

REPARO ÓSSEO UTILIZANDO ENXERTO DE MATRIZ ORGÂNICA DE OSSO CORTICAL E MEDULAR DE ORIGEM BOVINA ASSOCIADOS AO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)

SILVANA DE ANDRADE SILVESTRE DE LIMA¹, PAULA DECHICHI², NATÁSSIA CRISTINA MARTINS OLIVEIRA³, BEATRIZ VIEIRA DE PAIVA⁴, FLAVIANA SOARES ROCHA⁵, JONAS DANTAS BATISTA⁶

RESUMO

O uso do PRP é baseado na premissa de que as plaquetas representam um reservatório de fatores de crescimento que, associados aos enxertos ósseos, podem influenciar positivamente a reparação de feridas. O presente estudo teve por objetivo avaliar o reparo ósseo, em calvária de coelhos, após a utilização de enxerto de matriz óssea orgânica bovina (GenOx Org®) associada ao plasma rico em plaquetas (PRP). Para o estudo, foram utilizados 25 coelhos, sendo realizadas duas lesões em cada animal, produzindo assim 50 lesões cirúrgicas. Estas foram aleatoriamente separadas em 5 grupos iguais e preenchidas com coágulo (controle) ou matriz orgânica de osso bovino: cortical, medular, cortical com PRP, medular com PRP. Após um mês os animais foram sacrificados e as regiões enxertadas foram removidas, fixadas em formol 10% em PBS 0,1M e processadas para inclusão em parafina. Os cortes semi-seriados com 5 µm de espessura foram corados e

1. Acadêmica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia. Bolsista do Programa de Iniciação Científica do PIBIC/CNPQ/UFU 2010-2011 pelo projeto de nº BIO24/CNPQ2010. Av. Pará, nº 1720, Bloco 2B, Campus Umuarama, Uberlândia/MG, CEP: 38405-320. E-mail: silvana.limas2@gmail.com

2. Professora do Instituto de Ciências Biomédicas (Departamento de Morfologia) da Universidade Federal de Uberlândia. Av. Pará, nº 1720, Bloco 2B, Sala 2B253, Campus Umuarama, Uberlândia/MG, CEP: 38405-320. E-mail: pauladechichi@umuarama.ufu.br

3. Mestranda em Odontologia pela Universidade Federal de Uberlândia. Av. Pará, nº 1720, Bloco 2B, Sala 113, Campus Umuarama, Uberlândia/MG, CEP: 38400-902. E-mail: natassiacmo@yahoo.com.br

4. Acadêmica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia. Av. Pará, nº 1720, Bloco 2B, Campus Umuarama, Uberlândia/MG, CEP: 38405-320. E-mail: beatriz_vieira27@hotmail.com

5. Professora de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Implantodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia. Av. Pará, s/nº, Bloco 4T, Sala 2G07, Campus Umuarama, Uberlândia/MG, CEP: 38400-902. E-mail: flavianasoaresha@gmail.com

6. Professor de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Implantodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia. Av. Pará, s/nº, Bloco 4T, Sala 2G07, Campus Umuarama, Uberlândia/MG, CEP: 38400-902. E-mail: jonasdantas@yahoo.com.br

analisados ao ML. Com auxílio do programa HL Image 2005++, mediu-se da distância linear de borda a borda das lesões a fim de obter-se a porcentagem de neoformação óssea. Analisou-se os dados por meio do programa GraphPad Prism versão 5.0. No que diz respeito à porcentagem de preenchimento, não houve diferença estatística significativa ($p > 0.05$) entre os grupos pesquisados, porém observou-se que o grupo orgânico medular tanto com PRP como sem PRP apresentou valores maiores. Pode-se concluir: que os enxertos ósseos orgânicos cortical e medular de origem bovina não favoreceram significativamente a neoformação óssea em calvária de coelhos, mesmo quando associados ao PRP.

Palavras-chave: *enxerto bovino, PRP, neoformação óssea, reparo ósseo.*

BONE REPAIR USING ORGANIC MATRIX GRAFT OF CORTICAL AND MEDULLARY BONE OF BOVINE ORIGIN ASSOCIATED WITH PLATELET RICH PLASMA (PRP)

ABSTRACT

The use of PRP is based on the premise that platelets constitute a reservoir of GFs, that once released, may be associated with bone grafts and may positively influence in regulation and in the early wound healing process. The aim of the present study was to evaluate the bone healing in rabbit calvaria, after the use of bovine organic bone matrix graft (GenOx Org ®) associated with platelet-rich plasma (PRP). Two bone lesions were created in calvaria of 25 rabbits. The 50 surgical lesions were separated into 5 groups: coagulous, bovine organic bone matrix medullar and cortical with and without PRP. At the 4-week time point, the animals were euthanized, the grafted areas removed, then fixed in formalin 10% with phosphate buffered saline, 0.1 M, and embedded in paraffin, obtaining semi-serial sections 5 mm thick analyzed on the microscope. With help of the HL Image + + 2005, we performed measurement of linear distance. from edge to edge of the lesions in order to obtain the percentage of neoformation. The data were analyzed with of the pro GraphPad Prism versão 5.0. With regard to the percentage of completion, when it narrowed the distance of neoformation, there was no statistically significant difference ($p > 0.05$)

between both groups, but notes that the medullary organic group with and without PRP has shown a better result. It can be concluded that: the organic bovine bone graft did not provide a satisfactory neoformation when compared to the control group both with and without PRP.

Keywords: *bone repair, organic matrix graft, neoformation and PRP.*

INTRODUÇÃO

O osso é um tipo especializado de tecido conjuntivo, formado por um conjunto de células e por um material extracelular mineralizado, a matriz óssea. Representa o principal constituinte do esqueleto, servindo de suporte para as partes moles e protegendo órgãos vitais (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008). O tecido ósseo destaca-se, entre os tecidos altamente organizados, por ser capaz de reparar fraturas e defeitos locais mantendo a semelhança estrutural. Isso só ocorre na presença de elementos fundamentais como, células osteocompetentes, mediadores biológicos (entre eles os fatores de crescimento), matriz e suporte estrutural (CANDINI, 2001).

As células associadas ao tecido ósseo são: osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e células osteoprogenitoras. Os osteoblastos originam-se a partir das células osteoprogenitoras e são responsáveis pela síntese e secreção dos constituintes orgânicos da matriz óssea, sendo capazes também de armazenar fosfato de cálcio participando da mineralização da matriz. Quando aprisionados na matriz óssea recém-sintetizada, os osteoblastos passam a ser chamados de osteócitos, ocupando cavidades na matriz óssea, as lacunas, das quais partem canálculos que contêm prolongamentos celulares que se dirigem para outras lacunas. Através dessa rede, ocorre a comunicação tanto de osteócitos entre si, como de osteócitos e osteoblastos. Os osteócitos são imprescindíveis para a manutenção da matriz óssea, uma vez que detectam alterações físicas e químicas deste tecido, e sua morte desencadeia a reabsorção da matriz. Os osteoclastos são células gigantes, multinucleadas (de 6 a 50 núcleos), móveis com muitas projeções citoplasmáticas. Estes participam da reabsorção e remodelação do tecido ósseo e possuem uma borda irregular que se adere ao local onde será realizada a reabsorção (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008).

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 colágenas da matriz, como osteopontina, sialoproteína óssea, osteonectina e osteocalcina, perfazem os 10% restantes (TZAPHLIDOU, 2005). Além da porção orgânica, a matriz óssea é composta por uma porção inorgânica cuja composição é basicamente íons fosfato e cálcio organizados em cristais de hidroxiapatita (DALLE CARBONARE et al., 2005; TZAPHLIDOU, 2005).

Macroscopicamente, o tecido ósseo pode apresentar um arranjo trabecular delimitando pequenas cavidades preenchidas por medula óssea, caracterizando-o como osso esponjoso. O osso compacto é formado por lamelas ósseas paralelas ou concêntricas (sistema de Havers), não apresentando cavidades. Ambos apresentam arquitetura macroscópica diferente, mas possuem a mesma constituição histológica (KATCHBURIAN & ARANA, 2004).

Histologicamente, o tecido ósseo pode ser classificado em imaturo ou primário e maduro ou secundário. Os dois tipos possuem as mesmas células e os mesmos constituintes da matriz. Porém, enquanto no tecido ósseo primário as fibras colágenas se dispõem sem orientação definida, tem menor quantidade de minerais e maior porcentagem de osteócitos; no tecido ósseo secundário as fibras colágenas se organizam em lamelas que ficam paralelas umas às outras ou se dispõem em camadas concêntricas em torno de canais com vasos, formando assim o sistema de Havers ou Ósteon (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008).

As superfícies interna e externa são revestidas por células osteogênicas e tecido conjuntivo, que constituem o endóstio e o perióstio, respectivamente. Estes tecidos têm como principais funções a nutrição do tecido ósseo e o fornecimento de novos osteoblastos para o crescimento e a recuperação do osso (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008).

Apesar da rigidez e aparente inatividade, o tecido ósseo é muito dinâmico, apresentando 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 (DAVIES, 2000). Este processo é contínuo e fisiológico permitindo que o tecido ósseo se renove constantemente, responda aos estímulos externos e também sofra reparação. (Katchuburian e, Arana Chaves, 2004)

O processo de reparo tecidual pode ocorrer tanto por cicatrização como por regeneração. A regeneração é caracterizada por um processo de reparo que resulta no restabelecimento integral de forma e função original. Já na cicatrização, o restabelecimento é parcial e o reparo da ferida ocorre por um tipo de tecido diferente do tecido originalmente perdido no que diz respeito à morfologia e função. O tecido ósseo geralmente sofre reparo por regeneração, devido a sua grande capacidade de se regenerar. Durante a cicatrização óssea, os osteoclastos vão funcionar reabsorvendo osso necrótico e osso que necessita ser remodelado. Durante esse processo há os osteoblastos que derivam de 3 fontes: periosteo, endosteo e células mesenquimais indiferenciadas circundantes. Os osteoblastos depositam o osteóide que, quando mantido completamente imóvel durante todo o processo de cicatrização, torna-se uma estrutura calcificada por deposição de mineral. (PETERSON, 2000).

Quando lesado, o tecido ósseo exibe um alto potencial de regeneração passando por uma fase inflamatória inicial, seguida de reparo e posteriormente remodelação. A duração de cada fase depende de alguns fatores sendo eles: o tipo de osso envolvido, a idade do indivíduo, o estado de saúde geral e nutricional, a intensidade do trauma, se há ou não irrigação local, presença ou não de forças mecânicas, imobilização e ausência de infecção para que o tecido ósseo possa constituir um osso com capacidade de receber carga funcional. (TEN CATE, 2001). Entretanto, esta capacidade de se regenerar, pode não se manifestar em defeitos ósseos de grandes dimensões (ocasionados por defeitos congênitos, patologias ou traumas), uma vez que para haver uma concretização do processo de reparo, é fundamental a existência de uma continuidade óssea local (KAMIJOU et al., 1994; BAPTISTA et al., 2003). Nestes casos, o tecido ósseo não exibe capacidade de regeneração espontânea, exigindo procedimentos operatórios reconstrutivos, que tem na enxertia óssea sua principal técnica de tratamento (SICCA et al., 2000; SERVICE, 2000).

Os enxertos ósseos são amplamente utilizados na medicina, em cirurgias plásticas e ortopédicas (BAPTISTA et al., 2003; KHAN et al., 2005), e na odontologia, em grandes

reconstruções maxilo-mandibulares (MARX, 2001) e pequenos aumentos da altura óssea (RAGHOEBAR et al., 1996; BLAY et al., 2003), favorecendo especialidades como a periodontia, implantodontia e cirurgia bucomaxilofacial. Sua utilização favorece o processo de reparo pelo preenchimento do defeito ósseo, servindo como um arcabouço e levando à neoformação óssea por meio de três mecanismos biológicos: osteogênese, osteoindução e osteocondução.

A osteogênese é definida quando células ósseas vivas do próprio enxerto permanecem com capacidade de formação de novo tecido ósseo no leito receptor (BECKER et al., 1998; BOYNE & SHABAHANG, 2001). Osteoindução é a propriedade de formação de novo osso pelas células osteoprogenitoras do leito receptor, derivadas das células mesenquimais indiferenciadas, sob a influência de um agente indutivo do enxerto. Este mecanismo está relacionado à atividade da Bone Morphogenetic Protein (BMP), presente na matriz óssea (ANDRADE et al., 1999; UEDA, 2003). Já a osteocondução é tratada como a propriedade de produção de novo osso por proliferação e migração de células ósseas do leito receptor através da superfície do enxerto, que age como um arcabouço (GAO, et al 2006). A matriz do enxerto deve ser reabsorvida e simultaneamente substituída pelo tecido ósseo neoformado. Um material é considerado osteocondutor quando permite a aposição de um novo tecido ósseo em sua superfície, requerendo a presença de tecido ósseo pré-existente como fonte de células osteoprogenitoras (SICCA et al., 2000).

Os enxertos ósseos podem ser classificados quanto ao tipo – cortical, esponjoso ou cortico-esponjoso; à composição – orgânico ou inorgânico; e à origem – autógeno, alógeno (homógeno), xenógeno (heterógeno) ou aloplástico (CRENSHAW, 1996). O enxerto é considerado autógeno quando obtido de áreas doadoras do próprio indivíduo; alógeno quando obtidos de indivíduos da mesma espécie do receptor; xenógeno quando obtidos de indivíduos de espécies diferentes do receptor, como os materiais de origem bovina; e aloplásticos são os de origem sintética cuja composição varia entre cerâmicas, vidros bioativos e polímeros (BECKER et al., 1998; SICCA et al., 2000; BOYNE & SHABAHANG, 2001; FIGUEIREDO et al., 2004).

Atualmente, existe uma grande variedade de opções para enxertos. No entanto, os enxertos autógenos são os mais frequentemente utilizados em grandes reconstruções ósseas

devido às suas propriedades osteogênicas, osteoindutoras e osteocondutoras, apresentado melhores resultados para o processo de morfogênese óssea, tais como rápida revascularização, ausência de reação imunológica e alta osteogenicidade (BRANEMARK et al., 1975; BLAY et al., 2003)). Os enxertos alógenos possuem uma característica osteocondutora, sendo os que mais se aproximam dos enxertos autógenos, porém seu potencial osteoindutor é questionável. Já os enxertos xenógenos são osteocondutores, mas suas diferenças antigênicas são mais pronunciadas do que no enxerto homogêneo, requerendo assim um preparo mais rigoroso (ELLIS III, 1996).

Mesmo assim, tanto os enxertos autógenos como os alógenos, oferecem algumas desvantagens. No caso dos autógenos, uma porção óssea saudável deve ser danificada para a obtenção do enxerto, podendo ocasionar dor local, infecção e aumento do tempo cirúrgico, agregando ao procedimento uma maior morbidade. Além disso, a quantidade de osso é limitada, sendo muitas vezes insuficiente (FIGUEIREDO et al., 2004). Para os alógenos, uma probabilidade maior de contaminações e infecções podem ser relatadas, além de aumentar o custo do procedimento.

Desta maneira, os enxertos heterógenos apresentam-se como uma alternativa aos autógenos e homogêneos, uma vez que proporcionam ao paciente e ao cirurgião certa comodidade, pois facilitam o ato operatório já que restringem o procedimento apenas ao leito receptor, sem lesão tecidual em áreas doadoras, e não limitam a quantidade de tecido para implantação (FIGUEIREDO et al., 2004). Isto porque como o enxerto xenógeno é extraído principalmente do feto bovino, ele representa uma fonte quase que inesgotável, principalmente aqui no Brasil onde o rebanho é livre de contaminações e outras complicações, sem contar ainda o seu baixo custo (MAGALHÃES et al., 2002; SANADA et al., 2003).

A matriz óssea bovina tem sido muito utilizada, como enxerto heterógeno, em vários procedimentos clínicos apresentando principalmente propriedades osteocondutoras. Ao realizar-se o processamento do osso bovino, obtêm-se duas formulações de matriz bovina: a inorgânica e a orgânica. O material inorgânico apresenta-se livre de proteínas e células e caracteriza-se por uma grande quantidade de hidroxapatita. Já o material orgânico é caracterizado pela permanência do arcabouço proteico que é constituído praticamente de colágeno tipo I e uma pequena quantidade de fatores de crescimento, como a proteína

morfogenética óssea. Para isso o osso bovino sofre um tratamento com solventes orgânicos, álcalis e ácidos com concentração e temperatura controlada e isso leva a remoção de células, detritos celulares e inúmeras proteínas não colágenas, bem como a porção mineral (SANADA et al., 2003). Tanto os materiais xenógenos como os homogêneos podem ser submetidos à desmineralização, tornando-se osteoindutores e osteocondutores (MAGALHÃES, 2002).

A matriz bovina inorgânica é mais frequentemente utilizada por ser um material biocompatível e osteocondutor, auxiliando na reparação de defeitos ósseos pela formação de matriz óssea, bem como no levantamento de seio maxilar e aumento de rebordo (RICHARDSON et al., 1999; LUNDGREN & SLOTTE, 1999; CAMARGO et al., 2001). Entretanto, diversos estudos experimentais utilizando enxerto de matriz orgânica em fêmur (BETTI, 2004), calvária (GARCIA, 1999; BRAZ et al., 2003; MARINS et al., 2004) e seio maxilar (XU et al., 2003) de coelhos confirmam o potencial osteocondutor do biomaterial, favorecendo a angiogênese, migração e adesão celular e a neoformação óssea (BRAZ et al., 2003; BETTI, 2004). Outros estudos ainda observaram o potencial osteoindutor do biomaterial (ISAKSSON & ALBERIUS; 1992; **RABIE & LIE KEN JIE, 1996**; RABIE et al., 1999, SCHWARTZ et al., 1996; TORRICELLI et al., 2002).

No decorrer da década de 1980, pesquisas em biologia celular e molecular dedicavam-se a investigação da possibilidade de utilizar mediadores químicos para a modulação do processo de reparo dos enxertos ósseos. Muitos fatores de crescimento foram identificados, isolados, e testados em associação aos materiais de enxertia óssea na busca pela aceleração e melhoria do reparo ósseo, desenvolvendo assim uma nova modalidade terapêutica (**MOHAM & BAYLINK, 1991**; MARX,1999).

Fatores de crescimento (FCs) podem ser definidos como polipeptídios específicos presentes no plasma e em certos tecidos que regulam a diferenciação e a proliferação celular, ou seja, a reparação dos tecidos (WISLTFALK et al., 2004). O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator transformador de crescimento (TGF- β) têm merecido destaque por serem considerados iniciadores do processo de reparo dos tecidos. Fatores de crescimento e fatores de diferenciação encontrados no osso incluem PDGF, TGF- β , fator de crescimento de fibroblastos básico (FGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e proteína morfogenética óssea (BMP).

Desde sua introdução por [Whitman et al \(1997\)](#), a utilização do plasma rico em plaquetas (PRP), que atua como auxiliar do enxerto ósseo acelerando o processo de reparo, tem ganhado muita popularidade. Sua utilização é explicada pela suposição de que o PRP pode melhorar o reparo uma vez que provoca um aumento dos níveis de fatores de crescimento no local da ferida após a degranulação das plaquetas que o compõem. O PRP é uma fonte autógena e barata de FCs, preparado a partir de uma pequena quantidade de sangue retirado do próprio corpo do paciente durante o período pré-operatório ([LIEBERMAN et al., 2002](#)). Este sangue passa por um processo de separação celular por centrifugação diferencial, no qual são separadas as substâncias desejadas, possuindo em sua constituição plasma, leucócitos e plaquetas. É importante frisar que o plasma apresenta diversos fatores de coagulação ([GOLDBERG, 1997](#)), os leucócitos promovem aos agentes infecciosos e imunológicos, resistência natural, e as plaquetas sofrem degranulação nos sítios da lesão liberando os FCs ([MARX & GARG, 1999](#)).

Embora diversos estudos demonstrem um efeito benéfico da associação do PRP com enxertos autógenos no processo de reparação óssea ([MARX et al., 1999](#); [CHOI et al., 2004](#); [RAGHOEBAR et al., 2005](#)), ainda há controvérsias sobre o verdadeiro papel dos fatores de crescimento liberados por meio do uso do PRP no reparo de defeitos, inclusive com resultados desfavoráveis relatados na literatura ([AGHALLO et al., 2002](#); [CHOI et al., 2004](#); [RAGHOEBAR et al., 2005](#)). Levando-se em consideração ainda que pouco se conhece sobre a efetividade da matriz orgânica de osso bovino associada ao PRP, o objetivo deste trabalho foi avaliar o reparo ósseo, em calvária de coelhos, após a utilização de enxerto de matriz óssea orgânica bovina associada ao plasma rico em plaquetas (PRP).

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Neste estudo foram utilizados 25 coelhos albinos machos (*Oryctolagus cuniculus*), da raça Nova Zelândia, com peso entre 2000g a 3000g. Os animais foram mantidos durante o período experimental com alimentação sólida e água a vontade no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Todos os procedimentos experimentais foram

executados em conformidade com os princípios éticos do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA/UFU) sob protocolo nº067/10.

Obtenção do Plasma Rico em Plaquetas

Por meio de um escalpe à vácuo foi feita a punção na artéria auricular média, obtendo-se dois tubos de vacuotainer de 5mL cada com anticoagulante (citrato de sódio). Um tubo de cada animal foi utilizado para contagem de plaquetas e o outro tubo para a produção do PRP que foi usado na cirurgia. Para a produção do PRP, os tubos foram processados na centrífuga Excelsa modelo 206-BL-Fanem de acordo com o método Sonnleitner modificado (SANTANA, 2003).

Neste método, foram realizadas duas centrifugações, uma primeira por 20min na velocidade de 1000rpm (160G) para separar os componentes celulares vermelhos do componente sérico. Em seguida, o plasma e 2mm abaixo da linha divisória entre duas fases foi pipetado, este volume foi transferido para um tubo sem anticoagulante. Uma segunda centrifugação foi realizada por 15min na velocidade de 1600rpm (400G). A partir do fundo do frasco foi assinalada uma linha de 0,8mm acima, que corresponde ao PRP. Essa porção superior à linha assinalada foi desprezada.

Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados através de injeção intra-muscular com ketamina (25mg/Kg)/xylazina (10mg/Kg)/acepran (0,2mg/Kg)/midazolam (0,2mg/Kg) e anestésico local com 1,8ml de bupivacaína com adrenalina. Uma única dose profilática de antibioticoterapia com cefalosporina (30mg/kg) foi administrada intravenosamente.

Com os coelhos em decúbito ventral, realizou-se tricotomia da região de calota craniana a ser abordada e antissepsia com solução de povidine tópica (solução aquosa de polivinilpirrolidona a 1%), bem como isolamento da área a ser operada com campos estéreis.

O procedimento cirúrgico para a realização de craniotomia em coelhos foi dirigido por meio do protocolo descrito por (ALBERIUS et al., 1990). Por meio de uma incisão mediana na calvária do coelho, foram incisados a pele e o tecido subcutâneo, estendendo-se

do osso frontal ao occipital, realizada com lâmina intercambiável número 15 montada em cabo de bisturi número 3. O periósteo que recobre a região frontal e a sutura coronal foi incisado com cautela, elevado e rebatido lateralmente.

Em cada animal, foram produzidas duas lesões, uma no parietal direito e outra no esquerdo, usando broca trefina de 8mm de diâmetro (Figura 1A), montada em contra-ângulo sob alta rotação. As osteotomias foram realizadas sob irrigação constante e abundante com solução fisiológico a 0,9%, evitando o superaquecimento ósseo. Posteriormente, o periósteo foi reposicionado e suturado com fio de nylon 4-0 sutura simples e a pele através de sutura contínua festonada utilizando o mesmo fio.

As 50 lesões cirúrgicas foram aleatoriamente separadas em cinco grupos iguais de acordo com o quadro 01 abaixo:

Quadro 1: Lesões divididas em cinco grupos.

Grupo	Preenchimento da lesão
Grupo I (controle)	Coágulo
Grupo II	Matriz orgânica de osso cortical bovino
Grupo III	Matriz orgânica de osso medular bovino
Grupo IV	Matriz orgânica de osso cortical bovino associado ao PRP
Grupo V	Matriz orgânica de osso medular bovino associado ao PRP

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico a 2,5% (50 mg/kg) e sacrificados com dose excessiva endovenosa de cloreto de potássio a 19,1% após 30 dias da cirurgia. As calvárias foram removidas com broca 701 em alta rotação, sob irrigação abundante em soro fisiológico 0,9% e fixadas em formalina a 10% em PBS 0,1M por 48h.



Figura 1A. Osteotomia com broca trefina de 8 mm.



Figura 1B. Osteotomias nos parietais.

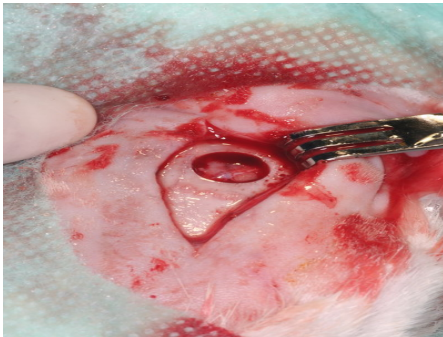


Figura 2. Defeito ósseo preenchido com coágulo.



Figura 3. Defeito ósseo preenchido com enxerto de osso orgânico



Figura 4. Defeito ósseo preenchido com enxerto de osso orgânico medular.

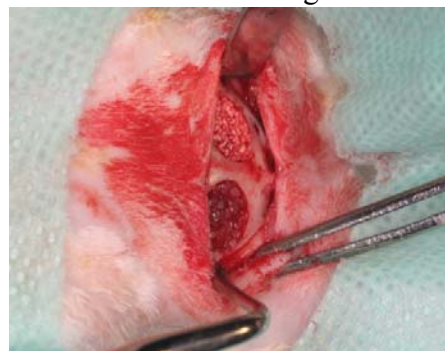


Figura 5. Defeito ósseo preenchido com ambos os enxertos.

Análise Histomorfométrica

Para a análise em microscopia de luz as peças foram descalcificadas com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 4,13% por 30 dias. Os defeitos ósseos direito e esquerdo foram separados, divididos ao meio e processados pela técnica de rotina para inclusão em parafina. As peças foram orientadas durante a inclusão de forma que o centro da lesão ficasse voltado para a face de corte do bloco (Figura 1). Com o auxílio de um micrótomo (Reichert-Jung 820II) foram obtidos cortes semi-seriados, na espessura de 5 µm. Estes cortes foram corados em Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricrômico de Mallory para análise morfológica ao microscópio de luz. De cada bloco, foram obtidas 9 lâminas histológicas, sendo 90 lâminas por grupo totalizando 450 lâminas.

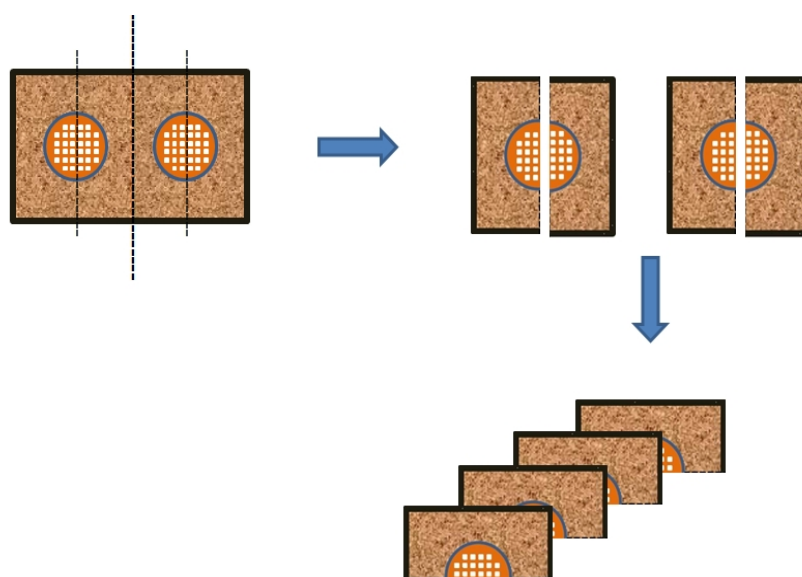


Figura 6. Desenho ilustrando a divisão das peças para inclusão em parafina.

As imagens histológicas da área da lesão foram capturadas com objetiva 4X utilizando microscópio binocular Leica 500 acoplado a câmera Leica ICC50 ligada a um computador PC através de placa digitalizadora Data Translation 3153. Com auxílio do programa Leica Application Suite LASEZ 1.8.0 (Leica Microsystems Cambridge Ltd,

United Kingdom) foram capturados tantos campos quantos necessários de forma a abranger toda a lesão de cada corte histológico (Figura 7). As imagens dos campos da lesão foram unidas (Figura 8) por meio do programa Adobe Photoshop CS5. Em seguida, com auxílio do programa HL Image 2005++, foi realizada medição da distância linear de borda a borda das lesões a fim de obter-se a porcentagem de preenchimento da neoformação óssea em relação à distância linear total (Figura 9).

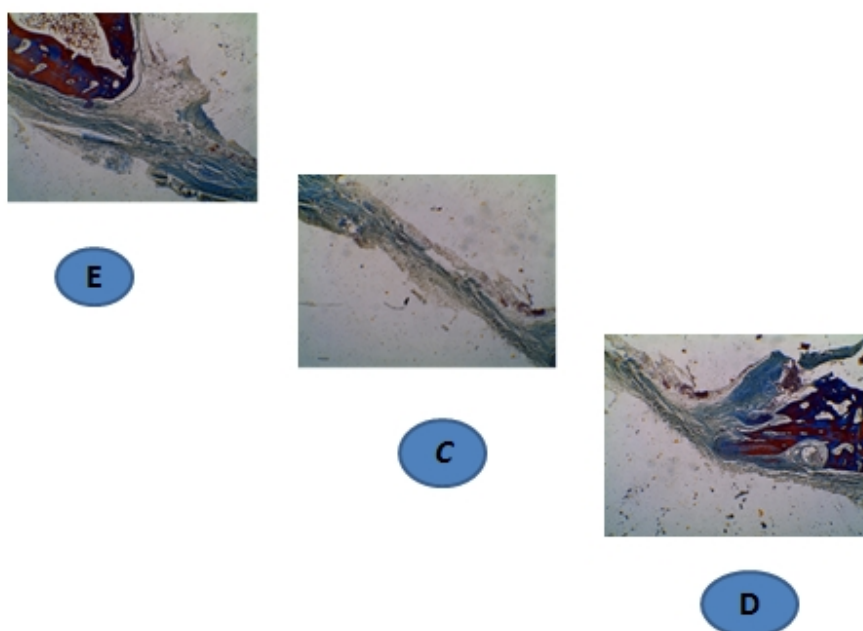


Figura 7. Imagem dos campos histológicos capturados: à esquerda (E), centro (C) e, à direita (D).

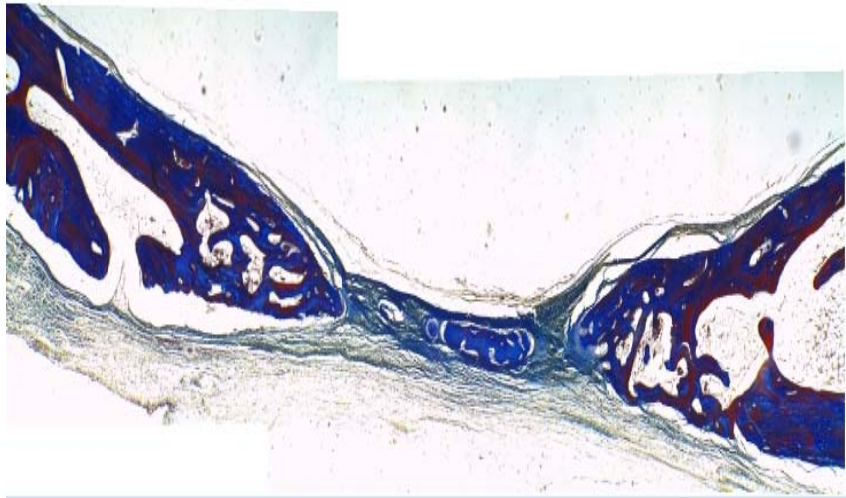


Figura 8. Imagem histológica da região da lesão posteriormente a união.

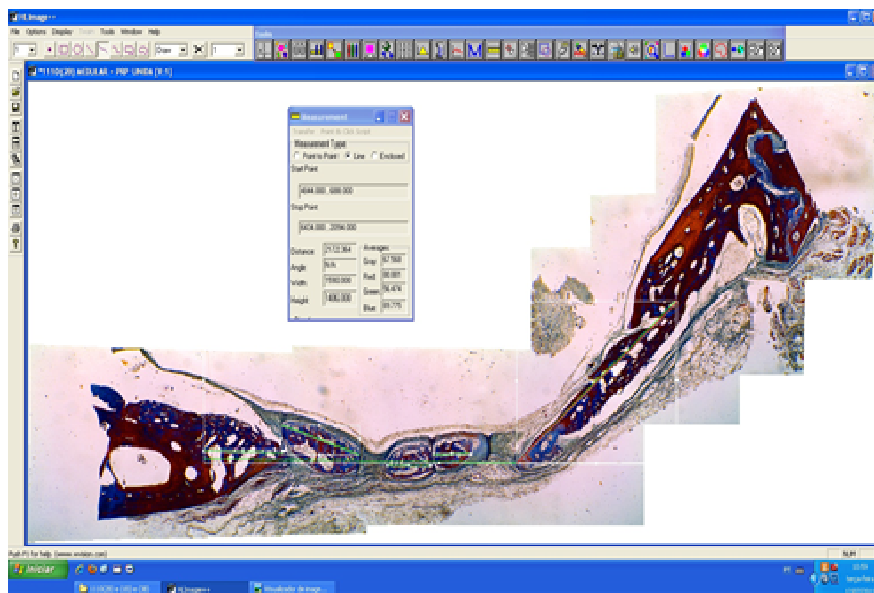


Figura 9. Quantificação da neoformação óssea, com auxílio do programa HL Image 2005++.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Prism version 5.0 for Windows, San Diego, CA, USA). Primeiramente, foi verificada a presença de normalidade utilizando o teste Kolmogorov-Smirnov. Uma vez detectada a ausência de normalidade, o preenchimento foi avaliado utilizando o teste Kruskal-Wallis com correção Dunns. O nível de significância foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

No que diz respeito à porcentagem de preenchimento, quando se delimitou a distância de neoformação, não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre os grupos pesquisados, porém observa-se que o grupo orgânico medular tanto com PRP como sem PRP demonstrou um resultado melhor. (Figura 10 e 11).

	Coágulo		Orgânico Medular		Orgânico Medular PRP		Orgânico Cortical		Orgânico Cortical PRP	
	média	DP	média	DP	média	DP	média	DP	média	DP
Distância total	5414	365,1	6047	966,4	5022	250,1	4696	334,3	5567	703,5
% preenchida	46,55	9,505	63,47	23,12	65,06	26,91	57,5	21,02	46,1	10,16
Área de neoformação	4338845500	244759	6022223000	342035	4920477000	293669	4402346000	85917	5165511000	1448799
% de neoformação	19,7	1,897	18,15	3,742	24,95	3,637	23,2	2,635	24,35	3,637
Table Analyzed	Área da neoformação									
Kruskal-Wallis test										
P value	0,0003									
Table Analyzed	Porcentagem de neoformação									
Kruskal-Wallis test										
P value	0,0087									
Table Analyzed	Distância Total									
Kruskal-Wallis test										
P value	0,0022									
Table Analyzed	Porcentagem de preenchimento									
Kruskal-Wallis test										
P value	0,2676									

Figura 10. Dados estatísticos da neoformação óssea.

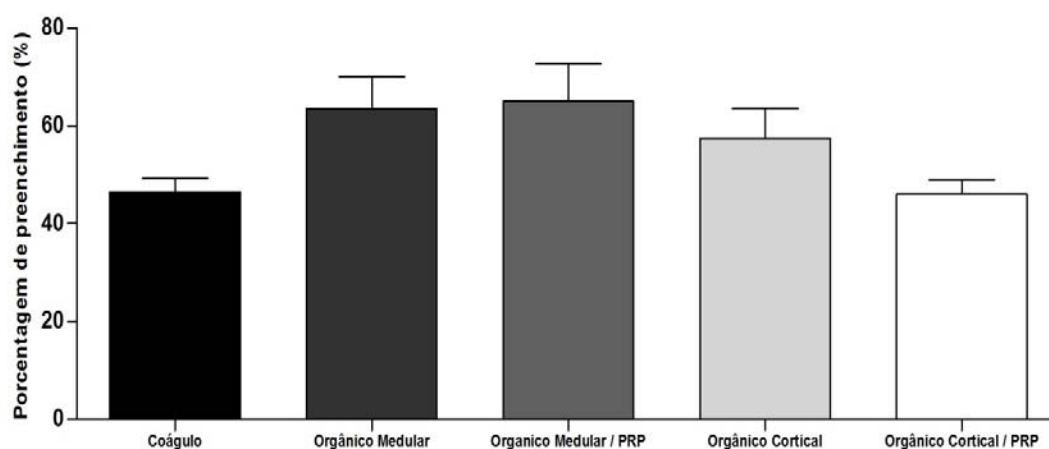


Figura 11. Gráfico da porcentagem de preenchimento.

DISCUSSÃO

O tecido ósseo apresenta propriedades que conferem ao mesmo uma excelente capacidade de regeneração. Porém quando os defeitos são muitos extensos essa capacidade de reparo pode não ser observada integralmente, sendo necessária a utilização dos enxertos. Fatores de crescimento, que podem ser obtidos por meio do PRP, têm sido associados ao enxerto ósseo com o objetivo de favorecer o reparo da lesão.

O presente estudo avaliou histomorfometricamente o reparo ósseo, em calvária de coelhos, após a utilização de enxerto de matriz óssea orgânica bovina associada ao plasma rico em plaquetas (PRP). Para a realização do experimento foi escolhido como modelo experimental o coelho. Pois, além de serem animais dos quais os pesquisadores já estão habituados a lidar, são de pequeno porte, podendo ser utilizados em experimentos que necessitam de um grande número de amostras. Os coelhos possuem o sistema harvesiano ósseo bastante semelhante com o dos humanos, o que proporciona um tipo de reparação óssea similar com a que ocorre no homem. Além de todas essas características ainda apresenta o volume necessário de sangue para a obtenção do PRP (NUNAMAKER , 1998; HILTUNEN et al.,1993 ; KIM et al., 2002). A calvária, região cirúrgica escolhida, é uma

área que possui uma boa acessibilidade, além de oferece baixa morbidade e as interferências das forças musculares são reduzidas (ALBERIUS et al., 1990).

Não houve constatação clínica de nenhum fator que viesse a interferir no reparo, como infecção, instabilidade do enxerto e deiscência. Houve certo cuidado para que não houvesse perfuração da Dura-mater e o periósteo foi mantido para que houvesse correta irrigação local (ALBERIUS et al., 1990). O sacrifício dos animais foi realizado 30 dias após a cirurgia, pois há estudos que sugerem que a ação do PRP é precoce (NAGATA et al., 2009;).

O substituto ósseo ideal deve promover a regeneração óssea sendo completamente reabsorvido simultaneamente com essa neoformação. O enxerto autógeno é considerado como o melhor material para o preenchimento dos defeitos ósseos, sendo por isso, chamado de “padrão ouro”. Isto pode ser explicado por ele apresentar características ideais como biocompatibilidade, osteoindução, osteocondução, além de possuir um potencial osteogênico (OLIVEIRA et al., 1999; SANADA et al, 2003). Porém devido aos seus inconvenientes como dor local, infecção, prolongamento do tempo cirúrgico e elevação dos custos, uma série de biomateriais foram desenvolvidos com o objetivo de buscar alternativas para o enxerto autógeno, auxiliando no processo de reparo sem, contudo, ser tão invasivo.

Comercialmente o enxerto ósseo de origem bovina difere em termos da origem de sua obtenção, podendo ser cortical ou medular (também chamado de esponjoso), sua composição, orgânica ou inorgânica, e apresentação física na forma de partículas ou blocos.

O enxerto de matriz bovina tem sido bastante utilizado como substituto ósseo e, além disso, ainda apresenta uma grande aplicabilidade na prática clínica. Ao realizar o processamento do osso bovino, obtêm-se dois tipos de materiais: o inorgânico e o orgânico. A utilização do biomaterial orgânico pode ser explicado, pois no processo de produção de enxerto ósseo orgânico a arquitetura original e as características estruturais do osso são preservadas, isso enquanto mantém a porção orgânica do mesmo, permitindo assim que o produto final atue como elemento osteocundutor no local da lesão. Sendo que, devido a sua natureza orgânica é mais rapidamente absorvido do que os xenoenxertos totalmente desproteinizados

(Orgânico GenOx Org). Betti (2004) avaliou clinicamente a utilização combinada da matriz bovina orgânica associada com bBMP, quando comparado ao enxerto autógeno, obtendo um resultado menos favorável do que o observado no enxerto autógeno.

Betti (2004) utilizando matriz orgânica desmineralizada considerou este biomaterial como um espaçador biológico eficiente no período de 30 dias, apesar do grupo coágulo ter apresentado o mesmo desempenho. No nosso estudo, a matriz orgânica também foi semelhante ao grupo coágulo, fato que indica que o biomaterial não contribuiu significativamente com o reparo da lesão.

No presente estudo, não foi observada uma diferença estatística significativa no aumento do reparo em nenhum dos grupos pesquisados. Nossos resultados contradizem os de Sanada (2003) que ao analisarem a combinação de matriz óssea orgânica bovina e hidroxiapatita, obtiveram como resultado, que a mesma não promoveu reações adversas e ainda favoreceu a reparação óssea.

Segundo os resultados obtidos, a matriz óssea bovina cortical ou medular não se mostrou como um substituto ósseo ideal. Porém durante a comparação dos grupos pode-se perceber que o grupo que apresentou um melhor resultado foi o orgânico medular com e sem PRP. A matriz orgânica medular bovina utilizada no estudo é um biomaterial constituído basicamente de colágeno tipo I, funcionando assim, como um arcabouço, promovendo a condução e migração de células osteoblásticas (DEZAGUN et al., 2001).

Assim também Marins et al (2004) avaliaram a capacidade do enxerto ósseo orgânico em bloco (Gen-ox, Baumer SA – Brasil), preparado à partir de osso medular bovino, em promover a reparação de lesões ósseas de tamanho crítico em calvária de ratos. Concluíram que ocorrendo o aprimoramento do controle de qualidade durante a produção do material, a matriz orgânica medular em bloco poderá ser uma boa alternativa para ser usada no reparo de defeitos ósseos na região buco-maxilofacial, devido a sua alta capacidade osteocondutora. Isso também foi observado por Thais Lima (2009) que realizou um estudo onde utilizou matriz orgânica de osso medular bovino. Obtendo resultados que sugerem que a utilização do biomaterial permite a reparação tecidual podendo ser utilizado como um material alternativo para o tratamento de recessões gengivais. O conjunto desses estudos,

somados aos nossos resultados, indica que, talvez aumentando a quantidade de amostras utilizadas no presente estudo a utilização da matriz orgânica medular bovina possa ser estatisticamente significativa.

No decorrer na década de 1980, os grandes laboratórios dedicavam-se a investigação da possibilidade de utilizar mediadores químicos para a modulação do processo de reparo dos enxertos ósseos. Marx et al. (1998) propuseram a utilização do PRP para obter uma mais rápida maturação do enxerto ósseo autógeno. A partir desse estudo clínico percebeu-se que o enxerto ósseo autógeno associado com PRP demonstrava como resultado um maior amadurecimento ósseo e uma maior densidade óssea quando comparados aos enxertos sem PRP. Desde então este biomaterial tem sido utilizado com sucesso em uma variedade de aplicações clínicas para melhorar a formação de tecidos duros. Entretanto outros estudos realizados relataram que o uso do PRP não apresenta nenhum benefício significativo em cirurgias de reconstrução óssea (AGHALLO et al., 2002; CHOI et al., 2004; RAGHOEBAR et al., 2005). Já outros estudos realizados demonstram que o PRP acelera o processo de reparo nas primeiras semanas porém esse efeito deixa de ser significativo após 12 semanas (NAGATA et al., 2009). Com isso pode-se perceber que há a necessidade de realizar mais estudos controlados, destinadas a aumentar a compreensão do verdadeiro papel dos FGs liberados através do PRP na cicatrização de feridas (RAGHOEBAR et al., 2005).

O uso do PRP é baseado na premissa de que as plaquetas constituem um reservatório de FG como, fator de crescimento transformador β , insulin-like factor-I de crescimento, e endotelial vascular fator de crescimento que, uma vez liberado, pode positivamente regular a cicatrização precoce de feridas (MARX, 2004; MARX, 2001)

Adelina et al. (2007) realizaram uma revisão sistemática, onde analisaram os efeitos relatados do PRP na regeneração óssea. Os autores concluíram que atualmente existe uma falta de evidências científicas na literatura odontológica a favor ou contra a utilização clínica do PRP. A grande heterogeneidade entre os estudos foi observado na revisão.

No presente estudo o PRP não influenciou no processo de reparo tanto no grupo medular como cortical. Assim como também demonstram Giovanini et al. (2010), em que sugerem que o uso PRP pode ser até desfavorável. Pois quando utilizado sozinho, o mesmo não

induziu a formação óssea craniofacial e quando usado concomitantemente com o enxerto autógeno produziu um excesso de tecido medular.

Nagata et al (2009) sugerem que o PRP acelera o processo de reparo porém esse efeito deixa de ser significativo após 12 semanas. Outros estudos anteriores também demonstram um significativo aumento da formação óssea apenas em estágios iniciais da cicatrização óssea em defeitos criados em crânio de suínos domésticos (WILTFANG e THORWARTH et al. 2005) e mandíbula de cães. No presente estudo, apesar dos animais serem sacrificados com 30 dias, não foi observada uma ação inicial do PRP. Nossos resultados contradizem também os de Schlegel (2004), que relataram um efeito significativo de aceleração da PRP na regeneração óssea precoce (2 semanas) em combinação com osso autógeno quando aplicado na área da testa de porcos. Na segunda semana, eles mostraram microradiograficamente uma taxa máxima de mineralização de 63% nos grupos com PRP e este nível de pico ocorreu duas semanas mais cedo do que no grupo que utilizou somente enxerto autógeno.

Por outro lado, nossos estudos concordam com os de Adelina et al (2007) que realizaram uma pesquisa onde investigavam o efeito inicial do PRP na regeneração óssea. Neste estudo foi promovida a combinação do PRP com um material osteocondutor. No entanto, após a 1ª e 2ª semana de implantação do PRP em defeitos cranianos de ratos, não houve diferença estatisticamente significativa na formação óssea entre o grupo com PRP e os grupos sem o PRP mesmo nos primeiros dias.

Várias explicações podem ser dadas para essa discrepância nos resultados. Em primeiro lugar, a técnica para preparar PRP e a concentração dos trombócitos adquirida pode variar. Em segundo lugar, as diferenças entre os animais utilizados (idade, raça) pode desempenhar um papel bastante significativo (ADELINA et al, 2007). Em terceiro lugar, melhores resultados com PRP são relatados quando ele é combinado com enxertos autógenos e não com materiais alogênicos (WILTFANG et al. 2004). Em quarto lugar, o uso de uma proporção específica do PRP pode acarretar diferenças de resultados. (NAGATA et al, 2009). Em quinto lugar, o protocolo de preparação adequada do PRP é fundamental para avaliar os efeitos biológicos reais do mesmo (PLACHOKOVA et al, 2008). Grageda (2004)

sugeriu uma padronização do protocolo, para futuros estudos que visam avaliar os efeitos biológicos do PRP.

Taga em 1996, afirma que a reabsorção completa do enxerto orgânico ocorre em 90 dias. No nosso estudo os animais foram sacrificados com 30 dias, o que pode ter interferido nos resultados obtidos, já que o enxerto não teve tempo de sofrer uma completa reabsorção. As controvérsias quanto à ação do PRP e os fatores que influenciam a sua eficácia poderão ser esclarecidas reduzindo as limitações metodológicas e padronizando seu método de obtenção.

CONCLUSÃO

Pode-se concluir, dentro das limitações do presente estudo, que os enxertos ósseos orgânicos cortical e medular de origem bovina não favoreceram significativamente a neoformação óssea, mesmo quando associados ao PRP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADELINA S. PLACHOKOVA A.S., DOLDER J.V.D., STOELINGA P.J., JANSEN J.A. Early effect of platelet-rich plasma on bone healing in combination with an osteoconductive material in rat cranial defects. **Clinical Oral Implants Research**, v.4, p.244-251, april. 2007.
2. AGHALOO TL, MOY PK, FREYMILLER EG. Evaluation of platelet- rich plasma in combination with xenograft materials in rabbit cranium: a pilot study. **J Oral Maxillifac Surg**. V.60, n.8, p.38-39, 2002.
3. 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**. V.82, n.1, p.22-33. 1990.

4. ANDRADE, D.P.F.A.A.; ANDRADE, P.J.M.; STAUDT. R.C. Principais doenças incidentes na cultura do algodoeiro, na região de Chapadão do Sul, MS. **Congresso Brasileiro DE Fitopatologia**, Curitiba v.32, p.362-363, 1999.
5. BAPTISTA, A.D.; SORNILHA, A.; TORMES, T.A.de M.; ABDOUNE, Y.A.; CROCI, A.T.; CAMARGO, O.P.de; OLIVEIRA, C.R.G.C.M.de. Estudo histológico dos enxertos ósseos homólogos humanos. **Acta Ortop Bras.**, v.11, n.4, p.220-24, 2003.
6. BECKER, T.S., BURGESS, S.M., AMSTERDAM, A.H., ALLENDE, M.L., AND HOPKINS, N. not really finished is crucial for development of the zebrafish outer retina and encodes a transcription factor highly homologous to human Nuclear Respiratory Factor-1 and avian Initiation Binding Repressor. **Development** n.125, p.4369-4378. 1998.
7. BETTI LV. Análise Microscópica e Radiográfica do Reparo de Defeitos Confeccionados em Fêmures de Coelho Preenchidos com Matriz Óssea Bovina Medular em Bloco ou Cortical em Microgrânulos. Tese (doutorado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2004.
8. BLAY, A.; TUNCHEL, S.; SENDYK, W.R. Viability of autogenous bone grafts obtained by using bone collectors: histological and microbiological study. **Pesqui Odontol Bras.**, v.17, n.3, p.234-40, 2003.
9. BRAZ F, RAHAL SC, ROCHA NS, TAGA E, BIASI F. Emprego de matriz óssea orgânica bovina e hidroxiapatita no reparo de defeito induzido em crânio de ratos. **Acta Cir Bras.**, v.18, n.1, 2003 [serial online].
10. BRANEMARK, P-I; LINDSTROM, J.; HALLEN, O.; BRONE, V.; JEPPSON, P-H.; OHMAN, A. Reconstruction of the defective mandibulaible. **Scan J Plast Reconstr Surg**, v.9, p.116-128, 1975.
11. BOYNE PJ, SHABAHANG S. An evaluation of bone induction delivery materials in conjunction with root-form implant placement. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v.21, n.4, p.333-343, 2001.
12. 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 em Odontologia) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos.

13. CAMARGO, P.M.; LEKOVIC, V.; WEINLAENDER, M.; VASILIC, N.; KENNEY, E.B.; MADZAREVIC, M. The effectiveness of enamel matrix proteins used in combination with bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects in humans. **J Clin Periodontol.** v. 28, p. 1016-1022, 2001.
14. 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**, v.33, n.9, 2004.
15. CRENSHAW A.H. Técnicas cirúrgicas. In: CRENSHAW A.H. **Cirurgia ortopédica de Campbell**. 8a. ed. Sao Paulo: Manole, 1996. p.13-17.
16. DALLE CARBONARE L, GIANNINI S. Bone microarchitecture as an important determinant of bone strength. **J Endocrinol Invest.** n.27, p.99-105.2005.
17. DAVIES JE. Histodynamics of endosseous wound healing. **Bone Engineering**. Toronto. V.33 P.435-440, 2000.
18. DEZAGUN EZ. Long- term outcome of xenogenic dermal matrix implantation in immunocompetent rats. **J Surg Res.** v.96, p. 96-106. 2001.
19. ELLIS III E. Cirurgia oral e maxilofacial contemporâneas. Rio de janeiro: Guanabara. P. 583-605, 1996.
20. FIGUEIREDO, A.S.; FAGUNDES, D.J.; NOVO, N.F.; INOUE, C.M.; TAKITA, L.C.; SASSIOTO, M.C.P. Osteointegração de osso bovino desvitalizado, hidroxiapatita de coral, poliuretana de mamona e enxerto ósseo autógeno em coelhos. **Acta Cir Bras**; v.19, n.4, Jul-Aug, 2004.
21. GARCIA R.R. **Comparação de matrizes ósseas desmineralizadas sobre o processo de regeneração óssea. Estudo Histológico em calvárias de coelhos.** Dissertação (mestrado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 1999.
22. GAO Y, CAO WI, WANG XY, GONG YD, TIAN JM, ZHAO NM. Characterization and osteoblast- like cell compatibility of porous scaffolds: bovine hydroxyapatite and novel hydroxyapatite artificial bone. **J Mater Sci Mater Med.** v.17. n. 9, p. 813-823, 2006.
23. GIOVANNI A.F., DELIBERADOR T.M., GONZAGA. C.C., FILHO O.A.M., GOHRINGER I., KUCZERA J., ZIELAK J.C.,URBAN C.A. Platelet-rich plasma

diminishes calvarial bone repair associated with alterations in collagens matrix composition and elevated CD34+ cell prevalence. **Journal homepage**, 39(4):371-8, Feb. 2010.

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

25. GOLDBERG, S. Descomplicando a fisiologia. **Tratado de fisiologia médica**. 8.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. p.61-65.

26. HILTUNEN, HYOTY, H., M., KNIP, M. A prospective study of the role of coxsackie B and other enterovirus infections in the pathogenesis of IDDM. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. **Diabetes**, n .44:p. 652-657, 1993.

27. ISAKSSON S, ALBERIUS P. Comparison of regenerations capacity elicited by demineralized bone matrix of different embryonic origins. **J Craniomaxillofac Surg.**, v.20, p.73. 1992.

28. JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara. 2008. 136-53 p.

29. KATCHUBURIAN E, ARANA CHAVES J. **Histologia e embriologia oral**. Rio de Janeiro: Guanabara. 2004.

30. KHAN, S.N.; CAMMISA-Jr., F.P.; SANDHU, H.S.; DIWAN, A.D.; GIRARDI, F.P.; LANE, J.M. The biology of bone grafting. **Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v.13, n.1, p. 77-86, 2005.

31. KAMIJOU, WANDERS RJA, SAUDUBRAY JM, AOJAMA T. Mitochondrial trifunctional protein deficiency. Catalytic heterogeneity of the mutant enzyme in two patients. **J Clin Invest** n.93, p.1740–1747. 1994.

32. KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e Embriologia Oral**. 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

33. KIM SG, KIM WK, PARK JC, KIM HJ. A comparative study of osseointegration of Avana implants in a demineralized freeze-dried bone alone or with platelet-rich plasma. **J Oral Maxillofac Surg**. v.60, n.9, p. 1018-1025, 2002.

34. LIEBERMAN, J.R. The hole of growth factors in the repair bone. **J Bone Joint Surg**, v.84, n.6, p.1032-1042, 2002.

35. LUNDGREN, D.; SLOTTE, C. Reconstruction of anatomically complicated periodontal defects using a bioresorbable GTR barrier supported by bone mineral. A 6-month follow-up study of 6 cases. **J Clin Periodontol.** v.26, p.56-62, 1999.
36. MAGALHÃES, D., MENEZES, H.H.M., TAGA, M. Perspectivas atuais na utilização dos biomateriais em regeneração periodontal. **Revista do Conselho Regional de Odontologia de Minas Gerais**, v.8, n.1, p.9-15, 2002.
37. MARINS LV, CESTARI TM, SOTTOVIA AD et al. Estudo radiográfico e histológico do reparo de defeito ósseo perene em calvária de rato após o tratamento com material de enxerto orgânico bovino poroso. **J. Appl. Oral Sci.**, v.12, n.1, p.62-69, 2004.
38. MARX R.E. Platelet-Rich Plasma (PRP): what is PRP and What is not PRP? **Implant Dent.** v.10, p.225-228, 2001.
39. MARX, R.E. Platelet-Rich Plasma: A Source of Multiple Autologous Growth Factors for Bone Grafts. In: LYNCH, S.E.; GENCO, R.J.; MARX,R.E. – **Tissue Engineering.** Illinois, Quintessence, p.71-101, 1999.
40. MARX, R.E.; GARG, A.K. Bone graft physiology with use of platelet-rich plasma and hiperbaric oxygen. The sinus bone graft. Colorado: Quintessence, 1999. p.183-189.
41. MARX, R.E. Platelet-rich plasma: evidence to suport its use. **J Oral Maxillofac Surg**, v.62, p.489-496, 2004.
42. MARX S.J. Multiple endocrine neoplasia type 1 B. Vogelstein, **The Genetic Basis of Human Cancer**, McGraw Hill, New York, p.489–506, 1998.
43. THORWARTH MICHAEL, STEFAN SCHULTZE-MOSGAU, PETER KESSLER, JOERG WILTFANG, KARL ANDREAS SCHLEGEL Bone Regeneration in Osseous Defects Using a Resorbable Nanoparticulate Hydroxyapatite, **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery** .V. 63,n. 11, p.1626-1633, 2005.
44. MOHAN S, BAYLINK DJ. Bone growth factors. **Clin Orthop Relat Res.** p.30-48, 1991.
45. NAGATA M.J.H., MELO L.G.N., MESSORA M.R., BOMFIM S.R.M., FUCINI S.E., GARCIA V.G., BOSCO A.F., OKAMOTO T. Effect of platelet-rich plasma on bone

healing of autogenous bone grafts in critical-size defects. **Journal of Periodontal Research**, 2009; v.36, p.775–783, jun. 2009.

46. NUNAMAKER DM. Experimental model of fracture repair. **Clin Orthop Relat Res**. P.56-65, 1998.

47. OLIVEIRA, R.C., SICCA A, C.M., SILVA, T.L et al. Efeito da temperature de desproteinização no prepare de osso cortical bovino microgranular : avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular em subcutâneo de ratos. **Rev Fac Odontol Bauru**. v.7(¾): .p.85-93. 1999.

48. PLACHOKOVA, A. S., NIKOLIDAKIS, D., MULDER, J.,JANSEN, J. A. AND CREUGERS, N. H. J. (2008), Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in dentistry: a systematic review. **Clinical Oral Implants Research**, v.19, p.539–545, 2008.

49. PETERSON, L. J. Reparação das feridas. In: HUPP, J. R. **Cirurgia Oral Maxilofacial Contemporânea**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 57-67.

50. RABIE A.B.M., WONG R.W.K., HÄGG U. Bone induction using autogenous bone mixed with demineralized bone matrices. **Aust. Orthodont. J.**, v.15, n.5, p.269-75, 1999.

51. RABIE ABM, LIE KEN JIE RK. Integration of endochondral bone grafts in the presence of demineralized bone matrix. **Int J Oral Maxillofac Surg**. V.25, p.308-311, 1996.

52. RAGHOEBAR GM, BATENBURG RH, VISSINK A, REINTSEMA H. Augmentation of localized defects of the anterior maxillary ridg with autogenous bone before insertion of implants. **J Oral Maxillofac Surg**. n.54, v.10, p.1185-1186, 2005.

53. RAGHOEBAR, G. M. Augmentation of localized defects of the anterior maxillary ridge with autogenous bone before insertion of implants. **J Oral Maxillofac Surg**, v.54,n.10, p.1180-1186, 1996.

54. RICHARDSON, C.R.; MELLONIG, J.T.; BRUNSVOLD, M.A.; MCDONNELL, H.T.; COCHRAN, D.L. Clinical evaluation of Bio-Oss®: a bovine-derived xenograft for the treatment of periodontal osseous defects in humans. **J Clin Periodontol**. v. 26, p. 421-428, 1999.

55. SANADA, I.T., CANOVA G.C., CESTARI, T.M. et al. Análise histológica, radiográfica e do perfil de imunoglobulinas após implantação de enxerto de osso esponjoso bovino desmineralizado em bloco em músculo de ratos. **Journal of Applied Oral Science**, v.11,n.3,p. 209-215, 2003.
56. SANTANA, S.I. Processo de reparo de cavidade óssea cirúrgica preenchida ou não com plasma rico em plaquetas: estudo radiográfico em calvária de coelhos. Uberlândia – MG: Fac. de Odontologia da Univ. Federal de Uberlândia – FOUFU, p.103, 2003.
57. SCHWARTZ Z. Ability of Commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. **J Periodont.**, v.67, n.9, p.918-926, 1996.
58. SERVICE, R.F. Tissue engineers build new bone. **Science**, v. 289, n.5484, p.1498-500, 2000.
59. SICCA, C.M.; OLIVEIRA, R.C. de; SILVA, T.L. da; CESTARI, T.M.; OLIVEIRA, D.T.; BUZALAF, M.A.R.; TAGA, R.; TAGA, E.M.; GRANJEIRO, J.M.; KINA, J.R. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos. Efeito tamanho da partícula. **Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru - FOB**, v. 8, n.1-2, p.1-10, 2000.
60. TAGA R. Biomateriais para uso em clínica Médico – Odontológica. Revista Brasileira Cir. Implantodontia Jul/Agos: 59-69, 1996.
61. THAIS LIMA C, MAGALHÃES D. Matriz orgânica de ossp medular bovino utilizada como alternativa no tratamento das recessões gengivais: avaliação histológica em cães. Dissertação de mestrado. 2010.
62. TEN CATE, A. R. **Histologia Bucal**. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2001, p. 95-111.
63. TORRICELLI P. et al. Characterization of bone defect repair in young and aged rat femur induced by xenogenic demineralized bone matrix. **J Periodont.**, v.73, n.9, p.1003-9, 2002.

64. TZAPHLIDOU, M., SPELLER, R., ROYLE, G., GRIFFITHS, J., OLIVO, A., PANI, S., LONGO, R.,. High resolution Ca/P maps of bone architecture in 3D synchrotron radiation microtomographic images. **Applied Radiation and Isotopes** v.62, p.569–575. 2005.
65. UEDA, M. Maxillofacial bone regeneration using tissue engineering concepts. **Dentistry in Japan**, v.39, p.199-207, 2003.
66. XU H, SHIMIZU Y, ASAI S, OOYA, K. Experimental sinus bone grafting with the use of deproteinized bone particles of different sizes. **Clin Oral Impl Res.**, v.14, p.548-555, 2003.
67. WHITMAN DH, BERRY RL, GREEN DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue whit applications in oral and maxillofacial sugery. **J Oral Maxillofac Surg.** n.55, v.11, p.1294-1299, 1997.
68. WILTFANG, J. Effects of platelet-rich plasma no bone healing in combination wih autogenous bone and bone substitutesin critical-size defects. **Clin Oral Implant Res**, v.15, p.187-193, 2004.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPQ (Projeto: BIO24/CNPQ2010) pelo apoio financeiro na forma de bolsa de iniciação científica.