

CRISTIANE BORGES VARGAS

**ESTUDO *IN VIVO* DO COMPORTAMENTO E NEOFORMAÇÃO ÓSSEA DE
HIDROXIAPATITA (HA) E HIDROXIAPATITA + MAGNÉSIO 1% (HAMGO 1%)
ACRESCIDOS OU NÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS IMPLANTADOS EM
CALVÁRIAS DE COELHOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa
Catarina -UDESC, como requisito para obtenção do
título de mestre em Ciência Animal

Orientador: Prof. Dr. Aury Nunes de Moraes

**LAGES
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com
auxílio do programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC

Borges Vargas, Cristiane

Estudo in vivo do comportamento e neoformação
óssea de hidroxiapatita (HA) e hidroxiapatita +
magnésio 1% (HAMgO 1%) acrescidos ou não de plasma
rico em plaquetas implantados em calvárias de
coelhos / Cristiane Borges Vargas. - Lages , 2018.
95 p.

Orientador: Aury Nunes de Moraes
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Lages, 2018.


1. Biomaterial. 2. Crescimento ósseo guiado. 3.
Plaquetas. I. Nunes de Moraes, Aury. II.
Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa
de Pós-Graduação. III. Título.

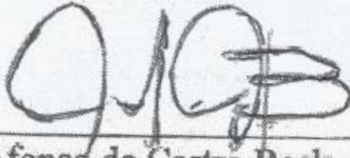
CRISTIANE BORGES VARGAS

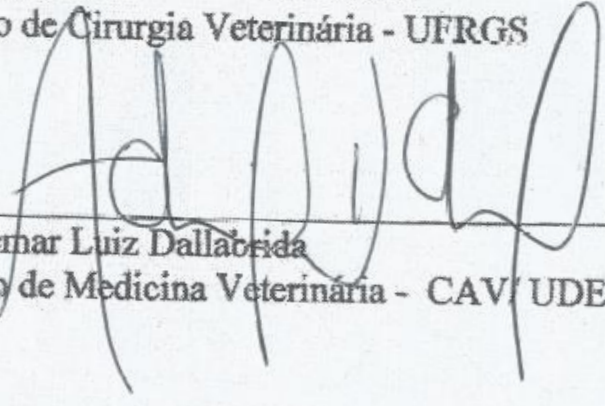
**ESTUDO *IN VIVO* DO COMPORTAMENTO E NEOFORMAÇÃO ÓSSEA DE
HIDROXIAPATITA (HA) E HIDROXIAPATITA + MAGNÉSIO 1% (HAMGO 1%)
ACRESCIDOS OU NÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS IMPLANTADOS EM
CALVÁRIAS DE COELHOS**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciência Animal da
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, como requisito para
obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Banca examinadora:

Orientador: 
Prof. Dr. Aury Nunes de Moraes
Departamento de Medicina Veterinária – CAV/UDESC

Membro: 
Prof. Dr. Carlos Afonso de Castro Beck
Departamento de Cirurgia Veterinária - UFRGS

Membro: 
Prof. Dr. Ademar Luiz Dallabrida
Departamento de Medicina Veterinária - CAV/UDESC

Lages - SC, 31/07/2018

"A minha mãe e irmã por estarem sempre por mim"

AGRADECIMENTOS

Impossível não iniciar agradecendo ao Pai Maior, por mais clichê que isso possa parecer, mas talvez eu tenha motivos de sobra para agradecer-Lo especialmente nesses dois últimos anos. Principalmente por me dar a chance de uma segunda chance e, mais ainda, a oportunidade de chegar até aqui.

Agradeço a todos os animais que me despertaram esse amor pela Veterinária desde criança, o qual me fez lutar para realizar um sonho de infância e hoje agradecer por ter me tornado quem eu sempre quis ser.

Para as pessoas terrenas, meus agradecimento mais que especial vão para minha "mamassita" Anna e minha "super Sis" Kel, obrigada por estarem sempre lá, ali, acolá ou onde quer que eu esteja... Vocês são meu amor maior

Quando estamos longe da nossa família, acabamos criando uma família de coração, a esses chamamos de amigos. Preciso dedicar um agradecimento especial a duas pessoas, que ouviram as reclamações, os choros, as risadas e participaram de toda a minha esperança para esse final- Ed, nos conhecemos num momento péssimo, mas tenho certeza que Deus te colocou no meu caminho para ser o anjo que salvaria minha vida e continuaria me "salvando" durante o resto dela, amo você. Murilo- pra você não tenho nem palavras, meu melhor amigo, meu irmão de outra mãe, obrigada a dona Roseli e seu Geneci por terem colocado alguém tão maravilhoso nesse mundo e a Deus por te colocar na minha vida. Obrigada pelas conversas, risadas, ombro amigo, dietas e "jacadas", te amo "since 2009".

Seguindo a linha dos amigos, não menos importantes, Giovana, Luara, Kelly, Cris Kuci (longe dos olhos mas perto do coração), a toda turma do Hospital. Aos amigos de fora do HCV, Luciana, Francine, Nayara, Jhonatan, Silvia e Geane mas que sempre me acompanharam desde antes dessa etapa, meu muito obrigada.

Minha bolsista querida, Dani Cáceres, descobri, além de uma alguém que pega firme em conjunto no trabalho, uma pessoa maravilhosa, parceira, te desejo muito sucesso e muito obrigada por tudo.

Agradeço ainda ao CAV-UDESC por me conceder toda minha formação, graduação, residência e mestrado. A CAPES pelo auxílio financeiro que me permitiu ficar em La... terminar essa grande etapa.

Obrigada ao meu querido orientador, Prof Aury, pela ajuda e principalmente por aceitar me orientar, ter seu nome em minha formação é uma grande honra. Ao meu amigo e co-orientador, mentor de tantos anos, prof Fabiano, como sempre, você foi fundamental.

Agradeço também ao Prof. Nelson Camargo do CCT/UDESC pelo auxílio com os biomateriais e por me auxiliar mesmo diante de toda a sua jornada pessoal. Obrigada aos professores Celso Pilati (CAV/UDESC) e Adriano Tony Ramos (UFSC/Curitibanos) por serem tão prestativos e pacientes, mesmo quando eu estava impaciente.

Pra finalizar, um agradecimento póstumo ao carinho que me mostrou durante 13 anos que amor sincero e incondicional levamos para a vida toda e além dela, Aquiles você será sempre meu gurizinho, meu amiguinho, meu filhinho.

Se a jornada terminou? Claro que não, nem comecei....

"E, à medida que Ele falava, já não lhes parecia mais um leão. E as coisas que começaram a acontecer a partir daquele momento eram tão lindas e grandiosas que não consigo descrevê-las. Para nós, este é o fim de todas as histórias, e podemos dizer, com absoluta certeza, que todos viveram felizes para sempre. Para eles, porém, este foi apenas o começo da verdadeira história. Toda a vida deles neste mundo e todas as suas aventuras em Nárnia haviam sido apenas a capa e a primeira página do livro. Agora, finalmente, estavam começando o Capítulo Um da Grande História que ninguém na terra jamais leu: a história que continua eternamente e na qual cada capítulo é muito melhor do que o anterior."

(As Crônicas de Nárnia)

RESUMO

VARGAS, Cristiane Borges. **Estudo *in vivo* do Comportamento e Neoformação Óssea de Biomateriais Acrescidos de Plasma Rico em Plaquetas Implantados em Calvárias de Coelhos**. 2018. 95 fls. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal, Lages, 2018.

A cirurgia de pequenos animais na Medicina Veterinária detém grande parte da casuística na rotina sendo a ortopedia a área de maior destaque. Perdas ósseas relevantes desafiam o cirurgião na busca de métodos resolutivos mais apropriados. O autoenxerto ainda é padrão-ouro porém traz desvantagens consideráveis. Sendo assim, a procura por substitutos ósseos têm-se mostrado promissora com estudos apresentando resultados bem sucedidos. A associação do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) aos biomateriais pode apresentar uma aceleração ao processo de neoformação óssea. Esse estudo tem como objetivo avaliar a relevância e aplicabilidade do plasma rico em plaquetas associado aos biomateriais HA 1,67M HAMgO 1% com 60 e 90 dias de evolução de pós- operatório, implantados na calvária de coelhos através de guias de crescimento. Foram utilizados 12 coelhos, machos, mestiços, com 10 meses de idade e peso médio de 4,0Kg± 0,52Kg. Através de exames clínicos e hematológicos atestou-se a higidez dos animais. Os mesmos foram submetidos a anestesia com propofol e manutenção inalatória com isoflurano para realização do procedimento cirúrgico. Foi realizada a exposição das calvárias para implantação das guias de nylon (n6) e fixadas com parafusos de aço inoxidável. Cada guia foi preenchida com os biomateriais HA 1,67M e HAMgO 1%, entretanto, 3 animais receberam PRP junto do biomaterial e os outros 3 receberam coágulo autógeno. Essa disposição aconteceu em G60 (n=6) e G90 (n=6). Ao final dos tempo de evolução, os animais foram submetidos a eutanásia. As calvárias foram coletadas e armazenadas imersas em formaldeído tamponado 10% por 7 dias. Após, as guias foram removidas e as amostras foram novamente acondicionadas em formaldeído 10% por mais 7 dias. As calvárias foram então seccionadas ao meio e enviadas às análises histológica, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e histomorfometria. Diante dos resultados obtidos foi observado, estatisticamente, que a aplicação do PRP não apresentou influência no crescimento ósseo quando comparado ao mesmo biomaterial associado ao coágulo. O tratamento HA 1,67M + PRP apresentou diferença estatística diante dos tratamentos HAMgO1% + PRP e HAMgO 1% + coágulo, contudo não apresentou diferença estatística diante do tratamento HA 1,67M + coágulo, direcionando a conclusão que o biomaterial teve mais influência na neoformação óssea que o complemento propriamente dito.

Palavras- Chave: Biomaterial. Crescimento ósseo guiado. Plaquetas.

ABSTRACT

VARGAS, Cristiane Borges. **Study *in vivo* of the Behavior and Bone Neof ormation of Biomaterials Added with Platelets Rich Plasma Implanted in Calvaries of Rabbits.** 2018. 95f. Dissertation (Masters in Animal Science) - Santa Catarina State University. Graduate Program in Animal Science, Lages, 2018.

The surgery of small animals in Veterinary Medicine has a great part of the casuistry in the routine, being orthopedics the highlighted area. Relevant bone losses challenge the surgeon to reach more appropriated resolutive methods. The autocraft is still the gold standard treatment but it has considerable disadvantages. For this, the search for bone substitutes has been promising with some studies showing well-succeeded results. The association of platelets rich plasma (PRP) with the biomaterials can show an acceleration to the bone neof ormation process. This study aims to evaluate the relevance and applicability of the platelets rich plasma associated to the biomaterials HA 1,67M and HAMgO 1% with 60 and 90 days of post-operative evolution, implanted in calvaries of rabbits, through guided bone growth system. Twelve rabbits, male, crossbreed, 10 months-old and medium weight $4,0 \pm 0,52\text{Kg}$. Through clinical and blood tests certified the animals were healthy. They were submitted to anesthesia with propofol and inhalation maintenance with isoflurane to accomplish the surgery. The calvaries were exposed to have the nylon (n6) guides implanted and attached with stainless steel screws. Each guide was filled with the biomaterials HA 1,67M or HAMgO 1%, however, 3 animals receiver PRP with the biomaterial and the other 3 received autogenous cloth. This disposition happened in G60 (n=6) and G90 (n=6). At the end of those times the animals were submitted to euthanasia. The calvaries were collected and stored immersed in buffered formaldehyde 10% for 7 days. After, the guides were removed and the samples were stored in formaldehyde 10% again for 7 days mores. The calvaries were cut in a half and sent to histological analysis, scanning electron microscopy and histomorphometry. With the results it was statistically observed that PRP did not present any influence in guided bone growth when compared to the same biomaterial associated to the cloth. The treatment HA 1,67M + PRP showed statistical difference before the treatments HAMgO 1% + PRP and MAMgO 1% + cloth, nevertheless it did not show any difference before the treatment HA 1,67M + cloth, directing the conclusion that the biomaterial had more influence in bone neof ormation than the association itself.

Keywords: Biomaterial. Guided bone growth. Platelets.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - (A) Esquema representativo do aparato de nylon (guia), usado para crescimento ósseo guiado e suas dimensões; (B) aparato em nylon, usado como guia de crescimento ósseo. Destaque para o orifício central (seta preta) por onde o parafuso cortical é introduzido, fixando a guia na calvária dos animais.....42
- Figura 2 - Imagem esquematizando a ordem de disposição dos tratamentos previamente determinadas.....45
- Figura 3 - Momento da implantação da guia de nylon repleta com o biomaterial (seta vermelha) na calvária do animal.....46
- Figura 4 - Imagens ilustrativas da coleta dos materiais para análise. (A) Calvária recém retirada ainda com as guias de nylon acopladas. (B) Material pós tempo de conservação em formaldeído tamponado a 10% após a retirada das guias.....48
- Figura 5 - Imagem da colheita das calvárias para avaliação. Ênfase para os parafusos que ultrapassaram os limites das calvárias (seta branca) e as respectivas lesões causadas em meninges e cérebro (seta azul).....54
- Figura 6 - Imagem histológica para o tratamento HA + PRP no período de evolução de 60 dias. Coloração Hematoxilina/Eosina (HE). A) (BR) biomaterial remanescente; (NTO) neoformação de tecido ósseo; (DFC) deposição de fibras colágenas. Aumento 10X. B) (BR) biomaterial remanescente; (NTO) neoformação de tecido ósseo. Detalhe para osteócitos e osteoblastos (setas pretas). Aumento 40X.....55
- Figura 7 - Imagem histológica para o tratamento HA + PRP com tempo de evolução para 60 dias. Coloração Tricrômico de Masson. (BR) Biomaterial remanescente. Tecido conjuntivo em coloração azul e tecido ósseo em coloração vermelha evidenciada pela seta amarela. Aumento 10X.....56
- Figura 8 - Micrografia obtida através de MEV para o tratamento HA + PRP no período de evolução de 60 dias. (A) Acentuada neoformação de tecido ósseo sobre o biomaterial remanescente (seta vermelha), deposição de moderada quantidade de fibras colágenas (seta verde) (aumento de 200X). (B) Interface do implante do biomaterial +PRP com a calvária, demonstrando boa osteointegração (seta laranja) (aumento 15X)56

- Figura 9 - Imagem histológica para o tratamento HA + PRP no período de evolução de 90 dias. Coloração Hematoxilina/Eosina (HE). A) (BR) biomaterial remanescente; (NTO) neoformação de tecido ósseo; (MO) medula óssea. Aumento 10X. B) (BR) biomaterial remanescente; (NTO) neoformação de tecido ósseo. Destaque para osteoblastos (seta preta). Aumento 40X.....57
- Figura 10 - Imagem histológica para o tratamento HA + PRP com tempo de evolução para 90 dias. Coloração Tricrômico de Masson. (BR) Biomaterial remanescente (MO) Medula óssea. Tecido conjuntivo em coloração azul e tecido ósseo em coloração vermelha (setas amarelas). Aumento 10X.....58
- Figura 11 - Micrografia do compósito HA + PRP no período de evolução de 90 dias obtida através de MEV. (A) Demonstração de neoformação de tecido ósseo sobre o biomaterial remanescente (seta vermelha), deposição de tecido fibroso (seta verde) (aumento de 50X). (B) Atividade dos osteoblastos formando um novo tecido ósseo (seta amarela) (aumento 5000X).....58
- Figura 12 - Imagem histológica para o tratamento HAMgO 1% + PRP no período de evolução de 60 dias. Coloração Hematoxilina/Eosina (HE). (BR) biomaterial remanescente. Crescimento ósseo moderado (setas amarelas); acentuada deposição de tecido fibroso (setas vermelhas). Aumento 10X.....60
- Figura 13 - Imagem histológica para o tratamento HAMgO1% + PRP com tempo de evolução para 60 dias. Coloração Tricrômico de Masson. (BR) Biomaterial remanescente. Tecido conjuntivo em coloração azul e tecido ósseo em coloração vermelha evidenciada pelas setas amarelas. Aumento 10X.....60
- Figura 14 - Imagem obtida através de MEV demonstrando os resultados obtidos da associação do biomaterial HAMgO 1% + PRP no período de 60 dias. (A) deposição acentuada de tecido fibroso (seta verde) (aumento 500X). (B) demonstração de neoformação óssea em quantidade moderada entremeada aos grânulos do biomaterial (seta vermelha), deposição de tecido fibroso (seta verde) (aumento 50X).....61
- Figura 15 - Imagem histológica para o tratamento HAMgO 1%+ PRP no período de evolução de 90 dias. Coloração Hematoxilina/Eosina (HE). A) (BR) biomaterial remanescente; (NTO) neoformação de tecido ósseo; (DFC) deposição de fibras colágenas. Aumento 10X. B) (BR) biomaterial remanescente; (NTO) neoformação de tecido ósseo. Destaque para os osteócitos dentro da matriz óssea (setas pretas). Aumento 40X.....62

- Figura 16 - Imagem histológica para o tratamento HAMgO1% + PRP com tempo de evolução para 90 dias. Coloração Tricrômico de Masson. (BR) Biomaterial remanescente. Tecido conjuntivo (DFC) em coloração azul e tecido ósseo em coloração vermelha (setas amarelas). Aumento 10X.....62
- Figura 17 - Imagem de micrografia obtida através de MEV demonstrando os resultados obtidos a partir da associação de HAMgO1% + PRP aos 90 dias de evolução. (A) Acentuada atividade de osteoblastos formando novo tecido ósseo (aumento 5000X). (B) Neoformação de tecido ósseo(setas vermelhas), atividade osteoblástica formando novo tecido ósseo(seta amarela) (aumento 5000X).....63
- Figura 18 - Imagem histológica para o tratamento HA + COÁGULO no período de evolução de 60 dias. Coloração Hematoxilina/Eosina (HE). A) (BR) biomaterial remanescente; (NTO) neoformação de tecido ósseo; Aumento 10X. B) (BR) biomaterial remanescente; (NTO) neoformação de tecido ósseo. Detalhe dos osteoblastos na interface de NTO e BR (setas pretas). Aumento 40X.....64
- Figura 19 - Imagem histológica para o tratamento HA + COÁGULO com tempo de evolução para 60 dias. Coloração Tricrômico de Masson. (BR) Biomaterial remanescente. Tecido conjuntivo (DFC) em coloração azul e tecido ósseo em coloração vermelha evidenciada pelas setas amarelas. Aumento 10X.....65
- Figura 20 - Micrografia demonstrando a neoformação de tecido ósseo do biomaterial HA + COÁGULO aos 60 dias de pós operatório. (A) Presença acentuada de neoformação óssea (seta vermelha) sobre o biomaterial remanescente (seta amarela) (aumento 200X). (B) Demonstração de prolongamentos ósseos se formando a partir do biomaterial (seta verde) e neoformação óssea (seta vermelha)(aumentode 1000X).....65
- Figura 21 - Imagem histológica para o tratamento HA 1,67M+ COÁGULO no período de evolução de 90 dias. Coloração Hematoxilina/Eosina (HE). A) (BR) biomaterial remanescente; (NTO) neoformação de tecido ósseo; (MO) medula óssea. Aumento 10X. B) (BR) biomaterial remanescente; (NTO) neoformação de tecido ósseo.Interface entre calvária e NTO evidenciada (seta azul), mostrando boa osteointegração. Aumento 10X.....66
- Figura 22 - Imagem histológica para o tratamento HA + COÁGULO com tempo de evolução para 90 dias. Coloração Tricrômico de Masson. (BR) Biomaterial remanescente; (MO) medula óssea. Tecido conjuntivo em coloração azul e tecido ósseo em coloração vermelha (setas amarelas). Aumento 10X.....67

- Figura 23 - Micrografia obtida através de MEV demonstrando a neoformação de tecido ósseo a partir do biomaterial HA + COÁGULO aos 90 dias de pós-operatório. A) Presença moderada de neoformação óssea (seta vermelha) (aumento de 200X). B) Prolongamentos de tecido ósseo se formando a partir dos grânulos do biomaterial (seta verde) (aumento 2000X).....67
- Figura 24 - Imagem histológica para o tratamento HAMgO 1%+ COÁGULO no período de evolução de 60 dias. Coloração Hematoxilina/Eosina (HE). A) (BR) biomaterial remanescente; (NTO) neoformação de tecido ósseo; (DFC) Deposição de fibras colágenas. Aumento 10X. B) (BR) biomaterial remanescente; (NTO) neoformação de tecido ósseo. Presença de osteócitos na matriz óssea (setas pretas) Aumento 40X.....69
- Figura 25 - Imagem histológica para o tratamento HAMgO1%+COÁGULO com tempo de evolução para 60 dias. Coloração Tricrômico de Masson. (BR) Biomaterial remanescente; (MO) medula óssea. Tecido conjuntivo em coloração azul e tecido ósseo em coloração vermelha (setas amarelas). Aumento 10X.....69
- Figura 26 - Micrografia obtida através de MEV demonstrando a neoformação de tecido ósseo a partir do biomaterial HAMgO 1% + COÁGULO aos 60 dias de pós operatório. A) Presença moderada de neoformação óssea (setas vermelhas) e acentuada deposição de fibras colágenas (setas verdes) (aumento 500X). B) Demonstração de neoformação de tecido ósseo (setas vermelhas) e deposição de fibras colágenas (setas verdes) (aumento 200X).....70
- Figura 27 - Imagem histológica para o tratamento HAMgO 1%+ COÁGULO no período de evolução de 90 dias. Coloração Hematoxilina/Eosina (HE). A) (BR) biomaterial remanescente; (NTO) neoformação de tecido ósseo; (MO) Medula óssea. Aumento 10X. B) (BR) biomaterial remanescente; (NTO) neoformação de tecido ósseo (DFC) Deposição de fibras colágenas. Aumento 40X.....71
- Figura 28 - Imagem histológica para o tratamento HAMgO1%+ COÁGULO com tempo de evolução para 90 dias. Coloração Tricrômico de Masson. (BR) Biomaterial remanescente; (MO) medula óssea. Tecido conjuntivo em coloração azul e tecido ósseo em coloração vermelha (setas amarelas). Aumento 10X.....71
- Figura 29 - Micrografia obtida através de MEV demonstrando a neoformação de tecido ósseo do biomaterial HAMgO 1% + COÁGULO aos 90 dias de pós-operatório. A) Presença acentuada de neoformação óssea (setas vermelhas) (aumento 100X). B) Demonstração de neoformação óssea (setas vermelhas) (aumento 1000X).....72

- Figura 30 - Imagem histológica comparativa dos tratamentos aos 60 dias de evolução de pós-operatório. Em azul evidencia-se o tecido conjuntivo fibroso. Em vermelho cora-se o tecido ósseo neoformado. (A) HA + PRP. (B) HA + COÁGULO. (C) HAMgO1% + PRP. (D) HAMgO1% + COÁGULO. (Tricrômico de Masson, aumento 10X).....74
- Figura 31 - Fotomicrografias comparativas dos tratamentos aos 60 dias de evolução de pós- operatório, obtidas por MEV. (A) HA + PRP. Imagem demonstrando acentuada neoformação de tecido ósseo (setas vermelhas) sobre o biomaterial remanescente (seta amarela). (B) HA + COÁGULO. Imagem demonstrando tecido ósseo neoformado (setas vermelhas) e moderada deposição de fibras colágenas (seta verde). (C) HAMgO1% + PRP Prolongamento de tecido fibroso (setas verdes) sobre o biomaterial remanescente (setas amarelas). (D) HAMgO1% + COÁGULO. Acentuada deposição de fibras colágenas (setas verdes) e moderada neoformação óssea (seta vermelha). (Aumento 200X).....75
- Figura 32 - Imagem histológica comparativa dos tratamentos aos 90 dias de evolução de pós-operatório. (A) HA + PRP demonstrando acentuada neoformação óssea. Presença de osteoblastos (seta preta). (B) HA + COÁGULO demonstrando linha de osteointegração entre calvária e neoformação óssea (seta verde). (C) HAMgO1% + PRP demonstrando moderada quantidade de tecido conjuntivo fibroso (seta amarela). (D) HAMgO1% + COÁGULO demonstrando acentuada neoformação de tecido ósseo. Presença de osteócitos (seta azul) (H&E, aumento 40X).....76
- Figura 33 - Fotomicrografia comparativas dos tratamentos aos 90 dias de evolução de pós- operatório, obtidas por MEV. (A) HA + PRP. Imagem demonstrando atividade osteoblástica induzindo neoformação óssea (seta azul). (B) HA + COÁGULO. Prolongamentos ósseos (setas vermelhas) formando-se entre os grânulos do biomaterial (setas amarelas). (C) HAMgO 1% + PRP. Prolongamentos ósseos (setas vermelhas) sobre o biomaterial remanescente (seta amarela). (D) HAMgO1% + COÁGULO. Imagem destacando neoformação óssea sobre os grânulos de biomaterial. (Aumento 3000).....77
- Figura 34 - Gráfico ilustrando resultados percentuais da análise de histomorfometria, demonstrando a relação, de todos os tratamentos, entre a neoformação de tecido ósseo (vermelho), a deposição de tecido fibroso (azul) e o biomaterial remanescente e outros tecidos (verde) aos 60 dias de evolução de pós-operatório.....78
- Figura 35 - Gráfico ilustrando resultados percentuais da análise de histomorfometria, demonstrando a relação, de todos os tratamentos, entre a neoformação de tecido ósseo (vermelho) a deposição de tecido fibroso (azul) e o biomaterial remanescente e outros tecidos (verde) aos 90 dias de evolução de pós-operatório.....78

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Descrição dos biomateriais produzidos pelo Grupo de Estudos em Biomateriais do CCT/ UDESC Joinville-SC, suas composições e proporções.....41
- Tabela 2 - Modelo de critérios de avaliação histológica baseado em atribuição de cruzes para quantificação de neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), presença de células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP), tecido ósseo secundário (OS).....49
- Tabela 3 - Resultados obtidos através da análise histológica de HA + PRP, com evolução de 60 dias de pós-operatório, quanto a neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS).....55
- Tabela 4 - Resultados obtidos através da análise histológica de HA + PRP, com evolução de 90 dias de pós-operatório, quanto a neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS).....57
- Tabela 5 - Resultados obtidos através da análise histológica de HAMgO 1% + PRP, com evolução de 60 dias de pós-operatório, quanto a neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS).....59
- Tabela 6 - Resultados obtidos através da análise histológica de HAMgO 1% + PRP, com evolução de 90 dias de pós-operatório, quanto a neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS).....61
- Tabela 7 - Resultados obtidos através da análise histológica de HA + COÁGULO, com evolução de 60 dias de pós-operatório, quanto a neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS).....64

Tabela 8 -	Resultados obtidos através da análise histológica de HA + COÁGULO, com evolução de 90 dias de pós-operatório, quanto a neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS).....	66
Tabela 9 -	Resultados obtidos através da análise histológica de HAMgO 1% + COÁGULO, com evolução de 60 dias de pós-operatório, quanto a neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS).....	68
Tabela 10 -	Resultados obtidos através da análise histológica de HAMgO 1% + COÁGULO, com evolução de 90 dias de pós-operatório, quanto a neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS).....	70
Tabela 11 -	Resultados médios comparativos para cada tempo de tratamento, 60 e 90 dias de pós-operatório, obtidos em relação à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS).....	73
Tabela 12 -	Médias em valores percentuais encontradas e respectivos desvios-padrão para neoformação de tecido ósseo e deposição de tecido fibroso para todos os tratamentos em seus respectivos tempo de evolução	79

LISTA DE ABREVIATURAS

ad libitum - a vontade

BID - duas vezes ao dia

BR - Biomaterial remanescente

CAM - concentração alveolar mínima

CAV - Centro de Ciências Agroveterinárias

CCT - Centro de Ciências Tecnológicas

CETEA - Comitê de Ética e Experimentação Animal

CL - células de limpeza

CONCEA - Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal

DFC- deposição de fibras colágenas

FC - Fatores de crescimento

G - gauge

HA - Hidroxiapatita

HA1,76M - Hidroxiapatita 1,67 molar

HAMgO - hidroxiapatita + Magnésio

HE - Hematoxilina Eosina

IGF - Insuline growing factor

LABOPAVE - Laboratório de Patologia Veterinária

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

MO - Microscopia óptica

n6 - nylon 6

NTO - neoformação de tecido ósseo

OP - Osso primário

OS - Osso secundário

PDGF - Platelets deriver growing factor

PO - Presença de osteoclastos

PRP - Plasma Rico em Plaquetas

SE - secondary eletrons

SID - uma vez ao dia

TCP- α - Trifosfato Cálcico- alfa

TGF- β - Transformation growing factor - beta

TID - três vezes ao dia

UDESC - Universidade do Estado de Santa Catarina

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	27
2.	REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1	TECIDO ÓSSEO	29
2.2	BIOMATERIAIS APLICADOS COMO SUBSTITUTOS.....	31
	2.2.1 Hidroxiapatita	33
	2.2.2 Hidroxiapatita em compostos bifásico	34
2.3	PLASMA RICO EM PLAQUETAS.....	34
2.4	CRESCIMENTO ÓSSEO GUIADO <i>in vivo</i>	36
2.5	MICROSCOPIA ÓPTICA (MO) E ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	37
2.6	HISTOMORFOMETRIA.....	37
3.	OBJETIVOS	39
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
4.	MATERIAS E MÉTODOS	41
4.1	DOS BIOMATERIAIS ESTUDADOS.....	41
4.2	PLASMA RICO EM PLAQUETAS.....	42
4.3	DA UNIDADE EXPERIMENTAL, MANEJO E CUIDADOS.....	43
4.4	PRÉ-OPERATÓRIO E ANESTESIA.....	43
4.5	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	44
4.6	PÓS-OPERATÓRIO.....	46
4.7	COLHEITA DAS AMOSTRAS PARA AVALIAÇÃO.....	47
	4.7.1 Avaliação Histológica	48
	4.7.2 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)	49
	4.7.3 Histomorfometria	50
5.	RESULTADOS	53
5.1	HA+ PRP.....	54
	5.1.1 Grupo 60 dias	54
	5.1.2 Grupo 90 dias	58
5.2	HAMgO1% + PRP.....	59
	5.2.1 Grupo 60 dias	59
	5.2.2 Grupo 90 dias	61

5.3	HA + COÁGULO.....	63
	5.3.1 Grupo 60 dias.....	63
	5.3.2 Grupo 90 dias.....	66
5.4	HAMgO 1% + COÁGULO.....	68
	5.4.1 Grupo 60 dias.....	68
	5.4.2 Grupo 90 dias.....	70
5.5	RESULTADOS COMPARATIVOS.....	73
	5.5.1 Análise histomorfométrica.....	77
	5.5.2 Análise Estatística.....	78
6.	DISCUSSÃO.....	81
7.	CONCLUSÃO.....	87
8.	REFERÊNCIAS.....	89

1.INTRODUÇÃO

A medicina veterinária voltada a animais de companhia ganhou grande notoriedade nos últimos tempos. A macroárea ortopedia tem-se destacado expansivamente, sendo a sub-área da traumatologia, uma das, senão a de principal importância.

Sabendo das dificuldades do período pós-operatório ortopédico, a busca por alternativas que tornem esse manejo menos trabalhoso e traumático, e também mais rápido tanto para o paciente quanto para o cuidador, precisa ser desenvolvida. A engenharia de materiais aliada às pesquisas médicas vem se destacando com louvor na criação de métodos alternativos que acelerem essa recuperação e, em casos de perdas relevantes, substituam o tecido ósseo de maneira mais semelhante possível à reparação fisiológica.

Com o passar do tempo, é esperada uma degeneração do sistema esquelético, a qual prejudica o funcionamento fisiológico de dentes, ossos e articulações. Avarias ósseas causadas por patologias como tumores, infecções e lesões traumáticas extensas são normalmente substituídos por tecido ósseo autógeno. Entretanto, a quantidade de material a ser fornecida como enxerto pode ser bastante limitada. Além disso, a implantação de enxertos alógenos pode apresentar dificuldades biológicas e mecânicas. Sendo assim, faz-se presente a necessidade de se encontrar materiais alternativos que atuem de forma eficaz (KOGA et.al, 2003).

Atualmente, os métodos de enxertia óssea disponíveis são: autógeno (fornecidos pelo mesmo indivíduo), alógeno (fornecidos por indivíduo diferente, porém de mesma espécie), xenógeno (fornecido por indivíduo de espécie diferente) e aloplásticos (materiais naturais ou sintéticos), sendo o autógeno o padrão-ouro na prática clínica (SOUZA, 2010).

Diante de dificuldades como danos secundários causados pelos autoenxertos, alguns biomateriais tem sido estudados como substitutos ósseos. Para serem considerados biomateriais, esses substitutos devem apresentar características-chave como estrutura estável, rapidez na incorporação com o tecido ósseo, promover osteocondução e não ter, preferencialmente, nenhuma complicação associada a seu uso (MELLONIG, 1991).

As biocerâmicas a base de fosfato de cálcio tem-se destacado nos estudos como biomateriais, basicamente nas formas de hidroxiapatita e trifosfato de cálcio (CONSTANTINO et al, 1992; ONO et al, 1992).

Os cimentos ósseos são formados por parte líquida e parte sólida que, ao serem homogeneizadas, formam uma pasta, a qual, com o tempo, perdem sua plasticidade dando lugar à resistência mecânica (ALONSO, 2011). Diversas formulações de cimento foram

testadas, resultando em diferentes solubilidades. Sendo assim, nenhuma proposta é assumida como formulação ideal (BOHNER,2005).

O plasma rico em plaquetas (PRP) é o produto obtido da centrifugação e processamento de sangue autógeno (LIEBERMAN, et.al, 2002). O gel de PRP é apontado como uma eficiente cola tecidual com uma vantagem adicional de conter fatores de crescimento e citocinas, conferindo-lhe maior poder cicatrizante (VENDRAMIN et al,2010).

Em um estudo desenvolvido por Barbosa *et al* (2008), o uso de PRP em gel sobre enxerto ósseo em cães, sem o uso de biomateriais, foi avaliado. Ao final de 30 dias percebeu-se precocidade e uniformidade de radiopacidade do grupo PRP associado ao enxerto esponjoso quando comparado aos grupos controle (vazio) e grupo PRP isolado.

Já no estudo realizado por Sebben *et al* (2012), o experimento foi realizado comparando o efeito isolado do PRP como o efeito do mesmo associado a α -TCP (trifosfato de cálcio alfa). Os resultados apresentaram valores numéricos distintos, entretanto não apresentaram diferenças estatísticas relevante. Por outro lado, os autores afirmam haver possível efeito de precocidade sobre a regeneração óssea quando aplicados em conjunto.

O objetivo desse estudo foi avaliar o uso do PRP como a parte líquida da formação do cimento ósseo assumindo-o como acelerador do processo de cicatrização e neoformação óssea quando associado aos biomateriais hidroxiapatita e hidroxiapatita com magnésio, os quais foram estudados e avaliados previamente por Colombo (2016) usando somente o coágulo sanguíneo como base líquida. Esse estudo foi desenvolvido a partir do sistema de crescimento ósseo guiado em calvárias de coelhos aos 60 e 90 dias de pós-operatório.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TECIDO ÓSSEO

Os ossos constituem parte importante do sistema locomotor, funcionando como apoio durante movimentos e implantando resistência contra a força gravitacional. São responsáveis também pela proteção e sustentação dos tecidos adjacentes. Além dessas funções mecânicas, os ossos também apresentam importantes funções químicas, servindo de reservatório para homeostasia de íons minerais (BOSKEY, 1993). Além disso, o tecido ósseo é responsável pelo alojamento e proteção da medula óssea, produtora de células sanguíneas (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004).

Explicando a citologia, as células ósseas precursoras, de origem mesenquimal, diferenciam-se em osteoblastos, as quais apresentam-se ativamente na deposição óssea. Estas, por sua vez, são precursoras dos osteócitos, que são células já maduras responsáveis por manter a matriz óssea mineralizada, dando a sustentação do osso já formado. Os osteoclastos por outro lado, são células multinucleadas, ativas na reabsorção e remodelação do osso. É através deles que a produção de fibras colágenas e fosfatos de cálcio, responsáveis pela mineralização óssea se estabelece (MACEDO et.al.,2010).

Histologicamente, podem-se diferenciar dois tipos de tecido ósseo: o imaturo e o maduro, ou também chamados primário e secundário, respectivamente. Ambos possuem os mesmos tipos celulares e constituintes de matriz. Em relação ao tecido primário, o mesmo possui suas fibras colágenas dispostas irregularmente, enquanto que no secundário, elas se dispõem em forma de lamelas. O tecido primário possui uma quantidade de minerais aquém do secundário, entretanto, possui maior proporção de osteócitos. O tecido lamelar, por sua vez, dispõem de fibras colágenas dispostas em lamelas, podendo se organizar, ou paralelamente umas às outras ou em camadas concêntricas contornando os canais com vasos, formando assim o Sistema de Havers. Cada sistema se organiza em forma de cilindro, o qual, em seu centro, contém um canal revestido de endóstio, chamado Canal de Havers, contendo nervos e vasos. Estes canais comunicam-se entre si, também com a cavidade medular e a superfície externa do osso. Essa comunicação se dá através de canais oblíquos e transversais, que cruzam as lamelas, chamados Canais de Volkmann (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004).

A matriz óssea já mineralizada é envolta por duas membranas de natureza conjuntiva, não calcificadas, que gradualmente permitem relação entre o tecido mineralizado e o restante do organismo. Na região mais interna, há uma camada de células com potencial osteogênico associada à células indiferenciadas- o endóstio. Já o perióstio, que é a camada mais externa, é

composta por fibras colágenas e fibroblastos (KATCHBURIAN; ARANA, 2004). O perióstio possui alta porcentagem de células osteoprogenitoras, as quais multiplicam-se por mitose, diferenciam-se em osteoblastos e possuem papel crucial no crescimento ósseo e reparação de fraturas. O endóstio, por sua vez, contribui para o processo regenerativo e remodelativo do osso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Lesões ósseas, sejam por doenças ou traumas, são condições corriqueiras que comprometem a qualidade de vida, considerando que vários processos podem acarretar em perdas relevantes de tecido ósseo, dificultando sua reparação (KOKUBO; KIM; KAWASHITA 2003). Os ossos passam por regenerações constantemente. A reestruturação dá-se continuamente para suportar as forças mecânicas que sofre, assim como o processo de remodelação, o qual realiza a substituição do tecido danificado ou velho por um tecido renovado e saudável (MOREJÓN-ALONSO et al.,2015). Esse processo natural consiste em formar tecido ósseo novo, em oposição ao tecido fibrótico que se forma no processo regenerativo de outros tecidos do organismo (SANTOS et al., 2012)

A cicatrização óssea é um processo dinâmico, onde as células e seus respectivos metabólitos interagem reparando o tecido danificado. Esse processo envolve várias células incluindo macrófagos, leucócitos polimorfonucleados e outras células pertinentes ao sistema imunológico (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). O processo de consolidação óssea desenvolve-se em três fases principais: inflamatória, reparação e remodelação. A fase inflamatória tem início imediato. Nesse momento há liberação de vários mediadores inflamatórios, fatores de crescimento e angiogênicos, células locais, macrófagos, neutrófilos e linfócitos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; SOUZA, 2003). Na fase de reparo, há a diferenciação em condrócitos, os quais serão responsáveis pela produção de cartilagens e osteoblastos, formando o osso primário (SOUZA, 2003; GERSTENFELD et al., 2003). A fase de reparo está amplamente relacionada ao suprimento sanguíneo. Quando a angiogênese está comprometida, a cicatrização não ocorre (PELLISSIER, *et al.*,2004). A fase de remodelação é marcada pela modificação por formação e reabsorção óssea secundária do calo ósseo inicial, restaurando a estrutura anatômica e deixando-a apta à absorção de cargas mecânicas (GERSTENFELD et al.,2003).

2.2 BIOMATERIAIS APLICADOS COMO SUBSTITUTOS

O uso dos biomateriais datam primariamente de épocas pré-históricas. Há descrições, de milhares de anos, do uso de implantes dentários e fios de sutura. Mais recentemente, o uso

dos mesmos foram modernizados com o aparecimento de lentes intraoculares, próteses mamárias, próteses articulares, implantes ósseos, valvulares e vasculares (RATNER, 2004).

O aumento da demanda clínica decorrente de perdas ósseas relevantes atenta para a necessidade de encontrar materiais compatíveis e com características adequadas para substituição e reparação de tecido ósseo (LEGEROS, 2002). Esse processo deu-se, inicialmente, pelo uso de materiais biológicos como os enxertos (GUASTALDI 2003; FOSSUM, 2008). Entretanto, tanto os enxertos autógenos, onde doador e receptor são o mesmo indivíduo, os enxertos alógenos, nos quais doador e receptor são indivíduos diferentes, porém de mesma espécie, os xenógenos, provenientes de indivíduos e espécies diferentes (FOSSUM, 2008) e os aloplásticos, que são materiais sintéticos ou naturais (SOUZA, 2010), possuem suas limitações. Os enxertos autógenos podem apresentar dificuldade de acessibilidade e quantidade limitada de disponibilidade (GUTIERREZ *et.al.*, 2006). Além disso, o defeito criado para extração do enxerto resulta em um pós-operatório da região doadora comumente com maior índice de complicações como infecções, algia e formação de hematomas, quando comparado à área receptora (BURG; PORTER; KELLAM, 2000; BOSTROM; SEIGERMAN, 2005). Já quanto aos enxertos heterógenos apresentam alto potencial de contaminação cruzada (GUTIERREZ *et.al.*, 2006).

Os biomateriais correspondem aos enxertos aloplásticos. Estes pode ser classificados de acordo com sua origem: natural (cuja matéria prima provém de organismos vivos como o colágeno) ou sintético (cuja base mescla materiais naturais e manufaturados como os metais e os polímeros sintéticos) , sua composição química- metal, cerâmica, polimérico ou compósitos, além de seu comportamento fisiológico (OLIVEIRA *et al.*, 2009; TEIXEIRA, 2009; FRANZAC, 2014).

Para serem considerados biomateriais em potencial, esses possíveis substitutos devem apresentar uma série de características químicas, físicas e biológicas que possibilitem o desenvolvimento da função desejada, estimulando a resposta esperada dos tecidos vivos (KAWACHI *et al.*, 2000). Considerando as propriedades para serem enxertos ósseos ideais, os biomateriais devem apresentar-se quimicamente inertes, biocompatíveis, não alergênicos, não cancerígenos, não passíveis de crescimento bacteriano, serem totalmente substituível por tecido ósseo, permitirem esterilização sem alterar sua estabilidade e composição química e serem de fácil modelagem e manipulação durante o procedimento cirúrgico (POTTER; ELLIS III, 2004), além de apresentarem propriedades osteoindutoras (capacidade de atração, proliferação e diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em células ósseas) e osteocondutoras (capacidade de criar suporte estrutural para permitir o estabelecimento e

desenvolvimento de vasos nutritivos e de células com potencial osteogênico) (CAMARGO et al, 2014).

Por definição, toma-se biomaterial toda e qualquer substância ou composição de substâncias, que não sejam fármacos, de origem natural ou sintética, que possa ser usada em qualquer período de tempo, como parte ou totalmente, em sistemas que tratam, aumentam ou substituem tecidos, sistemas ou funções do organismo vivo (FRANCZAC, 2014).

A sintetização desse biomateriais pode ocorrer de várias formas (grânulos, membranas, blocos e outros) e possuir diversas composições, únicas ou combinadas. O formato a ser utilizado será avaliado de acordo com o defeito ósseo. Reconstruções tridimensionais exigem um formato estrutural maior, sendo os blocos os melhores indicados, enquanto que os grânulos são indicados para defeitos cirurgicamente criados (ALMEIDA et al., 2014).

Microporosidade e grãos nanométricos podem oferecer melhor capilaridade, adesão celular na superfície óssea e molhabilidade, favorecendo as características osteoindutora e de osteointegração, cooperando para a formação de novo tecido (CAMARGO, et.al, 2014). O tamanho das partículas do biomaterial é amplamente relacionada à área da superfície disponível à reação das células com o meio biológico, isto é, quanto maior o tamanho das partículas, maior o tempo de absorção do substituto ósseo (TEIXEIRA, 2009).

A porosidade é também uma característica bastante importante para a eficácia da reação do material com o meio biológico, sendo que desse fator depende a colonização celular do biomaterial. As interconexões formadas entre os macroporos formados pela distribuição do biomaterial implantado, formam um sistema similar à túneis, permitindo o trânsito de fluidos biológicos e células ósseas, facilitando a formação do novo tecido ósseo no interior do material substituto implantado (TEIXEIRA, 2009)

As cerâmicas ou biocerâmicas são os materiais sintéticos, não metálicos e inorgânicos de utilização mais difundida hoje. As cerâmicas nanoestruturadas formadas por compostos de fosfato de cálcio são as mais empregadas, tanto na reparação quanto na reposição de tecido ósseo pois apresentam características diferenciadas dos biomateriais convencionais como biatividade, semelhança mineral com a apatita encontrada em esqueletos humanos e biocompatibilidade (GUASTALDI; APARECIDA, 2010; CAMARGO, et al., 2014).

As biocerâmicas nanoestruturadas à base de fosfato de cálcio são materiais inorgânicos, quimicamente inertes, constituída de uma ou duas fases contínuas dispersas em uma fase contínua, sendo a fase descontínua de ordem nanométrica. Em caso de ocorrer uma fase descontínua de natureza diferente da contínua, a esse material dá-se o nome de

nanocompósito (CORRÊA, 2013). A biocerâmica a base de fosfato de cálcio mais difundida nos estudos hoje é a hidroxiapatita (HA) (LEGEROS, 2002).

2.2.1 Hidroxiapatita

As composições a base de fosfato de cálcio são amplamente usadas como substitutos ósseos. Isso se dá por causa da mimetização biológica desse componente inorgânico ser compatível ao tecido ósseo (HUANG, *et. al.*, 2010). É o principal componente mineral de ossos e dentes, representando 30 a 70% da massa total dos mesmos (RIGO, *et.al.*, 2007)

A HA é biocompatível com o tecido ósseo por possuir a mesma estrutura cristalina (SCHMITZ; HOLLINGER; MILAM, 1999; FRANCO; BORGES; VILÓRIA, 2001). É considerada um substituto vantajoso por possuir uma composição uniforme, alta biocompatibilidade, segurança biológica por não ser carcinogênica, alérgica ou tóxica e por sua sintetização ser de fácil controle da porosidade (ONO, *et.al.*, 1992).

A estrutura porosa desse biomaterial é um suporte passivo à neoformação vascular, levando ao aumento de fatores de indução da formação de novo tecido ósseo (BORGES ; REZENDE; RIBEIRO, 2000).

A HA é uma biocerâmica amplamente usada clinicamente, entretanto, suas propriedades mecânicas limitantes restringem seu uso (baixa resistência e alta fragilidade). Sendo assim, sua utilização é limitada a locais de pouco esforço mecânico exigido. Devido a essa limitação, uma solução proposta foi associa-la à outros compostos, unindo propriedades desejáveis, aumentando sua eficácia (BONAN, *et.al.*, 2014).

2.2.2. Hidroxiapatita Em Compostos Bifásicos

A utilização da HA como matriz adicionando uma segunda fase nanométrica na elaboração de biomateriais bifásicos tende proporcionar uma estabilidade mecânica à HA, além de aprimorar a bioatividade (EPURE *et.al.*, 2007).

Dentre os diferentes íons que possibilitam as composições bifásicas da HA, o magnésio (Mg) destaca-se por ser o quarto cátion de maior abundância no organismo, segundo no meio intracelular e o de maior representatividade em cartilagens e tecido ósseo nas fases iniciais da osteogênese. Esse íon tem grande importância e relevância nas fases iniciais da mineralização, pois atua sobre as células ósseas estimulando a proliferação de osteoblastos (TAVARES *et.al.*, 2013).

Ao adicionar magnésio (Mg) à estrutura da HA, através da substituição dos íons de cálcio por íons de magnésio, ocorre a diminuição da cristalinidade da HA, levando ao aumento da dissolução da mesma. Essa substituição tem apresentado grande interesse científico pois os compostos bifásicos têm-se mostrado, *in vitro*, biocompatíveis e atóxicos (BERTINETTI *et al.*, 2006).

2.3. PLASMA RICO EM PLAQUETAS

O plasma rico em plaquetas (PRP) é uma fonte autógena e não-onerosa de obtenção de fatores de crescimento (FC), preparado a partir de pequena quantidade de sangue obtida do próprio paciente (LIEBERMAN *et al.*, 2002). Em sua constituição há plasma, leucócitos e plaquetas. No plasma há vários FC, os leucócitos são responsáveis por fornecer resistência imunológica enquanto que as plaquetas sofrem degranulação na região lesionada promovendo liberação de FC (MARX & GARG, 1999; GOLDBERG, 1997). Esses fatores de crescimento influenciam a divisão celular, síntese matricial e diferenciação tecidual. Além disso, os FC tem grande representatividade na reparação óssea, dos tecidos musculares e formação condral (LIEBERMAN *et al.*, 2002). Eles são osteoindutores, diferenciando as células progenitoras, promovendo a osteogênese (LEMOES *et al.*, 2002). Há, pelo menos três fatores de crescimento que derivam dos grânulos plaquetários: Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento e transformação beta (TGF- β) e fator de crescimento semelhante a insulina (IGF) (GIANNOBILE, 1996).

O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) é o principal FC das plaquetas por ser o primeiro a se apresentar na ferida e guiar a revascularização, síntese de colágeno e regeneração óssea (SCARSO *et al.*, 2001). Outras fontes de PDGF são os macrófagos, células endoteliais e osteócitos. O PDGF das plaquetas inicia o processo de reparo, enquanto que o presente nos macrófagos dá sequência ao processo de cicatrização (LYNCH, 1999).

Os fatores de crescimento de transformação beta (TGF- β) constituem um grande grupo de mediadores locais, que regulam a proliferação e funções da maioria dos vertebrados. Os TGFs mais abundantes no PRP são TGF- β 1 e TGF- β 2, ligados à cicatrização do tecido conjuntivo e regeneração óssea. Suas principais funções são a quimiotaxia e a mitogênese de osteoblastos, promovendo a neoformação óssea (SCARSO, *et al.*, 2001).

O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF I e II) são secretados pelos osteoblastos no processo de formação óssea, o que promove a osteogênese a acelera a deposição óssea, além disso, esse FC estimula a mitogênese dos osteoclastos e promovem a quimiotaxia para fibroblastos, osteoclastos e células progenitoras dos osteoclastos. São

produzidos no fígado e circulam ligados à proteínas. Quando aderido à proteína, possui grande afinidade à HA, por isso, pode ser armazenado no osso (SCARSO, et.al, 2001).

O PRP é obtido através da centrifugação do sangue, resultando em uma concentração acentuada de plaquetas e reduzido volume plasmático. Deve ser sempre autólogo devido ao risco de rejeição ou inviabilização de secreção de fatores de crescimento ativos (MARX, 2004). Foi estipulada ainda que a concentração mínima de plaqueta que o PRP precisa apresentar para que seus resultados clínicos sejam favoráveis é de 338% a mais que o valor basal (MARX et al, 1998).

O sangue deve ser coletado de forma asséptica e armazenado da mesma forma em tubos com anticoagulante, preferencialmente o citrato (CAMARGO, et.al,2002). Toda a manipulação e o procedimento devem ser realizados de forma cuidadosa, evitando ruptura e/ou danos à membrana plaquetária, além de assegurar uma separação eficiente dos componentes (PAGLIOSA, ALVES, 2007).

2.4. CRESCIMENTO ÓSSEO GUIADO *in vivo*

Estudos baseado em preenchimentos de defeitos ósseos não críticos tem sido modelo atual para testes comparativo *in vivo*. Esse método permite a avaliação do comportamento de diferentes biomateriais no processo de neoformação óssea. Por outro lado, a literatura confronta essa metodologia pelo fato de que a regeneração espontânea apresentada pelas células ósseas podem confundir o resultado, sendo que por muitas vezes, estudos com grupos controle de coágulos sanguíneos somente, apresentaram velocidade de reparação maiores que implantes de biomateriais (REICHERT et al., 2009).

O modelo de crescimento ósseo guiado *in vivo* é baseado na criação de um espaço segregado onde haverá proliferação de neovascularização e células osteoprogenitoras, as quais criam uma barreira contra o crescimento de tecidos alheios ao tecido ósseo que possuem velocidade de migração maior que as células osteogênicas (DINATO; NUNES; SMIDT, 2007). Basicamente, o método consiste na implantação de barreiras mecânicas para isolamento e proteção do coágulo sanguíneo e do defeito ósseo propriamente dito, permitindo assim que as células ósseas precursoras acessem um espaço isolado destinado à regeneração do tecido ósseo (EL HADDAD et.al, 2014)

Após a implantação das guias para essa metodologia, há uma sequência específica de eventos. Nas 24 horas que precedem o enxerto ósseo, o biomaterial e o espaço criado pela guia são preenchido com o coágulo sanguíneo. Este, por sua vez, libera fatores de crescimento

e citocinas. Após absorção, o coágulo será substituído por tecido de granulação, rico em neovascularização. Através desses novos vasos, há o transporte de nutrientes e células tronco mesenquimais diferenciáveis, capazes de promover neoformações ósseas (osteóide). Em seguida, a mineralização desse osteóide inicia a formação do tecido que servirá de aporte para o osso lamelar (LIU; KERNS, 2014).

Para esse estudo, a barreira acima citada foi desenvolvida em formato de uma guia de nylon, as quais possuem o objetivo de isolar a interação entre o defeito ósseo criado na calvária e o espaço interno da guia, o qual foi preenchido com biomaterial e coágulo sanguíneo ou PRP (vide Materiais e Métodos). Esse mesmo modelo de guia já foi utilizado previamente e com sucesso por Colombo (2016) e Kuci (2017), contudo o aparato era feito em poliamida. Levandowski Jr (2014) também utilizou esse tipo de guia entretanto fabricado em outro material, o Teflon.

2.5. MICROSCOPIA ÓPTICA (MO) E ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Os aparelhos de microscopia óptica convencionais são geralmente limitados a um aumento de 2000 vezes. Acima desse aumento, detalhes menores tem sua observação prejudicada. Já em aparelhos mais modernos, esse aumento pode chegar a 30.000 vezes ou até mais para a maioria dos materiais sólidos (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

O MEV pode conceder informações relevantes sobre as características estruturais e identificação de elementos químicos de materiais sólidos. O MEV permite alta resolução das amostras analisadas, propiciando imagens tridimensionais, resultantes da grande profundidade de campo. Pode-se afirmar ainda que o exame de MEV funciona como um complemento do exame de MO (DEDAVID; GOMES; MACHADO 2007).

Um dos objetivos da técnica de MEV é avaliar superfícies irregulares, como os ossos, permitindo uma análise qualitativa do tecido, tendo em vista que análises quantitativas podem ser dificultosas, uma vez que a padronização de amostras biológicas é complicada de se obter (DIAMANTINO; NICOLAU, 2009).

2.6. HISTOMORFOMETRIA

A histomorfometria óssea quantifica o processo de formação e reabsorção óssea (CORRÊA, et.al., 2000). É uma avaliação histológica de certa região óssea calcificada que tem como objetivo avaliar a remodelação estática e dinâmica, além da estruturação óssea. É

um método diagnóstico acurado, capaz de ceder informações não obtidas por nenhum outro método (KULAK; DEMPSTER, 2010).

As variações histomorfométricas derivam-se de medições primárias feitas em microscópio, como área, perímetro e espessura . Os parâmetros histomorfométricos são divididos em duas categorias - estrutura, a qual fornece informações precisas sobre a massa óssea; e o - remodelamento, onde é possível averiguar a quantidade de osso não mineralizado (osteóide) e a extensão da cavidade de absorção (lacunas de Howship) (KULAK; DEMPSTER, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o comportamento da neoformação óssea dos biomateriais de hidroxiapatita (HA) e hidroxiapatita com magnésio (HAMgO 1%), acrescidos ou não (controle) de plasma rico em plaquetas por meio de guias de crescimento implantadas experimentalmente na calvária de coelhos, aos 60 e 90 dias pós-implantação.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar, aos 60 e 90 dias, a capacidade de neoformação óssea, osteointegração e osteocondução dos biomateriais estudados.
- Avaliar a capacidade do plasma rico em plaquetas de acelerar o processo.
- Verificar qual biomaterial apresentou melhor qualidade de tecido ósseo obtido, além de analisar a aplicabilidade e relevância com plasma rico em plaquetas, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia óptica (MO) e histomorfometria.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Esse estudo foi submetido ao Comitê de Ética e Experimentação Animal- CETEA da Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC e obteve aprovação sob o protocolo número 1447300617

4.1. DOS BIOMATERIAIS ESTUDADOS

Esse estudo englobou a avaliação de dois biomateriais, ambos produzidos pelo Grupo de Pesquisa em Biomateriais do Centro de Ciências Tecnológicas (CCT) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), situado em Joinville, Santa Catarina. As composições estudadas foram Hidroxiapatita (HA) 1,67M e Hidroxiapatita com Magnésio (HA/MgO) 1%.

A caracterização microestrutural e morfológica foi realizada em colaboração com o grupo do CCT/UDESC, através de microscopia eletrônica de varredura MEV). Os biomateriais usados nesse estudo foram utilizados em forma de grânulos nanoestruturados sinterizados à temperatura de 1100°C durante 2 horas.

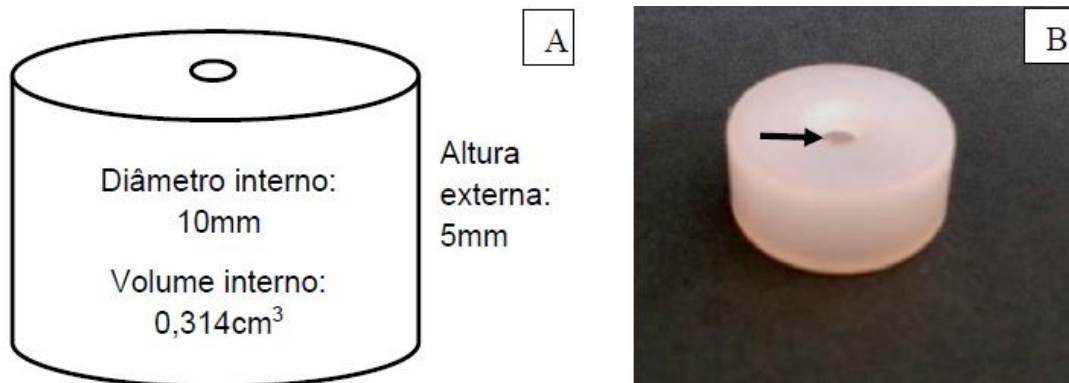
Tabela 1 Descrição dos biomateriais produzidos pelo Grupo de Estudos em Biomateriais do CCT/UDESC Joinville-SC, com suas composições e proporções.

BIOMATERIAL	COMPOSIÇÃO	PROPORÇÃO
Hidroxiapatita 1,67M	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	100%
Hidroxiapatita + Magnésio	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂ + MgO	99%/ 1%

Fonte: Arquivo Pessoal

Para a implantação dos biomateriais, associados ou não ao PRP, foram utilizados aparatos de crescimento ósseo guiado, feitos em nylon, termoplástico dúctil, com boa usabilidade, propriedades mecânicas e tribológicas. O nylon possui estabilidade química, é bioinerte (não citotóxico), com baixa molhabilidade em fluidos corpóreos. É um material hidrofóbico, e por isso, não exerce nenhuma influência sobre os biomateriais de fosfato de cálcio e ao processo de neoformação óssea, quando aplicados em teste *in vivo*. Esse aparato foi fabricado pelo CCT/UDESC nas dimensões 5mm de altura e 10mm de diâmetro interno, resultando assim em um volume interno de 0,314 cm³ (Figura 1).

Figura 1 - (A) Esquema representativo do aparato de nylon (guia), usado para crescimento ósseo guiado e suas dimensões; (B) aparato em nylon, usado como guia de crescimento ósseo. Destaque para o orifício central (seta preta) por onde o parafuso cortical é introduzido, fixando a guia na calvária dos animais



Fonte:

Grupo de Estudos em Biomateriais do CCT/UEDESC em Joinville-SC.

4.2. PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)

Para obtenção do PRP, a técnica utilizada foi adaptada de Vendramin *et.al* (2006), com processamento das amostras de sangue total imediatamente após as coletas de 4mL (seringa de 5mL e agulha hipodérmica 25x7mm), proveniente da artéria auricular, sendo esse volume armazenado em tubos com anticoagulante citrato de sódio.

Foi realizada a contagem manual das plaquetas, através da câmara de Neubauer para obtenção das quantidades basais das mesmas, sendo após, a amostra submetida a primeira rotação a 1000rpm/min durante 10 minutos.

Ao final desse tempo, o sobrenadante do plasma foi separado e armazenado em tubo de Falcon, onde foi submetido a nova rotação-500rpm/minuto durante mais 10 minutos. Na sequência do segundo processamento, o sobrenadante pobre em plaquetas foi descartado, restando aproximadamente 1 mL do plasma rico, quando uma nova contagem manual por câmara de Neubauer foi realizada.

Adicionou-se gluconato de cálcio a 10%, ativando o PRP, para formação de um gel que facilitaria sua aplicação. Essa adição ocorreu na proporção de 300µL de gluconato de cálcio a 10% para cada 1000µL de plasma. Esse gel foi associado ao biomaterial, formando uma espécie de pasta que foi colocada dentro da guia de nylon (n6), a qual foi implantada na calvária dos animais através de um parafuso cortical.

4.3. DA UNIDADE EXPERIMENTAL, MANEJO E CUIDADOS

Para a realização do estudo, foram utilizados 12 coelhos hígidos, mestiços, com idade aproximada de 10 meses e peso médio de $4,0 \pm 0,54$ Kg. Os animais foram adquiridos no criatório autorizado do Centro de Educação Profissional Caetano Costa, em São José do Cerrito- SC e ambientalizados em gaiolas individuais, próprias à espécie, suspensas a 60 cm do chão, o qual foi coberto por maravalha, em uma mesma sala por trinta dias. Durante esse tempo, os animais foram alimentados com ração peletizada apropriadas e vegetais duas vezes ao dia, além de água *ad libitum*. Nesse período foi aplicada medicação antiparasitária a base de ivermectina 1%, na dose de 0,4mg/Kg, por via subcutânea. Todos os animais foram avaliados quanto aos aspectos clínicos e laboratoriais e comprovada sua higidez por meio de realização de hemograma e perfil bioquímico.

Os animais foram separados aleatoriamente em dois grupos de 6 animais cada, sendo um grupo eutanaziados aos 60 dias e outro aos 90 dias de avaliação pós-operatória. Tanto o grupo 60 quanto 90, receberam os mesmos biomateriais (Hidroxiapatita (HA 100%) 1,67M e Hidroxiapatita com Magnésio (HAMgO) 1%), entretanto 3 animais de cada grupo receberam PRP (plasma rico em plaquetas) adicionado ao biomaterial, enquanto os outros três receberam coágulo sanguíneo adicionado ao biomaterial.

4.4. PRÉ-OPERATÓRIO E ANESTESIA

Nos dias que antecederam os procedimentos cirúrgicos foram realizadas as tricotomias da porção dorsal dos crânios estendendo-se da região supraorbital rostral até a região caudal da base das orelhas, usando como limites laterais as pálpebras superiores. Também foram realizadas tricotomias nas orelhas dos animais, para acessos de vasos sanguíneos. Nas quatro horas que precederam os procedimentos, os animais foram submetidos a jejum sólido somente, já que o líquido não apresenta relevância para a espécie.

Previamente a realização do procedimento cirúrgico, os animais receberam a medicação pré-anestésica composta pela associação de cloridrato de cetamina (Cetamin®, Syntec, Santana de Parnaíba/SP, Brasil) na dose de 20 mg/Kg, midazolam (Hipolabor, Sabará/MG) na dose de 2 mg/Kg e sulfato de morfina (Dimorf®, Cristália, Itapira/SP, Brasil) na dose de 0,5mg/Kg. A aplicação foi realizada por via intramuscular e os animais, mantidos em local escuro e silencioso. Após 15 minutos, os animais foram canulados com catéter 24G na artéria auricular em uma das orelhas, com intuito de coletar 4 mL de

sangue arterial para o desenvolvimento do PRP. Já um catéter de mesmo calibre foi utilizado para acessar a veia auricular periférica da outra orelha com intuito de usá-la como via de administração de fluidoterapia e fármacos. Para indução anestésica, foi aplicado propofol (Provive®, União Química, Embu-Guaçu/SP, Brasil) na dose de 2mg/Kg . Após relaxamento, borrifou-se a região da glote com cloridrato de lidocaína 100mg/mL (Hipolabor, Sabará /MG, Brasil), em spray, previamente para introdução da máscara laríngea (V-Gel®, Docsinnovent Ltda, London/UK) de tamanhos R3 ou R4- averiguando a compatibilidade com o tamanho do animal, que foi utilizada para manutenção da anestesia inalatória com isoflurano (BioChimico, Rio de Janeiro/RJ, Brasil) a 1 CAM diluído em oxigênio a 100% em vaporizador calibrado, com fluxo variando entre 200 - 300mL/Kg/min. Na linha de incisão, foi infiltrado, via subcutânea, cloridrato de lidocaína 2% (Hypofarma, Ribeirão das Neves/MG, Brasil) sem vasoconstritor, na dose de 7mg/Kg.

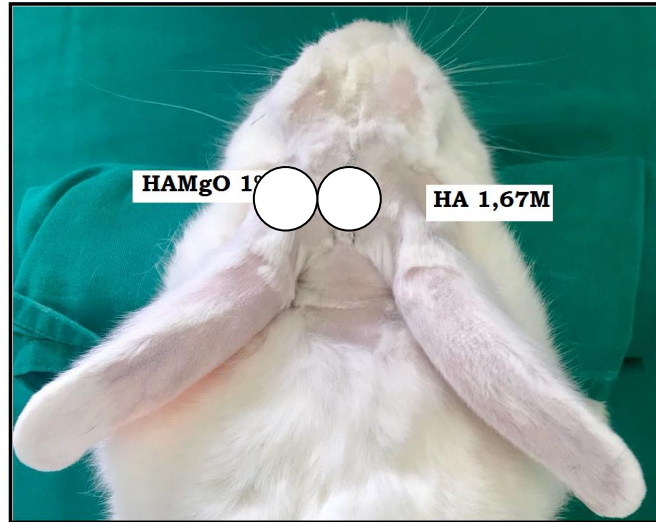
Aproximadamente 30 minutos antes do início do procedimento cirúrgico, os animais receberam antibiótico, via intravenosa, enrofloxacino (Chemitril® 2.5%, Chemitec, São Paulo/SP, Brasil), na dose de 10mg/Kg.

4.5. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados todos pelo mesmo cirurgião, com os animais posicionados em decúbito esternal e com a cabeça apoiada ventralmente sobre uma calha metálica. Realizou-se a antisepsia local baseada no protocolo álcool 70% - iodo povidona - álcool 70%, sendo logo após, posicionado o campo cirúrgico.

Uma incisão magistral longitudinal em sentido rostrocaudal, de aproximadamente 5 cm foi realizada na crista sagital como acesso cirúrgico, com lâmina de bisturi número 24, estendendo-se da região interorbital até a base das orelhas . Após, o periósteo também foi incisado e lateralizado com o auxílio de um elevador periosteal para que a região óssea da calvária estivesse totalmente exposta para a aplicação do biomaterial. A disposição das guias de nylon foram semelhantes em todos os animais. Dividiu-se, subjetivamente, as calvárias em dois quadrantes longitudinais e foi aplicada uma guia de cada lado. Em todos os animais, de ambos os grupos, o quadrante direito recebeu HA enquanto que o quadrante esquerdo recebeu HAMgO 1% (Figura 2).

Figura 2 - Imagem esquematizando a ordem de disposição dos tratamentos previamente determinadas

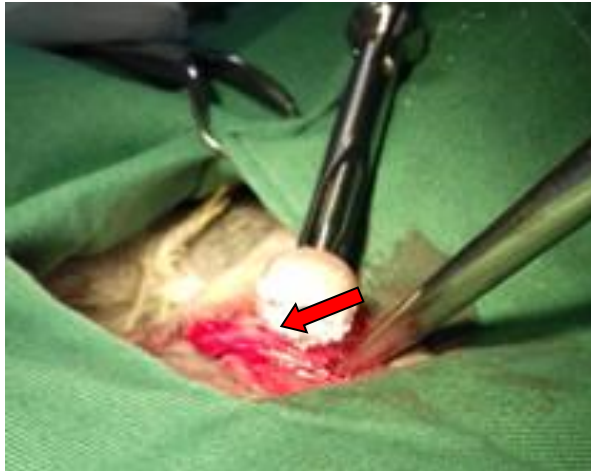


Fonte: Arquivo Pessoal

No grupo 60 dias, os animais 1, 2 e 3, devidamente identificados, receberam a composição de PRP, enquanto que os animais 4, 5 e 6 receberam coágulo sanguíneo. Por outro lado, no grupo 90 dias, os animais 1, 3 e 4 receberam a composição do PRP enquanto que, os animais 2, 5 e 6 receberam o coágulo sanguíneo.

Para a fixação das guias de náilon, foram realizadas perfurações corticais da calvária com broca ortopédica de 1.5 mm acoplada a um guia de broca, seguido de rosqueamento cortical com um rosqueador de 1.5mm. Após este procedimento e aferição da espessura cortical com um medidor de profundidade foram introduzidos parafusos corticais sextavados não bloqueados de 2.0 de 10mm de comprimento (Figura 3), os quais foram fixados a cortical óssea com auxílio de uma chave hexagonal, fixando a guia de náilon.

Figura 3 - Momento da implantação da guia de nylon repleta com o biomaterial (seta vermelha) na calvária do animal



Fonte: Arquivo Pessoal

Após a implantação, procedeu-se a sutura dos tecidos moles, sendo o periósteo suturado com fio de náilon monofilamentar 3-0 em padrão Wolf. A dermorrafia foi realizada com fio de náilon monofilamentar 3-0 em padrão de sutura de Wolf, diretamente sem a redução prévia do plano subcutâneo.

4.6. PÓS-OPERATÓRIO

Ao final do procedimento, os animais foram medicados com cloridrato de tramadol (6mg/Kg), TID, dipirona sódica (25mg/Kg), TID e meloxicam 0,2% SID (2mg/Kg), todos por via subcutânea. O mesmo tratamento foi realizado nos três dias subsequentes. Além destes, os animais receberam ainda antibioticoterapia à base de enrofloxacino 2,5% (10mg/Kg), por via intramuscular, BID por cinco dias.

Durante os 10 dias de pós-operatório, as feridas cirúrgicas foram avaliadas para edema, contaminação, hiperemia ou deiscência das suturas. Após esse período, os pontos de pele foram retirados. As limpezas eram realizadas com solução de cloreto de sódio 0,9%, BID.

Em todo o período do estudo, os animais foram avaliados para qualquer tipo de alteração fisiológica ou comportamental que pudesse sugerir a necessidade de descarte e substituição da amostra.

4.7. COLHEITA DAS AMOSTRAS PARA AVALIAÇÃO

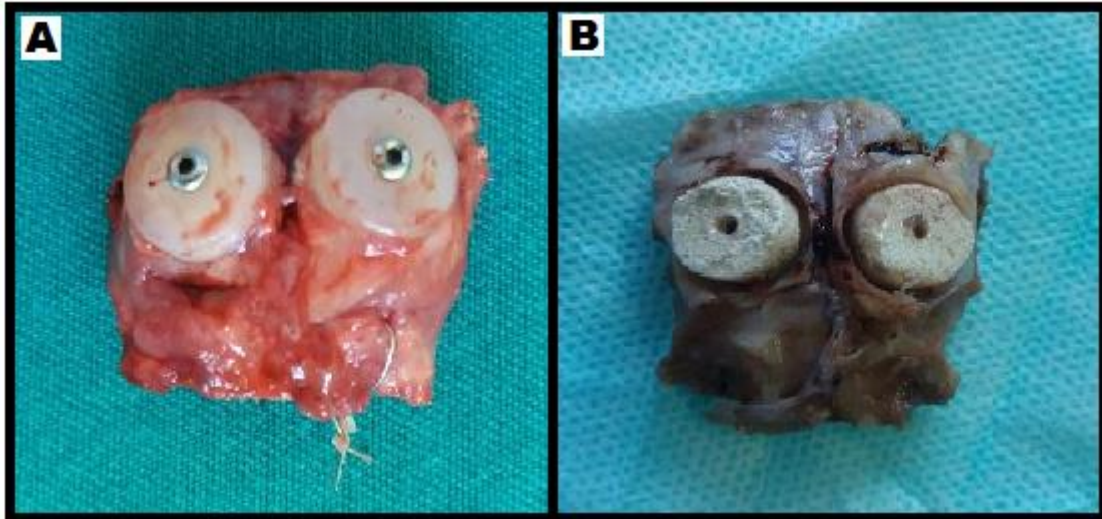
Ao final dos períodos pós-operatórios- 60 e 90 dias, os animais foram submetidos à eutanásia, para realização da colheita das calvárias, conforme Resolução nº 13 de 20 de setembro de 2013 do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA).

A medicação pré-anestésica baseou-se na associação de cetamina (Cetamin®, Syntec, Santana do Panaíba/SP, Brasil) na dose de 20 mg/Kg, midazolam (Medicamento genérico, Hipolabor, Sabará/MG) na dose de 2 mg/Kg, por via intramuscular, seguida pela indução anestésica com propofol (Provive®, União Química, Embu-Guaçu/SP, Brasil) na dose de 5mg/Kg, por via intravenosa, aplicada na veia auricular. Ao atingir o plano anestésico desejado, os animais receberam 10 mL de cloreto de potássio 19,1%, também por via intravenosa, até a parada cardiorrespiratória confirmada por auscultação por estetoscópio.

A obtenção das calvárias procedeu-se similarmente ao procedimento cirúrgico. Após incisão de pele no mesmo local e rebatimento das estruturas de tecidos moles, as calvárias foram seccionadas com auxílio de um disco serrilhado acoplado a uma furadeira elétrica, realizando-se assim a retirada da porção de tecido ósseo craniano contendo as amostras.

As calvárias foram armazenadas em frascos de vidro individuais contendo solução de formaldeído tamponado a 10% por 7 dias (Figura 4), sendo as amostras devidamente identificadas. Após esse período, as guias de nylon foram removidas e os fragmentos ósseos (calvárias) foram divididos em duas partes, com o auxílio de um disco diamantado acoplado a um motor elétrico. Cada parte foi armazenada novamente em frascos individuais com formaldeído tamponado a 10% por mais 7 dias. Em seguida, as amostras foram encaminhadas para análise histológica, histomorfométrica e de microscopia de varredura.

Figura 4 - Imagens ilustrativas da coleta dos materiais para análise. (A) Calvária recém retirada ainda com as guias de nylon acopladas. (B) Material pós tempo de conservação em formaldeído tamponado a 10% após a retirada das guias



Fonte: Arquivo Pessoal

4.7.1. Avaliação Histológica

O processamento e análise das amostras para os exames histológicos foram realizados no Laboratório de Histologia Animal do CAV/UEDESC - Lages-SC, sob coordenação do professor Doutor Celso Pilati. Inicialmente, as amostras foram descalcificadas em ácido nítrico a 10% por um período de 7 dias, seguido do processamento histotécnico. Na sequência, foram submetidas à desidratação com álcool, diafanização com xilol e introduzidas em blocos de cera de parafina, os quais foram seccionados através de um micrótomo a uma espessura de 4 a 5 μm . Após montagem das lâminas, as mesmas foram coradas com hematoxilina e eosina de Harris para, por fim, serem avaliadas por microscopia óptica (MO).

No processo de avaliação, o histologista era cego aos tratamentos e períodos estudados. Utilizou-se um critério de avaliação adaptado de Valiati (2011) baseado em cruzes para atribuir quantidades dos tipos celulares encontrados. Os parâmetros avaliados foram neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), presença de células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), além da proporção de osso primário (OP) e osso secundário (OS). Quando da ausência do parâmetro assumiu-se a marcação como nenhuma cruz; consequentemente, uma cruz era atribuída para pouca quantidade, duas cruzes para quantidade moderada, três cruzes para quantidade acentuada e quatro cruzes para quantidade muito acentuada (Tabela 2).

Além disso, um novo critério foi adicionado à avaliação, no qual dividiu-se subjetivamente o crescimento ósseo em três terços, sendo terço inicial, terço médio e terço final, visando avaliar até onde havia neoformação óssea na amostra.

Tabela 2 - Modelo de critérios de avaliação histológica baseado em atribuição de cruzes para quantificação de neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), presença de células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP), tecido ósseo secundário (OS)

	NTO	DFC	PO	CL	BR	OP	OS
Ausência	0	0	0	0	0	0	0
Leve	+	+	+	+	+	+	+
Moderada	++	++	++	++	++	++	++
Acentuada	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Muito acentuada	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

Fonte: Adaptado de Valiati (2011)

4.7.2. Microscopia Eletrônica De Varredura (MEV)

As amostras coletadas aos 60 e 90 dias de pós-operatório foram submetidas à análise de microscopia eletrônica de varredura para caracterização morfológica e microestrutural dos fragmentos ósseos com biomateriais. Essa avaliação foi realizada pelo Grupo de Pesquisa em Biomateriais do CCT/UEDESC - Joinville-SC, sob coordenação do professor doutor Nelson Heriberto Almeida Camargo. Para tal, o equipamento da marca ZEISS®, modelo DSM 940A foi utilizado. A metodologia foi definida por meio de elétrons secundários (SE), tendo a corrente de operação em 60 mA, a tensão de aceleração de elétron a 15kV e a distância de trabalho de 10mm.

As amostras foram mantidas em solução de formaldeído tamponado a 10% até o início do processamento para o MEV. Primeiramente, as mesmas passaram por um processo de desidratação em álcool 70% e 100%, durante 6 dias. Na sequência foram submetidas a diafanização em xilol por uma hora e retornaram ao álcool por mais 48 horas. Com o auxílio de um disco diamantado acoplado a um motor elétrico, as amostras foram fraturadas para serem finalmente avaliadas.

Os fragmentos ósseos com biomateriais recuperados do teste *in vivo* foram então fixados sobre um suporte porta- amostra com o auxílio de uma fita carbono dupla face. Após, passaram pelo dessecador sendo, na sequência, submetidas ao processo de metalização por

pulverização catódica, utilizando equipamento específico (Bal-Tec® SCD 050, modelo Sputter Coater). Ao término desse procedimento, obteve-se um filme de ouro-paládio de 30nm sobre o fragmento. Esse recobrimento teve o objetivo de conter os efeitos de carga no interior da câmara do microscópio eletrônico. No procedimento de deposição iônica, a temperatura da câmara de metalização foi ajustada em 25°C, a tensão em 2kV, a corrente em 40mA e o tempo de deposição em 140 segundos.

A microscopia eletrônica de varredura foi responsável pela análise descritiva morfológica através do método visual da interface entre a superfície receptora (calvária) e o biomaterial implantado. Foram avaliados ainda a quantidade de biomaterial não absorvido e os tipos e quantidades de células osteogênicas.

4.7.3. Histomorfometria

Após o corte das amostras já processadas para a microscopia óptica, os blocos foram enviados para o LABOPAVE (Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Catarina), UFSC, em Curitibanos- SC, aos cuidados do Professor Dr. Adriano Tony Ramos, as quais foram seccionadas através de um micrômetro na espessura de 3µm e coradas com tricrômico de Masson.

Para a realização das avaliações, foram obtidas imagens fotográficas de cinco campos diferentes da amostra, todas no mesmo aumento de 10X, utilizando-se um microscópio óptico (Leica, modelo DM 500) com uma câmera fotográfica acoplada (Leica ICC 50HD), conectada a um computador através de um cabo USB comum. A obtenção das imagens ocorreu através de um software específico (Leica Application Suite, versão 3.0.0, 2013). Assim como na avaliação histológica, o avaliador era cego aos tratamentos e períodos de evolução.

Após a obtenção das imagens, as mesmas foram importadas para outro software (ImageJ 1.50i), o qual foi utilizado para calibrar os tons das cores dos quesitos a serem avaliados. Foi estabelecido como padrão o azul para o tecido conjuntivo fibroso, já que a coloração Tricrômico de Masson é responsável por evidenciar o colágeno, e vermelho para o tecido ósseo.

Ao final da calibragem, o programa analisou a função chamada "Macro", a qual estabeleceu valores em pixels das áreas averiguadas, criando uma tabela. Por sua vez, o software de obtenção das imagens estabeleceu o aumento de 10X como o selecionado para as imagens desse estudo, uma vez que cada pixel equivalia a 0,64 microns e a área de cada

imagem, equivalia ao mesmo aumento de 2048 X 1536 microns.

5. RESULTADOS

Os procedimentos cirúrgicos ocorreram sem nenhum tipo de complicação e o cirurgião classificou o procedimento como facilmente exequível. Após recuperação anestésica, os animais não apresentaram nenhuma alteração de comportamento e alimentaram-se normalmente.

Durante todo o estudo os animais foram avaliados para qualquer alteração fisiológica ou neurológica e também em relação às feridas cirúrgicas. Nenhuma alteração em nenhum desses aspectos foi digna de nota.

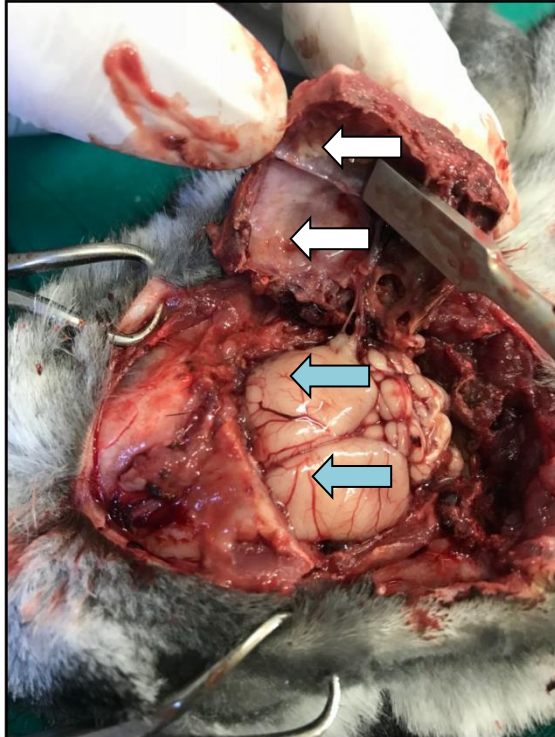
O projeto inicial era composto de dois grupos amostrais apresentando 7 animais cada. Entretanto, na execução da primeira fase das cirurgias de colocação das guias com biomateriais, no grupo de 90 dias, o sétimo animal veio a óbito. Ao ser submetido à necropsia, constatou-se o colapso dos pulmões, sugerindo um deslocamento precoce da máscara laríngea. Não foram constatadas lesões que pudessem ser decorrentes dos implantes. Na segunda fase dos procedimentos, não houve nenhuma intercorrência digna de nota.

Mesmo após o ocorrido, percebeu-se a homogeneidade do grupo, uma vez que dos seis animais remanescentes, três haviam recebido o implante de biomaterial acrescido de PRP e três de biomaterial acrescido de coágulo. Sendo assim, optou-se por diminuir as amostras para doze animais.

Após o procedimento de eutanásia dos animais e coleta das amostras, observou-se macroscopicamente uma boa integração dos biomateriais, tanto com PRP quanto com coágulo, no leito receptor. Apenas uma das amostras, HA + PRP do grupo 60 dias, desprende-se parcialmente da calvária no instante da remoção do parafuso e da guia.

Importante ressaltar que durante a remoção das calvárias, foi percebido que em todas as amostras, os parafusos ultrapassaram o limite interno da cortical óssea das calvárias (Figura 5) e conseqüentemente lesionaram as meninges e o cérebro. Entretanto, nenhum dos animais apresentou qualquer tipo de alteração comportamental ou fisiológica.

Figura 5 - Imagem da colheita das calvárias para avaliação. Ênfase para os parafusos que ultrapassaram os limites das calvárias (seta branca) e as respectivas lesões causadas em meninges e cérebro (seta azul)



Fonte: Arquivo Pessoal

Ainda macroscopicamente, foi possível perceber uma quantidade bastante acentuada de biomaterial remanescente em todos os tratamentos e períodos. A seguir, serão apresentados os resultados do dois biomateriais acrescidos de PRP ou coágulo durante os dois períodos de evolução estudados.

5.1. HA + PRP

Os resultados encontrados para essas amostras apresentaram uma classificação de crescimento ósseo acentuado para esse tratamento nos dois períodos, porém com quantidade de tecido fibroso relevante. Sendo assim, o tratamento sugere um bom potencial osteoindutor.

5.1.1. Grupo 60 dias

Esse tratamento apresentou acentuada neoformação de tecido ósseo, a qual apresentou-se moderada tanto em tecido ósseo primário quanto em secundário. Apresentou ainda moderada quantidade de tecido fibroso. As amostras acusaram ainda leve quantidade de

células gigantes mononucleadas (osteoclastos) e moderada quantidade de células de limpeza. No quesito crescimento ósseo, esse tratamento desenvolveu-se até o terço médio da amostra.

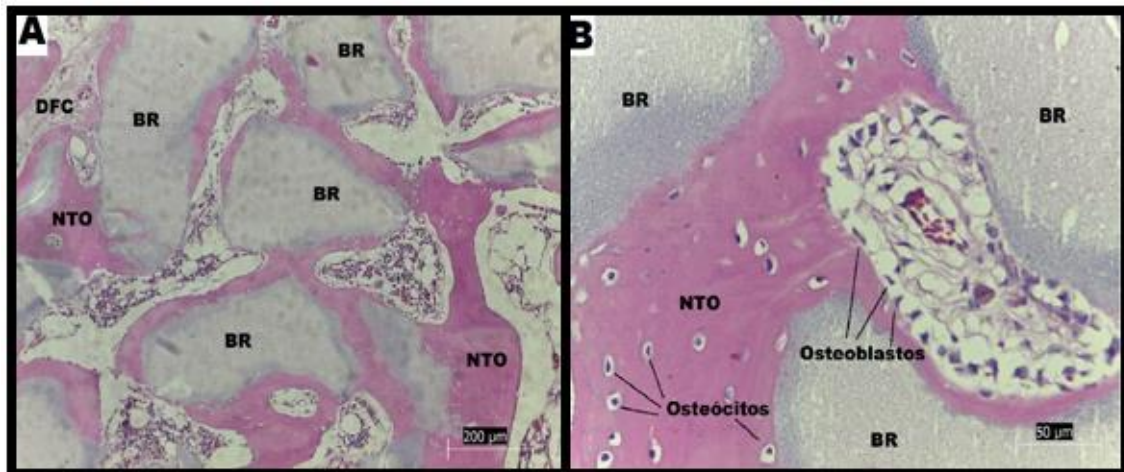
A partir da Tabela 3 serão apresentados os resultados histológicos obtidos nas análises das amostras. As Figuras 6, 7 e 8 representam respectivamente, as micrografias obtidas pela microscopia óptica com diferentes colorações e as obtidas pela microscopia eletrônica de varredura, sobre a superfície de fratura do fragmento ósseo, obtido do tratamento HA + PRP no período de 60 dias de teste *in vivo* guiado.

Tabela 3 - Resultados obtidos através da análise histológica de HA+ PRP, com evolução de 60 dias de pós-operatório, quanto a neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS)

NTO	DFC	PO	CL	BR	OP	OS
+++	++	+	++	++++	++	+

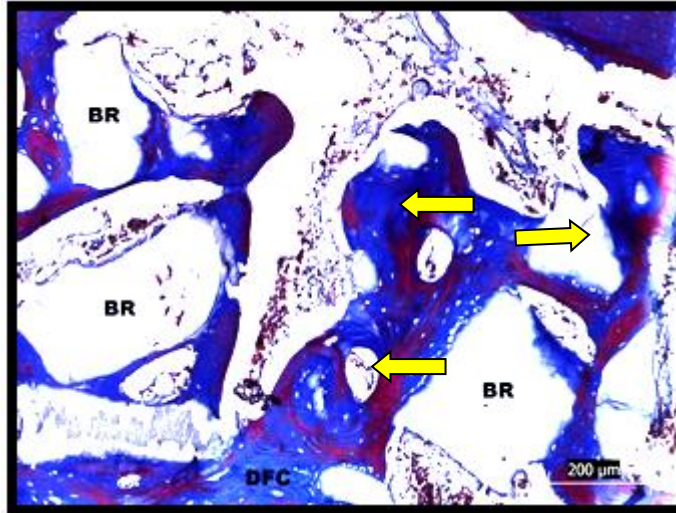
Fonte: Arquivo Pessoal

Figura 6 - Imagem histológica para o tratamento HA + PRP no período de evolução de 60 dias. Coloração Hematoxilina/Eosina (HE). A) (BR) biomaterial remanescente; (NTO) neoformação de tecido ósseo; (DFC) deposição de fibras colágenas. Aumento 10X. B) (BR) biomaterial remanescente; (NTO) neoformação de tecido ósseo. Detalhe para osteócitos e osteoblastos (setas pretas). Aumento 40X



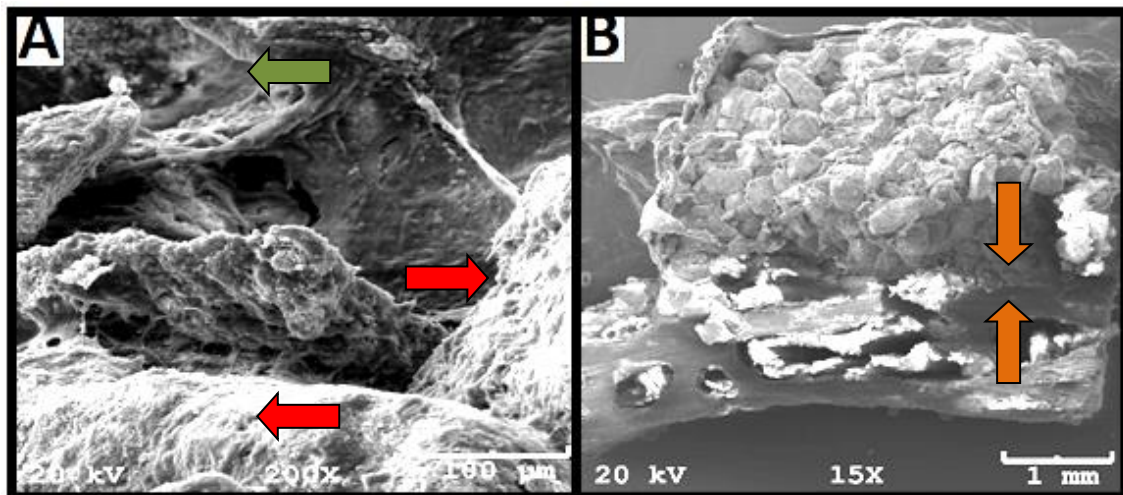
Fonte: Laboratório de Histologia Animal CAV/UDESC- Lages- SC

Figura 7 - Imagem histológica para o tratamento HA + PRP com tempo de evolução para 60 dias. Coloração Tricrômico de Masson. (BR) Biomaterial remanescente. Tecido conjuntivo em coloração azul e tecido ósseo em coloração vermelha evidenciada pela seta amarela. Aumento 10X



Fonte: LABOPAVE- UFSC - Curitiba- SC

Figura 8 - Micrografia obtida através de MEV para o tratamento HA + PRP no período de evolução de 60 dias. (A) Acentuada neoformação de tecido ósseo sobre o biomaterial remanescente (seta vermelha), deposição de moderada quantidade de fibras colágenas (seta verde) (aumento de 200X). (B) Interface do implante do biomaterial +PRP com a calvária, demonstrando boa osteointegração (seta laranja) (aumento 15X)



Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais da CCT/UEDESC - Joinville SC

5.1.2. Grupo 90 dias

No período de 90 dias de evolução, as análises demonstraram acentuada neoformação de tecido ósseo, assim como no período anterior, sendo moderada a classificação tanto de tecido ósseo primário quanto de tecido secundário. Apresentou ainda moderada quantidade de deposição de tecido fibroso e menor quantidade de células de limpeza, além de número de

osteoclastos superior a do período de 60 dias. A Tabela 4 apresenta os resultados acima descritos e as Figuras 9, 10 e 11 revelam as microscopias ópticas e de varredura obtidas sobre a superfície de fratura dos fragmentos ósseos.

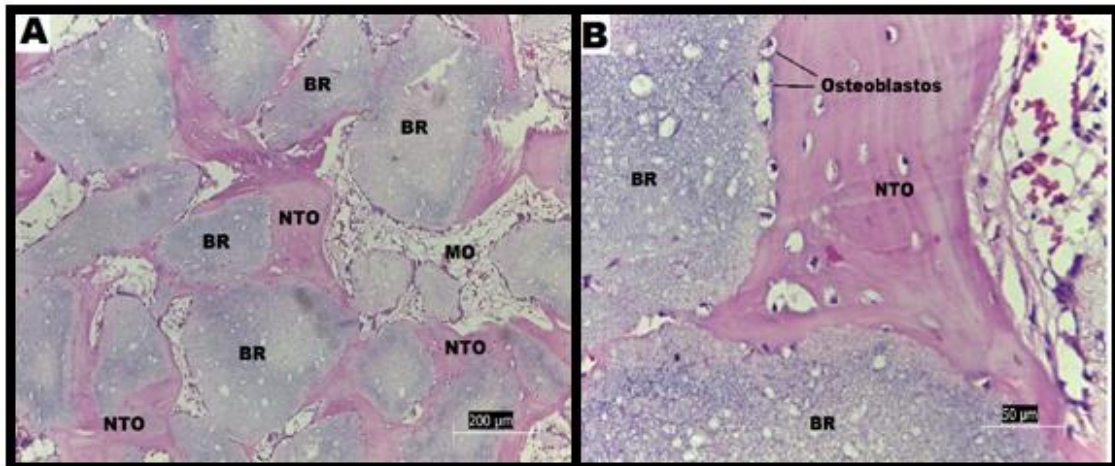
Em relação ao crescimento ósseo da amostra, esse tratamento desenvolveu-se até o terço final da guia.

Tabela 4 - Resultados obtidos através da análise histológica de HA + PRP, com evolução de 90 dias de pós-operatório, quanto a neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS)

NTO	DFC	PO	CL	BR	OP	OS
+++	++	+++	+	++++	++	++

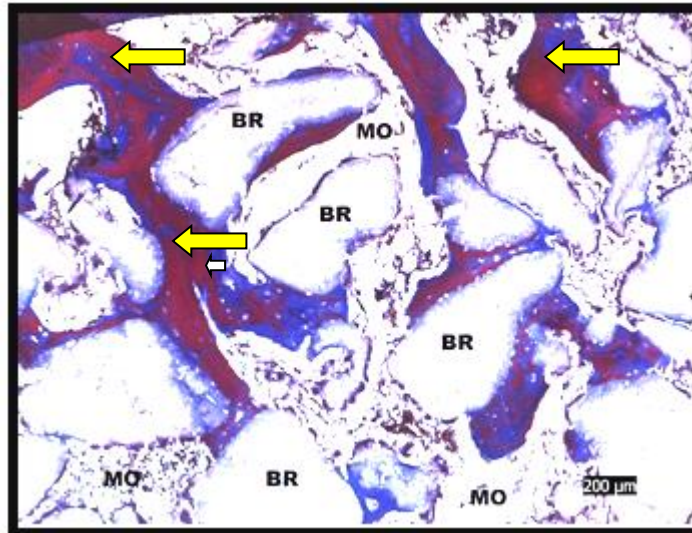
Fonte: Arquivo Pessoal

Figura 9 Imagem histológica para o tratamento HA + PRP no período de evolução de 90 dias. Coloração Hematoxilina/Eosina (HE). A) (BR) biomaterial remanescente; (NTO) neoformação de tecido ósseo; (MO) medula óssea. Aumento 10X. B) (BR) biomaterial remanescente; (NTO) neoformação de tecido ósseo. Destaque para osteoblastos (seta preta) Aumento 40X



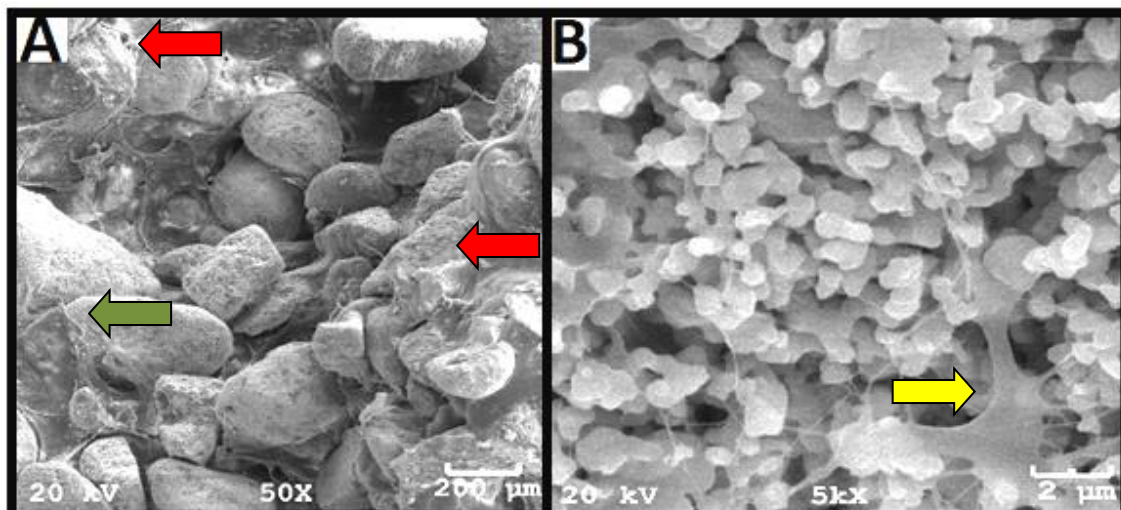
Fonte: Laboratório de Histologia Animal CAV/UEDESC- Lages- SC

Figura 10 Imagem histológica para o tratamento HA + PRP com tempo de evolução para 90 dias. Coloração Tricrômico de Masson. (BR) Biomaterial remanescente (MO) Medula óssea. Tecido conjuntivo em coloração azul e tecido ósseo em coloração vermelha (setas amarelas). Aumento 10X



Fonte: LABOPAVE - UFSC - Curitiba- SC

Figura 11 Micrografia do composto HA + PRP no período de evolução de 90 dias obtida através de MEV. (A) Demonstração de neoformação de tecido ósseo sobre o biomaterial remanescente (seta vermelha), deposição de tecido fibroso (seta verde) (aumento de 50X). (B) Atividade dos osteoblastos formando um novo tecido ósseo (seta amarela) (aumento 5000X)



Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais da CCT/UDESC - Joinville SC

5.2. HAMgO 1% + PRP

Em uma visão geral, essa associação apresentou neoformação de tecido ósseo bastante satisfatório, indicando uma boa osteointegração, já que nenhuma das amostras, em nenhum dos tempo de evolução, apresentou desprendimento do leito receptor.

5.2.1. Grupo 60 dias

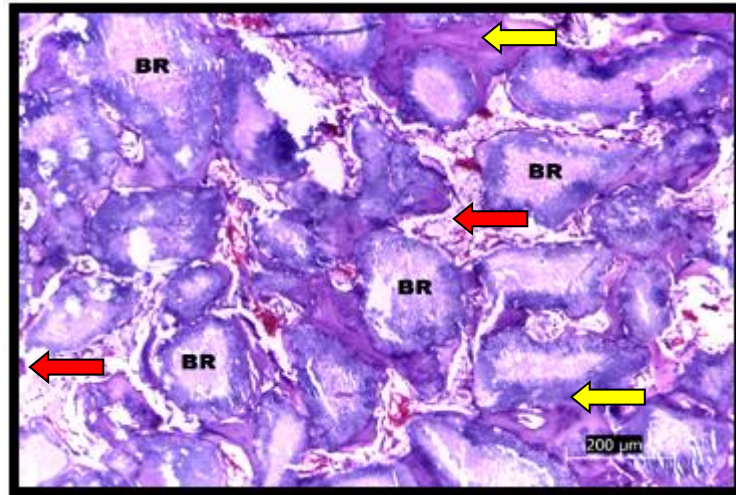
O crescimento ósseo desse tratamento desenvolveu-se até o terço médio da guia. A Tabela 5 mostra os resultados obtidos da associação do HAMgO 1% com PRP, o qual apresentou moderada neoformação de tecido ósseo, sendo moderada a formação de tecido ósseo primário e leve a de tecido secundário. Apresentou ainda acentuada formação de tecido fibroso. Os osteoclastos apresentaram-se em quantidade moderada assim como as células de limpeza. As Figuras 12, 13 e 14 demonstram as micrografias de histologia óptica e varredura, sobre a superfície do fragmento ósseo.

Tabela 5 Resultados obtidos através da análise histológica de HAMgO 1% + PRP, com evolução de 60 dias de pós-operatório, quanto a neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS)

NTO	DFC	PO	CL	BR	OP	OS
++	+++	++	++	++++	++	+

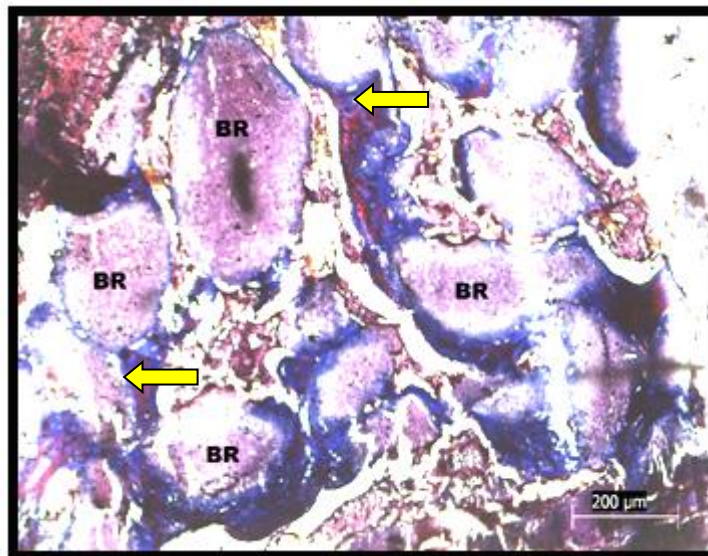
Fonte: Arquivo Pessoal

Figura 12 Imagem histológica para o tratamento HAMgO 1% + PRP no período de evolução de 60 dias. Coloração Hematoxilina/Eosina (HE). (BR) biomaterial remanescente. Crescimento ósseo moderado (setas amarelas); acentuada deposição de tecido fibroso (setas vermelhas). Aumento 10X.



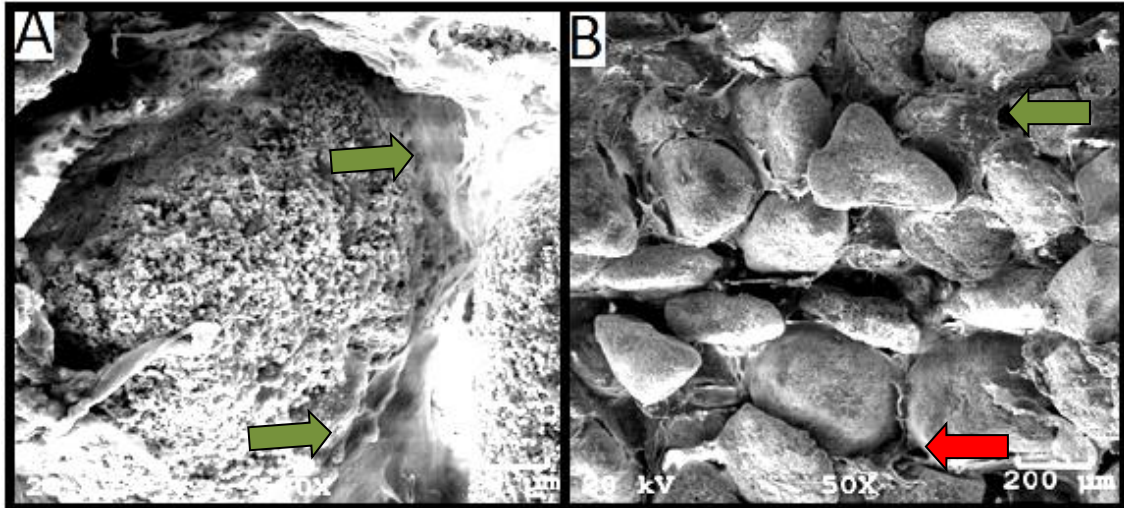
Fonte: Laboratório de Histologia Animal CAV/UEDESC- Lages SC

Figura 13 Imagem histológica para o tratamento HAMgO1% + PRP com tempo de evolução para 60 dias. Coloração Tricrômico de Masson. (BR) Biomaterial remanescente. Tecido conjuntivo em coloração azul e tecido ósseo em coloração vermelha evidenciada pelas setas amarelas. Aumento 10X



Fonte: LABOPAVE - UFSC - Curitiba- SC

Figura 14 Imagem obtida através de MEV demonstrando os resultados obtidos da associação do biomaterial HAMgO 1% + PRP no período de 60 dias. (A) deposição acentuada de tecido fibroso (seta verde) (aumento 500X). (B) demonstração de neoformação óssea em quantidade moderada entremeadada aos grânulos do biomaterial (seta vermelha), deposição de tecido fibroso (seta verde) (aumento 50X)



Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais da CCT/UEDESC - Joinville SC

5.2.2. Grupo 90 dias

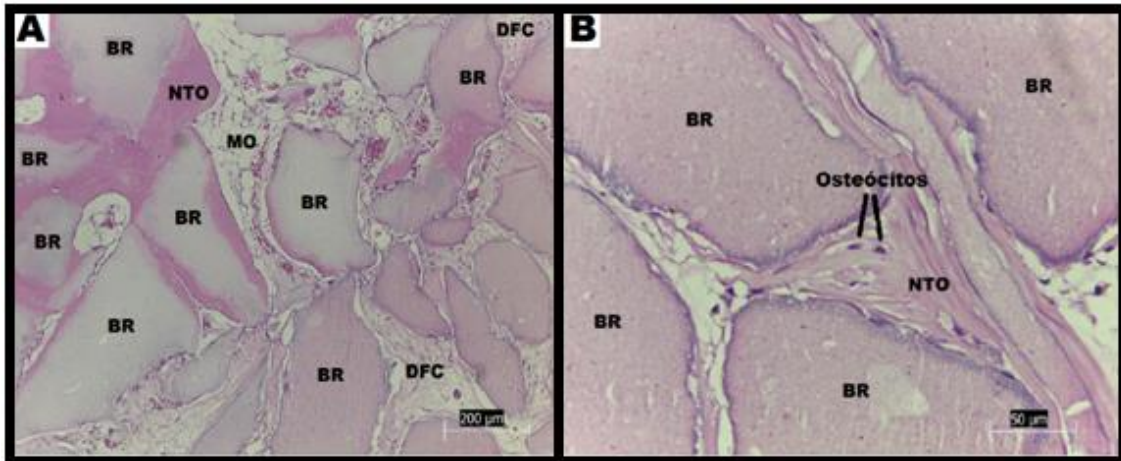
Em comparação ao grupo de 60 dias a neoformação óssea foi superior apresentando um tecido ósseo mais organizado, caracterizando o tecido ósseo secundário, o qual apresentou uma quantidade mais significativa. A deposição de tecido fibroso apresentou quantidade semelhante, porém tanto os osteoclastos quanto as células de limpeza apresentaram-se em quantidade inferior (Tabela 6). O crescimento ósseo desenvolveu-se até o terço superior. As Figuras 15, 16 e 17 representam as microscopias ópticas e de varredura.

Tabela 6 Resultados obtidos através da análise histológica de HAMgO 1% + PRP, com evolução de 90 dias de pós-operatório, quanto a neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS)

NTO	DFC	PO	CL	BR	OP	OS
+++	++	+	+	++++	++	++

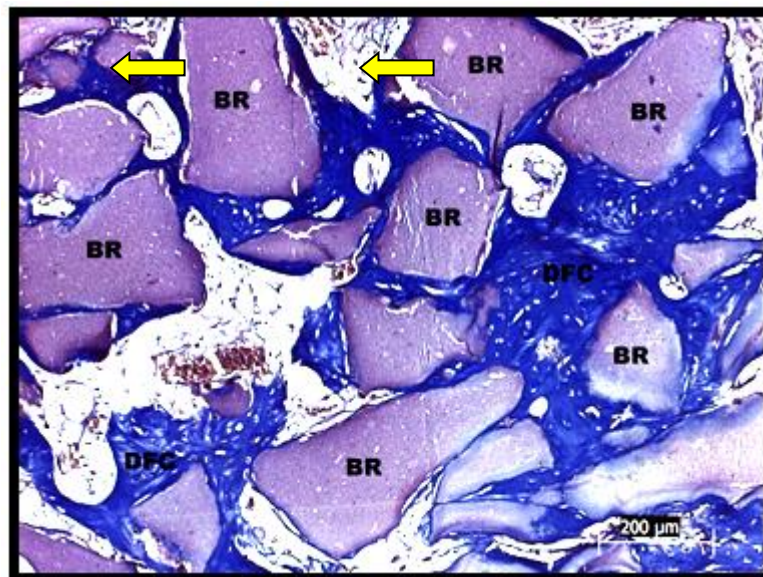
Fonte: Arquivo Pessoal

Figura 15 Imagem histológica para o tratamento HAMgO 1%+ PRP no período de evolução de 90 dias. Coloração Hematoxilina/Eosina (HE). A) (BR) biomaterial remanescente; (NTO) neoformação de tecido ósseo; (DFC) deposição de fibras colágenas. Aumento 10X. B) (BR) biomaterial remanescente; (NTO) neoformação de tecido ósseo. Destaque para os osteócitos dentro da matriz óssea (setas pretas) Aumento 40X



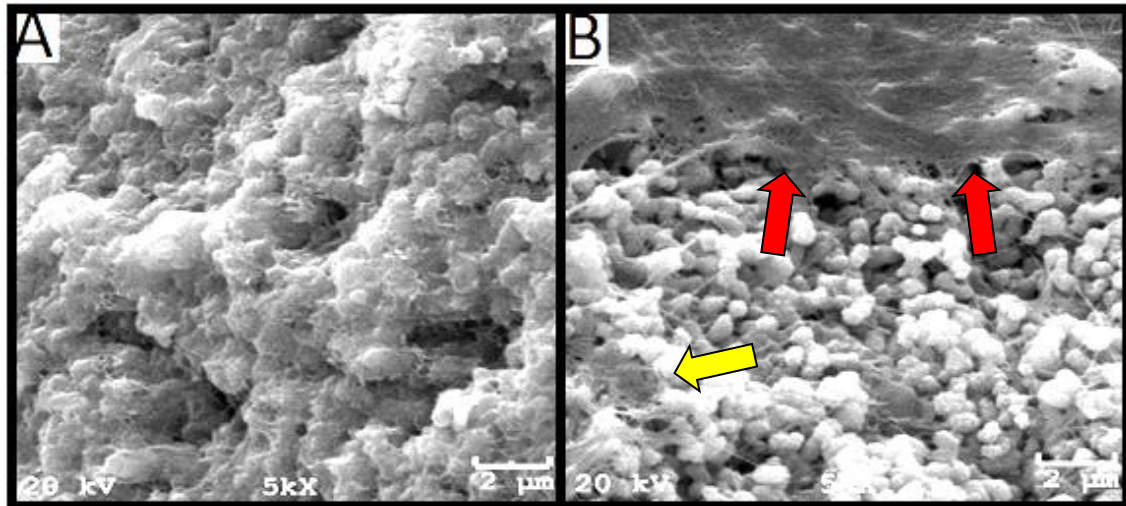
Fonte: Laboratório de Histologia Animal CAV/UEDESC- Lages- SC

Figura 16 Imagem histológica para o tratamento HAMgO1% + PRP com tempo de evolução para 90 dias. Coloração Tricrômico de Masson. (BR) Biomaterial remanescente. Tecido conjuntivo (DFC) em coloração azul e tecido ósseo em coloração vermelha (setas amarelas). Aumento 10X



Fonte: LABOPAVE- UFSC- Curitiba- SC

Figura 17 Imagem de micrografia obtida através de MEV demonstrando os resultados obtidos a partir da associação de HAMgO1% + PRP aos 90 dias de evolução. (A) Acentuada atividade de osteoblastos formando novo tecido ósseo (aumento 5000X). (B) Neoformação de tecido ósseo (setas vermelhas), atividade osteoblástica formando novo tecido ósseo (seta amarela) (aumento 5000X).



Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais da CCT/UEDESC - Joinville SC

5.3 HA + COÁGULO

Esse tratamento, assim como os demais, obteve neoformação de tecido ósseo de maneira bastante satisfatória, com distribuição entre tecido ósseo primário e secundário em quantidades similares.

5.3.1. Grupo 60 dias

Aos 60 dias de pós-operatório, o crescimento ósseo médio pela amostra desenvolveu-se até o terço superior da guia. Nesse período de evolução, as amostras apresentaram acentuada neoformação de tecido ósseo, distribuindo-se moderadamente entre tecido ósseo primário e secundário. A deposição de tecido fibroso apresentou-se também em quantidade moderada assim como as células de limpeza e as células gigantes mononucleadas (osteoblastos).

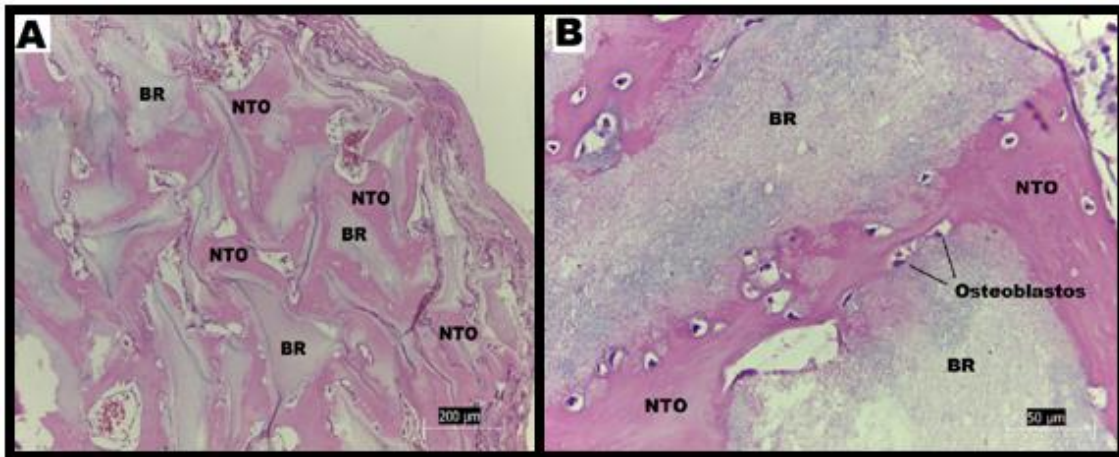
A seguir, a Tabela 7 mostra os resultados obtidos nesse tratamento aos 60 dias de evolução e as Figuras 18, 19 e 20 mostram as micrografias obtidas por microscopia óptica e MEV.

Tabela 7 Resultados obtidos através da análise histológica de HA + COÁGULO, com evolução de 60 dias de pós-operatório, quanto a neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS)

NTO	DFC	PO	CL	BR	OP	OS
+++	++	++	++	++++	++	++

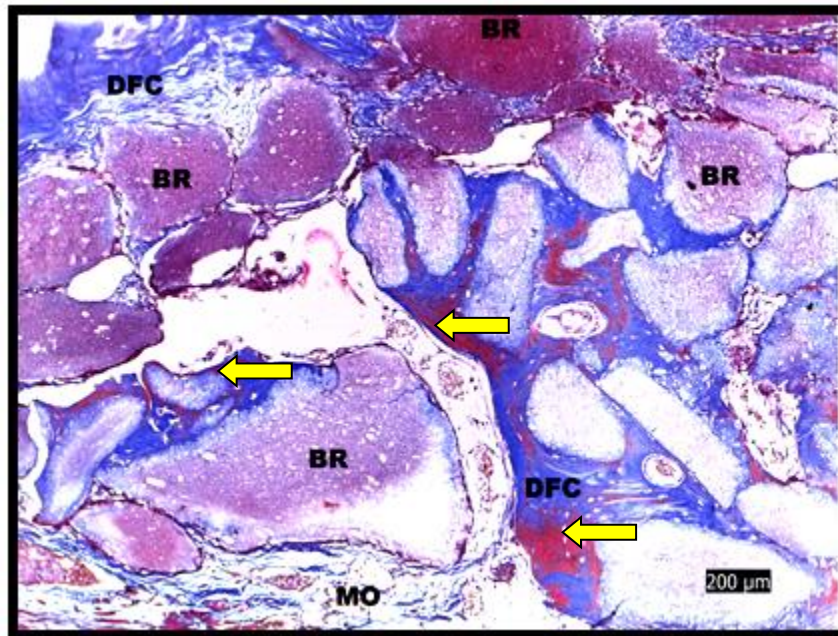
Fonte: Arquivo Pessoal

Figura 18 Imagem histológica para o tratamento HA+ COÁGULO no período de evolução de 60 dias. Coloração Hematoxilina/Eosina (HE). A) (BR) biomaterial remanescente; (NTO) neoformação de tecido ósseo; Aumento 10X. B) (BR) biomaterial remanescente; (NTO) neoformação de tecido ósseo. Detalhe dos osteoblastos na interface de NTO e BR (setas pretas). Aumento 40X



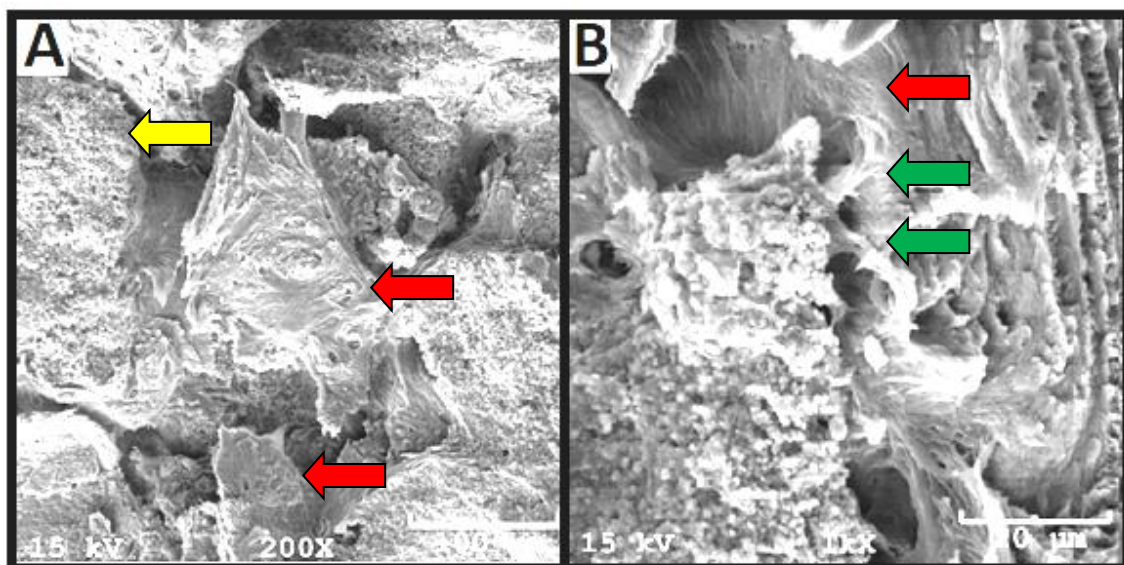
Fonte: Laboratório de Histologia Animal CAV/UEDESC- Lages - SC

Figura 19 Imagem histológica para o tratamento HA+ COÁGULO com tempo de evolução para 60 dias. Coloração Tricrômico de Masson. (BR) Biomaterial remanescente. Deposição de fibras colágenas (DFC) em coloração azul e tecido ósseo em coloração vermelha evidenciada pelas setas amarelas. Formação de medula (MO). Aumento 10X



Fonte: LABOPAVE - UFSC - Curitibanos - SC

Figura 20 Micrografia demonstrando a neoformação de tecido ósseo do biomaterial HA + coágulo aos 60 dias de pós operatório. (A) Presença acentuada de neoformação óssea (seta vermelha) sobre o biomaterial remanescente (seta amarela) (aumento 200X). (B) Demonstração de prolongamentos ósseos se formando a partir do biomaterial (seta verde) e neoformação óssea (seta vermelha) (aumento de 1000X)



Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais da CCT/UEDESC - Joinville SC

5.3.2. Grupo 90 dias

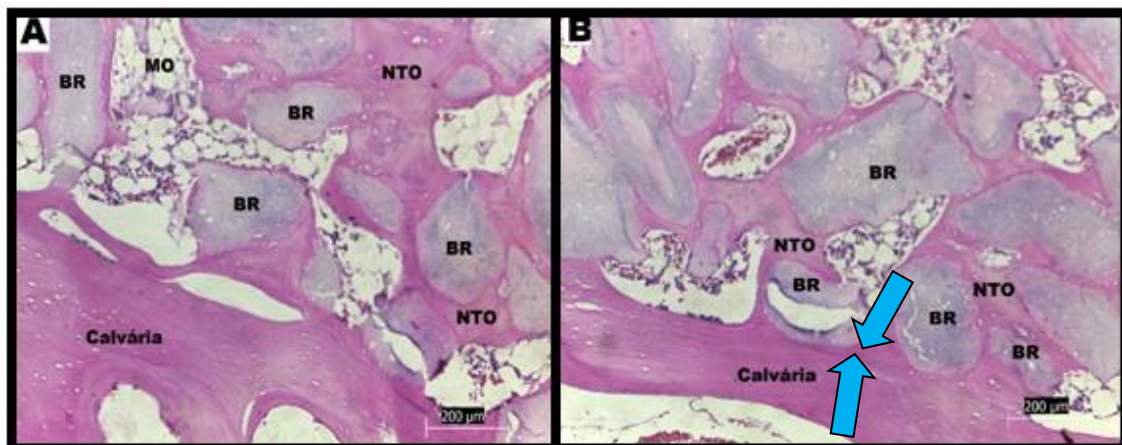
As amostras apresentaram uma neoformação de tecido ósseo abaixo da apresentada pelo grupo de 60 dias. O crescimento pela amostra limitou-se ao terço médio da guia de crescimento. Os outros parâmetros como presença de osteoclastos, células de limpeza e formação de tecido fibroso não apresentaram diferença entre os períodos. A Tabela 8 apresenta os resultados desse período e as Figuras 21, 22 e 23 ilustram as microscopias óptica e de varredura.

Tabela 8 Resultados obtidos através da análise histológica de HA + COÁGULO, com evolução de 90 dias de pós-operatório, quanto a neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS)

NTO	DFC	PO	CL	BR	OP	OS
++	++	++	++	++++	++	++

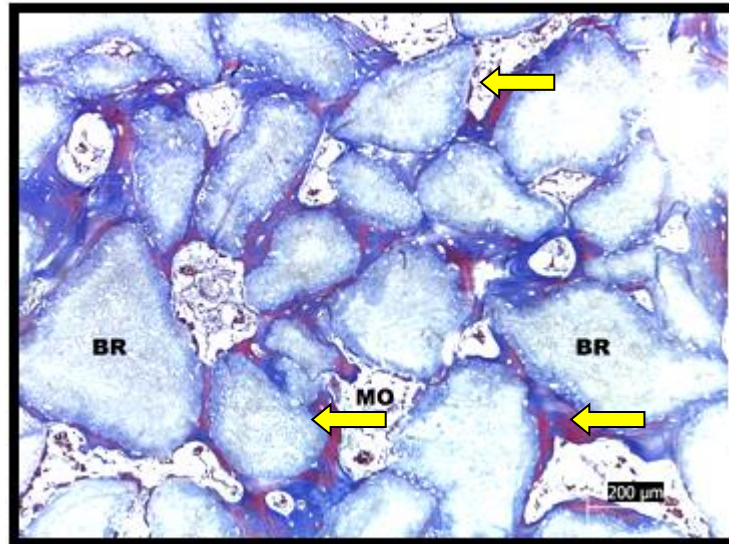
Fonte: Arquivo Pessoal

Figura 21 Imagem histológica para o tratamento HA +COÁGULO no período de evolução de 90 dias. Coloração Hematoxilina/Eosina (HE). A) (BR) biomaterial remanescente; (NTO) neoformação de tecido ósseo; (MO) medula óssea. Aumento 10X. B) (BR) biomaterial remanescente; (NTO) neoformação de tecido ósseo. Interface entre calvária e NTO evidenciada (seta azul), mostrando boa osteointegração. Aumento 10X



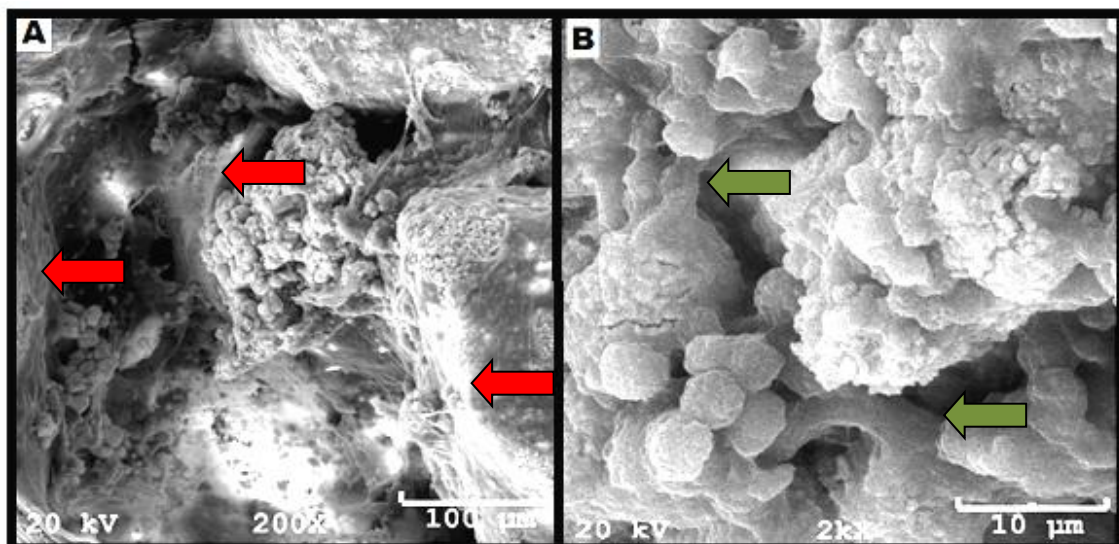
Fonte: Laboratório de Histologia Animal CAV/UEDESC- Lages- SC

Figura 22 Imagem histológica para o tratamento HA +COÁGULO com tempo de evolução para 90 dias. Coloração Tricrômico de Masson. (BR) Biomaterial remanescente; (MO) medula óssea. Tecido conjuntivo em coloração azul e tecido ósseo em coloração vermelha (setas amarelas). Aumento 10X



Fonte: LABOPAVE - UFSC - Curitiba- SC

Figura 23 Micrografia obtida através de MEV demonstrando a neoformação de tecido ósseo a partir do biomaterial HA + COÁGULO aos 90 dias de pós- operatório. A) Presença moderada de neoformação óssea (setas vermelhas) (aumento de 200X). B)Prolongamentos de tecido ósseo se formando a partir dos grânulos do biomaterial (setas verdes) (aumento 2000X)



Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais da CCT/UEDESC - Joinville SC

5.4. HAMgO 1% + COÁGULO

Assim como nos grupos do biomaterial HAMgO 1% associado ao PRP, a neoformação óssea obteve resultado considerável ao associar o HAMgO 1% ao coágulo. A seguir, as evoluções nos dois períodos de tratamento.

5.4.1. Grupo 60 dias

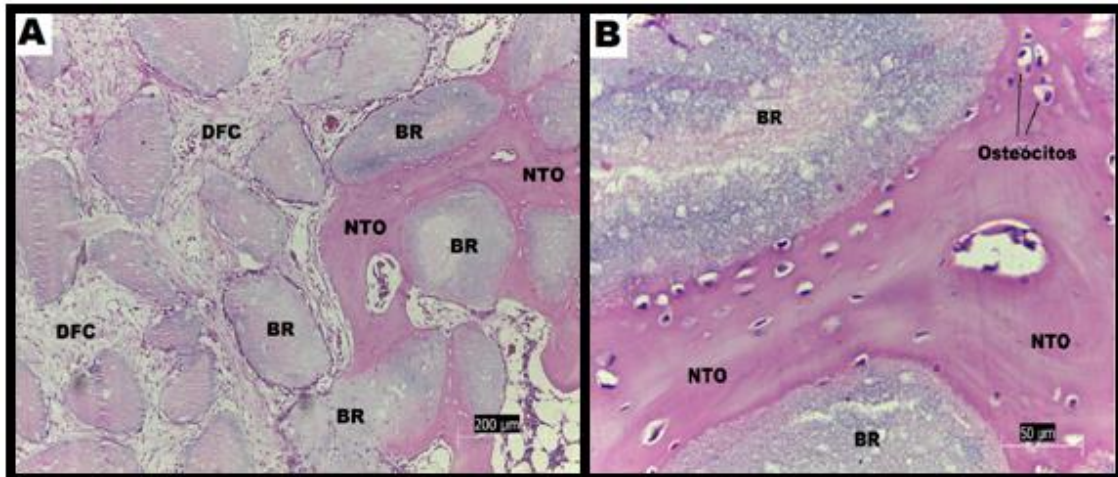
Após esse período de evolução, a neoformação de tecido ósseo apresentou quantidade moderada. Essa neoformação apresenta-se distribuída moderadamente e similarmente entre tecido ósseo primário e secundário. A deposição de tecido fibroso apresentou-se em quantidade acentuada. Já as células de limpeza e os osteoclastos apresentaram-se em quantidade moderada (Tabela 9). O crescimento ósseo pela amostra expandiu-se até o terço médio da guia. As Figuras 24, 25 e 26 mostram as microscopias óptica e de varredura.

Tabela 9 Resultados obtidos através da análise histológica de HAMgO 1% + COÁGULO, com evolução de 60 dias de pós-operatório, quanto a neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS)

NTO	DFC	PO	CL	BR	OP	OS
++	+++	++	++	++++	++	++

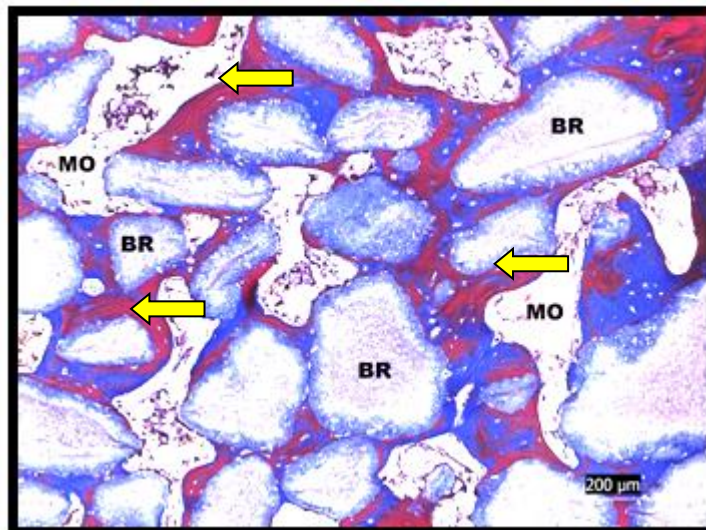
Fonte: Arquivo Pessoal

Figura 24 Imagem histológica para o tratamento HAMgO 1%+ COÁGULO no período de evolução de 60 dias. Coloração Hematoxilina/Eosina (HE). A) (BR) biomaterial remanescente; (NTO) neoformação de tecido ósseo; (DFC) Deposição de fibras colágenas. Aumento 10X. B) (BR) biomaterial remanescente; (NTO) neoformação de tecido ósseo. Presença de osteócitos na matriz óssea (setas pretas) Aumento 40X



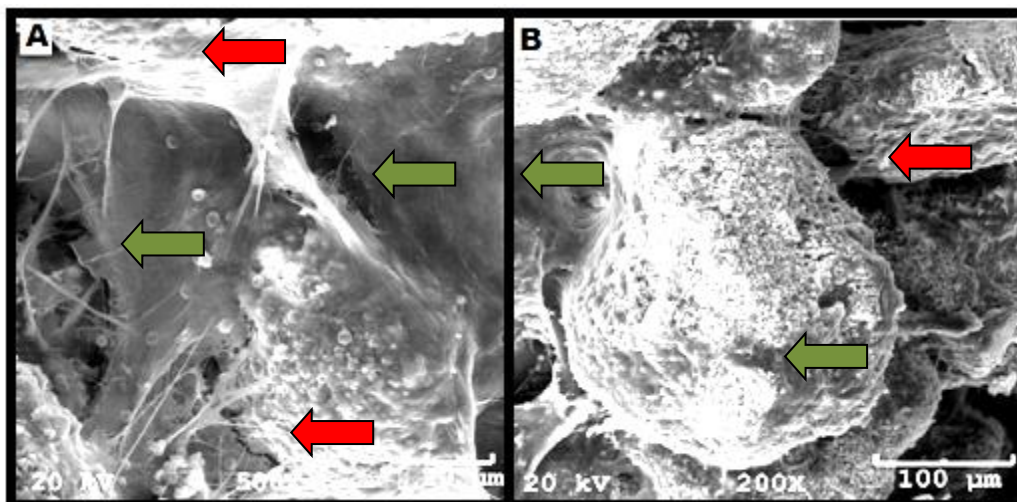
Fonte: Laboratório de Histologia Animal- CAV/UDESC - Lages- SC

Figura 25 Imagem histológica para o tratamento HAMgO1%+ COÁGULO com tempo de evolução para 60 dias. Coloração Tricrômico de Masson. (BR) Biomaterial remanescente; (MO) medula óssea. Deposição de fibras colágenas em coloração azul e tecido ósseo em coloração vermelha (setas amarelas). Aumento 10X



Fonte: LABOPAVE- UFSC - Curitiba- SC

Figura 26 Micrografia obtida através de MEV demonstrando a neoformação de tecido ósseo a partir do biomaterial HAMgO 1% + COÁGULO aos 60 dias de pós operatório. A) Presença moderada de neoformação óssea (setas vermelhas) e acentuada deposição de fibras colágenas (setas verdes) (aumento 500X). B) Demonstração de neoformação de tecido ósseo (setas vermelhas) e deposição de fibras colágenas (setas verdes) (aumento 200X)



Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais da CCT/UEDESC - Joinville SC

5.4.2. Grupo 90 dias

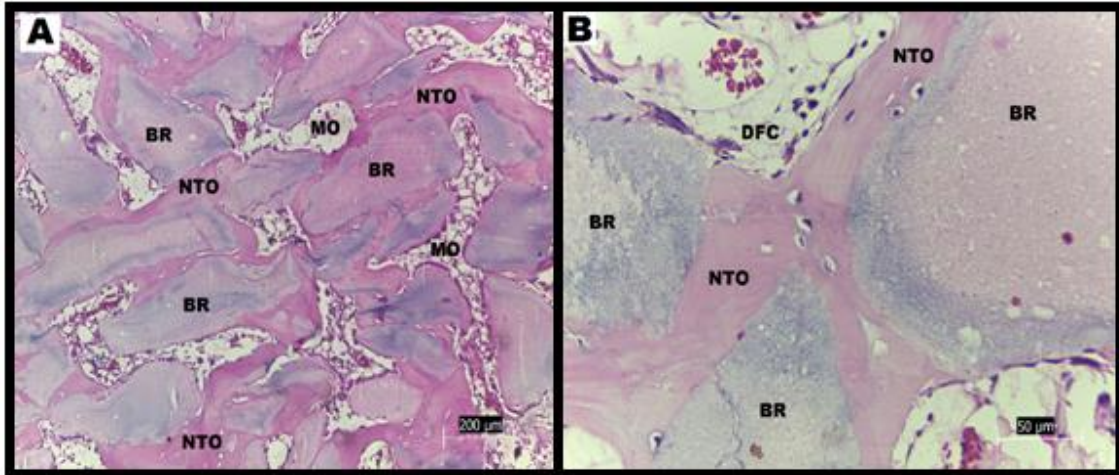
A neoformação óssea demonstrou acentuado crescimento nesse período de evolução. Assim como no período anterior, a distribuição entre tecido ósseo primário e secundário apresentou-se similarmente moderada. Tanto as células de limpeza quanto os osteoclastos apresentaram menor quantidade, assim como a deposição de tecido fibroso (Tabela 10). O crescimento pela amostras distribuiu-se até o terço médio. As Figuras 27, 28 e 29 ilustram as microscopias óptica e de varredura.

Tabela 10 Resultados obtidos através da análise histológica de HAMgO 1% + COÁGULO, com evolução de 90 dias de pós-operatório, quanto a neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS)

NTO	DFC	PO	CL	BR	OP	OS
+++	+	+	+	++++	++	++

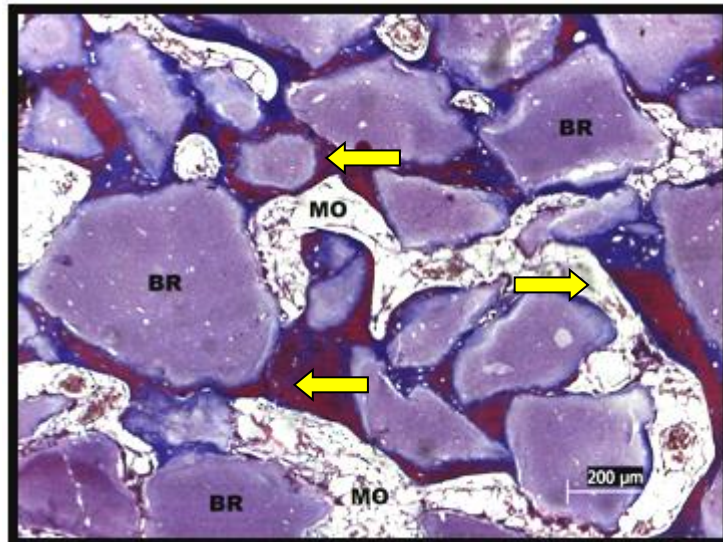
Fonte: Arquivo Pessoal

Figura 27 Imagem histológica para o tratamento HAMgO 1%+ COÁGULO no período de evolução de 90 dias. Coloração Hematoxilina/Eosina (HE). A) (BR) biomaterial remanescente; (NTO) neoformação de tecido ósseo; (MO) Medula óssea. Aumento 10X. B) (BR) biomaterial remanescente; (NTO) neoformação de tecido ósseo (DFC) Deposição de fibras colágenas. Aumento 40X



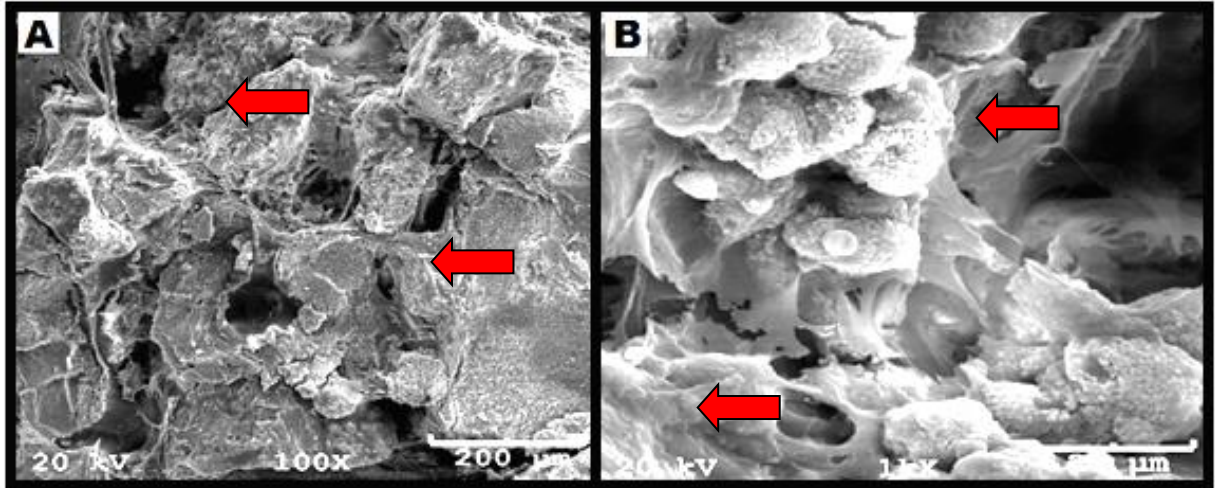
Fonte: Laboratório de Histologia Animal- CAV/UDESC - Lages- SC

Figura 28 Imagem histológica para o tratamento HAMgO1%+COÁGULO com tempo de evolução para 90 dias. Coloração Tricrômico de Masson. (BR) Biomaterial remanescente; (MO) medula óssea. Tecido conjuntivo em coloração azul e tecido ósseo em coloração vermelha (setas amarelas). Aumento 10X



Fonte: LABOPAVE - USFC - Curitiba - SC

Figura 29 Micrografia obtida através de MEV demonstrando a neoformação de tecido ósseo do biomaterial HAMgO 1% + COÁGULO aos 90 dias de pós-operatório. A) Presença acentuada de neoformação óssea (setas vermelhas) (aumento 100X). B) Demonstração de neoformação óssea (setas vermelhas) (aumento 1000X)



Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais da CCT/UEDESC - Joinville SC

5.5. RESULTADOS COMPARATIVOS

A Tabela 11 compara os biomateriais estudados e suas respectivas associações com PRP ou coágulo, através dos critérios histológicos avaliados aos 60 e 90 dias de evolução de pós-operatório.

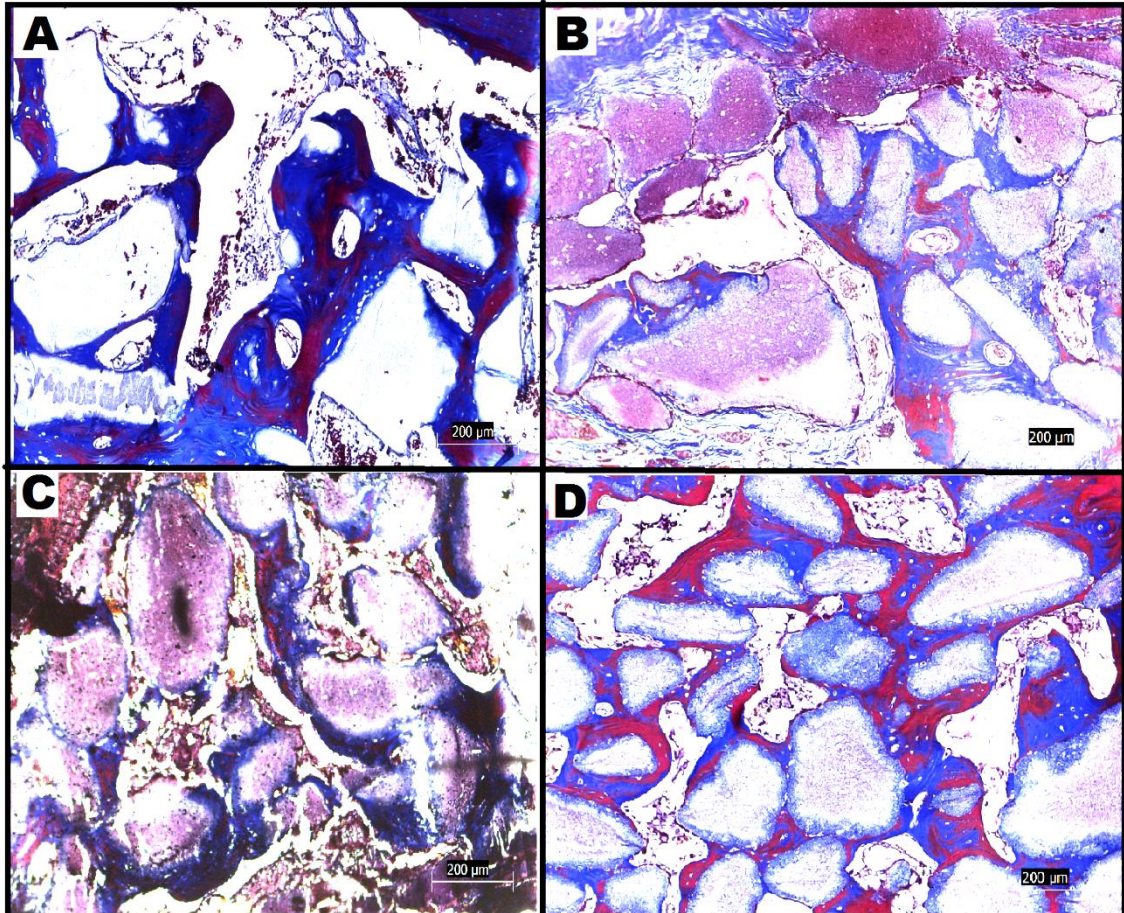
Tabela 11 Resultados médios comparativos para cada tempo de tratamento, 60 e 90 dias de pós-operatório, obtidos em relação à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS)

Biomaterial + Tratamento	NTO	DFC	PO	CL	BR	OP	OS
HA 1,67M + PRP (90 dias)	+++	++	+++	+	++++	++	++
HAMgO 1% + PRP (90 dias)	++	++	++	++	++++	++	++
HA 1,67M + coágulo (90 dias)	+++	++	+	+	++++	++	++
HAMgO 1% + coágulo (90 dias)	+++	+	+	+	++++	++	++
HA 1,67M + PRP (60 dias)	+++	++	+	++	++++	++	+
HAMgO 1% + PRP (60 dias)	+++	++	++	++	++++	++	++
HA 1,67M + coágulo (60 dias)	++	+++	++	++	++++	++	+
HAMgO 1% + coágulo (60 dias)	++	+++	++	++	++++	++	++

Fonte: Arquivo Pessoal

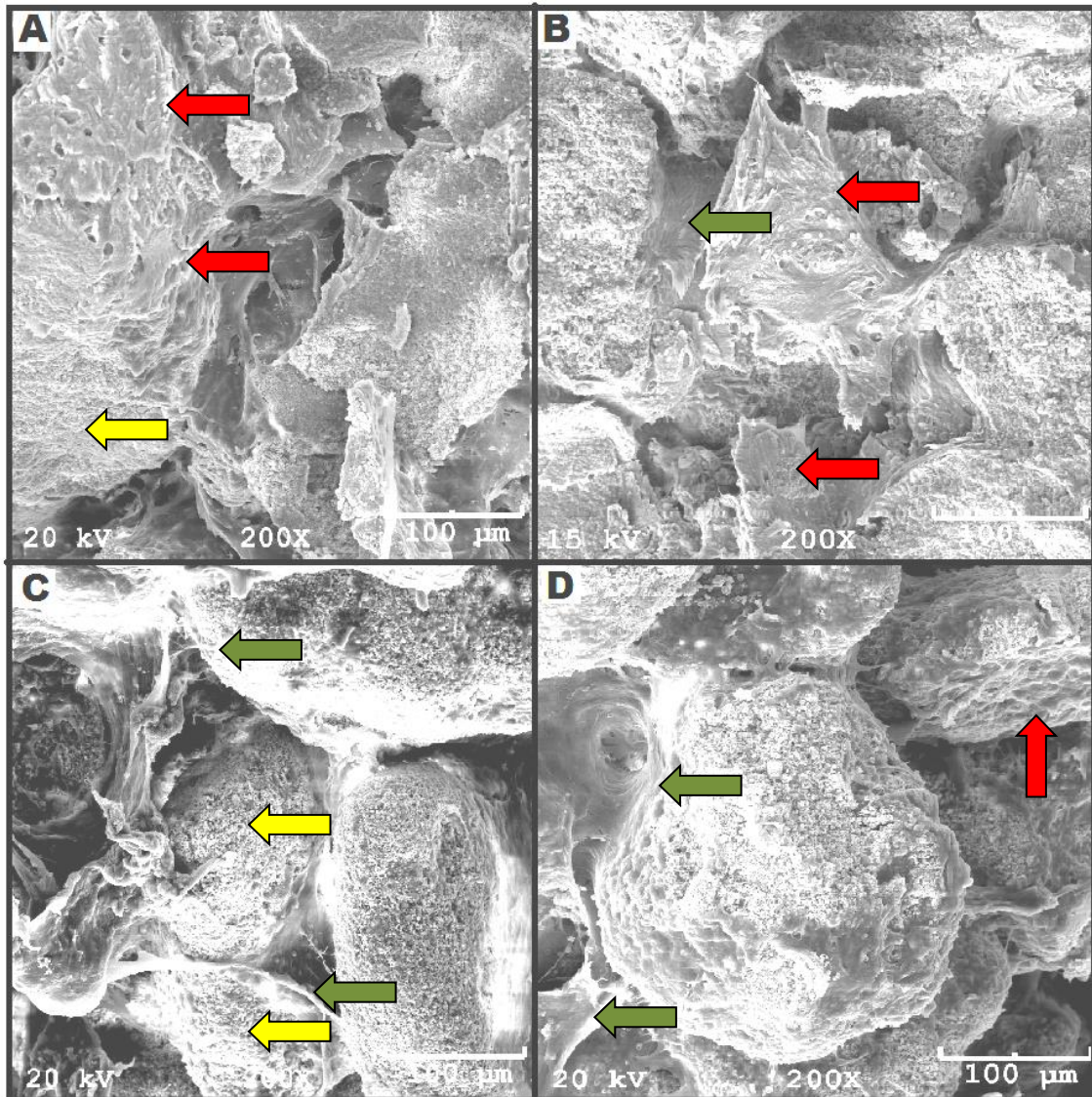
As FIGURAS 30 e 31 ilustram comparativamente as micrografias obtidas da análise histológica e MEV os tratamentos com biomaterial acrescido de PRP ou coágulo aos 60 dias de evolução. Já as FIGURAS 32 e 33 ilustram as micrografias obtidas da análise histológica e por MEV para o tempo de teste in vivo de 90 dias.

Figura 30 Imagem histológica comparativa dos tratamentos aos 60 dias de evolução de pós-operatório. Em azul evidencia-se o tecido conjuntivo fibroso. Em vermelho cora-se o tecido ósseo neoformado. (A) HA + PRP. (B) HA + COÁGULO. (C) HAMgO1% + PRP. (D) HAMgO1% + COÁGULO. (Tricrômico de Masson, aumento 10X)



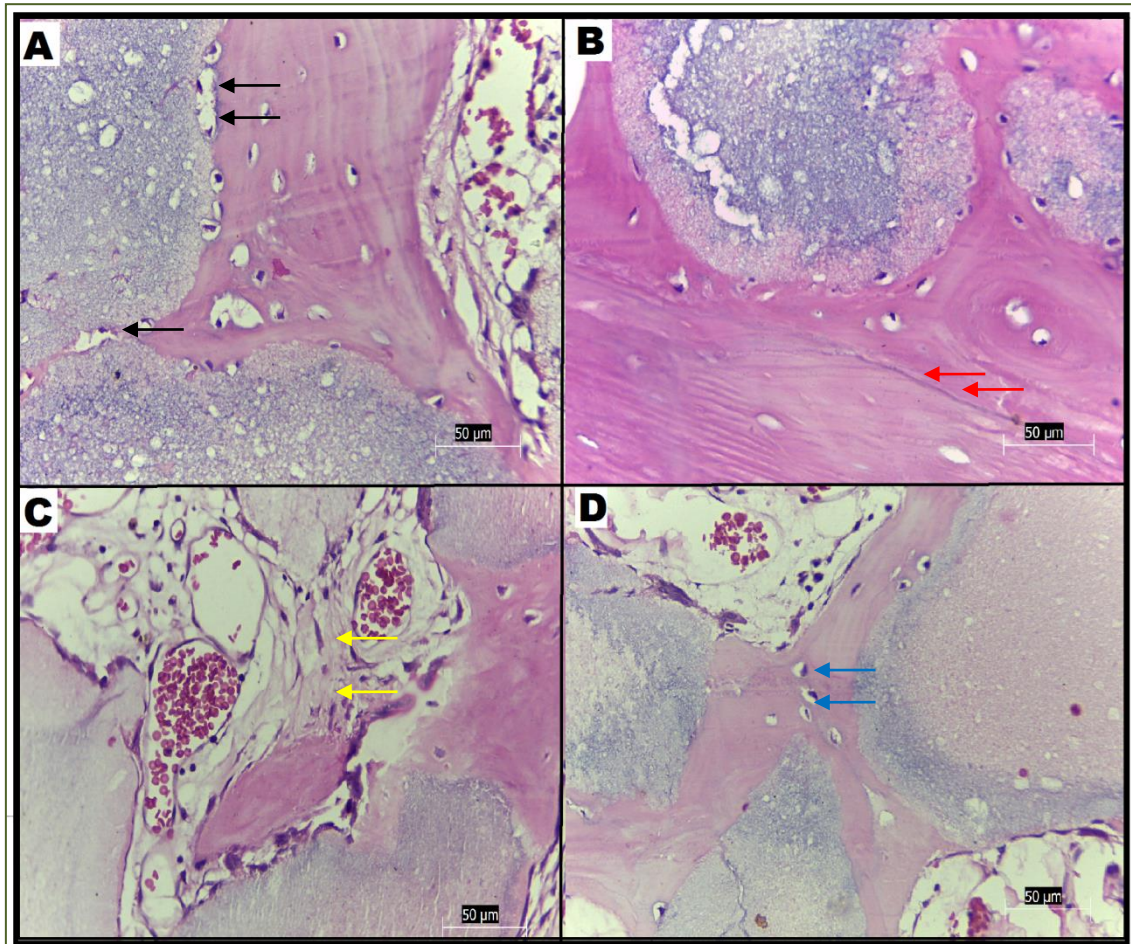
Fonte: LABOPAVE- UFSC- Curitiba- SC

Figura 31 Fotomicrografias comparativas dos tratamentos aos 60 dias de evolução de pós-operatório, obtidas por MEV. (A) HA + PRP. Imagem demonstrando acentuada neoformação de tecido ósseo (seta vermelha) sobre o biomaterial remanescente (setas amarelas). (B) HA + COÁGULO. Imagem demonstrando tecido ósseo neoformado (seta vermelha) e moderada deposição de fibras colágenas (setas verdes). (C) HAMgO1% + PRP Prolongamento de tecido fibroso (seta verde) sobre o biomaterial remanescente (setas amarelas). (D) HAMgO1% + COÁGULO. Acentuada deposição de fibras colágenas (setas verdes) e moderada neoformação óssea (setas vermelhas). (Aumento 200X)



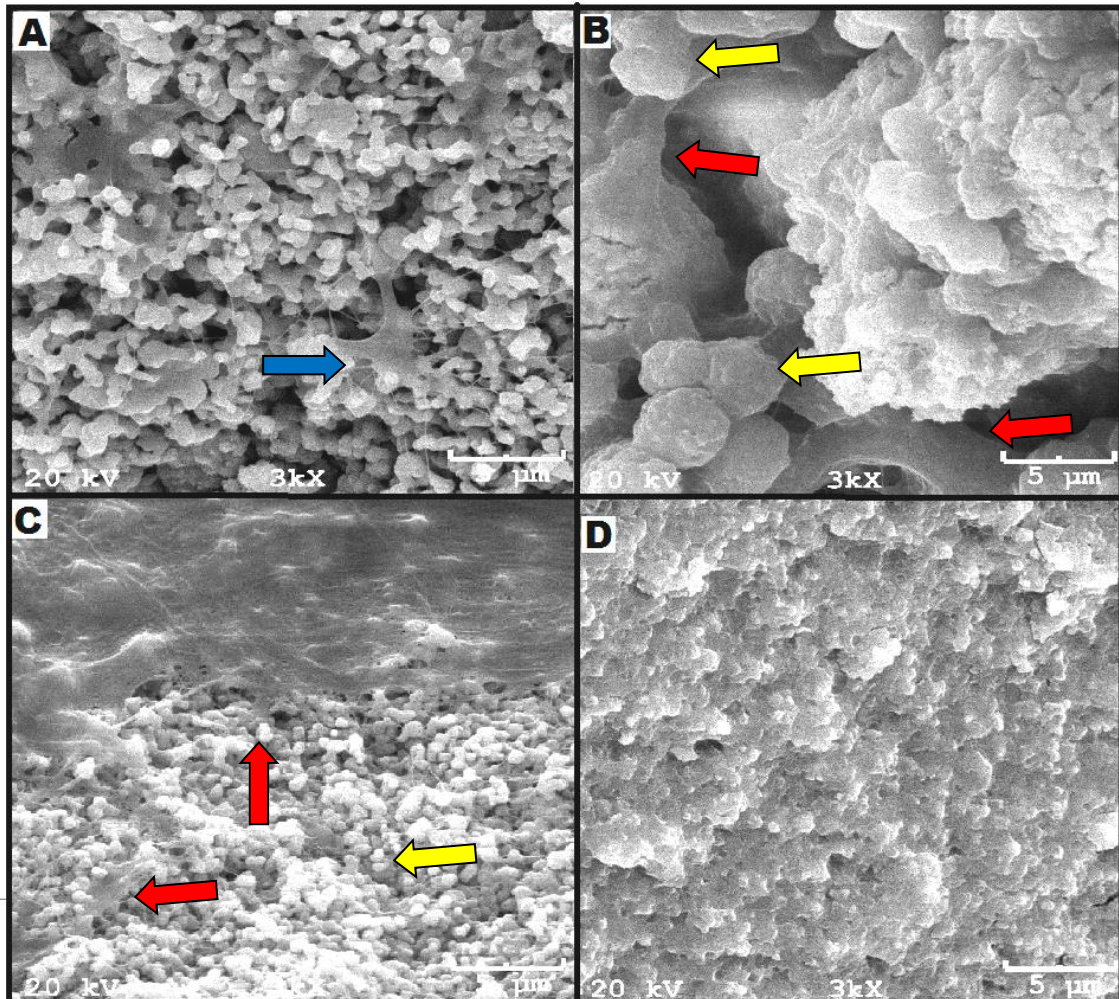
Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais CCT/UEDESC- Joinville-SC

Figura 32 Imagem histológica comparativa dos tratamentos aos 90 dias de evolução de pós-operatório. (A) HA + PRP demonstrando a neoformação óssea. Presença de osteoblastos (setas pretas). (B) HA + COÁGULO demonstrando linha de osteointegração entre calvária e neoformação óssea (setas vermelhas). (C) HAMgO1% + PRP demonstrando moderada quantidade de tecido conjuntivo fibroso (setas amarelas). (D) HAMgO1% + COÁGULO demonstrando acentuada neoformação de tecido ósseo. Presença de osteócitos (setas azuis) (H&E, aumento 40X)



Fonte: Laboratório de Patologia Animal CAV/UEDESC - Lages- SC

Figura 33 Fotomicrografia comparativas dos tratamentos aos 90 dias de evolução de pós-operatório, obtidas por MEV. (A) HA + PRP. Imagem demonstrando atividade osteoblástica induzindo neoformação óssea (seta azul). (B) HA+ COÁGULO. Prolongamentos ósseos (setas vermelhas) formando-se entre os grânulos do biomaterial (setas amarelas). (C) HAMgO 1% + PRP. Prolongamentos ósseos (setas vermelhas) sobre o biomaterial remanescente (setas amarelas). (D) HAMgO1% + COÁGULO. Imagem destacando neoformação óssea sobre os grânulos de biomaterial.(Aumento 3000X)

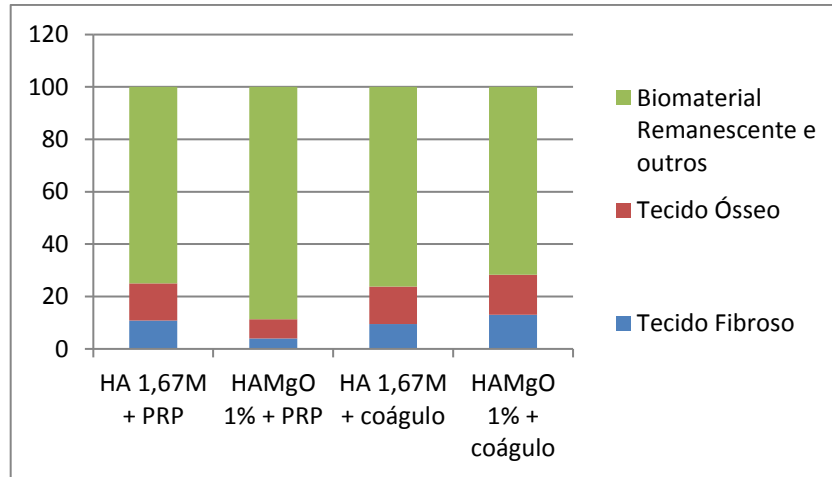


Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais CCT/UEDESC - Joinville - SC

5.5.1. Análise Histomorfométrica

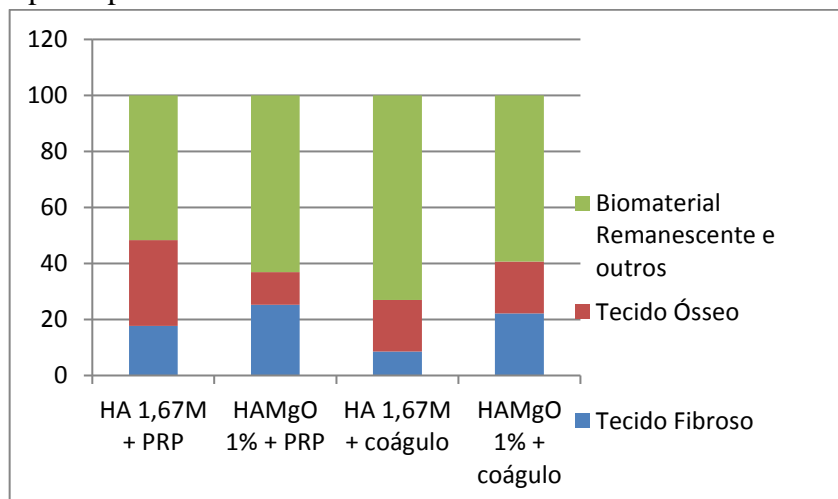
Foram analisadas e quantificadas a formação de novo tecido ósseo e, em contrapartida, a deposição de tecido fibroso em cada um dos tratamentos, HA + PRP, HAMgO 1% + PRP, HA + COÁGULO e HAMgO 1% + COÁGULO e seus respectivos tempos de evolução -60 e 90 dias. As Figuras 34 e 35 ilustram os resultados encontrados.

Figura 34 Gráfico ilustrando resultados percentuais da análise de histomorfometria, demonstrando a relação entre os tratamentos, para a neoformação de tecido ósseo (vermelho), a deposição de tecido fibroso (azul) e o biomaterial remanescente e outros tecidos (verde) aos 60 dias de evolução de pós-operatório.



Fonte: Arquivo Pessoal

Figura 35 Gráfico ilustrando resultados percentuais da análise de histomorfometria, demonstrando a relação entre os tratamentos, para a neoformação de tecido ósseo (vermelho), a deposição de tecido fibroso (azul) e o biomaterial remanescente e outros tecidos (verde) aos 90 dias de evolução de pós-operatório.



Fonte: Arquivo Pessoal

5.5.2. Análise Estatística

A Tabela 12 apresenta os valores das médias e desvios-padrão relacionados aos valores encontrados na análise histomorfométrica dos tratamentos em relação a neoformação de tecido ósseo e a deposição de tecido fibroso aos 60 e 90 dias de evolução, respectivamente.

Tabela 12 Médias em valores percentuais encontradas e respectivos desvios- padrão para neoformação de tecido ósseo e deposição de tecido fibroso para todos os tratamentos em seus respectivos tempos de evolução

Tratamento	TECIDO ÓSSEO		TECIDO FIBROSO	
	60 dias	90 dias	60 dias	90 dias
HA 1,67M + PRP	14,13± 11,72a	30,5± 17ab	10,86± 14,9	17,76± 14,1c
HAMgO 1% + PRP	7,29± 5,52bc	11,65± 8,3b	4 ± 2,8abc	25,24± 12,06ab
HA 1,67M + coágulo	14,39± 9,51	18,37± 23	9,46± 3,45b	8,6± 8,16bc
HAMgO 1% + coágulo	15,36± 5,39bc	18,54± 12,3	13 ± 9,3abc	22,17± 6,84ab

a- diferença significativa entre momentos no mesmo tratamento

b - indica diferença entre grupos, após teste One-Way ANOVA

c- indica diferença estatística entre dois grupos após teste *t* de Student

As análises estatísticas foram desenvolvidas através do software GraphPad Prism, versão 7.00. A realização do teste *t* de student, confrontou o uso do PRP e do coágulo com os diferentes biomateriais e o teste de ANOVA analisou todos os tratamentos, avaliando qual apresentava o melhor resultado estatisticamente.

Para analisar os tratamentos entre o mesmo biomaterial e complementos diferentes, PRP ou coágulo, dentro do mesmo tempo de evolução, referente ao crescimento ósseo, usou-se o teste *t* de student. Aos 60 dias de evolução para os tratamentos com o biomaterial HAMgO 1% com seus diferentes complementos, o coágulo apresentou resultado estatístico superior ao PRP, entretanto os outros tratamentos não apresentaram diferença estatística significativa entre eles, nem mesmo aos 90 dias de evolução.

Realizando uma avaliação geral do desempenho de cada tratamento diante de todos os outros, utilizou-se o teste de ANOVA. Diante disso, ao avaliar os tratamentos aos 60 dias, o tratamento HAMgO 1% associado a coágulo apresentou melhor resultado estatístico diante do mesmo biomaterial associado ao PRP, apresentando uma média superior de crescimento ósseo com um desvio padrão mais similar. Já o grupo de 90 dias, mostrou uma superioridade do tratamento HA + PRP diante do biomaterial HAMgO 1% com a mesma associação. Em uma visão geral, o tratamento HAMgO 1% + PRP apresentou o pior desempenho nos dois períodos de evolução.

Confrontando os dois períodos de evolução, o teste *t* foi novamente selecionado. O resultado mostra que o tratamento HA + PRP aos 90 dias de evolução apresentou um desempenho superior apresentando diferença estatística relevante.

Com relação ao tecido fibroso, os mesmos testes foram realizados, nas mesmas situações. Ao equiparar os resultados entre o mesmo biomaterial e seus diferentes complementos, o tratamento HA+ PRP apresentou superioridade estatística relevante diante

do mesmo biomaterial associado ao coágulo no grupo de 90 dias. Em contrapartida, no grupo de 60 dias, a associação HAMgO 1% + coágulo apresentou resultado superior ao mesmo biomaterial associado ao PRP.

Ao contrastar os tratamentos com eles mesmo, dentro de um mesmo período de evolução, no grupo de 60 dias, o tratamento HAMgO1% + PRP apresentou superioridade na formação de tecido fibroso sobre o tratamento HA + coágulo e o mesmo aconteceu entre os tratamentos HAMgO 1% + coágulo e HA + coágulo, sendo o primeiro superior ao segundo. No grupo 90 dias, as duas situações se repetem, apresentando também diferença estatística relevante.

Na aplicação do teste t entre momentos de um mesmo tratamento, o tratamento HAMgO 1% apresentou superioridade estatística na formação de tecido fibroso aos 90 dias com os dois complementos, PRP e coágulo.

6. DISCUSSÃO

Por promover uma situação similar a realidade, o modelo animal apresenta-se como ferramenta fundamental para estudos nas mais diversas áreas da saúde, fazendo com que os estudos *in vivo* apresentem resultados fidedignos. Entretanto, deve-se sempre procurar utilizar o menor número de animais possível, primando por minimizar seu sofrimento em todas as situações (STEIN,2009). Este estudo foi criterioso nos cuidados para com os animais visando seu bem estar e, conseqüentemente, resguardando os resultados obtidos, tendo em vista que os mesmos apresentam-se relevantes às áreas médicas, tanto animal quanto humana.

A escolha por coelhos deu-se pela facilidade de manejo, porte pequeno e relativa docilidade, além do baixo custo de manutenção. Calasans- Maia et al.(2009) realizaram uma revisão sobre a utilização de coelhos como unidades experimentais e afirmam ser uma espécie com disponibilidade satisfatória de informações básicas tornando-os, além das razões citadas anteriormente, vantajosos em pesquisa.

A calvária foi a região pré-determinada para realização dos implantes. Compreende-se por calvária a área que se estende da cavidade supraorbital até a protuberância occipital externa (LEVANDOWSKI- Jr, 2009). A escolha dessa região deu-se pelo fato de ser uma área de fácil acesso cirúrgico, apresentar morbidade muito baixa e pouca interferência das forças musculares no local (DE LIMA *et al.*, 2013). Outros estudos já foram realizados nessa região obtendo sucesso relevante (KUCI, 2017; COLOMBO 2016; LEVANDOWSKI-Jr, 2014; LEVANDOWSKI- Jr, 2009), todos eles usando a mesma metodologia de crescimento ósseo guiado *in vivo*.

Foi realizada a implantação de duas guias de crescimento, similar ao estudo realizado por Ezirganli *et al.*(2013), contrapondo os autores acima citados, os quais utilizaram quatro guias de crescimento em cada calvária. Optou-se por somente duas guias devido ao tamanho dos animais, que eram pequenos, considerando-se que poderia haver influência nos resultados como ocorreu no trabalho desenvolvido por Kuci (2017), onde as guias ultrapassaram os limites supraorbitais permitindo que houvesse um pequeno ponto sem contato entre as mesmas e o leito receptor na porção mais rostral da calvária.

O método de formação óssea guiada recepciona a criação de neoformação de tecido ósseo em sítios onde não há crescimento ósseo prévio. Para a realização desse método é necessário o auxílio de aparatos rígidos e impermeáveis que vão estabilizar o biomaterial granulado promovendo um isolamento quanto aos tecidos adjacentes. O nylon é um material bioinerte e amplamente usado em procedimentos cirúrgico como suturas (VECHI *et al.*,

2016). O nylon 6 é um polímero sintético com força mecânica apropriada, boa estabilidade e excelente maleabilidade (PANT *et al.*2011). O presente estudo utilizou guias de nylon (n6) como aparatos de crescimento ósseo guiado, diferentemente de Levandowski-Jr (2014) que utilizou Teflon e Colombo (2016) e Kuci (2017), que utilizaram a poliamida. Entretanto, assim como os anteriores, as guias de nylon não apresentaram interferência nos resultados obtidos, vedaram de forma eficiente os sítios de crescimentos ósseos, juntamente com os parafusos e nenhum dos animais apresentaram qualquer tipo de rejeição.

Os autores supracitados, Levandowski- Jr(2014), Colombo (2016) e Kuci (2017) usaram parafusos de titânio de tamanho 2.0 X 0,8mm. Entretanto, no decorrer dos procedimentos cirúrgico percebeu-se que parafusos de mesmo tamanho não ultrapassavam o limite interno das guias de nylon, não realizando de forma apropriada a sua fixação. Sendo assim, optou-se pela utilização de parafusos mais longos de 2.0 X 10mm. No momento da colheita das calvárias notou-se que os parafusos ultrapassaram os limites das mesmas de forma consistente e que culminaram em lesões em meninge e cérebro em todos os animais do experimento. Contudo, nenhum animal apresentou alteração comportamental ou fisiológica. Esses aspectos pode ter permanecido inalterados, devido ao fato dos animais terem sido tratados com enrofloxacino, uma quinolona que apresenta baixo peso molecular, ligação a proteínas séricas baixa a moderadas e com característica lipofílica, o que a torna farmacocineticamente ideal para o tratamento de infecções do sistema nervoso central (LIN; DE SÁ, 2002). Para estudos futuros, que usem essa metodologia, recomenda-se um parafuso de tamanho intermediário, ou ainda o uso de aparelhagens de imagem em tempo real, como o fluoroscópio, com os quais pode ser possível analisar a medida de implantação dos parafusos.

Os biomateriais selecionados por esse estudo foram previamente avaliados por Colombo (2016), no formato de biocimento. Levandowski-Jr (2014) e Regalin (2014) também avaliaram a hidroxiapatita 100%, entretanto com outro formato de sinterização, o grânulo, sendo assim, seus resultados associados ao coágulo sanguíneo já eram elucidados. Na avaliação dos resultados desses autores, a HA obteve em todos eles excelentes resultados. Em Colombo (2016), o biocimento formado pelo compósito HAMgO 1% associado a coágulo obteve resultado superior ao biocimento de HA 100%. Sabe-se pela literatura que a microporosidade exerce influencia direta sobre as propriedades tanto biológicas quanto mecânicas refletindo diretamente na capacidade de formação óssea *in vivo* (COATHUP *et al.*, 2012) e que a morfologia do biomaterial e a microporosidade interconectada influenciam diretamente a osteoindução (SONG *et.al.*, 2013). Teixeira (2009) afirma ainda que o tamanho do grão exerce influencia direta no preenchimento da área da superfície disponível para

reações biológicas. Em outras palavras, quanto maior a partícula do biomaterial, maior o tempo de absorção do mesmo e, conseqüentemente, maior o tempo necessário para formação de tecido ósseo. Sendo assim, pode-se hipotetizar que o tamanho dos grânulos tenha influenciados negativamente no crescimento ósseo, tendo em vista que o biocimento do estudo citado previamente possuiu formulação em pó.

O PRP é o produto obtido a partir da centrifugação de sangue autógeno, a qual aumenta a concentração de plaquetas e diminui o volume do plasma (PAGLIOSA e ALVES,2007). Esse produto contribui para a reparação quimiotática promovida pela presença de quimiocinas, proteínas sanguíneas, citocinas e fatores de crescimento nele contidos (ANITUA *et al*, 2004).A comprovação da eficácia do PRP ainda é objeto de estudo visto que há poucos experimentos em medicina veterinária relacionadas a ele (MAIA e SOUZA,2009; VENDRAMIN *et al*,2010; VENDRUSCOLO *et al.*, 2012). Além disso, o PRP é considerado bastante seguro em seu uso pois, por ser produzido a partir de sangue autógeno, não transmite doenças infectocontagiosas e seu risco de rejeição é nulo (MARX , 2004).

O PRP em forma de gel é uma forma de cola tecidual com todas as vantagens adicionais dos fatores de crescimento que o PRP proporciona (VENDRAMIN *et al.*,2010). Esse mesmo autor realizou um estudo avaliando a aplicabilidade do PRP na cicatrização de feridas cutâneas em coelhos, comparando o seu uso em gel e na forma líquida. Como conclusão, observaram que a apresentação em gel, sobre feridas cutâneas, demonstra certa dificuldade de aplicação diante da forma líquida. Contudo, neste trabalho, a opção por utilizar o PRP em forma de gel, processo realizado com o uso de gluconato de cálcio, deu-se pela necessidade de prover um arcabouço de sustentação para o crescimento ósseo, visando que sua aplicabilidade seria mais adequada nesta apresentação.

O uso do PRP neste estudo não apresentou o resultado esperado como adjuvante ao crescimento ósseo, já provido pelos biomateriais. Abla *et al* (2009) relataram a aplicação de enxerto autógeno associado a PRP e hidroxiapatita associada a colágeno nos seios maxilares direito e esquerdo, respectivamente, em uma paciente humana, concluindo que ambos apresentaram neoformação óssea consistente com o enxerto autógeno apresentando melhor resultado. Em contrapartida, em um estudo realizado por Camarini *et.al* (2006) realizado com a associação de biomateriais com PRP ou coágulo em cães observaram que não houve interferência do PRP com o crescimento ósseo. Os resultados do presente estudo mostram a HA associada ao PRP apresentando crescimento ósseo relevante quando comparada ao HAMgO 1% associado ao PRP ou ao coágulo, embora, independente do tempo de evolução, não tenha ocorrido diferença estatística significativa quando comparada ao tratamento HA +

coágulo, demonstrando que o biomaterial apresentou maior relevância no crescimento ósseo que o PRP.

O tratamento HA + PRP também apresentou uma alta atividade osteoclástica, similar ao que ocorreu nos estudos de Regalin (2014) e Colombo (2016), os quais não empregaram o PRP, apontando que a absorção desse material tende a ser rápida, ressaltando sua característica osteoindutora. Contudo é importante avaliar que a presença do PRP no presente estudo não aprimorou a atividade osteoclástica quando comparado ao grupo coágulo, em nenhum dos tempos de evolução.

Após a retirada das calvárias, as amostras precisaram ficar acondicionadas em solução de formaldeído tamponado a 10%. O processo de fixação é um dos pontos críticos para a realização adequada das avaliações histológicas. Para essa fixação a solução de formaldeído é amplamente aplicada na rotina e pesquisa por preservar a integridade morfológica das amostras (SILVEIRA *et al.*, 2011). O mesmo autor realizou um estudo buscando o tempo mínimo de fixação para o útero de cadelas híginas e testou os tempo de fixação de 12, 24, 48 e 72 horas através da análise morfológica pela microscopia óptica, a qual não mostrou alterações relevantes nos em diferentes tempos. Seguindo essa premissa, as amostras desse estudo foram fixadas em metade do tempo proposto por Colombo (2016) e Kuci (2017), cujos estudos mantiveram inicialmente as amostras em solução de formaldeído a 10% por 15 dias e após a retirada das guias de crescimento e secção das calvárias, mantiveram as mesmas na solução por mais 15 dias. Desta forma, o tempo de armazenamento das amostras utilizado neste trabalho foi de 7 dias para os dois períodos, não havendo alteração morfológica percebida nas amostras durante as avaliações.

Os estudos supracitados foram analisados através de microscopia óptica (MO) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), as quais são consideradas análises qualitativas. Neste estudo, entretanto, assim como o realizado por Levandowski-Jr, (2014), optou-se pela análise quantitativa através da histomorfometria, que é um método diagnóstico capaz de quantificar os processos de neoformação e reabsorção óssea (CORRÊA, *et.al.*, 2000). Através da histomorfometria foi possível quantificar os resultados obtidos pela associação dos biomateriais HA e HAMgO 1% com PRP ou coágulo, permitindo a análise estatística deste estudo. Aos 60 dias de pós operatório, foi possível perceber que os tratamentos HA + PRP, HA + COÁGULO E HAMgO 1% + COÁGULO obtiveram crescimentos ósseos de quantidade muito semelhante. Em contraponto, o tratamento HAMgO 1% + PRP teve um resultado aquém do esperado. Os resultados foram semelhantes em relação a deposição de fibras colágenas. Já aos 90 dias de pós operatório, o tratamento HA+ PRP obteve um

resultado superior aos outros tratamentos, enquanto que o tratamento HAMgO 1% + PRP obteve o menor percentual de tecido ósseo para o período e maior porcentagem de deposição de fibras colágenas. O tratamento HA + COÁGULO, nesse período, obteve o menor percentual de fibras colágenas. A análise histomorfométrica foi imprescindível para obtenção de valores para essas quantificações.

A análise estatística demonstrou altos valores de desvio-padrão, um dos fatores que permitiu, com determinado grau de probabilidade, generalizar à população certas conclusões, por comparação com resultados amostrais (REIS *et al.*,2015), o que pode ter ocorrido devido as diferenças individuais apresentadas dentro das amostras de cada grupo. Esses valores elevados iminentemente influenciaram nos valores finais percentuais tanto em relação ao crescimento ósseo quanto ao desenvolvimento de tecido fibroso.

7. CONCLUSÃO

Ao analisar os resultados obtidos por esse estudo, nessa metodologia, conclui-se que todas as associações apresentaram capacidade de promover neoformação óssea, entretanto, aos 90 dias de pós-operatório o tratamento HA + PRP obteve um resultado superior.

Aos 60 dias de pós-operatório, os tratamentos HA+PRP, HA + COÁGULO E HAMgO 1% + COÁGULO apresentaram resultados de crescimento ósseo similares, enquanto que o tratamento HAMgO 1% + PRP apresentou menos capacidade de neoformação óssea. Aos 90 dias, o tratamento HA + PRP apresentou resultado superior.

O tratamento HAMgO 1% associado ao PRP não apresentou resultados tão satisfatórios para a formação do tecido ósseo, uma vez que o tamanho do grânulo pode ter influenciado no resultado deste processo.

Diante desses resultados, constata-se que o plasma rico em plaquetas (PRP) não acelera o processo de crescimento ósseo *in vivo*. Sendo assim, sua aplicabilidade apresentou-se irrelevante. Ao confrontar os tratamentos com biomaterial associado ao PRP e biomaterial associado ao coágulo, através da histomorfometria, foi possível concluir a diferença de crescimento ósseo entre eles não apresentou relevância estatística.

8. REFERÊNCIAS

- ABLA, M *et al.*, Utilização de biomaterial e osso autógeno em levantamento de seio maxilar: Relato de caso clínico com avaliação histológica. **Revista Implantnews**. Vol 3, nº 05, p.561-565, 2009.
- ALMEIDA, R. S. *et al.* Avaliação da fase inicial do reparo ósseo após implantação de biomateriais. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 13, n. 3, p. 331-336, 2014.
- ALONSO, L. M. **Avaliação de cimentos ósseos de Fosfatos de Cálcio com adições de Aluminato e Silicato de Cálcio**. 2011. 175f. Tese (Doutorado em engenharia) – Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.
- ANITUA, E. *et al.* Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneratio. **Thrombosis and haemostasis**, v. 91, p. 4-15, 2004.
- BARBOSA, A.L.T *et.al*, Plasma rico em plaquetas para reparação de falhas ósseas em cães. **Ciência Rural**. Santa Maria, Vol.38, n.5, p. 1335-1340, ago, 2008.
- BERTINETTI, L., *et al.* Punctual investigation of surface sites of HA 118 and magnesium-HA. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 26, p. 987-91, 2006.
- BOHNER, M. Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: a critical assessment. **Biomaterials**, v. 26, p. 6423–6429, 2005.
- BONAN, R. F. *et al.* Métodos de reforço microestrutural da hidroxiapatita. **Cerâmica**, v. 60, p. 402-410, 2014.
- BORGES, A.P.B.; REZENDE, C.M.F.; RIBEIRO, M.F.B. Hidroxiapatita sintética (HAP-91) como substituto ósseo em defeito experimental provocado no terço proximal da tíbia em cão: aspectos à microscopia eletrônica de transmissão. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.52, p.616-620, 2000.
- BOSKEY, A.L.; Tecidos Conjuntivos do Sistema Músculo-Esquelético. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgis de Pequenos Animais**. Vol. 2 .2.ed. São Paulo. Manole: 1993.
- BOSTROM, M. P.; SEIGERMAN, D.A. The clinical use of allografts, demineralized bone matrices, synthetic bone graft substitutes and osteoinductive growth factors: a survey study. **HSS Journal**. v.1, n.1, p.9-18, 2005.

BURG, K. J.; PORTER, S.; KELLAM, J. F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. **Biomaterials**. v.21. n.23, p.2347-2359, 2000.

CALASANS-MAIA, M. D. *et al.*. The rabbit as an animal model for experimental surgery. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 24, n. 4, p. 325-328, 2009.

CAMARGO, N. H. A. *et al.* Synthesis and Characterization of Nanocomposite HA/ α -Al₂O₃ Sol-Gel Powders for Biomedical Applications. **Advances in Science and Technology** (Online), v. 87, p. 61-66, 2014.

CAMARGO, P.M. *et al.* Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. **J Period Res**, v.37, p.300-306, 2002.

CAMARINI, E. T *et al.*, Utilização de biomateriais associados ou não ao plasma rico em plaquetas em cavidades ósseas cranianas. Estudo microscópico em cães. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**. [en linea], 2006, 6 (maio-setembro). Última visualização em 21 de junho de 2018. Disponível em: <<http://www.redaluc.org/articulo.oa?id=63760214>>ISSN 1519-0501

COATHUP, M. J. *et al.*, Effect of increased strut porosity of calcium phosphate bone graft substitute biomaterials on osteoinduction. **J Biomed Mater Res Part A**, 100A, p. 1550–1555, 2012.

COLOMBO, B. B. **Análise de três formulações de biocimentos aplicados através de guias de crescimento na calvária de coelhos**. 2016. 134 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2016.

CONSTANTINO, P.D.; *et al.* Experimental hydroxyapatite cement cranioplasty. **Plastic & Reconstructive Surgery**. v.90, n.2, p.174-185, 1992.

CORRÊA, P. Síntese e Caracterização de Nanocompósitos HA/Al₂O₃- α sol-gel para Aplicações na Reconstrução Óssea, 2013. 143 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais – Área: Cerâmica) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Joinville, 2013.

CORRÊA, P.H.S *et al.*, Papel da histomorfometria óssea no diagnóstico diferencial da osteomalácia. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**. Vol 44, n.2, São Paulo, Abril,2000.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). In: **Microscopia Eletrônica de Varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Edipucrs, Porto Alegre, cap. 1, p. 9-26, 2007.

DE LIMA, S. A. S. *et al.* Reparo ósseo utilizando enxerto de matriz orgânica de osso cortical e medular de origem bovina associados ao Plasma Rico em Plaquetas (PRP). **Horizonte Científico**, v. 7, p. 1-29, 2013.

DIAMANTINO, A. G. ; NICOLAU, R. A. . **Raio-x, EDX e MEV como métodos de avaliação do processo de reparação do tecido ósseo: revisão de literatura**. In: Encontro Latino Americano de Pós-Graduação, 2009, Universidade do Vale do Paraíba, INIC / EPG 2009.

DINATO, J. C.; NUNES, L. S. S.; SMIDT, R. Técnicas cirúrgicas para regeneração óssea viabilizando a instalação de implantes. In: SABA-CHUFJI, E.; PEREIRA, S. A. S. (Org.). **CIPE - Periodontologia: Integração e resultados**. São Paulo: Artes Médicas, 2007. p.183-226.

EL HADDAD, E. *et al.* Guided bone regeneration is a reliable technique in implant dentistry: An overview and a case report. **Open Access Dentistry**, v. 2, n. 1, p. 1-4, 2014.

EPURE, L. M.,*et al.* The effect of varying Al₂O₃ percentage in hydroxyapatite/Al₂O₃ composite materials: Morphological, chemical and cytotoxic evaluation. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 83, n. 4, p. 1009-1023, 2007.

EZIRGANLI, Ş. *et al.* Comparative investigation of the effects of different materials used with a titanium barrier on new bone formation. **Clinical Oral Implants Research**, v. 24, n. 3, p. 312-319, 2013.

FOSSUM, T. W.; *et al.* Tratamento de Fraturas Específicas. In: **Cirurgia de Pequenos Animais**. Elsevier, São Paulo, 3.ed, cap.32, p. 1015-1142, 2008.

FRANCO, K.L.; BORGES, A.P.B.;VILÓRIA, M.I.V.. Hidroxiapatita sintética pura, hidroxiapatita associada ao colágeno e hidroxiapatita sintética associada ao lipossoma como substitutos ósseos em defeitos provocados na tíbia de cães: aspectos da osteointegração à microscopia de luz transmitida. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.53, p.431-436, 2001.

FRANCZAK, P.F. **Síntese e caracterização de biocimentos de fosfatos de cálcio para uso na reparação do tecido ósseo**, 2014. 120 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais –Área: Cerâmica) –Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Joinville, 2014.

GERSTENFELD, L. C. *et al.* Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial and temporal aspects of its regulations. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 88, n. 5, p. 873-884, 2003.

GIANNOBILE, W.V. Periodontal regeneration: potencial role of bone morphogenic proteins. **J Period Res**, v.29, p.225-235, 1996.

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

GUASTALDI, A. C., APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**. v.33, n.6, p.1352-1358, 2010.

GUASTALDI, A.. Engenharia de superfície do titânio para aplicações biomédicas. **Metalurgia e Materiais**. v. 59, n. 535, p. 442-444, 2003.

GUTIERREZ, M.; *et al.*, Substitutos Ósseos: Conceitos Gerais e Estado Atual. Arquivos de Medicina - ArqMed. Vol.19, n.4, p. 153-162, 2006.

HUANG, M. S. *et al.* *In vivo* evaluation of poorly crystalline hydroxyapatite-based biphasic calcium phosphate bone substitutes for treating dental bony defects. **Journal of Dental Sciences**, v. 5, n. 2, p. 100-108, 2010.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: _____. **Histologia básica**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 10.ed, cap. 8 p.136-148, 2004.

KATCHBURIAN, E., ARANA, V. **Histologia e Embriologia Oral**, 2.ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 2004.

KAWACHI, E. *et al.* Biocerâmicas: Tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 518-522, 2000.

KOKUBO, T., KIM, H. M., KAWASHITA, M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. **Biomaterials**. v.24, n.13, p. 2161-2175, 2003.

KOGA, N. *et al.* Thermodynamics of non-bridging oxygen in silica bio-compatible glass-ceramics - Mimetic material for the bone tissue substitution. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 71, p. 927-937, 2003.

KUCI, Cristiana Corrêa. **Neoformação óssea comparativa de biomateriais micronanoestruturados aplicados através de um sistema guiado em calvária de coelhos *Oryctolagus cuniculus***. 2017. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2017.

KULAK, C.A.M., DEMPSTER, D.W., Bone histomorphometry: a concise review for endocrinologists and clinicians. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**. Vol 54, n. 2, 2010

LEGEROS , R.Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clinical Orthopaedics and Related Research**. n. 1, p.81-98, 2002.

LEMOS, J.J. *et al.* Utilização de plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos – Proposta de um protocolo de obtenção simplificado. 2002. Capturado em 18 de março de 2018. **Online**. Disponível na Internet: <http://www.odontologia.com.br/artigos.asp?id=225&idesp=6&ler=s>

LEVANDOWSKI-JR, N. **Análise Comparativa de Diferentes Substitutos Ósseos Sintéticos Microporosos em Calvária de Coelhos**, 2014. 154 p. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais – Área: Cerâmicas e Biomateriais) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Joinville, 2014.

LEVANDOWSKI-JR, N. **Biocerâmicas nanoestruturadas para aumento ósseo guiado: um estudo comparativo in vivo**. 2009. Dissertação (Mestrado)- Universidade de Santo Amaro, 2009.

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

LIN, K.; DE SÁ, P.N.D., Aspectos Farmacocinéticos e Farmacodinâmicos dos Agentes Antibacterianos no Sistema Nervoso Central: Artigo de Revisão. **Arquivos Catarinenses de Medicina**. Vol. 31, nº 1-2, p. 25-30, 2002

LIU, J.; KERNS, D. G. Mechanisms of Guided Bone Regeneration: A Review. **The Open Dentistry Journal**, v.8, p.56-65, 2014.

LYNCH, S. E. Introduction. Tissue Engineering: **Applications in Maxilofacial Surgery and Periodontics**. 1 ed., Illinois, Quintessence Books, cap.1,1999.

MACEDO, A. *et al.* Bone graft in skull: basic principles for osteointegration. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v.25, n.4, p.617-23, 2010.

MAIA, L, SOUZA, M.V. Componentes ricos em plaquetas na reparação de afecções tendo-ligamentosas e osteoarticulares em animais. **Ciência Rural**, Santa Maria, Vol 39, nº 4, p. 1267- 1274, 2009.

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

MARX, R. E. *et al.* . Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, v.85, n.6, p.638-646, 1998.

MARX, R.E.; GARG, A.K. Bone graft physiology with use of platelet-rich plasma and hiperbaric oxygen. In.: _____. **The sinus bone graft**. Colorado: Quintessense, 1999. p.183-189

MELLONIG, J.T. Porous particulate hydroxyapatite in a human periodontal osseous defect: a case report. **The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**. v.11, n.3, p.217-223, 1991.

MOREJÓN-ALONSO, L. *et al.* In situ Synchrotron X-ray Powder Diffraction Study of the Early Hydration of α -tricalcium Phosphate/tricalcium Silicate Composite Bone Cement. **Materials Research**. v.18, n.1, p.164-169, 2015.

OLIVEIRA, S. M., *et al.* Engineering endochondral bone: in vivo studies. **Tissue Engineering. Part A**, New York, v. 15, n. 3, p. 635-643, 2009.

ONO, I; *et al.* A study on bone induction in hydroxyapatite combined with bone morphogenetic protein. **Plastic & Reconstructive Surgery**. v. 90, n.5, p. 870-879, 1992.

PAGLIOSA, G.M; ALVES, G.E.S. Considerações sobre a obtenção e o uso do plasma rico em plaquetas e das células mesenquimais indiferenciadas em enxertos ósseos. **Ciência Rural**, Vol 37, n.4, p. 1202-1205, Santa Maria, Jul-ago, 2007.

PANT, H. R. *et al.*, Effect of lactic acyd on pollymer crystallization chain conformation and fiber morphology in an electrospun nylon 6. **Mat. Polymer** **52**, p. 4851- 4856, 2011

PELLISSIER, P. H.; *et al.* Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and cold stimulate bone regeneration. **Journal of Orthopaedic Research**. v.22, p.73-79, 2004.

POTTER, J.K, ELLIS III, E. Biomaterials for reconstruction of the internal orbit. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery** 2004; 62:1280-97.

RATNER, B D. A history of Biomaterials. In: Ratner, edits. **Biomaterials Science**. 2nd edition. Elsevier Inc. 2004. pp.10- 9.

REGALIN, B. D. C. **Neoformação óssea e osteointegração de biomateriais micro e nanoestruturados em ovinos**. 2014. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2014.

REICHERT, J. C., *et al.*,. The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. **Biomaterials**. v. 30, n. 12, p. 2149–2163, 2009.

REIS, E. *et al.*, Estatística Aplicada 1. 6º ed. Edições Sílabo. Lisboa - PT, 2015

RIGO, E. C. S. *et al.* Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida pelo método de precipitação. **Revista Dental Press de Periodontia e Implantologia**, v. 1, n. 3, p. 39-50, 2007.

SANTOS, C. F. L. *et al.* Design and production of sintered β -tricalcium phosphate 3D scaffolds for bone tissue regeneration. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, n. 5, p. 1293-1298, 2012.

SCARSO Fº, J. *et al.* Plasma Rico em Plaquetas. In: DINATO, J. C.; POLIDO, W.D. **Implantes Osseointegrados**. 1. Ed. São Paulo: Artes Médicas,2001. p.315-342.

SEBBEN, A.D, *et.al.*, Estudo comparativo do uso isolado de plasma rico em plaquetas e combinado com cimento alfa-fosfato tricálcico no reparo ósseo em ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, Vol .47, n. 4, p. 505-512, 2012.

SCHMITZ, J.P.; HOLLINGER, J.O.; MILAM, S.B. Reconstruction of bone using calcium phosphate bone cements: a critical review. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v.57, p.1122-1126, 1999.

SILVEIRA, E, *et al.*, Análise morfológica de amostras de útero de cães fixados em formaldeído em diferentes concentrações e durações de tempo. **J. Health Sci. Inst.** Vol 29, n. 1, p. 16-18, 2011.

SONG, G.; *et al.*, The homing of bone marrow MSCs to non-osseous sites for ectopic bone formation induced by osteoinductive calcium phosphate. **Biomaterials**, Vol. 34, n. 9, p. 2167-2176, 2013.

SOUZA, C. D. S. **Estudo histomorfométrico da reparação óssea em ratos após o uso de biomaterial de origem sintética (hidroxiapatita + β -tricalciofosfato)**. 2010. 88 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Odontologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa

SOUSA, V. L. **Efeitos do ultrassom de baixa intensidade sobre a consolidação óssea em fratura de ossos longos (rádio e ulna, tíbia e fíbula) em cães (*Canis familiaris*)**. 2003. 127f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

STEIN, R. S. **Estudo comparativo da neoformação óssea utilizando-se o enxerto autógeno e três substitutos - defeitos ósseos em ratos**. 2009. 59f. Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

TAVARES, D. *et al.* Synthesis and cytotoxicity evaluation of granular magnesium substituted β -tricalcium phosphate. **Journal of Applied Oral Science**, v. 21, n. 1, p.37-42, 2013.

TEIXEIRA, L. J. C. **Potencial osteocondutor de grânulos de hidroxiapatita em defeitos críticos na calvária de ratos**. 2009. Tese (Doutorado). Duque de Caxias: Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Rio de Janeiro, 2009.

VALIATI, R. **Análise do efeito da laserterapia na incorporação de aloenxertos ósseos em blocos processados por congelamento profundo - estudo em coelhos**. 2011. 124 f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

VECHI, L; *et al.* Fabricação de dispositivo em nylon para uso em teste *in vivo* como guia de neoformação óssea dentro de um sistema fechado. **Anais COLAOB/2016**. p.03 - 11. 2016

VENDRAMIN, F.S *et.al*, Utilização do plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo em enxertos cutâneos em coelhos. Revista **Brasileira de Cirurgia Plástica**, 2010, Vol.25, n.1, p. 4-10.

VENDRUSCOLO, C. P.*et al.*, Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo de Plasma Rico em Plaquetas para uso em Medicina Equina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Vol 32, nº 2, p. 106-110, 2012.