheto, professor adjunto da Faculdade de Odontologia da UFU, por ajuda na orientação e auxílio no desenvolvimento deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti, professor da histologia da UFU, pela obtenção dos dados estatísticos deste estudo;

Ao Dr. Amado, gerente do Hospital Veterinário da UFU, por ter cedido local para a realização deste estudo;

As colegas, Gustavo Rabelo, Rafaela Guide, Jonas Dantas, A Flaviane, Lara, Orlando Aguirre, pela ajuda nas cirurgias experimentais deste trabalho;

A Abigail e a Cidinha nos momentos mais urgentes e burocráticos para execução deste trabalho;

Aos técnicos e funcionários do Hospital Veterinário ``Srs. João`` pela ajuda no tratamento dos animais;

Aos amigos do mestrado Gustavo Rebelo, Orlando, Welligton, Thiago Lucena, Danilo, Gustavo de Paula, Vitor Coró, Carolina Guica, Anne, Adriana, Thaís, Marina,... pelo companheirismo nos momentos difíceis e de descontração;

A todos que contribuíram na execução deste trabalho que marca minha vida profissional e pessoal.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	01
RESUMO	02
ABSTRACT	03
1.INTRODUÇÃO	04
2.REVISÃO DE LITERATURA	06
2.1. BIOLOGIA DO TECIDO ÓSSEO	06
2.2. REPARO ÓSSEO	11
2.3. EFEITO DA RADIAÇÃO NO TECIDO ÓSSEO	16
2.4. PLASMA RICO EM PLAQUETAS	23
3. PROPOSIÇÃO	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. ANIMAIS	27
4.2. TÉCNICA CIRÚRGICA	28
4.3. OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS	31
4.4. SACRIFÍCIO	32
4.5. HISTOMORFOMETRIA	32
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
5. RESULTADOS	36
6. DISCUSSÃO	39
7. CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS	48
ANEXO I	68
ANEXO II	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

PRP	Plasma Rico em Plaquetas
FCs	Fatores de Crescimento
mm	Milímetros
%	Porcentagem
PBS	Tampão fosfato salina
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetracético
µm	Micrômetros
α	Alfa
x	Vezes
BMP	Proteína Óssea Morfogenética
PO ₂	Potencial de Oxigênio
mmHg	Milímetros de Mercúrio
PDGF	Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas
TGF	Fator de Crescimento de Transformação
IGF	Fator de Crescimento Similar a Insulina
β	Beta
DFDBA	Osso Liofilizado Desmineralizado
FDBA	Osso Liofilizado Mineralizado
µL	Microlitros
mL	Millilitros
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
PPP	Plasma Pobre em Plaquetas
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
G	Aceleração da gravidade
Gy	Gray
cGy	Centigray

RESUMO

O objetivo deste estudo foi analisar histologicamente, o reparo ósseo em lesões de tíbia previamente irradiada, após tratamento com enxerto ósseo autógeno associado ao PRP.

Neste estudo, foram utilizados 12 coelhos separados em dois grupos iguais: irradiado (I) e não irradiado (II), que foram divididos em subgrupos: controle (tíbia esquerda) e PRP (tíbia direita). O grupo irradiado recebeu dose única de 15 Gy nas tíbias. Após 45 dias, nos grupos I e II, foram criadas lesões nas tíbias, com trefina de 5 mm de diâmetro. As lesões foram preenchidas com enxerto autógeno associado a PRP (grupo teste) ou não associado a PRP (grupo controle). Após quatro semanas, os animais foram sacrificados e as regiões enxertadas foram removidas, fixadas em formol tamponado, desmineralizadas em EDTA e processadas para inclusão em parafina. As imagens histológicas foram digitalizadas, utilizando objetiva de 4X, e submetidas ao processo de segmentação interativa, como preconizado por Oliveira *et al.* (2006). A região de matriz óssea foi denominada de Região de Interesse (ROI) e a porcentagem de matriz por área foi obtida e analisada por meio de algoritmos desenvolvidos em ambiente de programação SCILAB. Os dados foram tratados utilizando os testes Kolmogorov – Smirnov e Teste t de Student pareado e não pareado. Nos grupo irradiado e não irradiado a análise estatística não mostrou diferença significativa entre os subgrupos teste e controle. Também não foi observada diferença significativa entre os grupos irradiado e não irradiado. De acordo com os dados obtidos, a utilização de enxerto autógeno associado ao PRP não contribuiu, significativamente no reparo de lesões em osso irradiado.

Palavras-chave: osso irradiado, PRP, enxerto, reparo ósseo.

Abstract

The aim of this study was to observe the repair in irradiated bone using autogenous bone graft associated with platelet-rich plasma in rabbit model.

Twelve New Zealand White rabbits were divided into two equal groups: irradiated (I) and non-irradiated (II), which were divided into subgroups: control (left tibiae) and PRP (right tibiae). The irradiated group received a single dose of 15 Gy in the tibiae bone. After forty-five days, in groups I and II, were created lesions in the tibiae, with trephine of 5 mm of diameter. The lesions were filled with autogenous bone grafts with PRP (test group) or without PRP (control group). After four weeks, the animals were sacrificed and the grafted regions were removed, fixed in formalin in PBS, demineralized in EDTA and embedded in paraffin. The histological images were captured at 4X magnification and submitted to the process of Targeting Interactive, as recommended by Oliveira *et al.* (2006). The region of bone matrix was called Region of Interest (ROI) and the percentage of matrix by area was obtained and analyzed through algorithms developed in the programming environment Scilab. The data were processed using the tests Kolmogorov-Smirnov and paired t-test student and not paired. The statistical analysis of irradiated and non-irradiated groups showed no significant difference between test and control groups. Also, there's no significant difference between groups irradiated and non-irradiated. According to data obtained, the use of autogenous bone grafts associated with the PRP did not contribute significantly in the repair of irradiated bone.

Key words: irradiated bone, bone repair, PRP, grafting.

1. INTRODUÇÃO

A radioterapia é freqüentemente aplicada antes ou depois de cirurgia de remoção de tumores malignos melhorando os resultados terapêuticos. Contudo, algum grau de prejuízo permanente ou transitório permanece após a radioterapia (Gränstrom, 2003). O potencial de lesão óssea causada pela radiação não é somente determinada pela dose total, mas também pelo número de frações e pelo tempo de tratamento.

Os protocolos de radiação usados em estudos prévios em animais, incluem doses simples de 15 Gy (Kudo *et al.*, 2001), 22 Gy/4 frações (equivalente a 64 Gy/32 frações em 6 semanas) (Morales *et al.*, 1987), 28 Gy/4 frações em 4 semanas (equivalente a 80 Gy/30 frações) (Eppley *et al.*, 1991), 22,5 Gy em 3 frações por 5 dias (Khatteery *et al.*, 1991), 45 Gy/10 frações em 3 semanas (equivalente a 60 Gy/30 frações em 6 semanas) (Larsen *et al.*, 1993), 50 Gy/20 frações por 4 semanas (Gantous *et al.*, 1994).

As mudanças ósseas induzidas pela radiação podem afetar o esqueleto humano de maneira mista, envolvendo tanto padrões de lise óssea quanto de esclerose óssea. Este fato está relacionado ao epicentro da radiação portal (feixe de radiação) expandir além de suas margens (Camp & Moreton, 1945), comprometendo a resistência da massa óssea irradiada (Eisenschenk *et al.*, 2006).

Os efeitos deletérios da radiação sobre o tecido ósseo, tais como morte celular, injúria celular, paralisar a divisão celular e reparação anormal com neoplasia, há muito são motivo de estudo. Atualmente esses efeitos são freqüentemente observados devido à melhora na sobrevida de pacientes em tratamento de tumores malignos com radioterapia com ou sem tratamentos coadjuvantes (Williams & Davies, 2006). As mudanças no reparo dos tecidos irradiados especificamente no osso, podem ser devidas, em parte, à diminuição dos fatores de crescimento que estão envolvidos na cicatrização da ferida (Aghaloo *et al.*, 2006; Williams & Davies, 2006; Colella *et al.*, 2007).

Em procedimentos de enxertia, o leito receptor pode apresentar comprometimento do suprimento vascular quando previamente submetido à

radioterapia, o que compromete o reparo ósseo e conseqüentemente o sucesso do enxerto ósseo autógeno. O plasma rico em plaquetas (PRP) contém vários tipos de fatores de crescimento envolvidos no reparo tecidual e vascular como PDGF, TGF, IGF-I, EGF, ECGF, entre outros. Estes fatores são importantes no reparo ósseo e junto com as proteínas morfogenéticas do osso, promovem a proliferação e diferenciação das células mesênquimais em osteoblastos (Bornstein *et al.*, 2007). Aghaloo *et al.* (2006) verificaram aumento de fatores de crescimento PDGF, β FGF e TGF β quando PRP foi adicionado a enxerto autógeno em lesões de calvária. A associação de PRP a biomateriais pode apresentar bons resultados quando comparado com grupo controle utilizando lesão preenchida com coágulo total (Freymiller & Aghaloo, 2004). Estes estudos incentivam a utilização do PRP, apesar de existirem controvérsias sobre a contribuição do PRP no reparo ósseo (Hatakeyama *et al.*, 2008).

Neste estudo objetivamos avaliar o reparo ósseo em tíbia de coelho irradiada com dose simples de 15 Gy utilizando enxerto ósseo autógeno associado a PRP.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Para o melhor entendimento do objetivo deste estudo, serão abordados aspectos gerais da histofisiologia do tecido ósseo, reparo ósseo, a utilização de enxertos ósseos, o uso de PRP e osso irradiado.

2.1. BIOLOGIA DO TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo cuja matriz extracelular é mineralizada, conferindo a este tecido propriedades ideais para a realização das funções de suporte e proteção do organismo vertebrado. A extrema rigidez do tecido ósseo é resultado da interação entre o componente orgânico e o componente mineral da matriz extracelular. Dentre os tecidos de suporte, o tecido ósseo é considerado como tendo o mais alto grau de evolução, sendo o principal constituinte dos ossos, possuindo um alto grau de rigidez e resistência à pressão. Além das propriedades mecânicas, o osso também apresenta uma função metabólica no equilíbrio da homeostasia mineral, agindo como reservatório de cálcio e fosfato e como local de hematopoiese (Roberts, 1988; Watrous & Andrews, 1989).

A porção orgânica da matriz óssea representa 33%, destes 28% são constituídos por colágeno tipo I e 5% de proteínas não colágenas. Os 67% correspondem à porção inorgânica da matriz, cuja composição é basicamente íons fosfato e cálcio formando cristais de hidroxiapatita (Watrous & Andrews, 1989; Ten Cate, 2001; Junqueira & Carneiro, 2004; Katchburian & Arana Chaves, 2004).

Os ossos são revestidos, em suas superfícies externas e internas, por membranas conjuntivas ricamente vascularizadas, apresentando células osteoprogenitoras, denominadas perióstio e endóstio, respectivamente. Os vasos sanguíneos do endóstio e do perióstio ramificam-se e penetram nos ossos através de canais encontrados na matriz óssea. As principais funções do perióstio e do endóstio são nutrição e osteogênese, necessárias para o crescimento e a reparação dos ossos (Junqueira & Carneiro, 2004).

O periósteo é um tecido conjuntivo denso, muito fibroso em sua parte externa e mais celular e vascular na porção interna, em contato com o tecido ósseo. Algumas fibras colágenas do tecido ósseo são contínuas com as fibras do periósteo, sendo responsáveis pela união entre esses tecidos. O endósteo é constituído por uma camada de células osteoprogênicas achatadas e por vasos. Ele reveste as cavidades internas do osso compacto e do esponjoso, interpondo-se entre o tecido ósseo e a medula óssea (Ten Cate, 2001; Junqueira & Carneiro, 2004).

O componente celular do tecido ósseo é constituído pelos osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e células osteoprogenitoras. Os osteoblastos são responsáveis pela síntese dos constituintes orgânicos da matriz óssea e também concentram fosfato e cálcio, participando da mineralização da matriz. São derivados de células osteoprogenitoras e quando em alta atividade sintética apresentam intensa basofilia citoplasmática.

O aspecto ultra-estrutural dos osteoblastos é característico de células especializadas em síntese e secreção de proteínas, apresentando citoplasma rico em retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi desenvolvido e grânulos de secreção. Também apresentam numerosas projeções celulares dispostas radialmente e junções comunicantes com as células osteoprogenitoras, com outros osteoblastos e com osteócitos, sugerindo comunicação entre as células ósseas (Watrous & Andrews, 1989; Ten Cate, 2001; Junqueira & Carneiro, 2004).

O componente orgânico da matriz, produzido pelos osteoblastos, é predominantemente constituído pela proteína colágeno do tipo I (85%), com pequenas quantidades de colágenos tipo III e V (5%). As proteínas não colagênicas da matriz, juntas, perfazem os 10% restantes. Diversas proteínas não colagênicas da matriz óssea foram identificadas: osteocalcina, osteonectina, sialoproteínas (osteopontina e sialoproteína óssea), decorina e biglicana. Além delas, estão presentes duas moléculas de adesão (tenascina e fibronectina), glicosaminoglicanas (principalmente condroitin-sulfato) e numerosos fatores biologicamente ativos, como a osteogenina e a proteína

morfogenética óssea (Hauschka *et al.*, 1986; Wozney *et al.*, 1988; Andriano *et al.*, 2000; Bessho *et al.*, 2002; Blatter *et al.*, 2002).

A célula mesenquimal, também denominada de célula adventícia, situa-se normalmente ao redor de capilares e pequenos vasos sanguíneos no tecido conjuntivo frouxo, sendo também conhecida como pericito ou célula perivascular. Sua denominação provém do fato de que ela retém a multipotencialidade das células mesenquimais embrionárias. Parecem ser importantes na formação de novos fibroblastos durante o processo de cicatrização de feridas e podem, em determinadas circunstâncias, formar outros tipos de células como os condroblastos e osteoblastos pelo estímulo dos fatores de crescimento transformador β e das proteínas morfogenéticas ósseas-2 (BMP-2) (Odgren *et al.*, 2001). Esta capacidade explicaria o ocasional aparecimento de osso na cicatrização de uma ferida. As células responsáveis pela produção da matriz orgânica são os osteoblastos que também participam do processo de mineralização. Adjacente aos osteoblastos existem células osteogênicas que se diferenciam em osteoblastos quando necessário (Katchburian & Arana Chaves, 2004).

Durante a formação da matriz óssea alguns osteoblastos ficam aprisionados na matriz, sendo então denominados osteócitos. Estas células constituem uma rede celular que permite a comunicação entre elas e destas com os osteoblastos da superfície. Os osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea, são células multinucleadas, que se localizam na superfície da matriz, sendo ativos no processo de remodelação óssea (Katchburian & Arana Chaves, 2004).

Na matriz óssea, a porção orgânica do osso é composta de proteínas colágenas e não colágenas acrescidas de proteoglicanos (Amber, 1969; Baker *et al.*, 1979). O colágeno tipo I responde por 90% da constituição protéica óssea, servindo como arcabouço estrutural para a fase mineralizada. As proteínas não colágenas possuem a função de promover a mineralização óssea, regulando a adesão e atividade celular durante fenômenos de formação e reabsorção óssea (Bord *et al.*, 1996). Dentre as proteínas não-colágenas presentes na matriz óssea, podemos citar a Osteocalcina que é uma proteína

de baixo peso molecular, contém em sua molécula resíduos do ácido carboxyglutâmico- α (GLA) responsáveis pela ligação do cálcio, promovendo mineralização óssea ou regulação do crescimento dos cristais. Ela se encontra nos osteoblastos, na matriz óssea mineralizada e no cimento acelular. Estudos *in vitro* associaram a resposta dos osteoclastos à presença da osteocalcina com a promoção da adesão e liberação dos osteoclastos, através do aumento da secreção da osteopontina, fibronectina, sialoproteína óssea e formação de agentes de adesão focal (Roach, 1994; Zhou *et al*, 1994).

Outra proteína não colágena é a osteopontina, que se encontra nos depósitos e nas superfícies da matriz óssea, sugerindo seu papel na mineralização e adesão dos osteoblastos e osteoclastos na matriz óssea. Também se encontra em muitos tipos de tecidos e está envolvida com a organização tecidual (Lindhe *et al.*, 4ª edição).

A osteonectina é considerada a proteína não colagênica mais abundante do osso e está manifestada nas células osteoprogenitoras, osteoblastos e osteócitos recentemente formados. Está relacionada com a mineralização óssea, porém sua função não está claramente definida. Encontram-se também nos tecidos, como no ligamento periodontal, nos fibroblastos e células endoteliais. Apresenta a propriedade de se ligar a várias moléculas de colágeno e de adesão, tendo a participação mediada pelo cálcio na organização da matriz extracelular (Odgren *et al*, 2001).

A sialoproteína óssea também é não colágena, e se restringe a matriz óssea mineralizada, mas não nos osteóides. Pesquisas têm mostrado que a associação de proteínas como a sialoproteína óssea e a osteocalcina com fibrilas colágenas criam alta concentração local de cálcio, levando a precipitação do mineral. Estas proteínas de ligação ao cálcio, quando presentes em solução, inibem a deposição de mineral. Entretanto, quando ligada a um substrato sólido, promovem a deposição óssea. A sialoproteína óssea promove reabsorção óssea por aumentar a adesão dos osteoclastos à matriz óssea (Aarden *et al*, 1994).

Outra proteína não colágena é a osteoprotegerina que também é conhecida como protetora óssea ou fator de inibição da osteoclastogênese,

sendo secretada como os membros da família de receptores TNF. O processo de reabsorção óssea funciona por meio da ligação do RANK com o RANK-L, o que resulta em osteoclastogênese de células progenitoras e da ativação dos osteoclastos maduros. A osteoprotegerina funciona como um receptor do RANK –L, e compete com o RANK para se ligar ao RANK-L. Trata-se de um inibidor efetivo da ativação e maturação dos osteoclastos (Ross, 2000).

O tecido ósseo pode apresentar um arranjo trabecular delimitando pequenas cavidades, preenchidas por medula óssea, caracterizando o osso esponjoso. O osso compacto é formado por lamelas ósseas paralelas ou concêntricas (sistemas de Havers) não apresentando cavidades. Osso esponjoso e compacto apresentam arquitetura macroscópica diferente mas possuem a mesma constituição histológica (Katchburian & Arana Chaves, 2004).

Histologicamente, o tecido ósseo pode ser classificado em primário (imaturo) ou secundário (maduro ou lamelar). O tecido ósseo imaturo apresenta fibrilas colágenas sem organização definida, maior número de osteócitos incluídos na matriz óssea e menor conteúdo mineral. No adulto ocorre apenas nas suturas dos ossos do crânio, nos alvéolos dentários e em alguns pontos de inserção de tendões. O tecido ósseo maduro apresenta fibrilas colágenas organizadas formando lamelas ou camadas, possui menor número de osteócitos incluídos na matriz e maior conteúdo mineral, sendo o tipo predominante no adulto.

Durante a formação do esqueleto ou nos processos de reparo, o primeiro tecido ósseo formado é o tipo primário, sendo progressivamente substituído pelo tipo secundário.

Os osteoclastos participam dos processos de reabsorção e remodelação do tecido ósseo. São células gigantes, multinucleadas, derivadas da fusão de monócitos que atravessam os capilares sangüíneos. Os osteoclastos ocupam depressões rasas, chamadas lacunas de Howship que caracterizam regiões de reabsorção óssea. Estas células gigantes são especializadas em decompor matriz mineralizada, do tecido ósseo, dentina, esmalte e cartilagem calcificada (Buser, 1994).

A reabsorção óssea está associada à produção aumentada das enzimas citoplasmáticas como fosfatase ácida, esterase não específica e anidrase carbônica. O exame ultraestrutural dos osteoclastos, durante a reabsorção, revela uma abundância de mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso esparsos, muitos ribossomos livres e uma zona citoplasmática periférica clara, com um bordo ondulado de membrana adjacente ao osso em reabsorção (Watrous & Andrews, 1989; Ten Cate, 2001).

A estrutura do osso é mantida por uma relação delicada entre osteoblastos, responsáveis pela formação óssea, e osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea. Os mecanismos reguladores são complexos e envolvem interações entre as células ósseas e diversos fatores locais e sistêmicos. Diversas citocinas estão envolvidas nesses mecanismos reguladores (Watrous & Andrews, 1989; Junqueira & Carneiro, 2004).

Apesar da rigidez e aparente inatividade, o tecido ósseo é muito dinâmico apresentando um processo combinado de formação e reabsorção, denominado de remodelação óssea. Este processo é contínuo e fisiológico permitindo que o tecido ósseo se renove constantemente, responda aos estímulos externos e também sofra reparação (Katchburian & Arana Chaves, 2004).

2.2. REPARO ÓSSEO

O crescimento, a formação e o desenvolvimento do tecido ósseo humano têm início durante o desenvolvimento embrionário e seguem até a idade adulta. Durante toda a vida, os ossos apresentam um processo combinado e constante de formação e reabsorção, denominado de remodelação óssea ou “turn over” ósseo. Esta remodelação é determinada pela carga genética e se mostra dependente de regulação e influências endócrinas, bioquímicas e ambientais. Mesmo no adulto, o tecido ósseo é metabolicamente ativo e a manutenção da matriz é o resultado de um balanço de atividade de síntese e reabsorção, os quais refletem as atividades antagonistas de osteoblastos e osteoclastos, respectivamente (Junqueira & Carneiro, 2004).

Um tecido vivo que sofreu agressão, que foi perdido ou tratado cirurgicamente responde através de um processo fisiológico chamado de reparação. A reparação pode ocorrer por regeneração ou por cicatrização (AAP, 1992).

Regeneração é a reprodução ou reconstituição de uma parte danificada ou perdida resultando em estruturas com a mesma arquitetura e função das estruturas originais. Já, a cicatrização é a reparação de uma ferida por um tecido que não restaura completamente a arquitetura ou a função da parte danificada (AAP, 1992).

O estudo da reparação óssea foi inicialmente realizado em animais, creditando-se a Euler (1923) os primeiros conhecimentos sobre o assunto. Este processo inicia-se pela organização do coágulo e proliferação endotelial, que caracteriza o tecido de granulação óssea (Buser *et al.*, 1997). Em seguida células osteoprogenitoras ocupam amplamente o defeito ósseo e têm como função, por meio de atividades mitóticas, dar origem a outras células ósseas, em condições normais. Em condições emergenciais, o fluxo das células osteoprogenitoras pode tornar-se insuficiente e outras células mitoticamente competentes multiplicam-se, para compensar a solicitação, viabilizando a diferenciação de osteoblastos, que vão produzir os constituintes da matriz orgânica do tecido ósseo, promovendo a osteogênese (Ten Cate, 2001).

O tecido ósseo exibe um alto potencial de regeneração, porém esta capacidade pode não se manifestar nos defeitos ósseos de grandes dimensões. Nestas situações, a utilização de enxertos favorece o processo de reparo pelo preenchimento do defeito ósseo, servindo como um arcabouço, levando à neoformação óssea através do processo de osteocondução, aderindo às partículas enxertadas.

A reabsorção que se segue à exodontia muitas vezes compromete o volume ósseo remanescente, impedindo a instalação de implantes. Por essa razão, a reconstrução óssea mostra-se necessária para permitir a posterior colocação de implantes em posição proteticamente satisfatória (Paleckis *et al.*, 2005).

Várias metodologias vem sendo empregadas para a reconstrução óssea: enxerto ósseos autógenos, substitutos ósseos alógenos, xenógenos e aloplásticos, regeneração óssea guiada, distração osteogênica, fatores de crescimento e combinações destas referidas metodologias (Pinto, 2003).

O enxerto é considerado autógeno quando obtido de áreas doadoras do próprio indivíduo; homogêneo quando obtidos de indivíduos da mesma espécie do receptor, são os que mais se aproximam dos enxertos autógenos; heterógeno quando obtidos de indivíduos de espécies diferentes do receptor, como os materiais de origem bovina. Os enxertos podem apresentar propriedades biológicas osteocondutoras, osteoindutoras ou osteogênicas (Becker *et al.*, 1998; Boyne & Shabahang, 2001).

A propriedade de osteocondução refere-se à capacidade do enxerto em conduzir o desenvolvimento de novo tecido ósseo através de sua matriz de suporte, chamado de arcabouço. A matriz deve ser reabsorvida e simultaneamente substituída pelo tecido ósseo neoformado. Assim os materiais osteocondutores são biocompatíveis e formam um arcabouço para deposição e proliferação celular com atividade osteoblástica (Misch *et al.*, 1993). Osteoindutores são enxertos que promovem a formação de novo osso a partir das células osteoprogenitoras do leito receptor, derivadas das células mesenquimais indiferenciadas. Os enxertos homogêneos e os autógenos são os agentes osteoindutores mais usados na Implantodontia. Fatores de crescimento como o plasma rico em plaquetas (PRP) e as proteínas ósseas morfogenéticas BMPs, também possuem propriedades osteoindutoras e freqüentemente são associadas aos enxertos (Boyne *et al.*, 1997; Bessho *et al.*, 2002; Blattert *et al.*, 2002).

Biologicamente, o enxerto ósseo autógeno constitui o padrão de comparação às outras metodologias para aumento ósseo e continua sendo o material mais utilizado para correção de defeitos esqueléticos adquiridos ou congênitos (Jorge *et al.*, 2006).

A importância do enxerto ósseo autógeno como padrão de aumento ósseo pode ser ilustrada pelo fato do osso ser o segundo tecido mais transplantado nos organismos, a exceção apenas do tecido sanguíneo (Prolo &

Rodrigo, 1995). A previsibilidade alcançada com o enxerto ósseo autógeno é explicada pelo fato dessa metodologia ser a única a fornecer ao leito receptor células com capacidade de neoformação óssea, fatores de crescimento e um arcabouço ósseo imunologicamente idêntico ao leito receptor. Além disso, o enxerto ósseo autógeno tem a capacidade de restaurar a estabilidade estrutural e mecânica original, fornecendo um resultado estético compatível (Prolo & Rodrigo, 1995).

Nas últimas décadas, a partir dos avanços da bioengenharia óssea tecidual, diferentes materiais têm sido sugeridos como substitutos ósseos, no sentido de funcionarem como arcabouço de matriz extracelular e permitirem neoformação óssea. Diversas propriedades são necessárias a estes substitutos, tais como: bioatividade, osteocondução, osteocondução, osteoindução, biocompatibilidade e biodegradação. Adicionalmente, devem ter custos acessíveis e serem facilmente produzidos, moldados e estocados (Burg *et al.*, 2000; Pilliar *et al.*, 2001).

Diante de seguidos desafios na obtenção de reparação óssea, a comunidade científica busca respostas em pesquisas relevantes, no sentido de conseguir a formação de tecido ósseo bem estruturado, para promover estabilidade das estruturas bucais e conseqüentemente desempenhar suas funções (Khan *et al.*, 2005).

Um exemplo é o trabalho de Axhausen, 1956, que avaliou histologicamente a reparação óssea em animais e Partiff, 1962, que estudou as variações do trabeculado do osso alveolar normal. O tecido ósseo apresenta-se em um processo contínuo de remodelação, do qual depende sua reparação frente às injúrias e alterações da normalidade. Este processo ocorre com a participação de várias substâncias endógenas, como paratormônio, a vitamina A e a calcitonina. O hormônio da paratireóide tem ação sobre cálcio e fósforo e na regulação de fatores de crescimento que atuam diretamente em osteoclastos e osteoblastos (McCauley & Somerman, 1998).

Inúmeros estudos deixaram de focar os aspectos morfológicos da reparação tecidual, passando a enfatizar a pesquisa dos fatores humorais que possam influenciar a cronologia e a intensidade do processo de reparação.

Esses estudos destacaram, entre outros fatores, a ação das plaquetas ou trombócitos. Enneking & Morris (1972) usaram de enxertos ósseos autógenos para aumento, substituição e reparo ósseo, entretanto observaram a necessidade de uma segunda cirurgia à distância do leito receptor.

Albrektsson *et al.* (1980) concluíram que a osteogênese é raramente observada em enxertos que demoram mais de dez dias para se revascularizarem, sendo que a osteogênese inicia-se na interface entre enxerto e o leito receptor.

Wilson & Mervin (1988) afirmaram que a recuperação após o enxerto é obtida havendo uma variável reabsorção e imprevisível formação óssea.

Masters (1988) afirmou que o osso autógeno parecia primeiro agir como material de preenchimento, enquanto prossegue o ciclo osteoclástico. Segue-se essa fase a ação dos osteoblastos que iniciam o processo de formação de novo tecido ósseo.

Boyne (1991) postulava que o material ideal para enxertia deveria existir em quantidade de suprimento, sem necessidade de violação a distância do local; prover osteogênese imediata para rápida consolidação; não provocar reação imune; facilitar a revascularização para recuperação rápida e resistência à infecção; estimular a osteoindução e osteocondução, conforme o caso; ser adaptável às exigências físicas e resistir ao deslocamento e não impedir o crescimento dental ou movimento ortodôntico.

Misch *et al.* (1992) utilizaram de enxerto autógeno da sínfise mandibular para reconstrução de defeitos alveolares maxilares e colocação de implantes.

Buser *et al.* em 1995 observara evidências histológicas que implantes colocados em osso regenerado atingem e mantêm a osteointegração, e que o osso regenerado responde ao implante da mesma forma que o osso original.

Raghoobar *et al.* (1996) estudaram a correção de defeitos ósseos com osso autógeno na região anterior da maxila antes da inserção do implante e concluíram que o uso de enxerto de osso mandibular apresenta menor reabsorção, quando comparado com enxertos da crista ilíaca, tíbia e costela.

Wallace *et al.* (1996) avaliaram exames histológicos seriados em um paciente e observaram uma lenta formação óssea em enxertos xenógenos

compostos de uma mistura de matriz bovina inorgânica(80%) e osso autógeno(20%), em sinus lift. Doze a vinte meses de cura, para reabsorver e remodelar o osso vital.

Manso & Lang (1997) descreveram com clareza as fases osteogênicas da reparação em enxertos autógenos em que destaca dois importantes tempos:

Fase I: Há a proliferação e diferenciação das células enxertadas com deposição de tecido osteóide e produção de trabeculado composto. Nessa fase, acontece a revascularização do osso enxertado por angiogênese periférica.

Fase II: Há o predomínio da diferenciação das células mesenquimais do leito receptor em osteoblastos (Osteoindução). Essa fase torna-se dominante durante as próximas 4 a 5 semanas após o transplante. Ainda na fase II, os osteoclastos derivados dos monócitos circulantes começam a aparecer no osso enxertado, promovendo reabsorção, que, juntamente com aposições, formam, de acordo com os autores, o fenômeno conhecido como “substituição aposicional”.

Carvalho *et al* (2000) consideraram necessário, entre os procedimentos, o preparo prévio da área receptora; nesse estudo foram utilizados os tipos de leito receptor perfurado, decorticado e cortical, este último não necessitando de preparo prévio. Constatou-se que o enxerto autógeno apresentava-se integrado principalmente nos grupos perfurado e decorticado. Os resultados menos favoráveis foram observados no grupo cortical, no qual ocorreu com maior frequência, interposição de tecido conjuntivo e reabsorção parcial do enxerto.

2.3. EFEITO DA RADIAÇÃO NO TECIDO ÓSSEO.

No final do século XIX alguns fatos importantes na história das radiações ionizantes ocorreram. A descoberta dos raios X por Wilhem Conrad Röntgen em 1895, constatação da radioatividade natural do urânio por Henri Becquerel

em 1896, a separação do polônio e do rádio por Pierre e Marie Cuyrie em 1898. A partir dessas descobertas a radiação ionizante passou a ser amplamente utilizada na indústria e na medicina, com finalidade de pesquisa, diagnóstico e tratamento de doenças oncológicas.

As radiações podem ser classificadas do ponto de vista físico e biológico. Do ponto de vista físico são classificadas em corpusculares e eletromagnéticas, sendo as corpusculares com massa (elétrons, prótons e nêutrons) e as eletromagnéticas são ondas com diferentes comprimentos e velocidade igual a da luz. Para fins biológicos as radiações são classificadas em não-ionizantes e ionizantes. As não-ionizantes são aquelas que não possuem energia suficiente para realizar ionização de átomos biologicamente importantes. As radiações ionizantes fazem com que elétrons sejam ejetados da órbita do átomo. Pequena parte da energia das radiações ionizantes é gasta com excitação, quando os elétrons apenas mudam de órbita no átomo. Importante propriedade física destes agentes, que interferem no efeito biológico, é a transferência linear de energia (LET), que é a taxa de energia liberada pela radiação por unidade de caminho percorrido. A densidade de ionização produzida num dado meio depende da massa, velocidade e carga.

Existe diferença na resposta radiobiológica entre tecido normal e o tumoral bem como entre os diferentes tecidos normais, do ponto de vista de lesão. A resposta está relacionada com a capacidade da célula reparar ou não as lesões radioinduzidas. Os tecidos de resposta rápida são aqueles que apresentam as manifestações clínicas de lesão em curto período de tempo depois da radiação. São exemplos de tecidos de resposta rápida: pele, mucosas, tecido hematopoiético, tecido linfóide, aparelho digestivo, ovário, e certos tumores. Associa-se a resposta rápida destes tecidos à alta atividade mitótica (fase bastante radiosensível do ciclo celular) e a grande suscetibilidade a apoptose (mecanismo de morte celular ativo, em oposição a mitose). Os tecidos de resposta lenta são aqueles que apresentam suas alterações em tempo mais prolongado após irradiação. São eles os tecidos: ósseo, conjuntivo, muscular e nervoso, que possuem baixa atividade proliferativa. Associa-se a resposta lenta à morte clonogênica (perda da

capacidade de divisão celular) das células e a menor suscetibilidade a apoptose (Williams & Davies, 2006).

Os efeitos deletérios dos raios-X no tecido ósseo tem sido mostrado por séculos e continua sendo visto nos dias atuais por causa da melhor sobrevivência dos pacientes tratados de tumores malignos com radioterapia, com ou sem outros tratamentos (Williams & Davies, 2006).

A irradiação nos tecidos pode causar morte celular imediata ou lenta, injúria celular, aumento da divisão celular e reparação anormal com neoplasia. A radiação afeta o esqueleto jovem interferindo com a condrogênese e a reabsorção da cartilagem calcificada e no crescimento da placa óssea. No esqueleto maduro os efeitos estão nos osteoblastos, primariamente resultando na diminuição da formação de matriz óssea (Probert & Parker, 1975; Howland *et al.*, 1975; Ergun & Howland, 1980).

Perthes em 1903 foi o primeiro a descrever os efeitos da radiação no crescimento ósseo. Ele mostrou que o crescimento das asas de galinha foi inibido depois da exposição aos raios-X. Os efeitos nos seres humanos foram inicialmente mostrados na literatura médica alemã em 1929 e posteriormente nos Estados Unidos. Os condrócitos da placa de crescimento epifiseal são os mais radiosensíveis ao longo do osso imaturo. Microscopicamente, as mudanças no crescimento da camada de condrócitos podem ser vistas com doses de radiação menores que 300 cGy e o retardamento do crescimento pode ocorrer com doses acima de 400 cGy (Dawson, 1968).

Os efeitos da radiação no osso maduro podem variar de acordo com a dose, com a variação na fração e no feixe de energia. A irradiação causa prejuízo aos osteoblastos resultando na diminuição da produção de matriz óssea e reabsorção pelos osteoclastos. Os osteoblastos podem ser mortos, tanto imediatamente quanto posteriormente à radiação, ou a divisão celular ser afetada.

A interação da radiação ionizante com os eventos biológicos ocorre em quatro estágios, produzindo um largo efeito no produto final. Esses estágios são: Estágio físico; físico-químico, químico e biológico (Marx & Johnson, 1987).

Acredita-se que estas mudanças podem ser causadas com doses de 3.000 cGy e a morte celular ocorrer com 5.000 cGy. As mudanças ósseas podem levar de uma osteopenia até uma osteoradionecrose. Radiograficamente a aparência osteopênica ocorre aproximadamente 1 ano após a radiação (Howland, 1975).

As mudanças ósseas induzidas pela radiação podem afetar o crânio e a mandíbula de maneira mista envolvendo tanto padrões de lise óssea quanto de esclerose óssea. Isto está relacionado ao epicentro da radiação portal (feixe de radiação) e se estende para fora de suas margens (Camp & Moreton, 1945).

A mandíbula é particularmente mais vulnerável por causa da pobre quantidade de vasos sanguíneos na região cortical ou superficial. Esta região exposta a altas doses de radiação no tratamento de tumores de cabeça e pescoço induzem mudanças no tecido ósseo em apenas um ano de tratamento. Isto é mais comum quando o tumor estiver adjacente ou envolvido pelo tecido ósseo. No entanto, a osteíte asséptica simples da mandíbula é geralmente de pouca repercussão. Infecção supurativa da mandíbula é mais comum em pacientes com má higiene oral e cáries dentárias. A dor é comum em infecção secundária, juntamente com ulcerações e celulite sobrejacente aos tecidos moles, hemorragia e perda de peso. Radiograficamente aparecem tipicamente com contornos mal definidos devido a lesão destrutiva sem seqüestros ósseos. Destruição da cortical e fraturas patológicas ocorrem com frequência. As características clínicas e radiográficas não permitem distinguir a recorrência tumoral, e este último também ocorre com frequência dentro de um ano de tratamento.

Ausência de recobrimento por tecido mole pode indicar mudança pela radiação. Esta condição pode progredir, e exige um tratamento conservador ou cirurgias se necessário (Dalinka & Haygood, 2002).

Essa necrose é de difícil controle e costuma atingir a mandíbula mais comumente do que a maxila, por ser irrigada apenas por uma grande artéria e também por ser um osso mais compacto e com menos canais nutrientes. Em determinadas situações evolui para osteomielite, determinando ressecção óssea. Dessa forma, considerando que o manejo clínico da osteoradionecrose

é bastante difícil, com grande sofrimento e sacrifício para os pacientes, a equipe de atendimento deve cercar-se de todos os cuidados no intuito de preveni-la. Implantes em tecidos irradiados podem prover meios de melhorar a reabilitação protética e, ao mesmo tempo, reduzir os riscos de trauma tecidual, que poderia desenvolver osteorradionecrose (Arcuri *et al.*, 1997).

A contribuição da radiação na injúria vascular desenvolvendo osteíte ou osteorradionecrose é desconhecida. A Radiação reduz a vascularidade óssea com endoarterite e periarterite obliterativa. Alguns estudos apresentam nenhum efeito significativo nos vasos sanguíneos endósseos após altas doses de radiação. Porém a maioria dos autores acredita que as mudanças descritas resultam da combinação dos efeitos radioativos nos osteoblastos complicado pelas alterações vasculares tardias (Dalinka & Mazzeo, 1985).

A relação entre irradiação e osseointegração vem sendo amplamente investigada na última década. A irradiação reduz a neovascularização e prejudica a reprodução celular (Amsel & Dell, 1972). As injúrias da radioterapia aos tecidos são cumulativas, progressivas e irreversíveis (Triplett *et al.*, 2000).

As taxas de sucesso dos implantes estão abaixo dos números observados em osso não irradiado. Essa diferença se deve, provavelmente, à redução da vascularização e quantidade celular do osso irradiado (Marx & Morales, 1998).

Clinicamente, o efeito mais adverso da radioterapia na cavidade oral é o desenvolvimento e a persistência da xerostomia, determinando o aumento da viscosidade e decréscimo da produção de saliva (Arcuri *et al.*, 1997), eliminando ou reduzindo consideravelmente o biofilme salivar, que é pré-requisito para retenção e conforto na utilização de próteses totais e próteses parciais removíveis (Curtis *et al.*, 1976).

O decréscimo no fluxo salivar pode ser associado ao aumento dos índices de cáries dentais, devido à perda da capacidade tampão e de lubrificação da saliva, decréscimo na higiene oral devido ao desconforto tecidual, e outros fatores, de tal forma que próteses fixas convencionais terão prognóstico ruim se comparadas com a população que não demonstra este decréscimo (Buemer *et al.*, 1979; Del Regato, 1939; Masella *et al.*, 1972).

Pacientes experimentam um aumento na susceptibilidade ao rompimento dos tecidos após pequenos traumas causados pelas próteses dentais (Curtis *et al.*, 1976). Estes traumas sobre a mucosa oral podem levar a osteorradioneecrose, condição mórbida e crônica que ocorre devido aos efeitos teciduais da radiação, que determinam uma diminuição no aporte sangüíneo da mucosa e do osso subjacente, tornando-os hipovascularizados e hipóxicos (Ecker *et al.*, 1996), que poderá resultar em grandes exposições e desvitalizações ósseas e fraturas patológicas (Triplett *et al.*, 2000).

Takahashi *et al.* (1994), avaliaram os efeitos da radioterapia intra-operatória na cicatrização óssea em relação à diferentes doses e intervalos pós radioterapia. Neste estudo os autores fizeram osteotomias bilaterais na fíbula de 56 coelhos imediatamente, após 13 semanas ou 39 semanas após radioterapia intra-operatória unilateral usando, em 21 coelhos a dose de 25 Gy, em outros 21 coelhos a dose de 50 Gy, e em 14 coelhos a dose de 100 Gy, sendo todos em doses únicas. A cicatrização das fíbulas foi evoluída radiograficamente e histologicamente 13 semanas após a osteotomia. Observaram que a habilidade de cicatrização óssea foi irreversivelmente reduzida em todas as fíbulas irradiadas e estes prejuízos ocorreram de maneira dose dependente. A severidade da injúria também tendia a melhorar com o intervalo de tempo entre a radiação e a osteotomia. Este agravamento nos intervalos relacionados estava caracterizado pelo aumento da perda óssea nas extremidades das osteotomias e pela atrofia óssea nas áreas vizinhas.

Está bem descrito que os efeitos em detrimento da radiação ionizante na regeneração óssea de uma fratura, inclui a diminuição do número de osteócitos, supressão da atividade osteoblástica, e diminuição da vascularidade. Contudo o mecanismo biológico da osteorradioneecrose e da precária reparação óssea do osso irradiado, ainda permanece indefinido. A radiação ionizante pode diminuir o sucesso do reparo ósseo pela alteração da expressão de citocina resultante de uma mudança no estado de diferenciação dos osteoblastos. Estas mudanças podem, em parte, levar a alterações na proliferação osteoblástica e na formação da matriz extra celular. Matthew *et al* em 2005, propuseram investigar os efeitos da radiação ionizante na proliferação, maturação e na produção de citocina do osteoblasto MC3T3-E1

em células em vitro. Foram feitas avaliações nas dosagens de 0, 40, 400 e 800 cGy, na expressão do fator de transformação de crescimento $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), e fosfatase alcalina. Observaram que a radiação ionizante resultou em uma diminuição dose dependente na proliferação celular e na promoção da diferenciação celular. Adicionalmente a radiação causou diminuição dose dependente no total de TGF- $\beta 1$ e VEGF. (Matthew *et al.*, 2005)

Eisenschenk *et al.* (2006) propuseram um modelo de estudo para observar o impacto da radioterapia na cicatrização e nas propriedades biomecânicas de enxertos ósseos vascularizados. Para isso dividiram uma amostra de 10 cães *beagles* em dois grupos, radiados (R) e controle (C). As 5ª e 7ª costelas esquerdas dos animais do grupo R foram irradiadas 3 e 2 semanas antes da cirurgia, usando uma dose de 8 Gy em cada tempo. Cada animal de ambos os grupos sofreu as seguintes intervenções cirúrgicas: as 5ª e 7ª costelas foram removidas, e a 5ª costela foi substituída por um enxerto vascularizado pediculado retirado da 4ª costela. A 7ª costela foi reconstruída usando um pedículo transplantado da 8ª costela. As 5ª e 7ª costelas foram usadas como enxertos ósseos não vascularizados substituindo os sítios doadores nas 4ª e 8ª costelas, respectivamente. O grupo R (radiado) recebeu outros dois ciclos de radiação, duas e três semanas no pós-cirúrgico. Deste modo obtiveram uma dose acumulativa de 32 Gy no leito das feridas e de 16 Gy nos enxertos ósseos vascularizados de costelas. Os enxertos de costela vascularizados do grupo R demonstraram um alto número de atrasos nas uniões ósseas observadas radiograficamente e de segmentos ósseos avasculares observados na microangiografia, do que no grupo controle. A presença de osteócitos vitais não foi significativamente diferente na análise histológica entre os grupos. Os testes biomecânicos focando a durabilidade das costelas vascularizadas contra as forças de tensão e torção, mostraram uma redução média nos momentos de máxima tensão de 56,6% após a radiação comparados com os do grupo controle. A resistência à torção foi reduzida em 47,6%. Os dados mostram uma significativa piora na cicatrização óssea e na estabilidade, após radioterapia tanto no pré quanto no pós-operatório, observados nos leitos das feridas e nos enxertos ósseos.

2.4. PLASMA RICO EM PLAQUETAS

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um volume de plasma autógeno que tem uma concentração de plaquetas acima do normal. As plaquetas são corpúsculos anucleados, com citoplasma complexo, muito rico em glicosaminoglicanas, glicoproteínas e fosfolipídeos, essenciais nas funções de adesividade e agregação plaquetária (Santos & Santos, 2004). Para ser considerado um verdadeiro PRP deve apresentar 1.000.000 de plaquetas/ μ L na concentração de 5 mL de volume de plasma (Marx, 2001a). O PRP representa somente 20% da fração de plasma total (Marx, 2000), oriundo do processamento laboratorial de sangue autógeno, colhido no período pré-operatório e rico em FCs (Lenharo & Mendonça, 2002; Tischler, 2002).

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos dos megacariócitos, anucleados, discóides, de dois a cinco micrômetros de diâmetro, com citoplasma complexo e limites externos irregulares ou disformes, com presença de mucopolissacarídeos, glicoproteínas e fosfolipídeos e que apresentam um período de vida no sangue de sete a dez dias (Harker & Finch, 1969).

No mecanismo trombodinâmico da coagulação as plaquetas participam ativamente, emitindo pseudópodos que proporcionam a adesividade interplaquetária e conseqüente formação do trombo plaquetário. Com a formação do coágulo propriamente dito, desenvolve-se uma rede de fibrina que proporciona um receptáculo favorável para a migração celular no processo de reparação tecidual (Ruggeri, 1997). As plaquetas, entretanto, também atuam por meio da liberação de mediadores químicos que participam do processo inflamatório e da reparação tecidual. O estudo de Gray e Elves, 1982 propiciou um avanço muito grande no que diz respeito à aplicação de fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF), quando apresentaram em seus resultados que o PDGF contribuía para a angiogênese necessária ao sucesso dos enxertos ósseos. Hoje em dia, sabe-se que os fatores de crescimento no processo de reparação tecidual exercem papel fundamental e efetivo na proliferação celular, angiogênese, diferenciação e síntese de matriz extracelular, bem como na quimiotaxia (AAP, 1996).

O uso do plasma rico em plaquetas tem sido demonstrado em estudos com animais e humanos com resultados favoráveis (Marx *et al.*, 1998).

O sucesso da terapêutica com PRP parece depender da quantidade de fatores de crescimento (PDGF e TGF- β) liberados dentro da ferida e a concentração de fatores de crescimento parecem estar relacionada com a quantidade de plaquetas e leucócitos obtidas no PRP (Weibrich *et al.*, 2002).

Aghaloo *et al.* (2004) em estudo experimental em crânio de coelhos, avaliaram o comportamento da neoformação óssea, com uso de osso autógeno, osso heterógeno (Bio-Oss), osso heterógeno com PRP e controle (mantido com coágulo sangüíneo). Foram utilizados quatro grupos com cinco animais em cada um, com quatro defeitos ósseos de 8,0 mm de diâmetro criados no crânio de cada animal. Os períodos de sacrifício foram de 1, 2 e 4 meses. Obtiveram os seguintes resultados em avaliação radiográfica: Bio-Oss, osso autógeno, e Bio-Oss + PRP mostraram um aumento significativo em densidade óssea em todos os períodos pós-operatórios. Pela avaliação histomorfométrica, o grupo tratado com osso autógeno e o grupo tratado com Bio-Oss+PRP mostraram um aumento significativo na neoformação óssea quando comparados aos grupos de tratamento com Bio-Oss e controle. Os autores concluíram que o uso de Bio-Oss associado ao PRP pode promover bons resultados.

Simion & Fontana (2004) em estudo experimental com 50 ratos Wistar, avaliaram a ação do PRP ao redor de implantes laminares em tíbias direitas, sendo as do lado esquerdo utilizadas como controle. Na análise histométrica foram encontrados resultados favoráveis para o grupo teste (30 ± 7 cm²) em comparação ao grupo controle (16 ± 3 cm²), para a neoformação óssea.

Weibrich *et al.* (2004) em estudo experimental com vinte coelhos (New Zeland), analisaram o efeito do PRP em reparação de tecido ósseo ao redor de implantes. Para obtenção do PRP foi utilizado o sistema de coleção concentrada de plaquetas (PCCS - 3i, Miami, EUA). Foi instalado um implante

(Bränemark MK III Ti Unite) por fêmur de coelho, sendo um lado testado com PRP e o outro sem PRP. No primeiro, sétimo, décimo quarto e vigésimo primeiro dias foram administrados três tipos de marcadores celulares para realização da análise histomorfológica. Comparando-se a reparação óssea nos implantes após 28 dias, a única diferença significativa foi vista com concentrações de plaquetas de valores intermediários entre 9.503.000/1.729.000 plaquetas/ μ L PRP. Não houve nenhuma diferença no percentual de células da área de contato osso/implante entre o teste e o controle nos três grupos. Dessa forma, os autores concluíram que a concentração de plaquetas requerida para que o PRP atue sobre a reparação óssea apresenta limites estreitos. Efeitos biológicos vantajosos parecem ocorrer quando o PRP é padronizado para uma concentração de plaquetas de aproximadamente 1.000.000/ μ L. Em concentrações inferiores, o efeito é menos eficaz, enquanto concentrações mais altas poderiam ter um efeito inibitório. O PRP não produziu um efeito benéfico do ponto de vista da aceleração da osseointegração dos implantes instalados.

3. PROPOSIÇÃO:

O objetivo deste estudo foi avaliar histomorfometricamente o reparo ósseo em cavidades produzidas cirurgicamente na tíbia de coelhos previamente irradiadas, e preenchidas ou não com PRP associado a enxerto ósseo autógeno.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. Animais

Neste estudo foram utilizados 12 coelhos albinos, fêmeas, da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*), com peso médio de 3,5 Kg e aproximadamente 5 meses de idade. Os animais foram mantidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia – UFU, em gaiolas individuais para cunicultura e tratados com ração e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com aprovação do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA-UFU) (Anexo-I).

Os animais foram separados em dois grupos com 6 animais cada um: Irradiado e controle. O grupo irradiado recebeu dose única de 15Gy (Kudo, 2001) na região da tíbia, bilateralmente. Para irradiação a distância foco/pele foi de 80 cm com o rendimento do aparelho a 110,73 cGy/min, sendo todo o processo realizado em sala baritada do Hospital do Câncer (HC – UFU), com toda a estrutura para evitar a contaminação das pessoas envolvidas. O método utilizado foi a teleterapia com bomba de cobalto-60 (AECL MEDICAL, Modelo Phoenix, Kanata, Ontario, Canada) (Quadro-1).

Após 45 dias, cada grupo foi submetido à cirurgia para confecção de uma cavidade cirúrgica em cada tíbia, preenchidas, na tíbia direita, com PRP associado ao osso autógeno particulado. Na tíbia esquerda, a cavidade foi preenchida com o osso autógeno particulado.

Quadro 1. Esquema da divisão dos grupos e subgrupos.

	Enxerto com PRP (perna direita)	Enxerto sem PRP (perna esquerda)
Irradiado (n=6)	Grupo I	Grupo I a
*Controle (n=6)	Grupo II	Grupo II a

*Controle (coelhos não irradiados)

4.2. Técnica cirúrgica

Todos os doze animais foram submetidos à tricotomia 24 horas antes da cirurgia nas 2 pernas dorsalmente e medialmente. Antibiótico-profilaxia foi feita com 1 ml de enrofloxacina a 2,5% 30 minutos antes do início da cirurgia.

Cada animal foi sedado por via intramuscular com 3 a 4 ml de uma solução contendo 1,2 ml de xilazina a 2%, 1,2ml de Acepran 0,2% (Laboratório Univet, Uerlândia Brasil), 0,2 ml de Cloridrato de quetamina a 5% e 0,2ml de midazolam 7,5 mg . Metade da dose foi repetida em alguns animais quando necessário.

Após a sedação, os animais passaram por antissepsia local com P.V.P.I. (Polivinil pirrolidona) com iodo a 10% e as áreas a serem operadas (pernas) isoladas com campos estéreis. Após infiltração local com lidocaína a 2% com adrenalina 1: 200.000, a pele e tecidos subcutâneos foram incisados nas pernas em uma extensão de aproximadamente 2 cm, na região dorso-medial superior da tíbia (Figura 1).

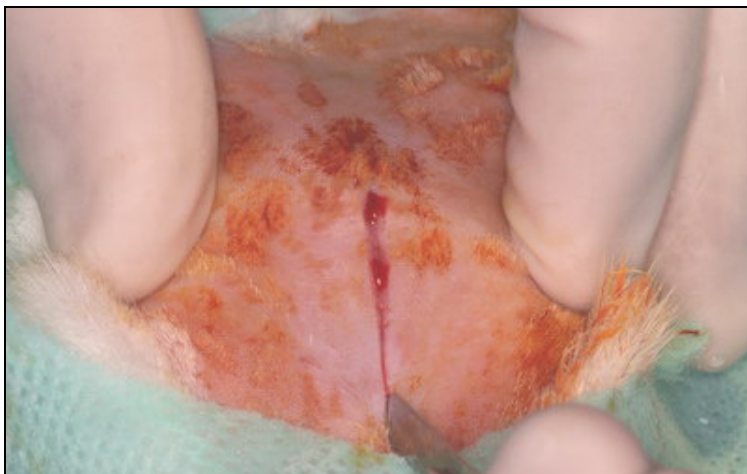


Figura 1. Incisão na linha média.

O periósteo que recobre a tíbia foi incisado, descolado e rebatido lateralmente (Figura 2), tendo como referência o tubérculo tibial, para possibilitar a confecção de uma cavidade cirúrgica em cada tíbia, com trefina de diâmetro externo de 5mm (Figura 3), com uma profundidade de aproximadamente 4 mm.

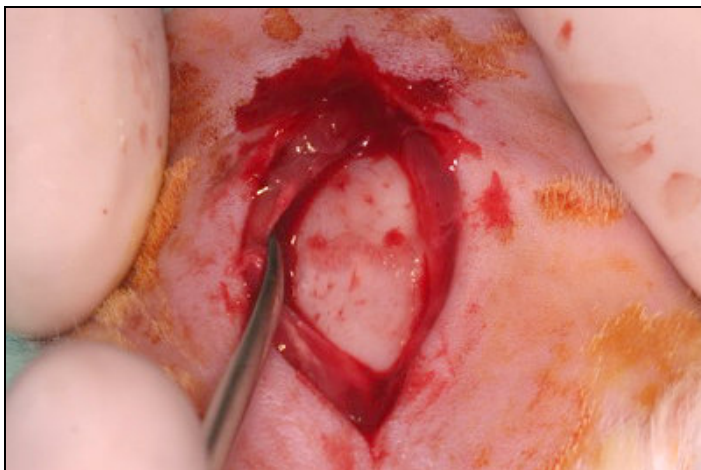


Figura 2. Exposição do osso da tíbia.



Figura 3. Remoção do fragmento com broca trefina de 5 mm.

O padrão para todos coelhos de ambos os grupos foi a cavidade da tíbia direita sempre preenchida com coágulo de PRP associado ao enxerto ósseo autógeno (Figura 4) e a da tíbia esquerda sempre preenchidas com coágulo de sangue total com enxerto de osso autógeno (Figura 5).

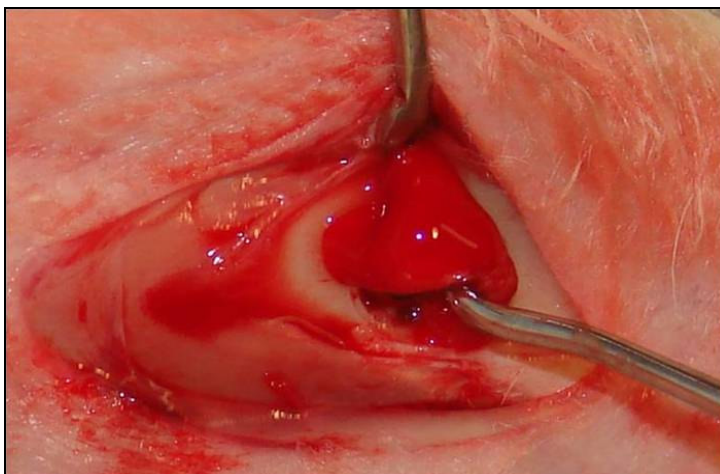


Figura 4. Colocação do enxerto com PRP.

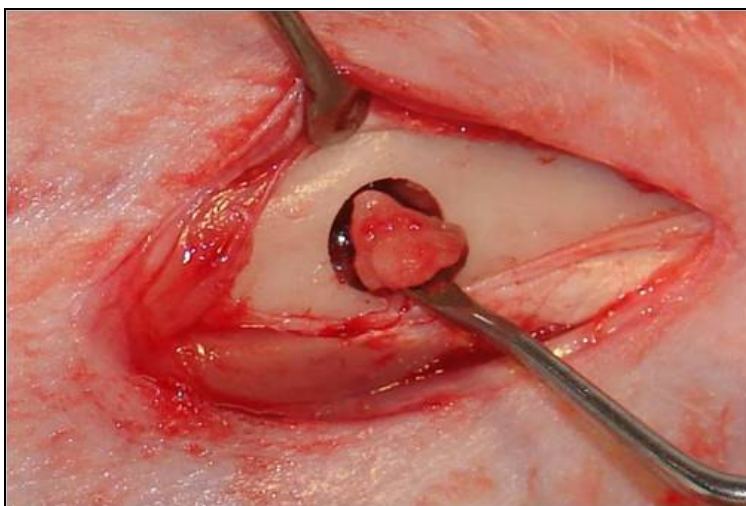


Figura 5. Colocação do enxerto sem PRP.

Os enxertos ósseos foram obtidos pela particulação das corticais ósseas removidas durante a perfuração, por meio de um particulador ósseo manual de aço inox de ponta temperada (Dentoflex) sendo 2 fragmentos corticais de igual diâmetro e espessura aproximada para cada cavidade a ser preenchida.

Foi realizado sutura por planos com fio de Nylon 5-0 (Figura 6). Sendo o último plano (pele) fechado com sutura contínua simples.



Figura 6. Sutura do plano muscular.

Após a cirurgia mantivemos antibioticoterapia com enrofloxacina a 2,5% por 7 dias.

4.3. Obtenção do plasma rico em plaquetas

O plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido através do protocolo de obtenção do PRP da UFSC segundo Gasperini (2003). Através de um escalpe à vácuo foi feita a punção na artéria auricular média, obtendo 10 mL de sangue em um tubo vacuotainer com anticoagulante (citrato de sódio). Os tubos foram submetidos a uma centrifugação de 10 minutos a 236G em centrífuga (Excelsa - modelo 206-BL-Fanem). Ocorreu uma divisão dos elementos constituintes do sangue em duas partes, uma superior de cor amarelada (plasma) e outra inferior de cor vermelha (eritrócitos). Todo o plasma e 2 mm da porção mais superficial da zona vermelha foram pipetados e acondicionados em tubos de ensaio estéreis. Estes tubos foram submetidos a uma segunda centrifugação de 10 minutos a 236G. Em seguida, removeu-se 80% da parte superior do plasma correspondente ao plasma pobre em plaquetas, que foi dispensado e os 20% restante, corresponde ao PRP, foram adicionados ao osso autógeno particulado.

Para a obtenção do gel de PRP foi adicionado ao mesmo solução de cloreto de cálcio a 10%.

4.4. Sacrifício

Todos os animais foram eutanasiados após 30 dias da cirurgia utilizando-se injeção intravenosa de aproximadamente 5ml de thiopental seguido por infusão também intravenosa de 10 ml de solução de cloreto de potássio a 19,1%, tendo suas tíbias removidas e seccionadas a 1cm de cada cavidade óssea, sendo estes fragmentos submetidos ao preparo para avaliação histológica.

4.5. Histomorfometria

Os fragmentos ósseos contendo os defeitos cirúrgicos foram embebidos para fixação em formol a 10% durante 48 horas e depois submetidos a descalcificação em EDTA durante aproximadamente 100 dias, após os quais foram cortados e incluídos em parafina pela técnica convencional. As peças foram orientadas durante a inclusão de forma que o centro da lesão ficasse voltada para a face de corte do bloco (Figura 7).

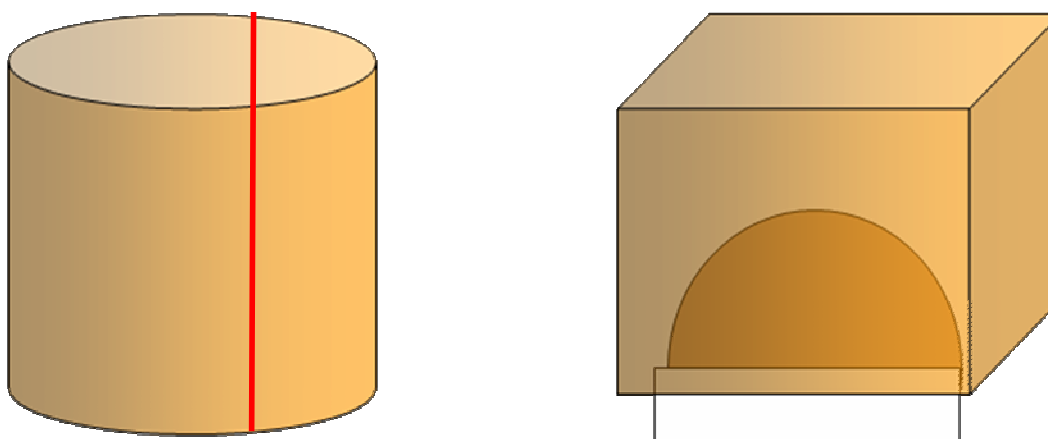


Figura 7. Desenho ilustrando a orientação da peça (Tíbia) durante a inclusão em parafina

Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo (360 x 360 - 69k) e obteve-se cortes com espessura de 5 µm, sendo estes corados em Tricômico de Mallory e Hematoxilina e Eosina.

De cada bloco obteve-se 09 cortes semi-seriados, dos quais, 3 foram analisados. Foram obtidas imagens histológicas da área da lesão, que foram capturadas com lente objetiva com aumento original de 4X utilizando microscópio binocular Olympus BX 40 acoplado a câmera Olympus OLY 200 ligada a computador PC através da placa digitalizadora Data Translation 3153, utilizando-se do programa HL Image 97++ (Figura 8). De cada corte histológico foram capturados 2 campos (Figura 9), tendo-se como referência as bordas da lesão. Estas imagens foram editadas no programa Jasc Paint Shop Pro 8 (Figura 10), onde subtraía-se as partes que não correspondiam ao tecido ósseo, tais como tecido mole e tecido cartilaginoso, e posteriormente passava-se esta imagem para escala de cinza (Figura 11).

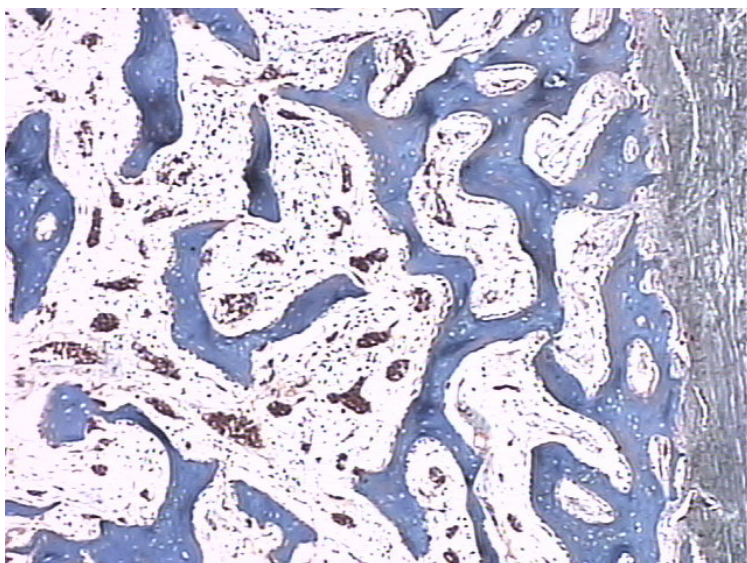


Figura 8. Imagem histológica digitalizada. Tricômico de Mallory 4X.

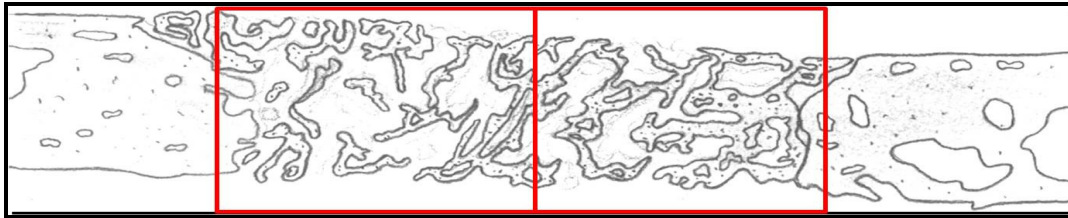


Figura 9. Imagem esquematizando a captura das imagens no microscópio nas duas margens.

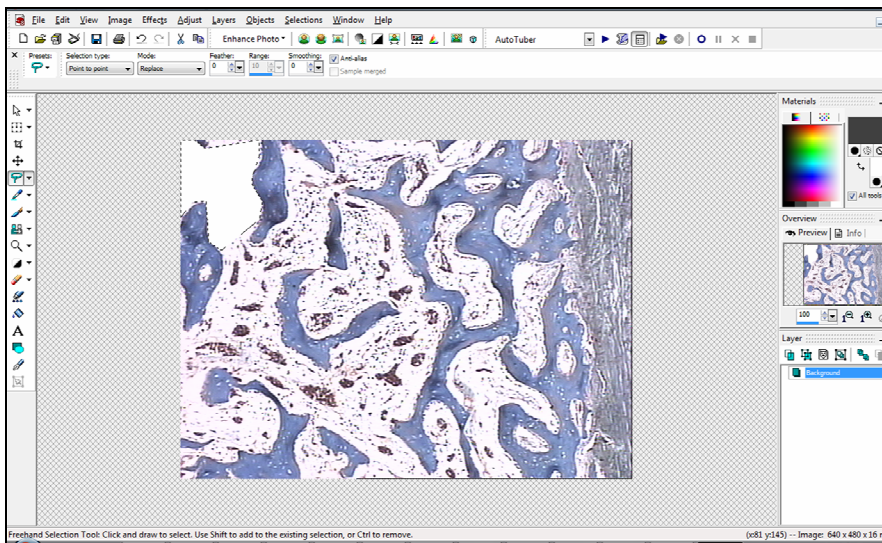


Figura 10. Utilização do programa Jasc Paint Shop Pro 8 para segmentação e transformação em escala de cinza.

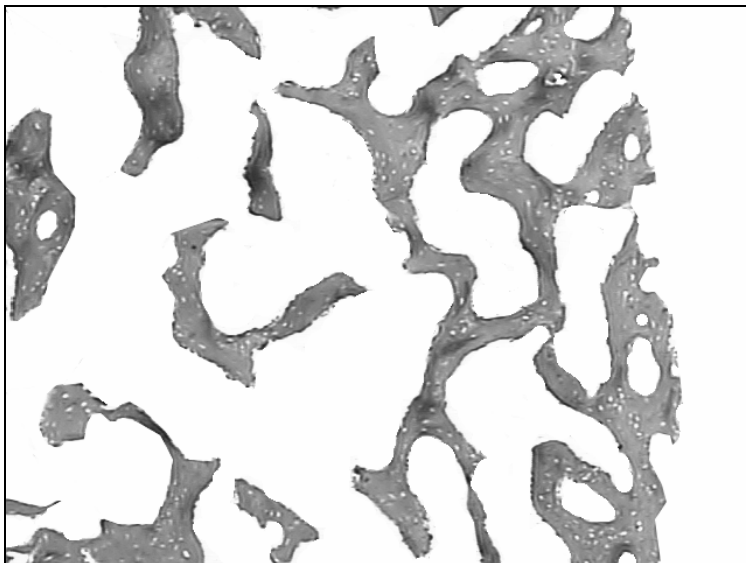


Figura 11. Imagem segmentada e em escala de cinza.

Estas imagens foram transformadas em imagens binárias utilizando ambiente de programação SCILAB, nas quais as regiões de matriz óssea mostravam-se negras e as outras regiões mostravam-se brancas. As regiões brancas foram denominadas Regiões de Interesse (ROI) e foram analisadas por meio de algoritmos desenvolvidos em ambiente de programação SCILAB, conforme preconizado por Oliveira *et al.* (2006), obtendo-se a porcentagem de matriz óssea por área.

4.6. Análise Estatística

A análise da distribuição dos dados foi feita por meio do software BioEstat® 5.0 utilizando o teste Kolmogorov-Smirnov e a análise estatística foi realizada utilizando o Teste t de Student pareado e não pareado (Anexo II).

Tabela 1. Valores em porcentagem da área de matriz óssea por animal, média (μ) e desvio padrão (SD).

	<i>Não Irradiado com PRP</i>	<i>Não Irradiado sem PRP</i>	<i>Irradiado com PRP</i>	<i>Irradiado sem PRP</i>
<i>Dados</i>	40,195	42,117	24,091	29,899
	56,347	48,801	51,971	55,741
	42,365	45,293	32,903	26,904
	38,989	39,559	43,651	52,3
	45,268	35,672	40,563	33,684
	37,411	46,908	39,689	34,721
Média (μ)	43,4^c	43,1^d	38,8^a	38,9^b
Desvio-padrão (SD)	6,9	4,9	9,5	12,1
Menor valor	37,411	35,672	24,091	26,904
Maior valor	56,347	48,801	51,971	55,741

Não foram observadas diferenças estatísticas nas comparações: a x b (p= 0,9921); c x d (p= 0,9167); a x c (p= 0,3582) e b x d (p= 0,4509).

5. RESULTADOS

A análise histológica dos grupos irradiados e não irradiados mostrou a região da lesão preenchida por tecido ósseo neoformado (Figura 12 e 13), com presença de poucas partículas de enxerto associadas. O tecido ósseo apresentou arranjo trabecular, delimitando pequenas cavidades com tecido medular em organização, bastante vascularizado. As trabéculas ósseas eram constituídas de tecido ósseo primário, mostrando algumas regiões de neoformação por ossificação endocondral (Figura 14). Notou-se também a presença de osteoclastos reabsorvendo fragmentos de osso enxertado (Figura 15). A análise estatística não mostrou diferença significativa na área de matriz entre os subgrupos controle e teste, tanto no grupo irradiado quanto no grupo não irradiado. Também não foi observada diferença entre os subgrupos equivalentes dos grupos irradiado e não irradiado (Tabela 1) (Anexo II).

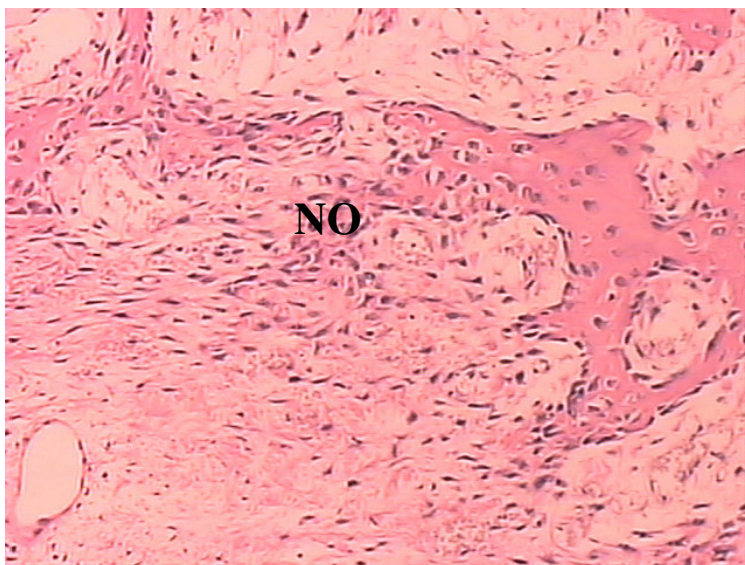


Figura 12. Fotomicrografia evidenciando região de neoformação óssea (NO). Hematoxilina – Eosina (10X).



Figura 13. Fotomicrografia mostrando região de tecido ósseo trabeculado (TC) e partícula de enxerto (E). Hematoxilina – Eosina (4X).



Figura 14. Fotomicrografia evidenciando região de neoformação óssea por ossificação endocondral (OE), condrócitos (setas). Hematoxilina– Eosina (40X).

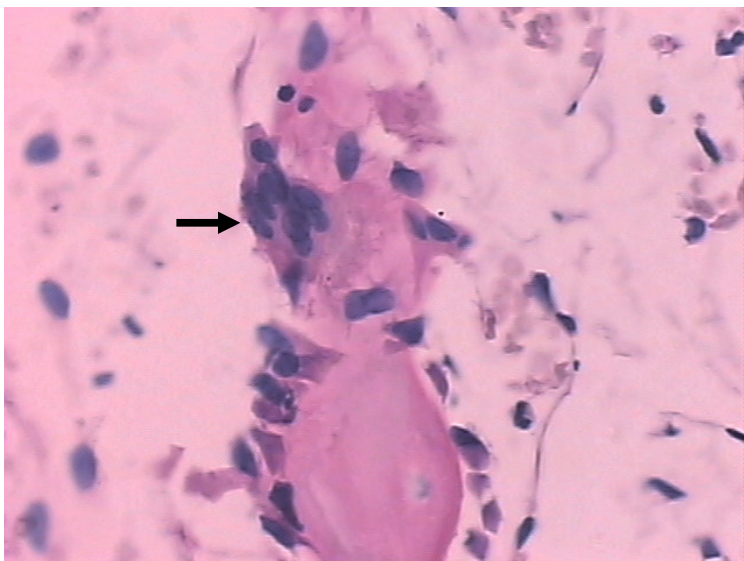


Figura 15. Fotomicrografia evidenciando osteoclasto (seta) reabsorvendo partícula do enxerto. Hematoxilina – Eosina (HE 40X).

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, o coelho foi escolhido como modelo experimental devido às semelhanças fisiológicas e metabólicas entre o tecido ósseo desse animal e o de humanos (Frame, 1980).

Durante a preparação histológica, o tecido ósseo sofre alterações relacionadas à técnica de processamento. A fixação do material em formol causa um espaço perilacunar, resultante da contração do osteócito. Segundo Marotti *et al.* (1998), a fixação do tecido ósseo não interfere substancialmente na preservação dos osteócitos. O processo de desmineralização também causa retração das células ósseas. Este fenômeno pode ser minimizado pelo uso de descalcificadores menos agressivos. Nesse estudo foi utilizado EDTA, um quelante de íons cálcio que promove descalcificação lenta. A despeito de todos os possíveis artefatos técnicos é importante considerar que o grupo controle foi submetido às mesmas condições que os grupos experimentais, sendo este estudo comparativo.

Os estudos sobre o PRP abrangem várias áreas e desde os anos 90 até a atualidade, com estudos em ressecções mandibulares realizados por Marx (1998), utilizados em alvéolos pós extração por Anitua (1999), em cirurgias plásticas realizadas por Man *et al.* (2001), em levantamentos de seios maxilares para reabilitação com implantes por Froum *et al.* (2002), na distração osteogênica de mandíbulas atroficas para colocação de implantes realizados por Robiony *et al.* (2002), na instalação de implantes imediatos associados a PRP realizados por Zechner *et al.* 2003. Todos estes estudos mostraram bons resultados no reparo ósseo com a associação de PRP.

O PRP não é carcinogênico nem mutagênico, pois atua nas membranas celulares e não no núcleo celular e promove expressão gênica normal. O uso do PRP é considerado relativamente uma nova biotecnologia na odontologia e pode atuar na engenharia tecidual e celular. O mecanismo de ação do PRP segue os seguintes passos: 1 – liberação do PDGF que promove a angiogênese e a diferenciação celular das células mesênquimais indiferenciadas nos espaços medulares, 2 – liberação de TGF- β responsável

pela maturação celular com estimulação de osteoblastos e produção de colágeno, 3 – VEGF e EGF promovem o término da maturação e consolidação da cicatrização com ativação de macrófagos. A liberação dos fatores de crescimento pode chegar até dez dias após a degranulação das plaquetas (MARX *et al.* 1998).

No entanto, os resultados de inúmeras pesquisas experimentais em animais (Zechner *et al.*, 2003; Weibrich *et al.*, 2004; Wiltfang *et al.*, 2004) apresentam resultados controversos em relação às atividades do PRP descrita anteriormente.

Autores como Lynch *et al.* (1999), Whitman *et al.* (1997), Marx *et al.* (1998), Anitua (1999), Rodriguez *et al.* (2003), Oyama *et al.* (2004) em estudos clínicos, obtiveram qualidade e quantidade de reparação óssea melhores com o uso do PRP. Dessa forma, esses autores sustentam resultados favoráveis à aplicação do PRP.

Como os resultados com o PRP ainda não são consensuais na literatura, também encontramos autores que afirmam que o uso de PRP não promove melhores resultados (Aghaloo *et al.*, 2002^a; Zechner *et al.*, 2003; Wiltfang *et al.*, 2004; Jensen *et al.*, 2004; Weibrich *et al.*, 2004).

Weibrich *et al.* (2004), salientaram um importante aspecto, que diz respeito à concentração ideal de plaquetas, pois tanto a hipo, como a hiperconcentração plaquetária pioram os resultados obtidos em relação à reparação óssea.

A contagem de plaquetas pode variar entre diferentes indivíduos, proporcionando diferentes resultados frente à utilização de uma mesma quantidade de sangue. No presente estudo, o pré-requisito para a utilização do sangue coletado na preparação do PRP seguiu a orientação de Marx *et al.* (1998), pela qual a concentração plaquetária deveria ser de aproximadamente 1.000.000 μ L/5,0 ml. É importante salientar, entretanto, que a concentração necessária pode ser espécie – específica com a contagem plaquetária ideal e a concentração de mediadores químicos resultantes ideais variando para cada espécie animal. Essa pode ser uma variável muito importante, que favorece resultados dispares quando o PRP é utilizado.

A radiação causa prejuízos aos osteoblastos, com absorção secundária da matriz óssea. Radiograficamente, o osso se apresenta osteopênico cerca de um ano após a irradiação. A radioterapia é uma importante modalidade de tratamento de uma grande variedade de neoplasmas. Complicações esqueléticas da radiação incluem alterações de crescimento ósseo, osteíte por radiação com fratura secundária e sarcomas induzidos por radiação. Em ossos longos como a tíbia, por exemplo, ocorre osteopenia assintomática seguida de radiação após um ano de terapia. A reação periosteal não está presente, uma característica que difere as mudanças relativas à radiação da recorrência do tumor. Mesmo assim a radioterapia ainda permanece como melhor opção no tratamento de pacientes oncológicos (Bluemk *et al.*, 1994).

Aghaloo *et al.*, (2006) estudaram imunohistoquimicamente osso cortical e medular de tíbia irradiada e enxerto ósseo autógeno associado a PRP em calota de coelhos (Aghaloo *et al.*, 2002a; Aghaloo *et al.*, 2002b). Dez coelhos adultos Nova Zelândia foram expostos a 65 cGy de irradiação de cobalto 60 divididas em oito frações e os animais sacrificados após quatro meses. Foram feitos defeitos bilaterais com trefinas de oito milímetros de diâmetro na calota craniana dos coelhos e neles adicionados enxerto ósseo autógeno ou enxerto ósseo autógeno associado a PRP. Observaram a diminuição da expressão de fatores de crescimento vascular PDGF, bFGF e TGF- β no osso tibial de coelho irradiado quando comparada com o grupo controle (não irradiado), e verificaram o aumento destes mesmos fatores de crescimento quando o PRP era adicionado ao enxerto ósseo autógeno.

A radioterapia é a modalidade de tratamento mais comum para tumores malignos de cabeça e pescoço. Comumente o uso do protocolo de irradiação em humanos nos Estados Unidos e ao redor do mundo, preconiza doses de 65 a 70 cGy e 52 a 70 cGy respectivamente (Grotz *et al.*, 2000). A radiação nesta dosagem tem alguns efeitos deletérios, sendo os mais relevantes a hipocelularidade, hipovascularidade e hipóxia na cicatrização do tecido mole e do tecido ósseo. Há uma diminuição documentada na cicatrização do osso após a irradiação (Wurzler *et al.*, 1998).

As mudanças nos tecidos irradiados, especificamente no osso, podem ser devidas, em parte, à diminuição dos fatores de crescimento que estão envolvidos na cicatrização da ferida (Aghaloo *et al.*, 2006).

Estudo do efeito da radiação (doses variando entre 60 a 70 Gy) em distração osteogênica para reconstrução de defeitos mandibular segmentar, realizado em seis pacientes com idades entre 47 a 80 anos, sendo três com excisão de tumor mandibular e três com excisão de osteorradionecrose, observou-se a perda do distrator em apenas um paciente com os outros cinco apresentando ótima ou boa qualidade óssea (Gonzáles-Garcia *et al.*, 2005).

O insucesso de uma ferida cicatrizar é normalmente devido a uma hipóxia e infecção. Atualmente discute-se o tratamento com oxigênio hiperbárico (OHB) em pacientes selecionados para facilitar a cicatrização, aumentando a saturação parcial de oxigênio tecidual, proporcionando ao tecido ósseo comprometido pela radiação ou pela perda de perfusão vascular, um ambiente mais favorável para reparação (Zamboni *et al.*, 2003).

Kudo *et al.* (2001) realizaram um estudo histomorfométrico da reação tecidual ao redor de implantes de hidroxiapatita (HA) irradiados após a colocação. Neste estudo cilindros com diâmetro de 2 mm de hidroxiapatita de alta densidade foram colocados em mandíbulas de 48 coelhos brancos japoneses. As mandíbulas foram irradiadas com doses simples de 15 Gy, 5, 14 ou 28 dias após a implantação. Os coelhos foram sacrificados com 7, 14, 28 ou 90 dias após a irradiação. Coelhos com implantes não irradiados foram usados como controle no estudo. Observaram que nos coelhos com cinco dias de irradiação após a implantação, o contato HA-osso ocorreu tardiamente do que nos de controle. A razão entre a superfície de contato osso-implante nos irradiados era menor do que nos coelhos não irradiados de controle, em cada um dos tempos de sacrifício por causa da necrose do osso neoformado que ocorria nos implantes irradiados. O contato HA-osso nos coelhos irradiados com 14 e 28 dias após a implantação era similar ao do grupo controle. A remodelação óssea estava reprimida nos coelhos de cada grupo sacrificados 90 dias após a irradiação. Assim concluíram que a radioterapia com doses simples menores (15 Gy) após a instalação dos implantes é suficiente para

inibir o contato direto entre o implante de HA e a superfície óssea. O contato ósseo ocorrido antes da irradiação estava minimamente afetado. Apesar dos intervalos entre a implantação e a irradiação, a irradiação realizada após a instalação dos implantes inevitavelmente prejudicou a remodelação óssea.

A irradiação no tecido ósseo prejudica a perfusão vascular (hipovascularidade e hipóxia) assim como reduz a capacidade reparadora (hipocelularidade) do osso pela depleção de fatores de crescimento do tecido ósseo, podendo estimular o aparecimento de patologias e fraturas ósseas (Williams & Davies, 2006).

Marx & Johnson (1987), observaram como sinais clínicos em pacientes irradiados, endurecimento do tecido, teleangectasia em mucosa irradiada, perda do crescimento do cabelo da face, atrofia cutânea, descamação cutânea e queratinização, piora na xerostomia e na perda do paladar.

O tecido ósseo é altamente especializado com a ação de inúmeros fatores que direcionam a sua função. O conhecimento da osteoclastogênese e o mecanismo de ação dos osteoclastos têm revelado numerosas estratégias para inibição da reabsorção óssea. A inibição de RANK-L pode ser um caminho promissor no tratamento da osteoporose, perdas dentárias e artrites reumatóides. O uso de bifosfonatos constitui uma alternativa bastante eficaz no tratamento de pacientes oncológicos; porém, mais estudos devem ser realizados para sua indicação segura na odontologia.

Desde as décadas de 80 e 90 intensificaram-se os estudos relacionados aos fatores de crescimento (Lynch *et al.*, 1987,1989, 1991; Becker *et al.*,1991; Wang *et al.*,1994) e ao uso ao PRP associado aos enxertos ósseos com a intenção de obter melhor qualidade óssea (Marx *et al.*, 1998, 2001; Anitua, 1999) que proporcione melhores características no que se refere à aceleração da reparação e qualidade de tecidos de proteção e sustentação, com resultados aparentemente significativos do ponto de vista clínico.

Os benefícios dos fatores de crescimento presentes no PRP observados na literatura pareciam trazer uma grande evolução na melhora da cicatrização de enxertos ósseos e de tecidos moles.

Contraditoriamente, estudos *in vivo* em animais mostraram que a associação de PRP a enxertos ósseos autógenos, retarda a neoformação óssea. A consistência desses estudos pode estar nas diferentes concentrações utilizadas de PRP. Segundo Weibrich *et al* (2004) em concentrações inferiores, o efeito é menos eficaz, enquanto concentrações mais altas poderiam ter um efeito inibitório. Mas de modo geral, a contribuição do PRP no reparo ósseo, osseointegração, entre outros processos biológicos, ainda é controverso.

No presente estudo, o PRP associado a enxerto autógeno não favoreceu significativamente o reparo em osso irradiado. Apesar de estudos em osso irradiado terem observado pouco prejuízo à estrutura óssea após lesões de estudo. Trabalhos como os de Gonzáles-García *et al.* (2007), Shao *et al.* (2006), Taylor *et al.* (1993) apresentam resultados favoráveis ao reparo ósseo de lesões causadas em osso irradiado, dando perspectiva em tratamentos de reabilitação e reconstrução de pacientes mutilados por grandes ressecções tumorais concomitantes a radioterapias.

Em nosso estudo adotamos o protocolo realizado por Kudo *et al.* (2001) que é um estudo prévio com uma dose simples de 15 Gy, contudo podemos observar em situações clínicas o uso de doses maiores que 50 Gy. Não observamos na literatura, um protocolo padrão de irradiação.

Baseado na informação de que a taxa de reparo ósseo em coelho seria três vezes mais rápido que em humanos (Roberts, 1988), 45 dias de espera para o sacrifício corresponde a 135 dias em humanos e 225 dias após a radiação. Este período de reparo pós cirurgico, segundo Manso & Lang (1997), encontra-se posterior à proliferação e diferenciação das células enxertadas com deposição de tecido osteóide e produção de trabeculado composto, ou seja, há o predomínio da diferenciação das células mesênquimais do leito receptor em osteoblastos (Osteoindução). Os osteoclastos derivados dos monócitos circulantes começam a aparecer no osso enxertado, promovendo reabsorção, que, juntamente com aposições, formam, de acordo com os autores, o fenômeno conhecido como “substituição aposicional”.

Encontramos ainda trabalhos mais antigos realizados por Jacobsson *et al.* (1985), Jacobsson & Albrektsson (1986), Block *et al.* (1987) e o de Matsui *et al.* (1994) combinando coelhos e doses simples de 15 cGy.

Eppley *et al.* (1991) observaram a indução de angiogênese e cicatrização óssea de sítios ressecados de mandíbula irradiada de coelhos, quando o material enxertado foi pré-tratado com bFGF. No grupo controle houve necrose, seqüestração óssea e falha no tratamento. Estudos com implantes dentários mostraram que não houve diferença nas taxas de falhas dos implantes na radioterapia antes ou depois da instalação dos implantes (Colella G *et al.*, 2007). No entanto, para se alcançar altas taxas de sucesso, são essenciais um planejamento cuidadoso de radioterapia e a seleção de áreas de implantação com adequado fornecimento de sangue (Asikainen P *et al.*, 1998).

Freymler & Aghaloo (2004) apresentaram um artigo de revisão de literatura em que sustentam a necessidade de maiores evidências científicas na utilização do PRP. Atentam para a possibilidade da ação do PRP em humanos ser diferente do que aquela em animais, no tocante à concentração de plaquetas. Destacam ainda que a técnica empregada para obtenção do PRP pode promover o sucesso ou insucesso do método, pois a liberação dos fatores de crescimento poderia ocorrer prematuramente, dificultando a ação no sítio desejado. Referiram que o PRP age como um adesivo, favorecendo a adesão do enxerto ao sítio cirúrgico. Recomendaram pesquisas experimentais em modelo animal seguras e bem planejadas, visando obter evidências científicas significativas para posterior indicação para o uso em humanos.

Eisenschenk *et al* (2006) propuseram um modelo de estudo para observar o impacto da radioterapia na cicatrização e nas propriedades biomecânicas de enxertos ósseos vascularizados em cães. Os dados mostram uma significativa diminuição na cicatrização óssea e na estabilidade mecânica, após radioterapia tanto no pré quanto no pós-operatório, observados nos leitões das feridas e nos enxertos ósseos.

Neste estudo podemos salientar, que uma amostra maior de animais, diferentes dosagens de radiação, a escolha da espécie estudada,

diferentes protocolos na obtenção do PRP, podem trazer resultados diferentes, o que necessitaria de mais trabalhos científicos para avaliar o reparo de osso irradiado em enxertos ósseos autógenos associados a PRP. Uma dose simples de 15 Gy em coelhos é matematicamente e biologicamente equivalente à dose típica em humanos (Frame JW, 1980). Nessas condições não pudemos identificar uma diferença significativa do reparo do osso irradiado (Tabela 1), entre o grupo irradiado tratado com enxerto ósseo autógeno associado a PRP em relação ao grupo controle.

Contudo o esquema de irradiação pode não ser suficiente para refletir em coelhos uma patologia comum de radioterapia em humanos, isso porque a resposta do tecido do hospedeiro é específica para cada espécie.

7. CONCLUSÃO

De acordo com as condições experimentais utilizadas no presente estudo, não foi observada contribuição significativa na utilização de PRP associado a enxerto autógeno no reparo de osso irradiado ou não irradiado.

REFERÊNCIAS

AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. Position Paper: the potential role of growth and differentiation factors in periodontal regeneration. **J. Periodontol.**, Chicago,v. 67, n.5, p. 545-53, May 1996.

Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Evaluation of platelet-rich plasma in combination with xenograft materials in the rabbit cranium: a pilot study. **J Oral Maxillofac Surg.** 2002a; 60(8):38-9.

Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study. **J Oral Maxillofac Surg.** 2002b; 60(10):1176-81.

Aghaloo TL, Le AD, Freymiller EG, Avera S, Shimizu K, Nishimura RD. Immunohistochemical analyses of cortical and cancellous bone after radiation and the effect of platelet-rich plasma of autogenous bone grafting. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 2006;21(4):535-42.

Alberius P, Gordh M, Lindberg L, Johnell O. Influence of surrounding soft tissues on onlay bone graft incorporation. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 1996; 82(1):22-33.

Albrektsson T. Repair of bone grafts. A vital microscopic and histological investigation in the rabbit. **Scand J Plast Reconstr Surg.** 1980; 14(1):1-12.

Amsel S, Dell ES. Bone formation by hemopoietic tissue: separation of preosteoblast from hemopoietic stem cell function in the rat. **Blood.** 1972; 39(2):267-273.

Amber MH. The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. **Oral Surgery**. 1969;27:309-18.

Andriano KP, Chandrashekar B, McEnery K, Dunn RL, Moyer K, Balliu CM, Holland KM, Garrett S, Huffer WE. Preliminary in vivo studies on the osteogenic potential of bone morphogenetic proteins delivered from an absorbable puttylike polymer matrix. **J Biomed Mater Res**. 2000;53(1):36-43.

Anitua E. Plasma Rich in Growth Factors: Preliminary Results of Use in the Preparation of Future Sites for Implants. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 1999; 14(4):529-35.

Anitua E. The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in oral surgery. **Pract Proced Aesthet Dent**. 2001; 13(6):487-93.

Arcuri MR, Fridrich KL, Funk GF, Tabor MW, LaVelle WE. Titanium osseointegrated implants combined with hyperbaric oxygen therapy in previously irradiated mandibles. **J Prosthet Dent**. 1997; 77(2): 177-183.

Arden EM, Burger EH, Nijweide PJ. Function of osteocytes in bone. **J Cell Biochem**. 1994;55:287-99.

Asikainen P, Klemetti E, Kotilainen R, Vuillemin T, Sutter F, Voipio HM, Kullaa A. Osseointegration of dental implants in bone irradiated with 40, 50 or 60 Gy doses. An experimental study with beagle dogs. **Clin Oral Implants Res**. 1998;9(1):20-5.

Baker RD, Terry BC, Davis WH, Connole PW. Long –term results of alveolar ridge augmentation. **Journal of Oral Surgery**. 1979;37:486-9.

Barboza E, Caúla AI. Regeneração tecidual e óssea guiada. In: R. J. A. Cardoso e E. A. N. Gonçalves (Ed.). **Periodontia, Cirurgia para Implante, Cirurgia, Anestesiologia**. São Paulo: Artes Médicas; 2002, p.137-57.

Bassett Ca. Clinical implications of cell function in bone grafting. **Clin Orthop Relat Res**. 1972; 87:49-59.

Bessho K, Carnes DL, Cavin R, Ong JL. Experimental studies on bone induction using low-molecular-weight poly (DL-lactide-co-glycolide) as a carrier for recombinant human bone morphogenetic protein-2. **J Biomed Mater Res**. 2002;61(1):61-5.

Bezerra Jfb, Lenharo A. Terapia Clínica Avançada em Implantodontia. São Paulo: **Artes Médicas**, v.1. 2002. 36-38 (313) p.

Blattert TR, Delling G, Dalal PS, Toth CA, Balling H, Weckbach A. Successful transpedicular lumbar interbody fusion by means of a composite of osteogenic protein-1 (rhBMP-7) and hydroxyapatite carrier: a comparison with autograft and hydroxyapatite in the sheep spine. **Spine**. 2002;27(23):2697-705.

Block MS, Kent JN, Kay JE. Evaluation of hydroxylapatite coated titanium dental implants in dogs. **J Oral Maxillofac Surg**. 1987;45(7):601-7.

Block, M. S.; Kent, F. N. Sinus Augmentation for dental implants: the use of autogenous bone. **J Oral Maxillofac Surg**, 1997; v.55, p.1281- 1286.

Block MS, Kent JN, Kallukaran FU, Thunthy K, Weinberg R. Bone maintenance 5 to 10 years after sinus grafting. **J Oral Maxillofac Surg**. 1998; 56(6):706-14; discussion 714-5.

Bluemke DA, Fishman EK, Scott, Jr WW. Skeletal complications of radiation therapy. **RadioGraphics**. 1994; 14(1): 111-21.

Bohr H, Ravn HO, Werner H. The osteogenic effect of bone transplants in rabbits. **J Bone Joint Surg Br**. 1968; 50(4):866-73.

Bord S, Horner A, Hembry RM, Reynolds JJ, Compston JE. Production of collagenase by human osteoblast and osteoclast in vivo. **Bone**. 1996;19(1):35-40.

Bornstein MM, Harnisch H, Lussi A, Buser D. Clinical performance of wide-body implants with a sandblasted and acid-etched (SLA) surface: results of a 3-year follow-up study in a referral clinic. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 2007;22(4):631-8.

Boyne Pj. Osseous Reconstruction of the Maxilla and Mandible. **Chicago: Quintessence**, v.1. 1997. 105 p.

Boyne PJ, Shabahang S. An evaluation of bone induction delivery materials in conjunction with root-form implant placement. **Int J Periodontics Restorative Dent**. 2001 Aug;21(4):333-43

Buemer J III, Curtis T, Harrison RE. Radiation therapy of the oral cavity: sequelae and management, part 2. **Head Neck Surg**. 1979; 1: 392-408.

Burg KLJ, Porter S, Kellan JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. **Biomaterials**. 2000;21:2347-59.

Burwell Rg. Studies in the Transplantation of Bone. Vii. the Fresh Composite Homograft-Autograft of Cancellous Bone; an Analysis of Factors Leading to Osteogenesis in Marrow Transplants and in Marrow-Containing Bone Grafts. **J Bone Joint Surg Br**. 1964; 46:110-40.

Buser D, Mericske-Stern R, Bernard JP, Behneke A, Behneke N, Hirt HP, Belser UC, Lang NP. Long-term evaluation of non-submerged ITI implants. Part 1: 8-year life table analysis of a prospective multi-center study with 2359 implants. **Clin Oral Implants Res.** 1997; 8(3):161-72.

Buser D, Ruskin J, Higginbottom F, Hardwick R, Dahlin C, Schenk RK. Osseointegration of titanium implants in bone regenerated in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 1995; 10(6):666-81.

de Carvalho PS, Vasconcellos LW, PIJ. Influence of bed preparation on the incorporation of autogenous bone grafts: a study in dogs. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 2000; 15(4):565-70.

Chen Nt, Glowacki J, Bucky Lp, Hong Hz, Kim Wk, Yaremchuk Mj. The roles of revascularization and resorption on endurance of craniofacial onlay bone grafts in the rabbit. **Plast Reconstr Surg.** 1994; 93(4):714-22; discussion 723-4.

Choi BH, Im CJ, Huh JY, Suh JJ, Lee SH. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. **Int J Oral Maxillofac Surg.** 2004; 33:56-9.

Colella G, Cannavale R, Pentenero M, Gandolfo S. Oral implants in radiated patients: a systematic review. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 2007; 22(4):616-22.

Curtis TA, Griffith MR, Firtell DN. Complete denture prosthodontics for the radiation patient. **J Prosthet Dent.** 1976; 36(1): 66-76.

Dalinka MK, Haygood TM Radiation changes. In: **Resnick D (ed) Diagnosis of bone and joint disorders.** 5th edn. Philadelphia: Saunders; 2002. p. 3393–3422.

Dalinka MK, Mazzeo VP. Complications of radiation therapy. **Crit Rev Diagn Imaging**. 1985;23:235–267.

Davies Je. Histodynamics of endosseous wound healing IN : **Bone Engineering**. Toronto. 2000. 435-40 p.

Dawson WB. Growth impairment following radiotherapy in childhood. **Clin Radiol**. 1968;19:241–256.

Dechichi P, Moura CCG, Santana SI, Zanetta-Barbosa D. Histomorphometric analyses of bone storage in saline solution or PPP. **Journal of Dental Research**. 2004; 85(The 21st Annual Meeting of the Brazilian Society for Oral Research).

Del Regato JA. Dental lesions observed after reontgen therapy in cancer of the buccal cavity, pharynx and larynx. **Am J Roentgenol**. 1939; 42:404-410.

Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SI, Dohan Aj, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 2006; 101(3):37-44.

Dudziak M, Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Greenwald JA, Gittes GK, Longaker MT. The Effects of Ionizing Radiation on Osteoblast-Like Cells in Vitro. **Plast. Reconstr Surg**. 2000; 106:1049-61.

Eckert SE, Desjardins RP, Keller EE, Tolman DE. Endosseous implants in an irradiated tissue bed. **J Prosthet Dent**. 1996; 76(1):45-49.

Eisenschenk A, Witzel C, Lautenbach M, Ekkernkamp A, Weber U, Küntscher MV. Impact of radiation therapy on healing and stability of vascularized bone grafts in a dog model. **Microsurgery**. 2006;26(5), p. 412-6.

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

Ellis III E. Manejo de pacientes com fissuras orofaciais. In: Peterson LJ, Ellis III E, Hupp JR, Tucker MR. **Cirurgia oral e maxilofacial contemporânea**. Rio de Janeiro: Guanabara; 1996. p.583-605.

Enneking WF, Morris JL. Human autologous cortical bone transplants. **Clin Orthop Relat Res**. 1972;87:28-35.

Eppey BL, Connolly DT, Winkelmann BA, Sadove AM, Heuvelman D, Feder J. Free bone graft reconstruction of irradiated facial tissue: experimental effects of basic fibroblast growth factor stimulation. **Plast Reconstr Surg**. 1991;88(1):1-11.

Ergun H, Howland WJ. Postradiation atrophy of mature bone. **Crit Rev Diagn Imaging**. 1980; 12:225–243.

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

Frame JW. A convenient animal model for testing bone substitute materials. **J Oral Surg**. 1980;38(3):176-80.

Freymiller EG, Aghaloo TL. Platelet-Rich Plasma: Ready or Not? **J Oral Maxillofac Surg**. 2004; 62(4):484-88.

Froum SJ, Wallace SS, Tarnow DP, Cho SC. Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus graft: three bilateral case reports. **Int J Periodontics Restorative Dent**. 2002;22:45-53.

Gantous A, Phillips JH, Catton P, Holmberg D. Distraction osteogenesis in the irradiated canine mandible. *Plast Reconstr Surg*. 1994;93(1):164-8.

Camp JD, Moreton RD. Radiation necrosis of the calvarium: report of 5 cases. **Radiology**. 1945;213–19.

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

Gasparini G. **Avaliação da ativação plaquetária no plasma rico em plaquetas após dois protocolos de obtenção em humanos**. [dissertação] Uberlândia: Faculdade de Odontologia/UFU; 2005.

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

González-García R, Rodríguez-Campo FJ, Naval-Gías L, Sastre-Pérez J, Díaz-González FJ. The effect of radiation in distraction osteogenesis for reconstruction of mandibular segmental defects. **Br J Oral Maxillofac Surg**. 2007;45(4):314-6.

Gomes-Filho JE, Gomes BPFA, Zaia AA, Novaes PD, Souza-Filho FJ. Glycol Methacrylate: an alternative method for embedding subcutaneous implant. **J Endod**. 2001; 27 (4): 266-8.

Gränstrom G. Radiotherapy, osseointegration and hyperbaric oxygen therapy. **Periodontol 2000**. 2003; 33;145-62.

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

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

Grötz KA, Krummenauer F, al-Nawas B, Kuffner HD, Reichert TE, Wagner W. [Retrospective analysis of the prognostic significance of the manner of mandibular resection and adjuvant radiotherapy in para-mandibular carcinomas]. **Mund Kiefer Gesichtschir.** 2000; 4(5):301-8.

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

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

Hatakeyama M, Beletti ME, Zanetta-Barbosa D, Dechichi P. Radiographic and histomorphometric analysis of bone healing using autogenous graft associated with platelet-rich plasma obtained by 2 different methods. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2008;105(1):e13-8.

Hauschka PV, Mann KG, Price P, Termine JD. Report of the Ad Hoc Committee on Nomenclature and Standards for Bone Proteins and Growth Factors. **J Bone Miner Res.** 1986;1(5):485-6.

Harker, L.A.; FINCH, C.A. Trombokinectics in man. **J Clin Invest.** 1969; 48(6):963-974.

Howland WJ, Loeffler RK, Starchman DE, Johnson RB. Postirradiation atrophic changes of bone and related complications. **Radiology.** 1975;117:677-685.

Jacobsson M, Albrektsson, T. (1986) Integration of bone implants in previously irradiated bed. In: van Steenberghe D (end). Tissue Integration in Oral and Maxillofacial Reconstruction [Proceedings of an international congress, may 1985, Brussels]. **Excerpta medica** pp. 110-117. Amsterdam, the Netherlands.

Jacobsson M: On behavior of bone after irradiation (thesis) Göteborg, Sweden, University of Göteborg, 1985. Pp t-201.

Jorge RS, Jorge JJ, Luz JGC. Reconstruction of a mandibular critical-sized defect using iliac graft in rats. **Implant Dent.** 2006;15(3):282-9.

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

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

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

Khatteery S, Waite PD, Lemons JE. The influence of radiation therapy on subperiosteal hydroxyapatite implants in rabbits. **J Oral Maxillofac Surg.** 1991; 49(7):730-4.

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

Kim SG, Kim WK, Park JC, Kim HJ. A comparative study of osseointegration of Avana implants in a desmineralized freeze-dried bone grafts. **J Oral Maxillofac Surg.** 2002; 60:1018-25.

Kudo M, Matsui Y, Ohno K, Michi K. A histomorphometric study of the tissue reaction around hydroxyapatite implants irradiated after placement. **J Oral Maxillofac Surg**. 2001;59(3):293-300.

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

Larsen PE, Stronczek MJ, Beck FM, Rohrer M. Osteointegration of implants in radiated bone with and without adjunctive hyperbaric oxygen. **J oral Maxillofac surg**. 1993; 51(3):280-7.

Latrenta GS, McCarthy JG, Breitbart AS, May M, Sissons HA. The role of rigid skeletal fixation in bone-graft augmentation of the craniofacial skeleton. **Plast Reconstr Surg**. 1989; 84(4):578-88.

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

Lekovic V, Camargo PM, Weinlaender M, Vasilic N, Kenney EB. Comparison of PRP, bovine porous bone mineral, and guided tissue regeneration versus platelet-rich-plasma and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects: A reentry study. **J Periodontol**. 2002;73:198-205.

Lenharo A, Mendonça RG. Plasma rico em plaquetas. In: Bezerra FJB, Lenharo A. **Terapia Clínica Avançada em Implantodontia**. São Paulo: Artes Médicas; 2002. p.77-104.

Lin KY, Bartlett SP, Yaremchuk MJ, Fallon M, Grossman RF, Whitaker LA. The effect of rigid fixation on the survival of onlay bone grafts: an experimental study. **Plast Reconstr Surg**. 1990; 86(3):449-56.

Lindhe J, Karring T, Lang NP. Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral. 4ª edição. Guanabara;38:843-69.

Lynch SE, Buser D, Hernandez RA, Weber HP, Stich H, Fox CH, Williams RC. Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. **J. Periodontol.** 1991; 62(11):710-716.

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

Lynch SE, Nixon JC, Colvin RB, Antoniades HJ. Role of platelet-derived growth factor in wound healing: synergistic effects with other growth factors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 1987; 84(21):7696-7700.

Lynch SE, Williams RC, Polson AM, Howell TH, Reddy MS, Zappa UE, Antoniades HS. A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen. 1989;16(8):545-548.

Man D, Plosker H, Winland-Brown JE. The use of autologous platelet-rich plasma (Platelet Gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. **Plast Reconstr Surg.** 2001;107(1):229-37.

Marotti G, Farneti D, Remaggi F, Tartari F. Morphometric investigation on osteocytes in human auditory ossicles. **Anat Anz.** 1998; 180(5):449-53.

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

Marx RE, Johnson RP. Studies in the radiobiology of osteoradionecrosis and their clinical significance. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1987;64:379-90.

Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-Rich plasma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1998; 85(6):638-46.

Marx RE, Morales MJ. The use of implants in the reconstruction of oral cancer patients. **Dent Clin North Am.** 1998; 42(1): 177-202.

Marx RE. Osteoradionecrosis: a new concept of its pathophysiology. **J Oral Maxillofac Surg.** 1983;41:283-8.

Marx RE. Platelet-Rich Plasma: A source of multiple autologous growth factors for bone grafts. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE (eds). **Tissue Engineering: Applications in maxillofacial surgery and periodontics.** Chicago: Quintessence, 1999:71-82.

Marx RE. Platelet-Rich Plasma (PRP): What is PRP and What is not PRP? **Implant Dent.** 2001a; 10(4):225-28.

Marx RE. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. **J Oral Maxillofac Surg.** (discussion) 2000; 58(3):300-01.

Marx RE, Johnson RP. Studies in the radiobiology of osteoradionecrosis and their clinical significance. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1987; (64)379-90.

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

Marx RE, Stevens MR. **Oral and maxillofacial trauma**. Philadelphia: W.B Saunders. 1997. 1101-203 p.

Masella RP, Cupps RE, Laney WR. et al. Dental management of the irradiated patients. **Northwest Dent**. 1972; 51: 269-275.

Masters DH. Implants. Bone and bone substitutes. **CDA J**.1988;16(1):56-65.

Matsui Y, Ohno K, Michi K et al: Histomorphometric examination of healing around hydroxyapatite implants in 60 Co irradiated bone. **J Oral Maxillofac Surg**. 1994;52(2):167-72; discussion 172-3.

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

Misch CM. Comparison of intraoral donor sites for onlay grafting prior to implant placement. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 1997 Nov-Dec; 12(6):767-76.

Misch CM, Misch CE, Resnik RR, Ismail YH. Reconstruction of maxillary alveolar defects with mandibular symphysis grafts for dental implants: a preliminary procedural report. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 1992;7(3):360-6.

Misch CM. Resorbable or non-resorbable membranes: where, why, and how. **Dent Implantol Update**. 1993 Jun ;4(6):49-51.

Morales MJ, Marx RE, Gottlieb CF. Effects of pre- and postoperative irradiation on the healing of bone grafts in the rabbit. **J Oral Maxillofac Surg**. 1987; 45(1):34-41.

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

Odgren PR, Kim N, van Wesenbeeck L et al. Evidence that the rat osteopetrotic mutation toothless (tl) is not in the TNFSF11 (Trance, Rankl, ODF, OPGL) gene. **Int J Dev Biol.** 2001;45:853-9.

Oliveira RC, Costa LF, Fernandes EA, Alvarenga BO, Mاتيoli SR, Beletti ME. Bone histomorphometry of broilers submitted to different phosphorus sources in growing and finisher rations. **Pesq. agropec. bras.** 2006;41(10):1517-23.

Oyama T, Nishimoto S, Tsugawa T, Shimizu F. Efficacy of platelet-rich plasma in alveolar bone grafting. **J Oral Maxillofac Surg.** 2004; 62(5):555-58.

Paleckis LGP, Picosse LR, Vasconcelos LW, Carvalho PSP. Enxerto ósseo autógeno – por que e como utilizá-lo. **Rev ImplntNews.** 2005;2(4):360-74.

Perthes G. Ueber den Einfluss der Röntgenstrahlen auf Epitheliale Gewebe, Insbesondere auf des Carcinom. **Arch Clin Chir.** 1903;71:955.

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

Pilliar RM, Fillaggi MJ, Wills JD, Grynblas MD, Kandel RA. Porous calcium polyphosphate scaffolds for bone substitute application-in vitro characterization. **Biomaterials.** 2001;22:963-72.

Pinto, AVS. Aumento ósseo com enxerto autógeno – áreas doadoras intrabuciais. In: **Cardoso RJA, Machado EL. Odontologia Arte e Conhecimento.** 2003. Cap. 14,p.297-334.

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

Probert JC, Parker BR. The effects of radiation therapy on bone growth. **Radiology.** 1975;114:155–162.

Prolo DJ, Rodrigo JJ. Contemporary bone graft physiology and surgery. **Clin Orthop Rel Res.** 1985;200:322-42.

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

Raghoobar GM, Batenburg RH, Vissink A, Reintsema H. Augmentation of localized defects of the anterior maxillary ridge with autogenous bone before insertion of implants. *J Oral Maxillofac Surg.* 1990;54(10):1180-5; discussion 1185-6.

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

Roach HI. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralization and resorption. **Cell Biol Int.** 1994;9:367-74.

Roberts WE. Bone tissue interface. **Int J Oral Implantol.** 1988;5(1):71-4.

Manso M C, Lang D: Enxerto Ósseo Retro Molar Onlay Para Restauração Ideal do Contorno do Rebordo Alveolar. **Revista Brasileira de Implantodontia**. 1997; 5:7-14.

Robiony M, Polini F, Costa F, Politi M. Osteogenesis distraction and platelet-rich plasma for bone restoration of the severely atrophic mandible: preliminary results. **J Oral Maxillofac Surg**. 2002;60(6):630-35.

Rodriguez A, Anastossov GE, Lee H, Buchbinder D, Wettan H. Maxillary sinus augmentation with deproteinated bovine bone and platelet rich plasma with simultaneous insertion of endosseous implants. **J Oral Maxillofac Surg**. 2003;61(2):157-63.

Ross, FP. Ranking the importance of measles virus in Paget's disease. **J Clin Invest**. 2000;105:5555-58.

Ruggeri ZM. Mecanismos initialing platelet thrombus formation. **Thromb Haemost**. 1997; 78(1):611-616.

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

Santos MD, Santos MDD. O sangue e a medula óssea. In: Pontual MAB, Magini RS. **Plasma Rico em Plaquetas e Fatores de Crescimento**. São Paulo: Santos; 2004. p.3-44.

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

Shao Z, Liu B, Liu Y, Liu W, Liu R, Peng Q, Liu L. Distraction osteogenesis in the irradiated rabbit mandible. **J Plast Reconstr Aesthet Surg.** 2006; 59(2):181-7.

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

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

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

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

Takahashi S, Sugimoto M, Kotoura Y, Nishimatsu H, Shibamoto Y, Abe M, Yamamuro T. The effects of intraoperative radiotherapy on bone-healing ability in relation to different doses and postradiotherapy intervals. **Int J Radiation Oncology Biol Phys.** 1994; 30(5):1147-52.

Taylor TD, Worthington P. Osseointegrated implant rehabilitation of the previously irradiated mandible: results of a limited trial at 3 to 7 years. **J Prosthet Dent.** 1993; 69(1):60-9.

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

Tischler M. Platelet rich plasma: The use of autologous growth factors to enhance bone and soft tissue grafts. **NY State Dent J.** 2002;68(3):22-4.

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

Triplett RG, Schow SR, Laskin DM. Oral and maxillofacial surgery advances in implant dentistry. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 2000; 15(1):47-55.

Wallace SS, Froum SJ, Tarnow DP. Histologic evaluation of a sinus elevation procedure: a clinical report. **Int J Periodontics Restorative Dent.** 1996; 16(1):46-51.

Wang HL, Pappert TD, Castelli WA, Chiego Jr DJ, Shyr Y, Smith BA. The effect of platelet-derived growth factor on the cellular response of the periodontium: an autoradiographic study on dogs. **J. Periodontol.** 1994; 65(5):429-436.

Watrous DA, Andrews BS. The metabolism and immunology of bone. **Semin Arthritis Rheum.** 1989; 19(1):45-65.

Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. **Bone New York.** 2004; 34(4):665-71.

Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. **J Oral Maxillofac Surg.** 1997;55(11):1294-99.

Williams HJ, Davies AM. The effect of X-rays on bone: a pictorial review. **Eur Radiol.** 2006;16:619–33.

Wilson J, Merwin GE. Biomaterials for facial bone augmentation: comparative studies. **J Biomed Mater Res.** 1988;22(A2 Suppl):159-77.

Wiltfang J, Kloss FR, Kessler P, Nkenke E, Schultze-Mosgau S, Zimmermann R, et al. Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. **Clin Oral Implants Res.** 2004;15(2):187-193.

Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. **Science.** 1988; 16;242(4885):1528-34.

Würzler KK, DeWeese TL, Sebald W, Reddi AH. Radiation-induced impairment of bone healing can be overcome by recombinant human bone morphogenetic protein-2. **J Craniofac Surg.** 1998; 9(2):131-7.

Zamboni WA, Browder LK, Martinez J. Hyperbaric oxygen and wound healing. **Clin Plastic Surg.** 2003; 30: 67– 75.

Zechner W, Tangl S, Tepper G, Furst G, Bernhart T, Haas R, et al. Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorphometric study in minipigs. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 2003;18(1): p.15-22.

Zhou H, Chernecky R, Davies JE. Deposition of cement at reversal lines in rat femoral bone. **J Bone Miner Res.** 1994;9:367-74.

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



**Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA)**

Campus Santa Mônica, Bloco 1J
www.comissoes.propp.ufu.br
Telefone: 3239.4531

PARECER

O projeto com o título “**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO COM O USO DO PRP ASSOCIADO A ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO E AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HISTOMORFOMÉTRICAS NO OSSO EM COELHOS IRRADIADOS E NÃO IRRADIADOS**”, coordenado pela Profa. Dra. Paula Dechichi, com colaboração e execução de Gustavo Davi Rabelo e Guilherme Romano Scartezini, foi submetido ao Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) em formulário próprio para Protocolo de Utilização de Animais e, avaliado segundo as normas éticas orientadoras do Comitê, recebeu parecer de “APROVADO”.

Uberlândia, 25/04/2008

Prof. Dr. Alcino Eduardo Bonella,
Coordenador *Pró-tempore* da
Comissão de Ética para Utilização de Animais (CEUA) – UFU

Anexo II

COELHOS NÃO IRRADIADOS											
1042		1047		1053		1054		1062		SN	
D (PRP)	E (SEM PRP)	D (PRP)	E (SEM PRP)	D (PRP)	E (SEM PRP)	D (PRP)	E (SEM PRP)	D (PRP)	E (SEM PRP)	D (PRP)	E (SEM PRP)
39.050	48.535	68.580	43.810	29.878	30.267	50.466	21.398	53.664	42.018	51.768	55.841
29.941	54.956	53.275	49.585	43.879	48.633	34.870	43.838	35.961	36.066	29.018	43.410
39.394	41.111	67.689	45.957	51.147	42.161	29.009	21.819	49.068	40.895	31.420	42.040
47.020	33.138	32.160	50.550	43.040	55.035	52.378	44.220	37.066	10.581	36.476	54.181
36.395	41.072	64.671	44.603	46.521	56.686	29.756	61.858	56.188	41.949	46.521	51.116
49.372	33.888	51.708	58.301	39.723	38.974	37.457	44.220	39.659	42.523	29.261	34.858
40.195	42.117	56.347	48.801	42.365	45.293	38.989	39.559	45.268	35.672	37.411	46.908
COELHOS IRRADIADOS											
1015		1020		1028		1043		1046		1097	
D (PRP)	E (SEM PRP)	D (PRP)	E (SEM PRP)	D (PRP)	E (SEM PRP)	D (PRP)	E (SEM PRP)	D (PRP)	E (SEM PRP)	D (PRP)	E (SEM PRP)
33.672	26.733	51.150	37.198	16.488	23.681	47.634	47.262	29.663	19.721	37.081	26.687
16.969	34.724	58.906	39.515	18.103	16.617	48.094	47.506	52.185	30.413	45.262	41.112
41.816	30.227	49.340	56.638	28.536	30.146	41.527	62.510	29.639	36.394	34.639	35.332
6.083	28.821	64.488	53.906	52.801	25.541	46.569	51.567	50.244	38.960	40.859	24.002
9.651	30.991	32.530	75.763	52.060	25.687	36.803	57.731	32.366	29.168	36.824	35.781
36.355	27.899	55.410	71.428	29.428	39.752	41.277	47.225	49.278	47.450	43.466	45.414
24.091	29.899	51.971	55.741	32.903	26.904	43.651	52.300	40.563	33.684	39.689	34.721

Quadro de distribuição dos animais teste e controle (perna direita e esquerda), com suas respectivas quantidades de matriz óssea (12 imagens histológicas por animal).