

## ASPECTOS MICROSCÓPICOS DA REPARAÇÃO MEDIADA POR PLASMA RICO EM PLAQUETAS E AUTOENXERTO ESPONJOSO EM FALHAS ÓSSEAS EXPERIMENTAIS NO CRÂNIO DE COELHOS

Ricardo Junqueira Del Carlo<sup>1</sup>  
Betânia Souza Monteiro<sup>2</sup>  
Paloma Sayegh Arreguy Silva<sup>2</sup>  
Napoleão Argolo<sup>2</sup>  
Rogéria Serakides<sup>3</sup>

### RESUMO

Com o objetivo de avaliar um protocolo para a obtenção de PRP e descrever os aspectos microscópicos da reparação de falhas ósseas após a aplicação local de plasma rico em plaquetas associado ou não ao autoenxerto ósseo esponjoso, a região fronto-parietal de 18 coelhas foi exposta, permitindo a realização de quatro falhas de 5,0mm de diâmetro, numeradas de I a IV, sendo duas no antímero direito e duas no esquerdo, até a exposição das meninges no fundo. A falha I foi preenchida com o PRP; a II foi preenchida com 3,0mg de enxerto esponjoso autógeno proveniente da crista ilíaca; a III com 3,0mg de enxerto esponjoso autógeno associado ao PRP e a falha IV não foi preenchida, servindo como controle. Três grupos experimentais (G1, G2 e G3) constituídos de seis coelhas, foram submetidos à eutanásia aos 30, 60 e 90 dias, respectivamente por grupo, após sedação, anestesia e sobredosagem anestésica com tiopental sódico. O protocolo laboratorial proposto para confecção do PRP mostrou-se de fácil execução e de baixo custo. Possibilitou a concentração de plaquetas, no PRP final, em todos os animais, entre 1.600.000 e 2.000.000/ $\mu$ L. Os exames histológicos evidenciaram que o PRP participou negativamente na fase inicial da reparação, aumentando o processo inflamatório, prejudicando a precocidade de formação óssea. Em relação a quantidade de novo osso formado, o preenchimento ósseo exibido pelos tratamentos enxerto e PRP associado ao autoenxerto apresentaram-se de forma semelhante, entretanto, o enxerto ósseo esponjoso autógeno utilizado de forma isolada determina precocidade de reparação óssea.

**Palavras-chave:** plasma rico em plaquetas; enxerto ósseo; reparação óssea.

### PLATELET RICH PLASMA AND AUTOLOGOUS BONE GRAFT IN HEALING OF EXPERIMENTAL BONE DEFECTS IN THE RABBITS CRANIUM. MICROSCOPIC STUDY

#### ABSTRACT

This study was undertaken to evaluate a protocol to obtain platelet rich plasma (PRP) and to describe the microscopic aspects of bone defects repair after the local application of (PRP) associated or not to autogenous bone graft (EOE). The fronto-parietal portion of 18 rabbit's skull was exposed, allowing the perforation of four defects (5.0 mm diameter each), numbered I to IV, being two of them in the right antimere and two in the left one, until the meninges could be seen at the bottom. Defect I received PRP only; defect II received 3.0 mg of EOE only; defect III received EOE associated to PRP; defect IV was left to heal naturally, serving as control. Three experimental groups (G1, G2 and G3) consisting of six rabbits were sedated, anesthetized and euthanized (sodic thiopental super-dose) on the 30<sup>th</sup>, 60<sup>th</sup> and 90<sup>th</sup> days, respectively for groups. The laboratorial protocol proposed to make PRP showed to be easily performed, low cost and made possible the concentration of platelets between 1.600.000 and 2.000.000 /  $\mu$ L in all the animals. Histology evidenced that PRP participated negatively in the initial phase of repair, increasing the inflammatory process and negatively influencing the

<sup>1</sup>Professor Titular, Pesquisador CNPq, Departamento de Veterinária (DVT), Universidade Federal de Viçosa (UFV). 36570-000 Viçosa, MG. Autor para correspondência. E-mail: ricarlo@ufv.br

<sup>2</sup>Pós-graduando, Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, DVT, UFV.

<sup>3</sup>Professora Adjunta, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

precocity of bone formation. In relation to the amount of new bone, bone filling exhibited by the treatments autogenous bone graft alone and PRP associated to the autogenous bone graft came in a similar form, however, the autogenous bone graft used alone determined the precocity of bone repair.

**Key words:** platelet rich plasma, bone graft, bone reparation.

## ASPECTOS MICROSCÓPICOS DE LA REPARACION MEDIADA POR PLASMA RICO EN PLAQUETAS Y AUTOENJERTO ESPONJOSO EN FALLAS OSSEAS EXPERIMENTALES EN CRANIO DE CONEJOS

### RESUMEN

Con el objetivo de evaluar un protocolo para la obtención de PRP y describir los aspectos microscópicos de la reparación de defectos óseos tras la aplicación local de plasma rico en plaquetas asociado o no al autoinjerto óseo esponjoso, la región fronto-parietal de 18 conejos fue expuesta, permitiendo la realización de cuatro defectos de 5mm de diámetro, numeradas de I a IV, siendo dos en el antímero derecho y dos en el izquierdo hasta la exposición de las meninges en el fondo. El defecto I fue rellenado con PRP, el II fue rellenado con 3,0mg de injerto esponjoso autógeno proveniente de la cresta iliaca; el defecto III con 3,0mg de injerto esponjoso autógeno asociado a PRP y el defecto IV no fue rellenado, sirviendo como control. Tres grupos experimentales (G1, G2 e G3) constituidos por seis conejas, fueron sometidos a eutanasia a los 30, 60 y 90 días, respectivamente por grupo, tras sedación, anestesia y sobredosaje anestésica con tiopental sódico. El protocolo laboratorial propuesto para la confección del PRP, mostró ser de fácil ejecución y de bajo costo. Posibilitó la concentración de plaquetas entre 1.600.000 e 2.000.000/ $\mu$ L en el PRP final de todos los animales. Los exámenes histológicos evidenciaron que el PRP participó negativamente en la fase inicial de la reparación, aumentando el proceso inflamatorio, perjudicando la precocidad de formación ósea. En relación a la cantidad de nuevo hueso formado, el llenado óseo exhibido por los tratamientos injerto y PRP asociado al autoinjerto se presentó de forma semejante, sin embargo, el injerto óseo esponjoso autógeno utilizado de forma aislada determina precocidad de reparación ósea.

**Palabras-clave:** plasma rico en plaquetas, injerto óseo, reparación de defectos óseos.

### INTRODUÇÃO

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos anucleares e discóides, presentes no sangue, produzidas a partir dos megacariócitos, e que auxiliam os processos de hemostasia, cicatrização e re-epitelização (SCHULZE e SHIVDASANI, 2005). Sofrem degranulação nos sítios de lesão liberando diversos fatores de crescimento (FCs) e citocinas que estimulam a ação de outras células (AGHALOO *et al.*, 2002), promovendo aumento da angiogênese, crescimento e permeabilidade vascular, proliferação de fibroblastos, proporcionando aumento na síntese de colágeno e produção de tecido de granulação, e a ativação de células osteoprogenitoras acarretando em reparação óssea (ROBSON, 1997; MARX, 2004).

O plasma rico em plaquetas (PRP) representa uma concentração de plaquetas em um pequeno volume de plasma e sua aplicação local tem demonstrado aumento da reparação após procedimentos ortopédicos, neuro-cirúrgicos, odontológicos e cirurgias plásticas (MAZZUCCO *et al.*, 2004).

A consistência de gel facilita a aplicação local do PRP em diversos tipos de procedimentos cirúrgicos (EFEUGLU *et al.*, 2004; KEVY e JACOBSON, 2004). A produção laboratorial do gel advém da adição de trombina autógena ou trombina recombinante espécie-específica e/ou gluconato ou cloreto de cálcio ao concentrado de plaquetas. Esses produtos ativam o sistema de coagulação e providenciam a liberação, pelas plaquetas, de fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento similar à insulina (IGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento epidermal [EGF] (KEVY e JACOBSON, 2004; MARX, 2004).

O presente estudo teve por objetivo avaliar um protocolo para a obtenção de PRP e descrever os aspectos microscópicos da reparação de falhas ósseas produzidas no crânio de coelhos, após a aplicação local de plasma rico em plaquetas associado ou não ao autoenxerto ósseo esponjoso.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 18 coelhas da raça Nova Zelândia, de nove meses de idade. Para obtenção do plasma rico em plaquetas, foram obtidos 9,0mL de sangue do plexo venoso retro orbital de cada animal que, posteriormente, foram armazenados em dois tubos de ensaio de 4,5mL contendo vácuo e citrato de sódio. O conteúdo dos tubos foi homogeneizado e centrifugado<sup>1</sup> a 1300rpm por 12 minutos. Após a centrifugação, o plasma foi separado das hemácias, passando a existir entre eles uma camada intermediária denominada zona de névoa, constituída de leucócitos, plaquetas e hemácias maiores. Foram pipetados 25,0µL da zona de névoa por tubo, e reservados em um tubo devidamente identificado e o plasma foi pipetado e colocado em outro tubo que, posteriormente, foi centrifugado novamente a 1300rpm por 8 minutos. Formou-se um botão de plaquetas ao fundo e o plasma que ficou separado ocupava o restante do tubo. Foi retirado o plasma sobrenadante, permanecendo apenas 125,0µL de volume final, formados pelo plasma e pelo botão plaquetário. Foram adicionados os 25,0µL da zona de névoa, armazenados anteriormente, obtendo-se o PRP final, não ativado. Foi realizada a contagem do número de plaquetas, tendo como referência mínima a quantidade de 1.000.000 de plaquetas em 1,0µL para ser considerado plasma enriquecido. Posteriormente, foram aspirados de um frasco, 75,0µL de soluplastin<sup>®2</sup> (coagulante), seguindo a proporção 2:1 (150,0µL de PRP para 75,0µL de soluplastin<sup>®</sup>). No momento da aplicação (tratamento), o soluplastin<sup>®</sup> foi adicionado ao PRP para confecção do gel de plaquetas.

Após anestesia geral e procedimentos rotineiros de assepsia e anti-sepsia a região fronto-parietal de cada animal foi exposta, permitindo a realização de quatro falhas de 5,0mm de diâmetro, numeradas de I a IV, sendo duas no antímero direito e duas no esquerdo, até a exposição das meninges no fundo. A falha I foi preenchida com o PRP; a II foi preenchida com 3,0mg de enxerto esponjoso autógeno proveniente da crista íliaca; a III com 3,0mg de enxerto esponjoso autógeno associado ao PRP e a falha IV não foi preenchida, servindo como controle.

Posteriormente, os animais foram separados aleatoriamente em três grupos experimentais (G1, G2 e G3) constituídos de seis coelhas, que foram submetidas à eutanásia aos 30, 60 e 90 dias, respectivamente por grupo, após sedação, anestesia e sobredosagem anestésica com tiopental sódico.

Na seqüência, a região fronto-parietal, contendo as falhas ósseas, foi coletada e fixada por 48 horas em formalina 10% tamponada. Posteriormente, foi descalcificada em ácido fórmico a 8% associado ao ácido clorídrico a 8%, durante 30 dias. A seguir, foi desidratada em álcool 70, 80 e 95% por 1 hora em cada, e em álcool a 100% (dois banhos de 1 hora cada). O material foi então, diafanizado em 2 banhos de xilol puro, por 40 minutos cada. Os fragmentos foram imersos em parafina e colocados em estufa a 56°C por um período de três horas e incluídos em parafina à temperatura ambiente, permitindo, cortes de 5,0µm de espessura, em micrótomo, e posterior montagem em lâmina de vidro. Os fragmentos foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e examinados ao microscópio óptico.

Na avaliação estatística foram realizadas análises descritivas e qualitativas do preenchimento e maturidade óssea exibidos nas falhas, dentro de cada grupo experimental. A classificação qualitativa deu-se segundo escores pré-estabelecidos para a intensidade de preenchimento ósseo (escore 1:  $0 < x \leq 25\%$ ; escore 2:  $26 < x \leq 75\%$ ; e escore 3:  $x > 75\%$ ) e para maturidade óssea (escore 0: imaturo e escore 1: maduro). Para determinar se houve influência significativa dos tratamentos dentro de cada grupo experimental, os dados foram submetidos à análise de Kruskal-Wallis, considerando a hipótese de nulidade em 5% e, posteriormente, submetidos ao teste de Dunn's. As análises foram realizadas utilizando a planilha eletrônica Excel<sup>®</sup> e o programa estatístico BioEstat<sup>®</sup> 2.0 (AYRES et al., 2000).

## RESULTADOS

O protocolo laboratorial proposto para confecção do PRP mostrou-se de fácil execução e de baixo custo, semelhante ao observado em cães por Barbosa *et al.* (2008). Também possibilitou a concentração de plaquetas, no PRP final, em todos os animais, entre 1.600.000 e 2.000.000/µL.

Na contagem celular, não foram identificados leucócitos no PRP inicial, que estavam

<sup>1</sup> Centrifuga<sup>®</sup> FANEN. São Paulo, SP, Brasil.

<sup>2</sup> Soluplastin<sup>®</sup> - Wiener Laboratórios S.A.I.C. Rosário, Argentina. Constituição do produto: cloreto de cálcio, cloreto de sódio e tromboplastina derivada do cérebro de coelho.

presentes em quantidade significativa na zona de névoa. No PRP final, obtido após a adição da zona de névoa, foi observado o aumento da concentração de leucócitos em relação ao sangue total.

Na análise descritiva das falhas, aos 30 dias (G1), verificou-se que o novo osso formado cresceu das bordas do defeito em direção ao centro. Esse crescimento foi do tipo trabecular e imaturo (osteóide), contendo osteócitos de tamanhos variados e revestidos por uma camada de osteoblastos, na maioria, achatados ou cuboidais. O defeito ósseo das falhas controle (IV) apresentou nova formação óssea discreta. Esse novo tecido estava presente em alguns pontos da borda da lesão associado à moderada quantidade de tecido conjuntivo fibroso vascularizado. As falhas tratadas com enxerto esponjoso autógeno (II) apresentaram a área do defeito totalmente preenchida por fragmentos do implante, que ainda estava viável apresentando osteoblastos e osteócitos ativos. Também foi observado tecido ósseo novo mais maduro em comparação às falhas I e IV, e grande quantidade de tecido conjuntivo fibroso. As falhas tratadas com enxerto esponjoso autógeno associado ao PRP (III) apresentaram-se mais preenchidas em comparação ao controle. Os fragmentos ósseos do enxerto estavam presentes em toda a borda do defeito, associados à moderada quantidade de tecido conjuntivo fibroso, com intensa vascularização e celularidade. O novo tecido ósseo foi do tipo trabecular maduro e com focos de tecido osteônico e alguns focos de tecido ósseo imaturo (osteóide).

Em áreas dessas falhas também foi visualizado tecido conjuntivo fibroso contendo material amorfo, eosinofílico e extracelular; semelhante ao gel formado após adição do soluplastin<sup>®</sup>. Juntamente a esse material, havia um processo inflamatório constituído, predominantemente, por linfócitos e, em menor número, por macrófagos e células gigantes multinucleadas fagocitando material amorfo acelular (Figura 1A e 1B).

Ainda aos 30 dias, a morfologia e a extensão do preenchimento do defeito ósseo evidenciadas nas falhas tratadas com PRP (I) foram semelhantes às observadas nas falhas controle. No entanto, como diferencial, de permeio ao novo tecido ósseo formado havia tecido conjuntivo fibroso mais proeminente em comparação às falhas controle.

No G2, avaliado aos 60 dias, as falhas controle (IV) apresentaram-se menores em comparação aos 30 dias e preenchidas por maior quantidade de novo tecido ósseo do tipo trabecular, mais maduro e por tecido conjuntivo fibroso vascularizado. Nas falhas tratadas com enxerto esponjoso (II) o crescimento ósseo apresentou-se maior e estavam preenchidas por menor quantidade de tecido conjuntivo fibroso, com fragmentos do enxerto ausentes ou presentes em menores proporções, em comparação aos 30 dias. Nas falhas preenchidas por enxerto esponjoso autógeno associado ao PRP havia a presença de novo tecido ósseo trabecular, maduro, com preenchimento superior quando comparado ao período anterior, porém a hiperplasia e hipertrofia osteoblástica observadas estavam menos expressivas. E, como relatado anteriormente, o crescimento ósseo encontrado nas falhas tratadas com PRP (I) foi semelhante ao observado nas falhas controle.

Na avaliação microscópica aos 90 dias, percebeu-se que as falhas controle estavam preenchidas por tecido ósseo e conjuntivo, à semelhança dos 60 dias. Nesse tecido conjuntivo fibroso observou-se intensa celularidade com fibroblastos e osteoblastos. Em nenhuma das falhas houve preenchimento total, restando cerca de 40-50% de área a ser preenchida.

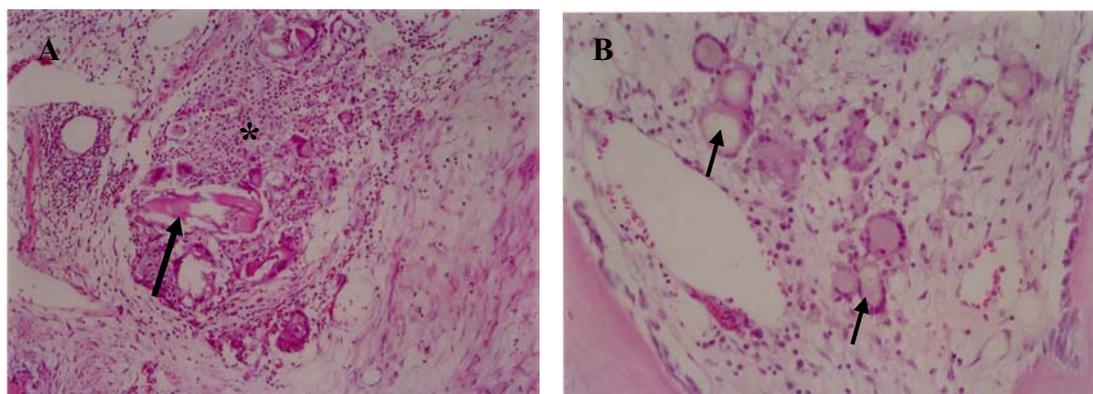
As falhas que receberam enxerto esponjoso autógeno exibiam preenchimento ósseo equivalente às falhas controle do mesmo grupo, bem como a quantidade de tecido conjuntivo, porém, o tecido ósseo estava mais organizado.

Nas falhas com enxerto esponjoso autógeno associado ao PRP, o preenchimento encontrado foi superior quando comparado ao período anterior. Focos ocasionais de inflamação linfocitária foram observados em alguns espécimes, provavelmente pela resolução da resposta inflamatória e pela absorção do gel formado pelo coagulante. Nas falhas tratadas com PRP (I), a presença de novo osso foi semelhante à quantidade observada nas falhas controle, contudo, o processo inflamatório não estava tão evidenciado.

As avaliações qualitativas, expressas em escores, estão representadas nas tabelas 1 e 2. As variáveis qualitativas preenchimento e maturidade óssea foram analisadas com o método não-paramétrico de Kruskal-Wallis e, verificou-se diferença significativa entre os tratamentos dentro de um mesmo grupo tanto para preenchimento ósseo, quanto para maturidade (Tabela 3).

A seguir, realizou-se o pós-teste de comparação utilizando-se o método de Dunn's já que o teste foi de comparação. Na análise do preenchimento ósseo foi constatado que os tratamentos com enxerto esponjoso autógeno e a associação PRP + enxerto foram os que mais contribuíram para essa

significância. O mesmo também foi observado para a variável maturidade óssea. Verificou-se, portanto, que o PRP, de forma isolada, não representou fator decisivo no processo de reparação óssea.



**FIGURA 1.** **A)** Aspectos microscópicos da reação granulomatosa apresentada aos 30 dias pela falha tratada com enxerto+ PRP. Notar a presença de fragmentos do enxerto (seta) e de infiltrado inflamatório predominantemente linfocitário (\*) (HE 37,5x). **B)** Aspectos microscópicos da reação tipo corpo-estranho e inflamatória apresentada aos 30 dias pela falha tratada somente com PRP. Presença de células gigantes (setas) fagocitando material amorfo acelular (HE 100x).

**TABELA 1.** Avaliação qualitativa do grau de preenchimento ósseo das falhas, por meio de análise microscópica, segundo escores pré-estabelecidos, por espécime e em diferentes períodos de observação.

Período	Espécime	Tratamentos e escores (preenchimento ósseo) <sup>(1)</sup>			
		Controle	PRP	Enxerto	Enxerto + PRP
30 dias	A	1	1	3	2
	B	1	1	3	2
	C	1	1	3	2
	D	1	1	3	2
	E	1	1	3	2
	F	1	1	3	2
60 dias	A	2	2	2	3
	B	2	2	2	3
	C	2	2	2	3
	D	2	2	2	3
	E	2	2	2	3
	F	2	2	2	3
90 dias	A	2	2	2	3
	B	2	2	2	3
	C	2	2	2	3
	D	2	2	2	3
	E	2	2	2	3
	F	2	2	2	3

**NOTA:** (1) escore 1 = preenchimento ósseo entre  $0 < x \leq 25\%$  da falha; escore 2 = preenchimento ósseo entre  $26 < x \leq 75\%$ ; escore 3 = preenchimento ósseo  $> 75\%$ .

PRP: plasma rico em plaquetas

**TABELA 2.** Avaliação da maturidade de preenchimento ósseo das falhas, por meio de análise microscópica, segundo escores pré-estabelecidos, por animal e em diferentes períodos de observação.

Período	Espécime	Tratamentos e grau de maturidade óssea <sup>(1)</sup>			
		Controle	PRP	Enxerto	Enxerto + PRP
30 dias	A	0	0	1	1
	B	0	0	1	1
	C	0	0	1	1
	D	0	0	1	1
	E	0	0	1	1
	F	0	0	1	1
60 dias	A	1	1	1	1
	B	1	1	1	1
	C	1	1	1	1
	D	1	0	1	1
	E	0	0	1	1
	F	0	1	1	1
90 dias	A	1	1	1	1
	B	0	1	1	1
	C	1	1	1	1
	D	1	1	1	1
	E	1	1	1	1
	F	0	0	1	1

**NOTAS:** (1) escore 0 = imaturo; escore 1 = maduro

PRP: plasma rico em plaquetas.

**TABELA 3.** Valores de significância (p) calculados pelo teste de Kruskal-Wallis para preenchimento ósseo e para maturidade, nos grupos 1, 2 e 3.

Grupo	Preenchimento ósseo (p) Kruskal-Wallis	Maturidade óssea (p) Kruskal-Wallis
1 (30 dias)	(p) = 0,007 <sup>a</sup>	(p) < 0,0001 <sup>a</sup>
2 (60 dias)	(p) = 0,0216 <sup>a</sup>	(p) < 0,0001 <sup>a</sup>
3 (90 dias)	(p) = 0,0216 <sup>a</sup>	(p) < 0,0001 <sup>a</sup>

## DISCUSSÃO

O resultado final do número de plaquetas no PRP foi dependente da contagem inicial no sangue total do animal, conforme também observado em cães por Barbosa *et al.* (2008). Quanto maior o número inicial, mais rico em plaquetas foi o PRP final. Portanto, pode-se inferir que a ocorrência de trombocitopenia ou de número pequeno de plaquetas é fator limitante para realização do procedimento.

No momento da cirurgia, a adição de soluplastin<sup>®</sup>, na proporção 2:1 (PRP/coagulante), permitiu a confecção de um gel de plaquetas consistente à semelhança do obtido por Aghaloo *et al.* (2002); Efeoglu *et al.* (2004) e Kevy e Jacobson (2004).

O crescimento ósseo centrípeto, observado no preenchimento das falhas, aos 30 dias, foi semelhante ao observado por Monteiro *et al.* (2007) que utilizaram outro fator de crescimento (proteínas morfogenéticas ósseas, BMP) associado a enxerto esponjoso, em coelhos, e enfatizaram a importância da viabilidade do osso adjacente à falha.

Ainda aos 30 dias, foi constatada similaridade quanto à quantidade de novo osso formado nas falhas controle e nas falhas tratadas com PRP. Tal resultado também foi evidenciado nos outros dois períodos estudados, grupos 2 (60 dias) e 3 (90 dias), corroborando os achados de Nunes Filho *et al.* (2007).

Nos grupos 2 e 3, nas falhas controle, observou-se a presença de tecido conjuntivo com intensa celularidade realizando o preenchimento. De maneira semelhante Okamoto e Russo (1973) observaram nas falhas controle de seu experimento, que a reparação óssea se processou a partir das bordas do osso receptor e grande parte dos espaços vazios foi preenchida por tecido conjuntivo fibroso.

O processo inflamatório observado aos 30 dias, também foi relatado nas observações feitas por Candini (2001). Esse autor afirma ter encontrado processo inflamatório sem, contudo, detalhar a presença de linfócitos, macrófagos e células gigantes multinucleadas, como encontrado no presente estudo.

O processo inflamatório observado aos 90 dias já não estava tão evidenciado, provavelmente, pela absorção do gel, ocorrida neste período nesta data. Quanto ao crescimento ósseo, tais resultados diferiram dos apresentados por Candini (2001) e Lemos *et al.* (2002), que relataram que o PRP, isoladamente, determinou resultados melhores que as falhas controle.

Em relação ao processo inflamatório identificado nas falhas que receberam o PRP aos 30 e 60 dias, considera-se que o mesmo pode ser consequência dos FCs liberados no sítio de lesão. Todo processo inicial de reparação apresenta uma fase inflamatória, com alteração do pH do meio, que se resolve dentro de 5-7 dias. Com a presença de PRP e dos FCs e citocinas que são liberadas, esse processo inflamatório torna-se mais exacerbado por que o PDGF atrai mais macrófagos e células fagocitárias multinucleadas para o local, assim como IGF, TGF- $\beta$  e demais citocinas (IL) recrutam outras células inflamatórias. Depois dessa fase, à medida que a influência do PDGF vai diminuindo e o pH vai se normalizando, os fatores de crescimento derivados dos macrófagos e o TGF- $\beta$  iniciam o recrutamento de células ósseas; justificando a reação inflamatória, a presença de células gigantes e parte do retardo no crescimento ósseo.

Aos 30 dias, a presença do coagulante soluplastin® também pode ter influenciado negativamente o preenchimento das falhas nas quais foram associados PRP e enxerto, pois verificou-se, no presente estudo, que a quantidade de novo osso formado nas falhas em que foram tratadas com enxerto de forma isolada, foram superiores e mais precoces. Para Nunes Filho *et al.* (2007), o PRP, ao formar uma rede de fibrina sobre a falha, impossibilita a migração de células ósseas para o interior do defeito, retardando o processo de cicatrização.

Outro fato que pode explicar o menor preenchimento ósseo nas falhas tratadas com PRP é que, segundo Marx (2001), as plaquetas em gel têm um curto período de vida, fragmentando-se em torno de 3 a 5 dias e a atividade de seus fatores de crescimento se extingue por volta de 7 a 10 dias. Como houve reação inflamatória identificada neste período, os efeitos desejáveis iniciais dos FCs não se manifestaram, e, desta forma, não contribuíram para o incremento do processo de reparação, sendo, portanto, o crescimento similar ao das falhas controle.

Quanto à presença das células gigantes observadas, é possível que em outros trabalhos que utilizaram metodologia semelhante de obtenção do PRP, estas células também estivessem presentes. Mas, dentre os autores compulsados, Aghaloo *et al.* (2002) realizaram seus experimentos em pacientes humanos oriundos da rotina clínica-cirúrgica em odontologia e restringiram suas conclusões aos resultados radiográficos e de quantificação celular. Consequentemente, não puderam identificar a presença ou não de células gigantes na morfologia.

Da mesma forma como apresentado por Nunes Filho *et al.* (2007), foi verificado, nesse experimento, que o PRP de forma isolada não representou um fator decisivo no processo de reparação óssea.

## CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que:

O protocolo laboratorial proposto para confecção do PRP concentrou as plaquetas, no PRP final, em todos os animais, entre 1.600.000 e 2.000.000/ $\mu$ L.

O PRP contribuiu negativamente na fase inicial da reparação, aumentando o processo inflamatório, prejudicando a precocidade de formação óssea.

Quando foram utilizados autoenxerto e PRP associado ao autoenxerto, a quantidade de osso novo formado preenchendo as falhas ósseas foi semelhante.

O enxerto ósseo esponjoso autógeno utilizado de forma isolada determina precocidade de reparação óssea.

#### AGRADECIMENTOS

O autores agradecem à CAPES e ao CNPq pelo apoio recebido. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética na pesquisa com animais do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, sob protocolo: 21/2006.

#### REFERÊNCIAS

AGHALOO, T.I.; MOY, P.K.; FREYMILLER, E.G. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: a pilot study. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.60, p.1176-1181, 2002.

AYRES, M.M.; AYRES JR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. **Bioestat 2.0**: aplicações estatísticas na área de ciências biológicas e médicas. São Paulo: USP, 2000. 252p.

BARBOSA, A.L.T.; DEL CARLO, R.J.; CASTRO GOMES, H.; OLIVEIRA, A.C.; MONTEIRO, B.S.; DEL CARLO, B.N. Plasma rico em plaquetas para reparação de falhas ósseas em cães. **Cienc. Rural**, v.38, 2008. (in press).

CANDINI A.L. **Avaliação do efeito do plasma rico em plaquetas foto-estimulado pelo laser de baixa potência no processo de regeneração óssea**. 2001. 108f. Dissertação (Mestrado). Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2001.

EFE OGLU, C.; AKÇAY, Y.D.; ERTÜRK, S. A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.62, p.1403-1407, 2004.

KEYV, S.V.; JACOBSON, M.S. Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. **J. Extra Corpor. Technol.**, v.36, p.8-35, 2004.

LEMO, J.J.; ROSSI JR, R.; PÍSPICO, R.. Utilização de plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos- proposta de um protocolo de obtenção simplificado. **Internet Health Company do Brasil S/A. Medcenter Periodontia**. Data da publicação: 07/11/2002. Disponível em: <[www.odontologia.com.br/artigos.asp?id=225](http://www.odontologia.com.br/artigos.asp?id=225)>. Acesso em: 12 jan. 2002

MAZZUCCO, L.; MEDICI, D.; SERRA, M.; PANIZZA, R.; RIVARA, G.; ORECCHIA, S.; LIBENER, R.; CATTANA, E.; LEVIS, A.; BETTA, P.G.; BORZINI, P. The use of autologous platelet gel to treat difficult-to-heal wounds: a pilot study. **Transfusion**, v.44, p.1013-1018, 2004.

MARX, R.E. Platelet-Rich Plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? **Implant Dent.**, v.10, p.225-228, 2001.

MARX, R.E. Platelet-Rich Plasma: evidence to support its use. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.62, p.489-496, 2004.

MONTEIRO, B.S.; DEL CARLO, R.J.; PINHEIRO, L.C.P.; VILORIA, M.I.V.; SILVA, P.S.A.; SOUZA, L.P.O.; BALBINOT, P.Z. . Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) associadas a osso esponjoso autógeno na reparação de falhas experimentais na calota craniana de coelhos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, p.745-751, 2007.

NUNES FILHO, D.P.; LUPPINO F.; YAEDÚ, R.Y.F.; CARVALHO, P.S.P. Avaliação microscópica da ação do osso autógeno associado ou não ao PRP em cavidades ósseas de cães. **Implant News**, v.4, p.263-269, 2007.

OKAMOTO, T.; RUSSO, M.C. Wound healing following tooth extraction. Histochemical study in rats. **Rev. Fac. Odontol. Araçatuba**, v.2, p.153-156, 1973.

ROBSON, M.C. The role of growth factors in the healing of chronic wounds. **Wound Repair Regen.**, v.5, p.12-17, 1997.

SCHULZE, H.; SHIVDASANI, R.A. Mechanisms of thrombopoiesis. **J. Thromb. Haemost.**, v.3, p.1717-1724, 2005.

**Recebido em: 06/05/2008**

**Aceito em: 16/07/2008**