

A proporção plasma rico em plaquetas/enxerto ósseo autógeno pode influenciar o reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico: um estudo radiográfico em calvária de ratos

Maria José Hitomi NAGATA^a, Michel Reis MESSORA^b, Natália de CAMPOS^a,
Natália Marcumini POLA^a, Leda Maria Pescinini SALZEDAS^c, Suely Regina Mogami BOMFIM^d,
Paula Lazilha FALEIROS^a, Carolina dos Santos SANTINONI^a,
Alvaro Francisco BOSCO^a, Valdir Gouveia GARCIA^a

^aDepartamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Faculdade de Odontologia,
UNESP – Univ Estadual Paulista, 16015-050 Araçatuba - SP, Brasil

^bDepartamento de Cirurgia e Traumatologia Bucocomaxilofacial e Periodontia,
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto,
USP – Universidade de São Paulo, 14040-904 Ribeirão Preto - SP, Brasil

^cDepartamento de Patologia e Propedêutica Clínica, Faculdade de Odontologia,
UNESP – Univ Estadual Paulista, 16015-050 Araçatuba - SP, Brasil

^dDepartamento de Clínica e Cirurgia e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária,
UNESP – Univ Estadual Paulista, 16050-680 Araçatuba - SP, Brasil

Nagata MJH, Messoria MR, Campos N, Pola NM, Salzedas LMP, Bomfim SRM, Faleiros PL, Santinoni CS, Bosco AF, Garcia VG. The proportion platelet-rich plasma/particulate autogenous bone graft may influence bone healing in critical-size defects: a radiographic study in rat calvaria. Rev Odontol UNESP. 2011; 40(6): 325-331.

Resumo

Introdução: Tem sido sugerido que enxertos ósseos associados ao Plasma Rico em Plaquetas (PRP) cicatrizam com maior densidade que os enxertos sem PRP. Contudo, esse resultado parece depender da proporção PRP/enxerto ósseo utilizada. **Objetivo:** O propósito deste estudo foi avaliar, radiograficamente, a influência da proporção PRP/enxerto de Osso Autógeno (OA) no reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico (DTCs) criados cirurgicamente em calvárias de ratos. **Material e método:** Cinquenta ratos foram divididos em cinco grupos: C, OA, OA/PRP-50, OA/PRP-100 e OA/PRP-150. Um DTC de 5 mm de diâmetro foi criado na calvária de cada animal. No Grupo C, o defeito cirúrgico foi preenchido somente com coágulo sanguíneo. No Grupo OA, o defeito foi preenchido com enxerto de OA particulado. Nos grupos OA/PRP-50, OA/PRP-100 e OA/PRP-150, o defeito foi preenchido com enxerto de OA particulado associado a 50, 100 ou 150 µL de PRP, respectivamente. Os animais foram eutanasiados aos 30 dias pós-operatórios. Imagens radiográficas padronizadas das calvárias foram obtidas com o sistema Digora (Soredex, Finlândia). As imagens foram avaliadas por três examinadores por meio de escores, que indicaram o percentual de radiopacidade dos defeitos. Os escores obtidos foram submetidos ao Teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). **Resultado:** O Grupo C apresentou radiopacidade significativamente menor que os grupos OA, OA/PRP-50, OA/PRP-100 e OA/PRP-150 ($p < 0,05$). O Grupo OA/PRP-50 apresentou radiopacidade significativamente maior que os grupos OA/PRP-100 e OA ($p < 0,05$). **Conclusão:** Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que a proporção PRP/enxerto de OA influencia a cicatrização de DTCs criados em calvárias de ratos.

Palavras-chave: Regeneração óssea; fator de crescimento; plaquetas; radiografia.

Abstract

Introduction: It has been suggested that bone grafts combined with platelet rich plasma (PRP) present greater density than bone grafts without PRP after healing process. However, this result may depend on proportion PRP/autogenous bone (AB) graft used. **Objective:** The purpose of this study was to analyze radiographically the influence of the proportion PRP/particulate autogenous bone (AB) graft on bone healing in surgically created critical-size defects (CSD) in rat calvaria. **Material and method:** 50 rats were divided into 5 groups: C, AB, AB/PRP-50, AB/PRP-100 and AB/PRP-150. A 5 mm diameter CSD was created in the calvarium of each animal. In Group C the defect was filled by blood clot only. In Group AB the defect was filled with 0.01 mL of AB graft. In groups AB/ RP-50,

AB/PRP-100 and AB/PRP-150 the defects were filled with 0.01 mL of AB graft combined with 50, 100 and 150 μ L of PRP, respectively. All animals were euthanized at 30 days post-operative. Standardized radiographic images of the rat calvaria were obtained using Digora System (Soredex, Finland). The images were evaluated by three examiners using scores that indicated the percentage of radiopacity of the defect. The obtained data were subjected to statistical analysis (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$). **Result:** Group C presented radiopacity significantly lower than groups AB, AB/PRP-50, AB/PRP-100 and AB/PRP-150. Group AB/PRP-50 showed radiopacity significantly greater than groups AB/PRP-100 and AB. **Conclusion:** It can be concluded that the proportion PRP/AB graft influences bone healing in CSD in rat calvaria.

Keywords: Bone regeneration; growth factors; platelets; radiography.

INTRODUÇÃO

Atualmente, abordagens terapêuticas clinicamente estabelecidas para o tratamento de defeitos de tamanho crítico incluem autoenxertos, aloenxertos e materiais artificiais utilizados isolados ou em associação com o enxerto ósseo. No entanto, essas técnicas possuem suas desvantagens: os autoenxertos geralmente oferecem suprimento de tecido insuficiente, resultando em morbidade do sítio doador. Os aloenxertos podem resultar em rejeição imunológica e inflamação. Felizmente, a engenharia tecidual tem sido bastante explorada, com a finalidade de superar essas restrições¹.

Uma das biotecnologias que têm se destacado nos últimos anos é o Plasma Rico em Plaquetas (PRP)². A racionalidade para o uso local do PRP está, sobretudo, no aumento do nível de fatores de crescimento no sítio da ferida após a degranulação plaquetária³. Estudos in vivo e in vitro da ação isolada desses fatores concluíram que os mesmos são potenciais agentes terapêuticos para acelerar o reparo de defeitos ósseos^{2,4}.

Sob o ponto de vista da aceitação biológica, o enxerto ósseo autógeno é considerado “padrão ouro” nos procedimentos regenerativos, sendo o que apresenta melhor prognóstico⁵⁻⁸. A possibilidade de aumentar o potencial osteogênico desses enxertos foi demonstrada de maneira promissora por Marx et al.³. Eles avaliaram, em 88 pacientes, a combinação de PRP e enxertos ósseos medulares no tratamento de defeitos mandibulares contínuos, com 5 a 6 cm, resultantes da remoção de tumores benignos e malignos. Os resultados deste estudo mostraram uma maturação mais rápida dos enxertos com PRP (1,16 a 2,16 vezes), bem como uma maior densidade óssea dos mesmos quando comparados aos enxertos sem PRP.

Enquanto vários estudos evidenciaram os benefícios do PRP combinado com enxertos de osso autógeno^{3,9} no processo de cicatrização de defeitos ósseos, outros estudos não encontraram nenhuma vantagem referente ao uso dessa associação^{10,11}. Tentando compreender esses diferentes resultados, Choi et al.¹² investigaram os efeitos de variadas concentrações de PRP sobre osteoblastos in vitro. Estes autores observaram que altas concentrações de PRP podem suprimir o crescimento celular, sendo as amostras com mais de 30% de PRP consideradas citotóxicas. Os autores inferiram, então, que a relação entre o volume de PRP e a quantidade de enxerto ósseo poderia influenciar os resultados dos procedimentos regenerativos. Nagata et al.⁹ demonstraram que a proporção PRP/enxerto de

ósseo autógeno influencia a expressão das proteínas osteopontina e osteocalcina durante o processo de cicatrização de defeitos de tamanho crítico, criados cirurgicamente em calvárias de ratos.

Os estudos que avaliaram a influência do PRP combinado com enxertos de osso autógeno no processo de reparo ósseo utilizaram diferentes volumes de PRP. Marx et al.³ usaram aproximadamente 70 mL de PRP, produzido a partir de 400 a 450 mL de sangue, e misturaram com osso autógeno para o tratamento de defeitos mandibulares com 50 mm de diâmetro ou mais. Robiony et al.¹³ e Mazor et al.¹⁴ usaram 8 mL de PRP em seus estudos clínicos. Em estudos experimentais em animais, diversos volumes de PRP foram utilizados em coelhos¹⁵ e ovelhas¹⁰.

Nota-se, portanto, que a influência da proporção de PRP e osso autógeno no processo de reparo ainda não foi avaliada apropriadamente. Essas proporções parecem ter sido empiricamente escolhidas em todos os estudos realizados até o presente momento. Tendo em vista a carência de pesquisas nesse campo, o propósito deste estudo foi avaliar, radiograficamente, a influência da proporção PRP/enxerto de osso autógeno no reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico criados cirurgicamente em calvárias de ratos.

MATERIAL E MÉTODO

1. Modelo Experimental

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP. Foram utilizados 50 ratos machos (*Rattus norvegicus, albinus*, Wistar), com idade entre 5 e 6 meses, pesando entre 450 e 500 g (UNESP, Biotério da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba-SP). Eles foram aleatoriamente divididos em cinco grupos experimentais: Grupo C (Controle), Grupo OA, Grupo OA/PRP-50, Grupo OA/PRP-100 e Grupo OA/PRP-150.

2. Procedimento Cirúrgico

Os ratos foram anestesiados por injeção intramuscular de xilazina (6 mg.kg⁻¹ de peso corporal) e quetamina (70 mg.kg⁻¹ de peso corporal). Após preparação asséptica, uma incisão semilunar foi feita na região anterior da calvária, permitindo rebater um retalho de espessura total em direção posterior. Um defeito de tamanho crítico (DTC) de 5 mm de diâmetro foi criado com

uma trefina acoplada em uma peça de mão de baixa rotação, sob contínua irrigação com solução salina estéril. O defeito incluiu uma porção da sutura sagital.

Com auxílio de um guia cirúrgico previamente confeccionado, uma marcação no formato de "L" foi feita 2 mm anterior e outra 2 mm posterior às margens do defeito cirúrgico. O maior eixo de cada "L" localizou-se sobre uma linha imaginária longitudinal craniocaudal que dividia o defeito cirúrgico ao meio. As marcações foram feitas com uma broca carbide troncocônica sob irrigação contínua com solução salina estéril e, posteriormente, preenchidas com amálgama². Essas marcações foram úteis para a identificação do defeito cirúrgico original (Figura 1).

No Grupo C, o defeito cirúrgico foi preenchido somente com coágulo sanguíneo. No Grupo OA, ele foi preenchido com 0,01 mL de enxerto ósseo autógeno particulado. Nos grupos OA/PRP-50, OA/PRP-100 e OA/PRP-150, o defeito cirúrgico foi preenchido com 0,01 mL de enxerto ósseo autógeno particulado associado a 50 (OA/PRP proporção = 1/5), 100 (OA/PRP proporção = 1/10) ou 150 μ L (OA/PRP proporção = 1/15) de PRP, respectivamente. O osso autógeno obtido da calvária durante a criação do defeito cirúrgico foi preparado em um triturador ósseo. O osso foi particulado em tamanhos que variavam de 172 a 210 μ m. Os tecidos moles foram, então, reposicionados e suturados para se obter um fechamento primário da ferida. Cada animal recebeu uma injeção intramuscular de 24.000 unidades de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico* Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge® Saúde Animal Ltda., Campinas-SP).

3. Preparo do PRP e Contagem das Plaquetas

Foram coletados 3,15 mL de sangue de cada animal, via punção cardíaca, em uma seringa descartável contendo 0,35 mL de citrato de sódio a 3,2%, para prevenir a coagulação. O sangue coletado foi, inicialmente, centrifugado a 160 G por 20 minutos, à temperatura ambiente (22 °C), para separar o plasma contendo as plaquetas das células vermelhas. O plasma foi pipetado e centrifugado a 22 °C por mais 15 minutos a 400 G, para separar as plaquetas. O Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) foi pipetado do topo, deixando o PRP e o *buffy coat*, que foram então ressuspensos. O PRP foi ativado no momento da aplicação clínica (0,05 mL de cloreto de cálcio para cada 1 mL de PRP).

4. Contagem das Plaquetas

O líquido de Brecher foi utilizado para lisar os eritrócitos e diluir as amostras de sangue periférico e PRP. As plaquetas nas amostras diluídas de sangue periférico e PRP foram contadas manualmente em câmara de Neubauer. Os esfregaços de sangue periférico e PRP foram corados com Panótico Rápido LB (LaborClin, Pinhais-PR, Brasil), para avaliar a morfologia das plaquetas. A contagem das plaquetas e a análise da sua morfologia foram feitas por um veterinário hematologista.

5. Processamento Tecidual

Os animais foram submetidos à eutanásia aos 30 dias pós-operatórios. A área do defeito cirúrgico original e os tecidos circunjacentes foram removidos em bloco. As peças foram fixadas em solução de formol neutro a 10%.

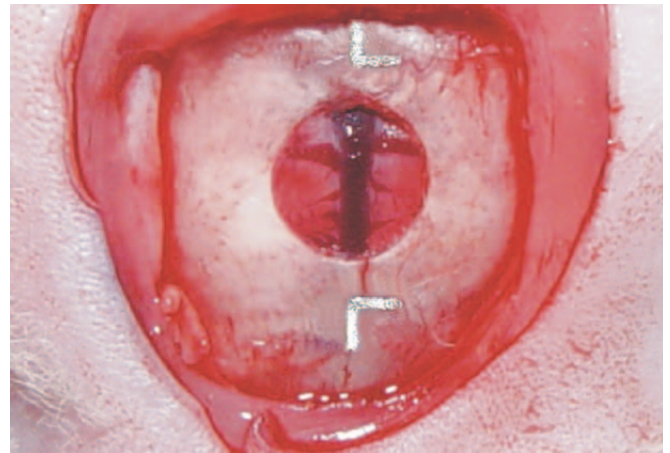


Figura 1. Defeito de tamanho crítico e marcações com amálgama criadas na calvária.

6. Análise Radiográfica

Imagens radiográficas padronizadas da calvária dos animais foram obtidas usando-se um aparelho de raio X (70 kVp, 10 mA, 12 impulsos – General Electric Company, Milwaukee, WI, EUA) e uma placa óptica de fósforo (Digora system, Soredex/Orion Corp., Helsinki, Finlândia). Os espécimes foram posicionados de maneira que o longo eixo do defeito cirúrgico ficasse paralelo à placa. O cilindro do raio X foi então posicionado perpendicularmente à placa e, conseqüentemente, ao defeito cirúrgico. A distância focal entre a fonte de raio X e as placas foi padronizada em 40 cm para todos os espécimes. A digitalização das placas ópticas de fósforo foi realizada imediatamente após a exposição ao raio X, usando-se o escaner do sistema Digora (Digora system, Soredex/Orion Corp., Helsinki, Finlândia). As imagens digitais foram analisadas no programa do mesmo sistema. A distinção entre os tecidos mineralizados e não mineralizados foi realizada para cada defeito por meio de avaliação visual de cada imagem por três examinadores calibrados e cegos ao tratamento realizado. Os defeitos foram classificados de acordo com os seguintes critérios, estabelecidos por Pryor et al.¹⁶:

As imagens digitais foram analisadas no programa do mesmo sistema. A distinção entre os tecidos mineralizados e não mineralizados foi realizada para cada defeito por meio de avaliação visual de cada imagem por três examinadores cegos ao tratamento realizado. Quando a classificação do defeito não era unânime, o defeito era reavaliado para que um consenso entre dois ou três examinadores fosse atingido.

Os defeitos foram classificados de acordo com os seguintes critérios, estabelecidos por Pryor et al.¹⁶:

0 = o defeito apresenta 0 a 25% de sua área total com imagem radiopaca visível, compatível com tecido ósseo mineralizado;

1 = o defeito apresenta 25,1 a 50% de sua área total com imagem radiopaca visível, compatível com tecido ósseo mineralizado;

2 = o defeito apresenta 50,1 a 75% de sua área total com imagem radiopaca visível, compatível com tecido ósseo mineralizado;

3 = o defeito apresenta 75,1 a 100% de sua área total com imagem radiopaca visível, compatível com tecido ósseo mineralizado.

7. Análise Estatística

A reprodutibilidade agrupada para a análise radiográfica foi avaliada para os três examinadores. Os escores obtidos foram submetidos ao Teste de Kruskal-Wallis (TKW) seguido pelo Teste de Dunn *post hoc*, quando o TKW sugeriu uma diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

RESULTADO

Os animais toleraram bem o procedimento cirúrgico e mantiveram-se saudáveis durante todo o período experimental. O pós-operatório transcorreu sem complicações.

Dois espécimes do grupo OA/PRP-150 foram perdidos durante o processamento laboratorial.

1. Estudo da Contagem de Plaquetas

As plaquetas presentes nas amostras de sangue periférico e de PRP apresentaram morfologia normal (Figura 2). A contagem de plaquetas confirmou que a técnica de preparo do PRP produziu amostras com alta concentração de plaquetas. Os esfregaços de amostras de PRP mostraram maiores concentrações de plaquetas do que os esfregaços de amostras do sangue periférico. A quantidade média de plaquetas nas amostras de sangue periférico foi $474,80 \pm 80,38 \times 10^3$ plaquetas/ μL , enquanto que nas amostras de PRP foi $2718,46 \pm 359,65 \times 10^3$ plaquetas/ μL . A concentração média de plaquetas nas amostras de PRP foi 5,7 vezes maior que aquela observada nas amostras de sangue periférico.

Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre a quantidade média de plaquetas/ μL nas amostras de PRP e de sangue periférico dos grupos OA/PRP-50, OA/PRP-100 e OA/PRP-150.

2. Análise Radiográfica

A frequência dos escores atribuídos aos grupos C, OA, OA/PRP-50, OA/PRP-100 e OA/PRP-150, assim como os

resultados das comparações entre os grupos, estão representados na Tabela 1. Imagens radiográficas representativas de cada grupo podem ser visualizadas na Figura 3.

DISCUSSÃO

A regeneração ou o reparo de defeitos ósseos extensos pode ser difícil de ser obtida sem intervenções, como o enxerto ósseo¹⁷. Assim, pesquisadores buscam continuamente melhorar as técnicas de enxerto para alcançar uma regeneração óssea mais rápida e com maior densidade¹¹. Uma das alternativas propostas é a associação de enxertos ósseos com o PRP.

A associação PRP/enxerto ósseo tem sido avaliada em diversos estudos^{3,9,12,18}. No presente estudo, o Grupo OA/PRP-50 apresentou percentual de radiopacidade significativamente maior que o Grupo OA. De fato, o PRP pode acelerar a cicatrização de enxertos de osso autógeno¹⁹. Entre as potencialidades do PRP capazes de justificar os resultados observados no Grupo OA/PRP-50, poderia ser citado o aumento na proliferação de células endoteliais²⁰, pré-osteoblastos²¹, osteoblastos¹² e osteoclastos²² no defeito cirúrgico.

No presente estudo, um efeito vantajoso do PRP na cicatrização de enxertos de osso autógeno foi observado apenas no Grupo OA/PRP-50. Este grupo também demonstrou percentual de radiopacidade significativamente maior que o Grupo OA/PRP-100. Uma das possíveis explicações para esses resultados seria a proporção PRP/enxerto ósseo autógeno utilizada. Quando uma pequena quantidade de enxerto ósseo é associada a um grande volume de PRP, as células ósseas do enxerto e do tecido ósseo adjacente são expostas a uma grande concentração de PRP⁹. Um recente estudo de Nagata et al.⁹ demonstrou que a proporção PRP/enxerto ósseo autógeno influenciou o reparo ósseo em DTC em calvárias de ratos. Esses autores avaliaram o reparo ósseo em DTCs tratados com enxerto de osso autógeno associado ou não a diferentes volumes de PRP e observaram que, aos 30 dias pós-operatórios, os grupos, nos quais foram utilizadas as menores proporções PRP/enxerto

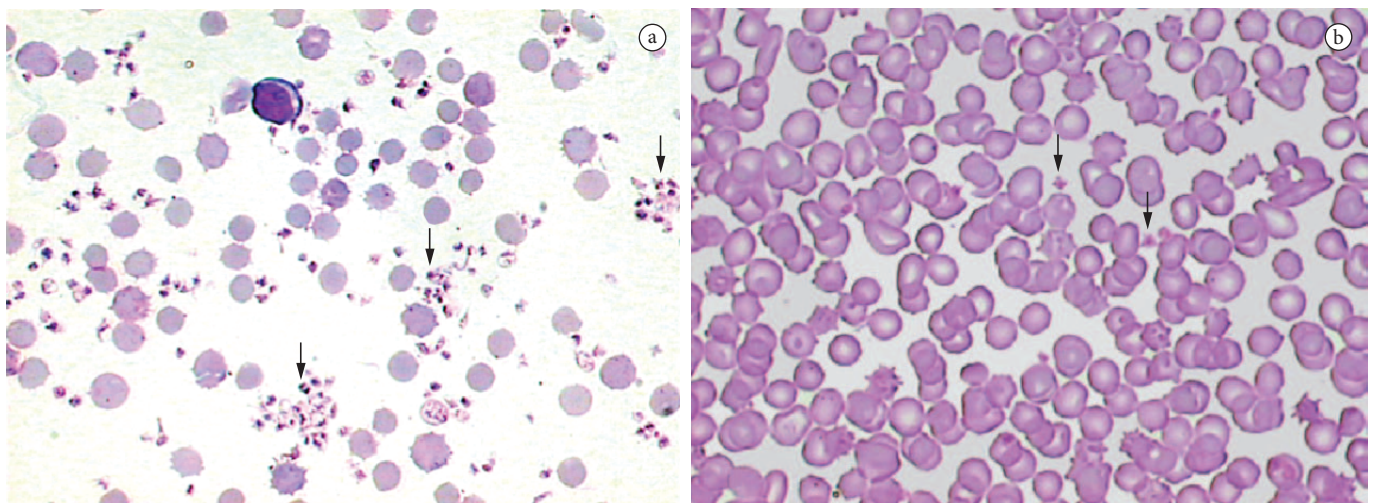


Figura 2. Esfregaço de amostra de PRP (a) mostrando maior número de plaquetas (setas) que o esfregaço de amostra de sangue periférico (b). Panorâmico. Aumento 1000 \times . PRP = Plasma Rico em Plaquetas.

ósseo autógeno, apresentaram maior expressão de osteocalcina e osteopontina, marcadores de produção óssea²³ e mineralização da matriz óssea²⁴, respectivamente. Nesses grupos, também foi observado um processo de reparo ósseo mais desenvolvido, o que pareceu indicar haver uma proporção ótima PRP/enxerto ósseo

autógeno a ser utilizada, podendo o aumento da concentração de PRP ser deletéria. De fato, a viabilidade e a proliferação de células ósseas são estimuladas por pequenas concentrações de PRP, porém suprimidas por grandes concentrações, conforme os achados in vitro de Choi et al.¹².

Tabela 1. Frequência dos escores atribuídos aos grupos C (controle), OA, OA/PRP-50, OA/PRP-100 e OA/PRP-150, bem como os resultados das comparações entre os grupos em relação ao percentual de radiopacidade dos defeitos cirúrgicos analisados

Escore	Grupos				
	Controle*	OA*§	OA/PRP-50*†§	OA/PRP-100*†	OA/PRP-150*
0	29	15	03	12	06
1	01	07	05	11	03
2	-	04	09	03	09
3	-	04	13	04	-

Símbolos semelhantes (†§) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Os grupos OA, OA/PRP-50, OA/PRP-100 e OA/PRP-150 apresentaram diferenças significativas (*) quando comparados ao Grupo Controle ($p < 0,05$). OA = Osso Autógeno; PRP = Plasma Rico Em Plaquetas.

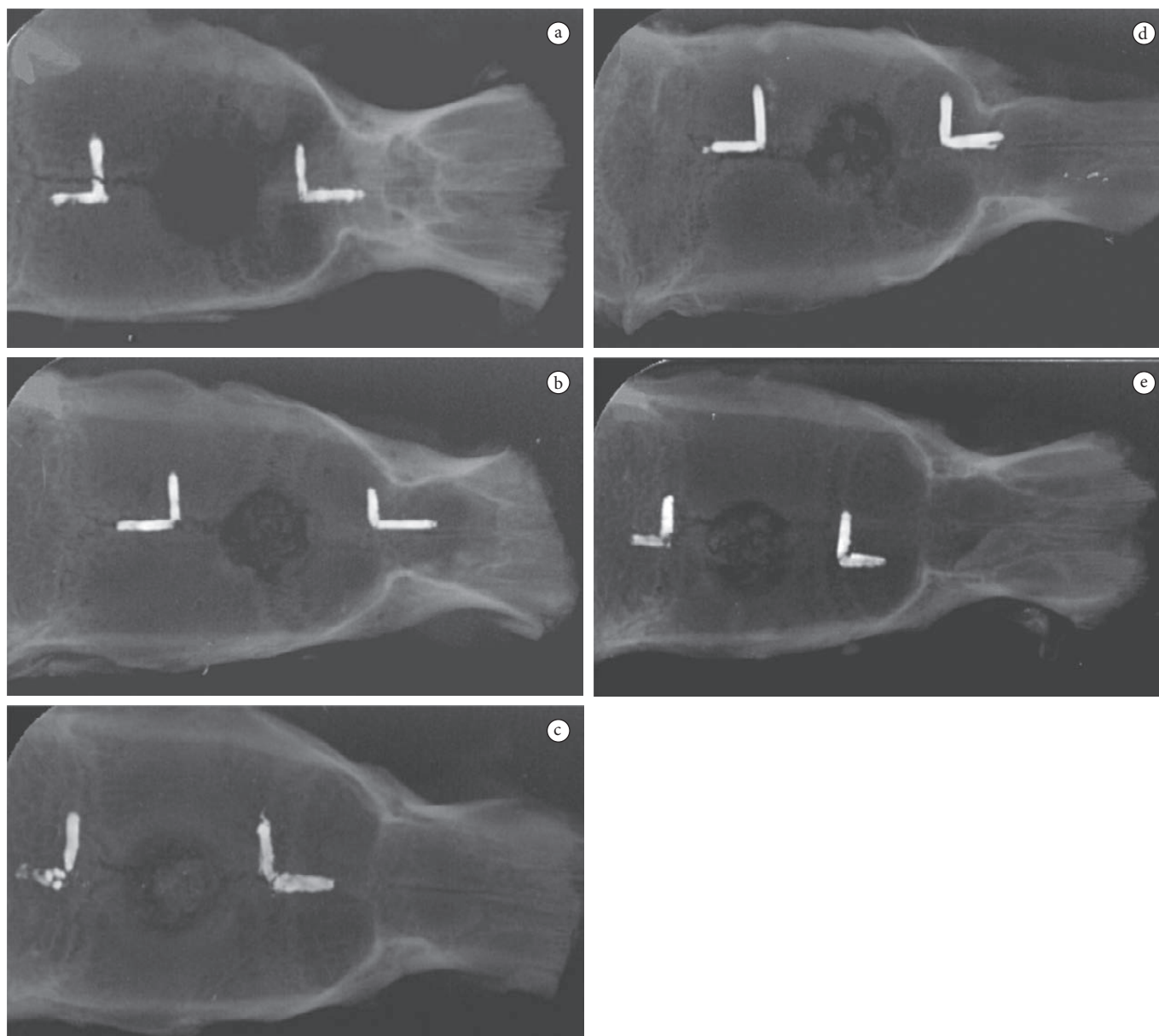


Figura 3. Imagens radiográficas representativas de cada um dos grupos analisados. a) grupo C; b) grupo OA; c) grupo OA/PRP-50; d) grupo OA/PRP-100; e e) grupo OA/PRP-150. OA = Osso Autógeno; PRP = Plasma Rico em Plaquetas.

Atualmente, os estudos relacionados ao PRP e à sua aplicação na Odontologia dedicam atenção especial a vários detalhes técnicos envolvidos no preparo dessa biotecnologia. Basicamente, o processo de centrifugação para o preparo do PRP deve ser estéril e precisamente adequado na separação de plaquetas das células vermelhas. Além disso, deve proporcionar o isolamento/sequestro plaquetário em altas concentrações sem causar qualquer dano ou lise das plaquetas, para que não ocorra liberação de fatores de crescimento prematuros¹⁹. De acordo com Marx²⁵, plaquetas danificadas ou tornadas inviáveis pelo protocolo utilizado para preparar o PRP não secretam fatores de crescimento bioativos. Assim, o resultado pode ser desapontador. A concentração de plaquetas nas amostras de PRP está intimamente ligada ao protocolo utilizado para seu preparo. Diferentes protocolos de preparo do PRP podem resultar em concentrações de plaquetas variadas, podendo promover efeitos biológicos diversos²⁶. No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de plaquetas das amostras de PRP utilizadas nos grupos OA/PRP-50, OA/PRP-100 e OA/PRP-150. Em todos esses grupos, as amostras de PRP apresentaram concentração média de plaquetas 5,7 vezes maior do que aquela observada nas amostras de sangue periférico, podendo ser consideradas, então, amostras de “PRP terapêutico”²⁵. Estudos em animais demonstraram que o uso de amostras de “PRP terapêutico” acelera o reparo ósseo^{9,26}. Dessa forma, desde que amostras semelhantes de “PRP terapêutico” foram utilizadas nos grupos OA/PRP-50, OA/PRP-100 e OA/PRP-150 do presente estudo, as diferenças de radiopacidade observadas nos defeitos cirúrgicos desses grupos podem ser explicadas pela proporção PRP/enxerto ósseo autógeno utilizado.

Outro fator a ser considerado no presente estudo é o modelo animal utilizado. A escolha do modelo animal adequado é fundamental para que as avaliações obtidas sejam confiáveis e possam mimetizar, com profundidade científica, o seu uso em seres humanos e, em um espectro maior, em uma população específica. No presente estudo, a escolha do rato como modelo animal torna-se essencial, pois são pequenos, baratos, podem ser utilizados em grande quantidade, proporcionam uma análise de resultados mais fácil do que quando são utilizados animais maiores²⁷, além de fornecerem uma quantidade de sangue adequada para o preparo do PRP autólogo. Alguns animais possuem volume sanguíneo reduzido para que o PRP autólogo possa ser produzido, necessitando então de um segundo animal, doador de sangue, para preparar o PRP. O uso do PRP homólogo poderia comprometer a confiabilidade dos resultados desses estudos, pois, de acordo com Marx²⁵, somente o PRP autólogo é o verdadeiro PRP.

Apesar de o exame radiográfico apresentar limitações como, por exemplo, o baixo nível de exatidão em relação ao preenchimento ósseo, esse método apresenta a vantagem de ser uma análise de baixo custo e consumir menos tempo do que o protocolo “padrão ouro” da análise histológica²⁸. Além disso, ainda é uma técnica muito utilizada clinicamente para avaliar os efeitos de vários tratamentos na formação óssea^{29,30}.

Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que a proporção PRP/Enxerto Ósseo Autógeno influencia a cicatrização de DTCs criados em calvárias de ratos.

REFERÊNCIAS

1. Lei H, Gui L, Xiao R. The effect of anticoagulants on the quality and biological efficacy of platelet-rich plasma. *Clin Biochem*. 2009;42:1452-60. PMID:19560449. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2009.06.012>
2. Messoria MR, Nagata MJ, Mariano RC, Dornelles RC, Bomfim SR, Fucini SE, et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodontol Res*. 2008;43:217-23. PMID:18302625. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0765.2007.01017.x>
3. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998;85:638-46. [http://dx.doi.org/10.1016/S1079-2104\(98\)90029-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1079-2104(98)90029-4)
4. Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*. 2000;289:1501-4. PMID:10968779. <http://dx.doi.org/10.1126/science.289.5484.1501>
5. Schlegel KA, Donath K, Rupprecht S, Falk S, Zimmermann R, Felszeghy E, et al. De novo bone formation using bovine collagen and platelet-rich plasma. *Biomaterials*. 2004;25:5387-93. PMID:15130723. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.12.043>
6. 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. An animal experiment. *Clin Oral Implants Res*. 2004;15:187-93. PMID:15008930. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0501.2004.00980.x>
7. Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Takahashi M, Hata K, Nagasaka T. Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue-engineered bone regeneration. *Tissue Eng*. 2004;10:955-64. PMID:15265313. <http://dx.doi.org/10.1089/1076327041348284>
8. Thorwarth M, Rupprecht S, Falk S, Felszeghy E, Wiltfang J, Schlegel KA. Expression of bone matrix proteins during de novo bone formation using a bovine collagen and platelet-rich plasma (prp) an immunohistochemical analysis. *Biomaterials*. 2005;26:2575-84. PMID:15585260. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.07.041>
9. Nagata M, Messoria M, Okamoto R, Campos N, Pola N, Esper L, et al. Influence of the proportion of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: an immunohistochemical analysis in rat calvaria. *Bone*. 2009;45:339-45. PMID:19410024. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2009.04.246>

10. Jakse N, Tangl S, Gilli R, Berghold A, Lorenzoni M, Eskici A, et al. Influence of PRP on autogenous sinus grafts. An experimental study on sheep. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14:578-83. PMID:12969361. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0501.2003.00928.x>
11. Raghoobar GM, Schortinghuis J, Liem RS, Ruben JL, van der Wal JE, Vissink A. Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? *Clin Oral Implants Res.* 2005;16:349-56. PMID:15877756. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0501.2005.01115.x>
12. Choi BH, Zhu SJ, Kim BY, Huh JY, Lee SH, Jung JH. Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: an in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005;34:420-4. PMID:16053853. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijom.2004.10.018>
13. 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;60:630-5. PMID:12022097. <http://dx.doi.org/10.1053/joms.2002.33107>
14. Mazor Z, Peleg M, Garg AK, Luboshitz J. Platelet-rich plasma for bone graft enhancement in sinus floor augmentation with simultaneous implant placement: patient series study. *Implant Dent.* 2004;13:65-72. PMID:15017307. <http://dx.doi.org/10.1097/01.ID.0000116454.97671.40>
15. Butterfield KJ, Bennett J, Gronowicz G, Adams D. Effect of platelet-rich plasma with autogenous bone graft for maxillary sinus augmentation in a rabbit model. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63:370-6. PMID:15742289. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joms.2004.07.017>
16. Pryor ME, Polimeni G, Koo KT, Hartman MJ, Gross H, April M, et al. Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: histologic and histometric observations. *J Clin Periodontol.* 2005;32:966-72. PMID:16104961. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-051X.2005.00772.x>
17. Intini G. The use of platelet-rich plasma in bone reconstruction therapy. *Biomaterials.* 2009;30:4956-66. PMID:19573909. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.05.055>
18. Messori M, Braga L, Oliveira G, Oliveira LF, Milagres R, Kawata L, et al. Healing of Fresh Frozen Bone Allograft with or without Platelet-Rich Plasma: A Histologic and Histometric Study in Rats. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2011 Dec 16. doi: 10.1111/j.1708-8208.2011.00419.x. [Epub ahead of print]
19. Nagata MJ, Messori MR, Furlaneto FA, Fucini SE, Bosco AF, Garcia VG, et al. Effectiveness of two methods for preparation of autologous platelet-rich plasma: an experimental study in rabbits. *Eur J Dent.* 2010;4:395-402. PMID:20922159. PMCid:2948740.
20. Fréchette JP, Martineau I, Gagnon G. Platelet-rich plasmas: growth factor content and roles in wound healing. *J Dent Res.* 2005;84:434-9. PMID:15840779. <http://dx.doi.org/10.1177/154405910508400507>
21. Gruber R, Kandler B, Fischer MB, Watzek G. Osteogenic differentiation induced by bone morphogenetic proteins can be suppressed by platelet-released supernatant in vitro. *Clin Oral Implants Res* 2006;17:188-93. PMID:16584415. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0501.2005.01216.x>
22. Gruber R, Varga F, Fischer MB, Watzek G. Platelets stimulate proliferation of bone cells: involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes. *Clin Oral Implants Res.* 2002;13:529-35. PMID:12453131. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0501.2002.130513.x>
23. Leitner GC, Gruber R, Neumüller J, Wagner A, Kloimstein P, Höcker P, et al. Platelet content and growth factor release in platelet-rich plasma: a comparison of four different systems. *Vox Sang.* 2006;91:135-9. PMID:16907874. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1423-0410.2006.00815.x>
24. Dileep Sharma CG, Pradeep AR. Gingival crevicular Fluid osteopontin levels in periodontal health and disease. *J Periodontol.* 2006;77:1674-80. PMID:17032109. <http://dx.doi.org/10.1902/jop.2006.060016>
25. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62:489-96. PMID:15085519. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joms.2003.12.003>
26. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone.* 2004;34:665-71. PMID:15050897. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2003.12.010>
27. Sweeney TM, Opperman LA, Persing JA, Ogle RC. Repair of critical size rat calvarial defects using extracellular matrix protein gels. *J Neurosurg.* 1995;83:710-5. PMID:7545744. <http://dx.doi.org/10.3171/jns.1995.83.4.0710>
28. Pryor ME, Susin C, Wikesjö UM. Validity of radiographic evaluations of bone formation in a rat calvaria osteotomy defect model. *J Clin Periodontol.* 2006;33:455-60. PMID:16677336. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-051X.2006.00921.x>
29. Behnia H, Khojasteh A, Soleimani M, Tehranchi A, Atashi A. Repair of alveolar cleft defect with mesenchymal stem cells and platelet derived growth factors: a preliminary report. *J Craniomaxillofac Surg.* 2012;40:2-7. PMID:21420310. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcms.2011.02.003>
30. Mardas N, D'Aiuto F, Mezzomo L, Arzoumanidi M, Donos N. Radiographic alveolar bone changes following ridge preservation with two different biomaterials. *Clin Oral Implants Res.* 2011;22:416-23. PMID:21561483. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0501.2010.02154.x>

AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA

Maria José Hitomi Nagata
Rua José Bonifácio, 1193, 16015-050 Araçatuba - SP, Brasil
e-mail: mjnagata@uol.com.br

Recebido: 01/12/2011
Aceite: 20/12/2011