



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINARIAS – CAV  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

COMPORTAMENTO E NEOFORMAÇÃO ÓSSEA DE BIOMATERIAIS  
ACRESCIDOS DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS ATIVADO E NÃO  
ATIVADO IMPLANTADO EM CALVÁRIA DE COELHOS

**ANDRÉIA SAUSEN RAKOSKI**

**LAGES, 2020**

**ANDRÉIA SAUSEN RAKOSKI**

**COMPORTAMENTO E NEOFORMAÇÃO ÓSSEA DE BIOMATERIAIS  
ACRESCIDOS DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS ATIVADO E NÃO ATIVADO  
IMPLANTADO EM CALVÁRIA DE COELHOS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Aury Nunes de Moraes

**Lages, SC  
2020**

*A minha mãe por estar sempre comigo e me impulsionar a ir sempre além.*

## AGRADECIMENTOS

Meus maiores agradecimentos vão a minha família, principalmente a minha mãe, que tem me ajudado a crescer como ser humano e me impulsionado cada vez mais para ser um profissional melhor. Agradeço sempre pela confiança e pela paciência, ao apoio incondicional tanto nos dias de glória quanto nos de fracasso.

Agradeço a todos os animais, tão presentes na minha vida, que despertaram em mim o amor pela medicina veterinária e me guiaram a realização dos sonhos infantis. Em especial aos meus companheiros de vida presentes ou já ausentes. E acima de tudo aos que participaram dessa pesquisa, cuidados com muito amor e respeito.

Aos meus “amigos irmãos” por sua paciência aos infindáveis dias de escrita, em especial a minha doce menina Carol, que conta a todos que não está comigo, pois “a dinda está trabalhando na tese” sem nem ao menos entender o significado disso.

Aos colegas pós-graduandos Luara, Raissa e Wendel por sua ajuda e seus ensinamentos e aos demais por seguir comigo essa jornada. Aos professores Aldo Gava e Poliana Rios pelo auxilio e ao professor Ademar Luiz Dallabrida por todo conhecimento que adquiri nesses anos. Agradeço também ao professor Adriano Tony Ramos (UFSC/Curitibanos) por seu auxilio e ensinamentos. Um agradecimento especial ao professor Nelson Camargo do CCT/UDESC por ceder os biomateriais nos proporcionando esse período de estudo.

Os meus bolsistas e voluntários Vanessa, Maria, Alice e Leonardo por seu amor e cuidado aos coelhos, pelas tardes de trabalho árduo e por todo carinho recebido. Agradecimentos também para os alunos do GEAS que nos auxiliaram, em especial a Amanda e ao Pedro.

Agradeço ainda ao CAV-UDESC por conceder minha formação de mestrado e tornar-se minha segunda casa. A CAPES pelo auxílio financeiro que me permitiu residir em Lages e terminar essa etapa importante da minha vida.

Acima de tudo um grande agradecimento ao meu orientador, prof Aury ao qual tornou-se meu pai e mentor nesses dois anos, além de ser um grande exemplo a se seguir. Tenho um grande orgulho de ter sido sua orientada e ter seu nome como parte de minha formação.

## RESUMO

RAKOSKI, Andréia Sausen. Comportamento e neoformação óssea de biomateriais acrescidos de plasma rico em plaquetas ativado e não ativado implantado em calvária de coelhos. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal, Lages, 2020.

O tecido ósseo possui a capacidade de regenerar-se espontaneamente, porém em grandes perdas ósseas a regeneração ocorre de forma limitada com a formação de tecido fibroso, nesses casos há a necessidade de utilizar enxertos ou substitutos ósseos. Os substitutos ósseos já apresentam aplicabilidade na clínica médica em diversas áreas, sendo os biomateriais definidos como qualquer substância ou combinação de substâncias de origem natural ou sintética que podem ser usadas a qualquer período de tempo. Quando associado aos biomateriais o Plasma rico em plaquetas (PRP) pode acelerar o processo de ativação plaquetária uma vez que suas propriedades regenerativas e cicatrizantes estão relacionadas à sua capacidade de secretar fatores de crescimento e moléculas de adesão no decorrer do processo de ativação plaquetária. Esse estudo tem como objetivo avaliar a relevância e aplicabilidade do plasma rico em plaquetas, ativado e não ativado, associado aos biomateriais hidroxiapatita (HA) e fosfato tricálcico  $\beta$ , com 60 e 90 dias de evolução pós-operatório, implantadas na calvária de coelhos através de guias de crescimento. Foram utilizados 16 coelhos, machos, da linhagem Nova Zelândia, com cerca de 6 meses de idade e pesando em média 3,5 kg. Os animais foram divididos em dois grupos compostos de 8 animais cada, o grupo 1 (G1) acrescido de plasma rico em plaquetas ativado e o Grupo 2 (G2) acrescido de plasma rico em plaquetas não ativado. Os animais foram anestesiados com propofol e mantidos na anestesia inalatória com isoflurano para a realização do procedimento cirúrgico. Realizou-se a exposição das calvárias para a implantação das guias de nylon, que foram fixadas com parafusos de aço inoxidável. Cada guia foi preenchida com os biomateriais HA 100% ou TCP- $\beta$  100%, quatro animais receberam PRP ativado junto ao biomaterial e 4 receberam PRP não ativado. Essa disposição aconteceu para o período de evolução de 60 e de 90 dias. Ao final do tempo de evolução, os animais foram submetidos a eutanásia. As calvárias foram seccionadas, permanecendo em solução de formaldeído tamponado a 10 % por 7 dias e, após foram removidas as guias retornando ao formaldeído por mais 7 dias. As calvárias foram seccionadas ao meio e enviadas para avaliação histológica e histomorfometria. Diante aos resultados observou-se estatisticamente que a HA possui vantagem sobre o TCP- $\beta$  pois possui menor produção de tecido fibroso ao longo do tempo, porém deve ser associado ao PRP ativado para uma maior formação óssea ao logo do tempo. Desse modo conclui-se que o PRP ativado possuiu influência na neoformação óssea ao longo do tempo quando aplicado juntamente ao biomaterial.

**Palavras chave:** Crescimento ósseo guiado. Plaquetas. Histomorfometria

## ABSTRACT

RAKOSKI, Andréia Sausen. Behavior and new bone formation of biomaterials associated to platelet-rich plasma activated and non-activated implanted in calvaries of rabbits. 2020. Dissertation (Masters in Animal Science) - Santa Catarina State University. Graduate Program in Animal Science, Lages, 2020.

Bone tissue can regenerate spontaneously, but in significant bone losses, regeneration occurs to a limited extent with the formation of fibrous tissue. In these cases, there is a need to use bone grafts or substitutes. Bone substitutes already have applicability in medical practice in several areas, with biomaterials being defined as any substance or combination of materials of natural or synthetic origin that can be used at any time. The regenerative and healing properties of platelet-rich plasma (PRP) are related to its ability to secrete growth factors and adhesion molecules during the platelet activation process. When associated with biomaterials, it can accelerate the bone neoformation process. This study aims to evaluate the relevance and applicability of activated and non-activated platelet-rich plasma associated with biomaterials hydroxyapatite (HA) and  $\beta$ -tricalcium phosphate with 60 and 90 days post-operative evolution, implanted in calvaria of the rabbit through guided growth. Sixteen rabbits, male, New Zealand, around six months old and medium weight of 3.5 kg. They were divided into two groups composed of 8 animals each, group 1 (G1) associated with activated PRP, and Group 2 (G2) with non-activated PRP. They were submitted to anesthesia with propofol and inhalation maintenance with isoflurane to accomplish the surgery. Calvaries were exposed to the implantation of nylon guides, which were fixed with stainless steel screws. Each guide was filled with biomaterials HA 100% or TCP- $\beta$  100%. However, four animals received activated PRP with the biomaterial, and 4 received non-activated PRP. This disposition happened for the evolution period of 60 days and 90 days. At the end of these two times, the animals were euthanized. The calvaries were sectioned and stored immersed in buffered formaldehyde 10% for seven days, then the guides were removed, and the samples returned to the formaldehyde for another seven days. Calvaries were cut in half and sent for histological analysis and histomorphometry. Because of the results obtained, the treatments for bone growth were statistically different, HA has an advantage over TCP- $\beta$  because it has less fibrous tissue production over time, but it must be associated with activated PRP for greater bone formation over time. Thus, it is concluded that the activated PRP had more influence on new bone formation when associated with the biomaterial HA.

**Keywords:** Guided growth. Platelet. Histomorphometry

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Classificação dos biomateriais segundo comportamento fisiológico .....	25
Figura 2 -	Esquema representativo de dois métodos de estudo: (A) defeito intraósseo e (B) aumento ósseo guiado. Notar a utilização de dispositivo sobre a superfície para estabilizar o biomaterial e promover seu isolamento. ....	35
Figura 3 -	(A) Desenho representativo do dispositivo de nylon que foi elaborado com as dimensões de 5 mm de altura e 10 mm de diâmetro interno, formando um volume interior de sua cúpula de aproximadamente $0,314 \text{ cm}^3$ . (B) Guia de crescimento de nylon. Notar o orifício central (seta preta) por onde o parafuso cortical é introduzido, fixando a guia na calvária dos animais .....	39
Figura 4 -	Gaiolas próprias para criação de coelhos suspensas a 60 cm do chão por estrados de madeira, os animais foram mantidos em uma mesma sala com luz e temperatura ambiente. ....	41
Figura 5 -	(A) Calha especial criada por Dallabrida (2016) para o posicionamento ideal da cabeça dos coelhos durante procedimento cirúrgico. (B) Posicionamento do animal sobre a calha, com acesso para coleta de sangue na orelha direita, acesso para fluidoterapia na orelha esquerda, oxímetro de pulso na orelha direita e utilização da máscara laríngea.....	43
Figura 6 -	Periósteo sendo lateralizado, com auxílio de elevador de periósteo, após incisão expondo totalmente a região óssea da calvária. ....	44
Figura 7 -	Imagen demostrando a ordem da disposição dos tratamentos, lado direito com a aplicação da campânula preenchida com biomaterial hidroxiapatita e lado esquerdo com a aplicação da campânula preenchida de fosfato tricálcico beta..	45
Figura 8 -	Imagen demostrando: (A) Cuba rim onde o biomaterial foi adicionado de PRP; (B) Perfuração cortical da calvária com broca ortopédica; (C) Biomaterial adicionado de plasma rico em plaqueta na campânula, notar a presença do parafuso sextavado; (D) Fixação dos parafusos corticais sextavados não bloqueados na cortical óssea. ....	46
Figura 9 -	(A) Porção do tecido ósseo craniano contendo as amostras, notar a presença das campânulas e parafusos; (B) Porção do tecido ósseo craniano contendo as amostras, já sem as campânulas e parafusos, ao final do tempo de conservação em folmaldeído tamponado a 10%.....	48

- Figura 10 - Imagem histológica, para o tratamento HA + PRP ativado no período de evolução de 60 dias, com coloração Hematoxilina/Eosina (HE). A) Biomaterial remanescente (BR); neoformação de tecido ósseo (NTO); osso secundário (calvária) (OS); formação de tecido mieloide (FMT). Notar tecido medular amarelo com presença de células sanguíneas entremeado a neoformação de tecido ósseo e biomaterial remanescente. Aumento 10X. B) Notar, seta amarela, células alongadas com núcleos alongados ou ovoides, caracterizando as células osteoprogenitoras (COP). Aumento 4X..... 52
- Figura 11- Imagem histomorfométrica para o tratamento HA + PRP ativado com tempo de evolução de 60 dias. Coloração Picrosírius. (BR) Biomaterial remanescente (BR), osso secundário (calvária) (OS). Observar a presença de fibras colágenas organizadas em lamelas paralelas umas às outras e sua disposição em camadas concêntricas formando o sistema de Havers. Notar a presença de tecido conjuntivo em coloração vermelha (setas amarelas) e tecido ósseo em coloração verde (setas brancas). Aumento 10X..... 53
- Figura 12 - Imagem histológica, para o tratamento HA + PRP ativado no período de evolução de 90 dias, com coloração Hematoxilina/Eosina (HE). A) Biomaterial remanescente (BR); neoformação de tecido ósseo (NTO); osso secundário (calvária) (OS). Notar a neoformação vascular evidenciada pelas setas vermelha. Aumento 10X. B) Biomaterial remanescente (BR); neoformação de tecido ósseo (NTO). Notar a os osteócitos, evidenciados pelas setas amarelas e a linha de osteoblastos evidenciados pela seta vermelha. Aumento 40X. .... 55
- Figura 13 - Imagem histomorfométrica para o tratamento HA + PRP ativado com tempo de evolução de 90 dias. Coloração Picrosírius. Biomaterial remanescente (BR); Notar a presença de tecido conjuntivo em coloração vermelha (setas amarelas) e tecido ósseo em coloração verde (setas brancas). Aumento 10X..... 56
- Figura 14 - Imagem histológica, para o tratamento HA + PRP não ativado no período de evolução de 60 dias, com coloração Hematoxilina/Eosina (HE). (A) Biomaterial remanescente (BR); neoformação de tecido ósseo (NTO); formação de tecido mieloide (FTM). Notar os progenitores de células sanguíneas junto aos adipócitos medulares evidenciadas pelas setas vermelhas. Aumento 10X. B) Biomaterial remanescente (BR); neoformação de tecido ósseo (NTO); Macrófagos (MA). Notar os macrófagos, caracterizadas por células com núcleo redondo, ao redor do biomaterial remanescente. Aumento 40X..... 58

- Figura 15 - Imagem histomorfométrica para o tratamento HA + PRP não ativado com tempo de evolução de 60 dias. Coloração Picrosírius. Biomaterial remanescente (BR); Tecido ósseo secundário (Calvaria) (OS). Observar o crescimento do tecido conjuntivo a partir da calvaria do animal. Notar a presença de tecido conjuntivo em coloração vermelha (setas amarelas) e tecido ósseo em coloração verde (setas brancas). Aumento 10X.....59
- Figura 16 - Imagem histológica, para o tratamento HA + PRP não ativado no período de evolução de 90 dias, com coloração Hematoxilina/Eosina (HE). Biomaterial remanescente (BR); neoformação de tecido ósseo (NTO). Notar a neoformação de tecido ósseo discreta. Aumento 10X .....60
- Figura 17 - Imagem histomorfométrica para o tratamento HA + PRP não ativado com tempo de evolução de 90 dias. Coloração Picrosírius. Biomaterial remanescente (BR); Tecido ósseo secundário (Calvária) (OS). Observar o crescimento do tecido conjuntivo a partir da calvária do animal. Notar a presença de tecido conjuntivo em coloração vermelha (setas amarelas) e tecido ósseo em coloração verde (setas brancas). Aumento 10X.....61
- Figura 18 - Imagem histológica, para o tratamento TCP  $\beta$  + PRP ativado no período de evolução de 60 dias, com coloração Hematoxilina/Eosina (HE). Biomaterial remanescente (BR); neoformação de tecido ósseo (NTO); Lacunas (LA); Deposição de fibras colágenas (DFC). Notar que a neoformação do tecido ósseo segue da direita para a esquerda, diminuindo em direção ao ápice da campânula, onde estão depositadas fibras colágenas. Observar a presença de vasos sanguíneos evidenciados pelas setas amarelas. Aumento 10X .....62
- Figura 19 - Imagem histomorfométrica para o tratamento TCP  $\beta$  + PRP ativado com tempo de evolução de 60 dias. Coloração Picrosírius. Coloração Picrosírius. Biomaterial remanescente (BR); Tecido ósseo secundário (Calvária) (OS). Observar o crescimento do tecido conjuntivo ao redor do biomaterial remanescente. Notar a presença de tecido conjuntivo em coloração vermelha (setas amarelas) e tecido ósseo em coloração verde (setas brancas). Aumento 10X .....63

- Figura 20 - Imagem histológica, para o tratamento TCP  $\beta$  + PRP ativado no período de evolução de 90 dias, com coloração Hematoxilina/Eosina (HE). A) Biomaterial remanescente (BR); neoformação de tecido ósseo (NTO); formação de tecido mieloide (FTM); Lacunas (LA). Notar a presença de lacunas no meio do biomaterial. Aumento 10X. B) Macrófagos (MA). Notar a presença macrófagos, caracterizado por células com núcleo redondo e material eosinófilo no citoplasma, ao redor do biomaterial remanescente. Aumento 40X ..... 65
- Figura 21 - Imagem histomorfométrica para o tratamento TCP + PRP ativado com tempo de evolução de 90 dias. Coloração Picosírius. Biomaterial remanescente (BR); Tecido ósseo secundário (Calvária) (OS). Notar a presença de tecido conjuntivo em coloração vermelha (setas amarelas) e tecido ósseo em coloração verde (setas brancas). Aumento 10X ..... 66
- Figura 22 - Imagem histológica, para o tratamento TCP  $\beta$  + PRP não ativado no período de evolução de 60 dias, com coloração Hematoxilina/Eosina (HE). Biomaterial remanescente (BR); neoformação de tecido ósseo (NTO); deposição de fibras colágenas (DFC). Notar a neoformação de tecido ósseo apenas próximo ao biomaterial. Aumento 10X ..... 67
- Figura 23 - Imagem histomorfométrica para o tratamento TCP  $\beta$  + PRP não ativado com tempo de evolução de 60 dias. Coloração Picosírius. Biomaterial remanescente (BR); Tecido ósseo secundário (Calvária) (OS). Notar a presença de tecido conjuntivo em coloração vermelha (setas amarelas) e tecido ósseo em coloração verde (setas brancas). Aumento 10X ..... 68
- Figura 24 - Imagem histológica, para o tratamento TCP  $\beta$  + PRP não ativado no período de evolução de 90 dias, com coloração Hematoxilina/Eosina (HE). Biomaterial remanescente (BR); neoformação de tecido ósseo (NTO); Formação de tecido mieloide (FTM). Notar a discreta neoformação óssea apenas próximo ao biomaterial remanescente. Aumento 10X ..... 69
- Figura 25 - Imagem histomorfométrica para o tratamento TCP  $\beta$  + PRP não ativado com tempo de evolução de 90 dias. Coloração Picosírius. Biomaterial remanescente (BR); Tecido ósseo secundário (Calvária) (OS). Notar a presença de tecido conjuntivo em coloração vermelha (setas amarelas) e tecido ósseo em coloração verde (setas brancas). Aumento 10X ..... 70

- Figura 26 - Imagem histológica comparativa dos tratamentos aos 60 dias de evolução de pós-operatório. Biomaterial remanescente (BR), neoformação de tecido ósseo (NTO), osso primário (OP), formação de tecido mieloide (FTM), células osteoprogenitoras (COP), deposição de fibras colágenas (DFC). (A) HA + PRP ativado, notar a presença de células osteoprogenitoras no ápice da campânula; (B) HA + PRP não ativado, notar os progenitores de células sanguíneas junto aos adipócitos medulares evidenciadas pelas setas vermelhas; (C) TCP  $\beta$  + PRP ativado, notar que a neoformação do tecido ósseo segue da direita para a esquerda, diminuindo em direção ao ápice da campânula, onde estão depositadas fibras colágenas, observar a presença de vasos sanguíneos evidenciados pelas setas amarelas; (D) TCP  $\beta$  + PRP não ativado, notar a neoformação de tecido ósseo apenas próximo ao biomaterial. (Figura 1. H&E, aumento 4X; Fig 2, 3 e 4, H&E, aumento 10X)..... 72
- Figura 27 - Imagem histológica comparativa dos tratamentos aos 90 dias de evolução de pós-operatório. Biomaterial remanescente (BR); neoformação de tecido ósseo (NTO); formação de tecido mieloide (FTM); Lacunas (LA); Deposição de fibras colágenas (DFC). (A) HA + PRP ativado, notar a neoformação vascular evidenciada pelas setas vermelha; (B) HA + PRP não ativado, notar a discreta neoformação de tecido ósseo; (C) TCP  $\beta$  + PRP ativado, notar a presença de lacunas no meio do biomaterial; (D) TCP  $\beta$  + PRP não ativado, notar a discreta neoformação óssea apenas próximo ao biomaterial remanescente. (H&E, aumento 10X)..... 73
- Figura 28 - Imagem histológica comparativa dos tratamentos aos 60 dias de evolução de pós-operatório. Em vermelho evidencia-se o tecido conjuntivo fibroso. Em verde cora-se o tecido ósseo neoformado. Biomaterial remanescente (BR), osso secundário (calvária) (OS), formação de tecido mieloide (FTM). (A) HA + PRP ativado, notar o crescimento proveniente da calvária em direção ao biomaterial; (B) HA + PRP não ativado, notar a pouca presença de crescimento ósseo representado pela coloração verde; (C) TCP  $\beta$  + PRP ativado, notar novamente o crescimento proveniente da calvária em direção ao biomaterial; (D) TCP  $\beta$  + PRP não ativado. Tecido conjuntivo em coloração vermelha (setas amarelas) e tecido ósseo em coloração verde (setas brancas). (Picrosírus, aumento 10X)..... 74
- Figura 29 - Imagem histológica comparativa dos tratamentos aos 90 dias de evolução de pós-operatório. Em vermelho evidencia-se o tecido conjuntivo fibroso. Em verde cora-

se o tecido ósseo neoformado. Biomaterial remanescente (BR); Osso secundário (calvária) (OS); Formação de tecido mielóide (FTM) (A) HA + PRP ativado notar a presença de fibras colágenas organizadas em lamelas, paralelas umas às outras a qual indica o osso secundário da calvária; (B) HA + PRP não ativado, notar a maior quantidade de tecido ósseo em coloração verde; (C) TCP  $\beta$  + PRP ativado, notar a maior presença de tecido conjuntivo em coloração vermelha; (D) TCP  $\beta$  + PRP não ativado, notar a mínima presença de tecido ósseo, representado pela coloração verde, entremeado ao tecido conjuntivo, representado pela coloração vermelha. Tecido conjuntivo em coloração vermelha (seta amarela) e tecido ósseo em coloração verde (seta branca). (Picosirius, aumento 10X). ..... 75

Figura 30 - Gráfico ilustrando os resultados da análise de histomorfometria, demonstrando a relação entre os tratamentos, para a neoformação de tecido ósseo (azul) e a deposição de tecido fibroso (laranja) aos 60 dias de evolução de pós-operatório. .... 76

Figura 31 - Gráfico ilustrando os resultados da análise de histomorfometria, demonstrando a relação entre os tratamentos, para a neoformação de tecido ósseo (azul) e a deposição de tecido fibroso (laranja) aos 90 dias de evolução de pós-operatório. .... 76

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Principais funções dos fatores de crescimento .....	32
Tabela 2 -	Biomateriais utilizados e sua composição química.....	38
Tabela 3 -	Dados das contagens das plaquetas basais e contagem de plaquetas do plasma rico em plaquetas de cada unidade experimental (continua).....	40
Tabela 5 -	Esquema das unidades experimentais e seus tratamentos. ....	41
Tabela 6 -	Modelo de critérios de avaliação histológica baseado em atribuição de cruzes para quantificação de biomaterial remanescente (BR), neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), osso primário (OP), presença de osteoblastos (POT), formação de tecido mieloide (FTM), presença de macrófagos (MA) e neoformação vascular (NFV). ....	49
Tabela 7 -	Resultados obtidos através da análise histológica de HA + PRP ativado, com evolução de 60 dias de pós-operatório, quanto a biomaterial remanescente (BR), neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), osso primário (OP), presença de osteoblastos (POT), formação de tecido mieloide (FTM), macrófagos (MA) e neoformação vascular (NFV).....	51
Tabela 8 -	Resultados obtidos através da análise histológica de HA + PRP ativado, com evolução de 90 dias de pós-operatório, quanto a biomaterial remanescente (BR), neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), osso primário (OP), presença de osteoblastos (POT), formação de tecido mieloide (FTM), macrófagos (MA) e neoformação vascular (NFV).....	54
Tabela 9 -	Resultados obtidos através da análise histológica de HA + PRP não ativado, com evolução de 60 dias de pós-operatório, quanto a biomaterial remanescente (BR), neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), osso primário (OP), presença de osteoblastos (POT), formação de tecido mieloide (FTM), macrófagos (MA) e neoformação vascular (NFV).....	57
Tabela 10 -	Resultados obtidos através da análise histológica de HA + PRP não ativado, com evolução de 90 dias de pós-operatório, quanto a biomaterial remanescente (BR), neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), osso primário (OP), presença de osteoblastos (POT), formação de tecido mieloide (FTM), macrófagos (MA) e neoformação vascular (NFV).....	60
Tabela 11 -	Resultados obtidos através da análise histológica de TCP $\beta$ + PRP ativado, com evolução de 60 dias de pós-operatório, quanto a biomaterial remanescente (BR),	

neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), osso primário (OP), presença de osteoblastos (POT), formação de tecido mieloide (FTM), macrófagos (MA) e neoformação vascular (NFV). ....	62
Tabela 12 - Resultados obtidos através da análise histológica de TCP $\beta$ + PRP ativado, com evolução de 90 dias de pós-operatório, quanto a biomaterial remanescente (BR), neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), osso primário (OP), presença de osteoblastos (POT), formação de tecido mieloide (FTM), macrófagos (MA) e neoformação vascular (NFV). ....	64
Tabela 13 - Resultados obtidos através da análise histológica de TCP $\beta$ + PRP não ativado, com evolução de 60 dias de pós-operatório, quanto a biomaterial remanescente (BR), neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), osso primário (OP), presença de osteoblastos (POT), formação de tecido mieloide (FTM), macrófagos (MA) e neoformação vascular (NFV). ....	67
Tabela 14 - Resultados obtidos através da análise histológica de TCP $\beta$ + PRP não ativado, com evolução de 90 dias de pós-operatório, quanto a biomaterial remanescente (BR), neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), tecido ósseo primário (OP), presença de osteoblastos (POT), formação de tecido mieloide (FTM), macrófagos (MA) e neoformação vascular (NFV). ....	69
Tabela 15 - Resultados médios comparativos para cada tempo de tratamento, 60 e 90 dias de pós-operatório, obtidos em relação à biomaterial remanescente (BR), neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), osso primário (OP), presença de osteoblastos (POT), formação de tecido mieloide (FTM), macrófagos (MA) e neoformação vascular (NFV). ....	71
Tabela 16 - Médias 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.....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>BR</b>	Biomaterial Remanescente
<b>CaP</b>	Fosfato de Cálcio
<b>CCT</b>	Centro de Ciências Tecnológicas
<b>DFC</b>	Deposição de Fibras Colágenas
<b>EFG</b>	Fator de Crescimento Epitelial
<b>EV</b>	Endovenoso
<b>FC</b>	Fatores de Crescimento
<b>FGF</b>	Fator de Crescimento Fibroblástico
<b>FMT</b>	Formação de Tecido Mielóide
<b>HA</b>	Hidroxiapatita
<b>IGF</b>	Fator De Crescimento Semelhante a Insulina
<b>IM</b>	Intramuscular
<b>MA</b>	Presença De Macrófagos
<b>MO</b>	Microscopia Óptica
<b>MPA</b>	Medicação Pré-Anestésica
<b>NFV</b>	Neoformação Vascular
<b>NTO</b>	Neoformação de Tecido Ósseo
<b>OP</b>	Osso Primário
<b>OS</b>	Osso Secundário
<b>PDGF</b>	Fator de Crescimento Vascular Endotelial
<b>POT</b>	Presença de Osteoblastos
<b>PRP</b>	Plasma Rico em Plaquetas
<b>SC</b>	Subcutâneo
<b>TCP- <math>\alpha</math></b>	Fosfato Tricálcico Alfa
<b>TCP- <math>\beta</math></b>	Fosfato Tricálcico Beta
<b>TGP- <math>\beta</math></b>	Fator De Crescimento Transformador Beta
<b>UDESC</b>	Universidade do Estado de Santa Catarina
<b>VEGF</b>	Fator de Crescimento Endotelial

## SUMÁRIO

1 Introdução .....	18
2 Revisão bibliográfica .....	21
2.1 Tecido Ósseo .....	21
2.2 Biomateriais.....	23
2.3 Hidroxiapatita.....	27
2.4 Fosfato Tricálcico.....	29
2.5 Plasma Rico em Plaquetas.....	30
2.5.1 Obtenção do plasma rico em plaquetas .....	32
2.6 Crescimento guiado.....	34
2.7 Histomorfometria Óssea.....	35
3 Objetivos .....	37
3.1 Objetivos gerais.....	37
3.2 Objetivos específicos.....	37
4 Materiais e Métodos.....	38
4.1 Biomateriais estudados.....	38
4.2 Plasma Rico em Plaquetas.....	39
4.3 Unidade Experimental, Manejo E Cuidados .....	40
4.4 Pré-operatório e Anestesia: .....	42
4.5 Procedimento Cirúrgico .....	44
4.6 Pós-Operatório.....	46
4.7 Coleta das amostras .....	47
4.8 Avaliação Histológica .....	48
4.9 Avaliação Histomorfometrica .....	49
5 Resultados .....	50
5.1 Hidroxiapatita acrescido de PRP ativado .....	50
5.1.1 Grupo 60 dias .....	50

5.1.2 Grupo 90 dias.....	53
5.2 Hidroxiapatita acrescido de PRP não ativado.....	56
5.2.1 Grupo 60 dias.....	56
5.2.2 Grupo 90 dias.....	59
5.3 Fosfato Tricálcico $\beta$ acrescido de PRP ativado .....	61
5.3.1 Grupo 60 dias.....	61
5.3.2 Grupo 90 dias.....	63
5.4 Fosfato Tricálcico $\beta$ acrescido de PRP não ativado.....	66
5.4.1 Grupo 60 dias.....	66
5.4.2 Grupo 90 dias.....	68
5.5 Resultados comparativos .....	71
5.6 Análise estatística.....	77
6 Discussão .....	79
7 Conclusão .....	83
BIBLIOGRAFIA .....	84

## 1 Introdução

As doenças ósseas são doenças graves que afetam diretamente a qualidade de vida dos pacientes, e na maioria dos casos o tratamento requer a utilização de enxerto, e em muitas vezes, em quantidade extensa (KOKUBO; KIM; KAWASHITA, 2003). Na medicina veterinária surgem inúmeras situações relacionadas a ortopedia e neurocirurgia que exigem a utilização de enxertos ou substitutos ósseos na sua resolução (DIAS et al., 2013). Os substitutos ósseos já apresentam aplicabilidade na clínica médica em diversas áreas, porém não é rotineiramente utilizada na medicina veterinária, sendo utilizados mais experimentalmente (PARETSIS et al., 2017). Na medicina a utilização de autoenxertos é considerada o padrão ouro para a reparação e substituição óssea (LEGEROS, 2002).

Os métodos de enxertia óssea disponíveis atualmente 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) (LEGEROS, 2002). A utilização de autoenxertos traz sérias desvantagens tais como: aumento da despesa, trauma adicional ao paciente, e possibilidade de morbidez do sitio doador (LEGEROS, 2002), além disso a coleta de ossos autógenos danifica o corpo saudável e a quantidade que pode ser coletada é severamente limitada (KOKUBO; KIM; KAWASHITA, 2003).

Nas últimas décadas, abordagens de engenharia de tecidos baseadas em biomateriais foram propostas como uma modalidade terapêutica alternativa para o tratamento de doenças ósseas (MADHURAKKAT PERIKAMANA et al., 2020). Há, então, uma procura por materiais ósseos substitutos artificiais que não danifiquem o tecido saudável, não apresentem risco viral ou bacteriano e que possam ser fornecidos a qualquer momento e em qualquer quantidade (KOKUBO; KIM; KAWASHITA, 2003). Dessa forma o uso de biomateriais inclui desde a avaliação clínica geral do animal, até as propriedades do biomaterial sobre o tecido (PARETSIS et al., 2017; KUCI, 2017 e VARGAS, 2018).

O ideal é que esses biomateriais sejam osteocindutores que consigam promover a aposição de tecido ósseo em sua superfície atuando como uma molde para facilitar a neoformação (PARETSIS et al., 2017). Além disso para serem considerados biomateriais devem apresentar características como: estrutura estável, rapidez na incorporação com o tecido ósseo, promover osteocondução e preferencialmente não ter nenhuma complicação associada ao seu uso (VARGAS, 2018).

Nas últimas três décadas diversos tipos de cerâmica bioativas foram desenvolvidas, sendo as mais utilizadas: a hidroxiapatita sinterizada (HA), fosfato tricálcico beta sinterizado (TCP), cerâmica bifásica e o vidro cristalino contendo oxifluoroapatita cristalina (KOKUBO; KIM; KAWASHITA, 2003). Essas biocerâmicas a base de fosfato de cálcio tem-se destacado nos estudos como biomateriais (VARGAS, 2018).

O plasma rico em plaquetas (PRP) tem sido rotineiramente associado a enxertos em cirurgias de levantamento de seio maxilar, apesar de seus efeitos ainda serem controversos (ROCHA, 2015). O PRP, também chamado de gel de plaquetas, plasma autógeno de plaquetas ou concentrado de plaquetas, vem sendo usado desde meados da década de 90, nas áreas de cirurgia oral, reconstrutiva oral, bucomaxilofacial e procedimento de reconstrução para a implantodontia, medicina estética, entre outros ramos da medicina com o objetivo de acelerar o reparo da ferida cirúrgica e regeneração óssea (COSTA, P. A. Da; SANTOS, 2016). O PRP é o resultado obtido da separação do plasma e plaquetas das hemácias e leucócitos através da centrifugação (COSTA, P. A. Da; SANTOS, 2016); trata-se, então, da concentração autóloga de plaquetas em um pequeno volume de plasma (VENDRAMIN et al., 2006). A centrifugação visa obter um plasma com maior concentração de plaquetas, quando comparada a contagem basal do sangue periférico, rico em fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador do crescimento  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) e  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), entre outros fatores (COSTA, P. A. Da; SANTOS, 2016).

O tecido hematopoiético é formado pelo conjunto de sangue periférico e medula óssea, sendo o sangue constituído por elementos figurados e plasma, o qual confere suas propriedades líquidas, eritrócitos, leucócitos e plaquetas os quais correspondem aos elementos celulares (COSTA, P. A. Da; SANTOS, 2016). As plaquetas encontram-se naturalmente inativas, sua ativação se dá através de agentes fisiológicos (trombina, colágeno, fator ativador de plaquetas, serotonina) presentes em tecidos lesados e inflamatórios, ou através de agentes químicos como o cloreto de cálcio a 10% (YAMADA, 2011). Após o reconhecimento desses agentes pelas membranas plaquetárias, elas tornam-se ativas emitindo pseudópodes responsáveis pela agregação e degranulação de  $\alpha$ -grânulos, liberando assim fatores de crescimento e recrutando novas plaquetas e tipos celulares (YAMADA, 2011).

O PRP é uma alternativa de biomaterial que, quando aplicado diretamente no foco da fratura, acelera o processo de cicatrização, promove a orientação e a adesão de células-tronco mesenquimais responsáveis pelo processo de consolidação e reparação tecidual (ANDRADE et al., 2016). Sendo então um produto com grande potencial de melhorar a integração de

enxertos, tanto ósseo quanto cutâneo, cartilaginoso ou de gordura, além de estimular a cicatrização de feridas (VENDRAMIN et al., 2006).

Nesse estudo foi avaliado a efetividade do PRP ativado comparado ao não ativado na aceleração do processo de cicatrização e neoformação óssea, quando associado aos biomateriais hidroxiapatita e fosfato tricálcico beta, sendo desenvolvido a partir de um sistema de crescimento ósseo guiado em calvárias de coelhos aos 60 e 90 dias.

## 2 Revisão bibliográfica

### 2.1 Tecido Ósseo

O osso é formado por uma série de eventos complexos envolvendo a mineralização de proteínas da matriz extracelular, orquestrada rigidamente por células com funções específicas para a manutenção da integridade do osso (LEGEROS, 2002). Semelhante a outros tecidos calcificados, o osso é um compósito íntimo das fases orgânicas (proteínas colágenas ou não colágenas) e inorgânica ou mineral (LEGEROS, 2002).

O tecido ósseo é o componente principal do esqueleto (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013) e sua função está associado ao suporte de tecidos moles, proteção anatômica do sistema nervoso central e caixa torácica, e, por compor o sistema musculo esquelético, participa da coordenação de movimentos voluntários e ampliação da força muscular (CASTRO JUNIOR et al., 2008). Além dessas funções, os ossos ainda funcionam como depósito de cálcio, fosfato e outros íons, armazenando e liberando-os de maneira a manter uma concentração destes nos líquidos corporais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

As células do tecido ósseo são provenientes de células indiferenciadas do mesenquima embrionário, sendo capaz de originar os demais tecidos mesenquimais (CASTRO JUNIOR et al., 2008). Diretamente a partir dessas células mesenquimais indiferenciadas originam-se células osteoprogenitoras as quais dão origem aos osteoblastos e osteoclastos (CASTRO JUNIOR et al., 2008).

Os osteoblastos formam uma camada celular continua sobre a superfície do osso que está sendo formado e também são responsáveis pela produção orgânica do osso e sua mineralização (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2013). São encontrados na superfície de regiões formadoras de osso (sistemas de Harvers) e uma vez cercados por mineral os osteoblastos se tornam osteócitos (SLATER, 2007). Os osteócitos são o tipo celular mais abundante no tecido ósseo e possuem prolongamentos citoplasmáticos formando junções do tipo gap, permitindo que os osteócitos, mesmo os localizados nas porções profundas do osso, possam responder as modificações sistêmicas e na superfície óssea (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2013), desse modo formando uma rede que conecta a superfície óssea as porções mais internas, sendo assim responsável pela manutenção da matriz óssea (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2013).

Os osteoclastos são responsáveis pela remoção de minerais e da matriz óssea, dissolvem o mineral mediante a secreção de ácidos e em seguida enzimas que digerem a matriz (SLATER, 2007). Ou seja, possuem origem similar aos macrófagos, sendo ativas na absorção e na remodelação do osso (KUCI, 2017). No osso sadio a atividade tanto dos osteoblastos quanto dos osteoclastos são acopladas, sendo que a reabsorção estimula a neoformação óssea (SLATER, 2007).

A constituição óssea possui uma parte orgânica e outra inorgânica (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2013). As fibras colágenas e o fosfato de cálcio que mineraliza o osso surgem através dos osteoblastos e os osteócitos mantêm a matriz óssea mineralizada (KUCI, 2017). A matriz orgânica é formada por colágeno (principalmente o tipo I), proteoglicanas e glicoproteínas, já a inorgânica é formada por íons de fosfato e cálcio, e em menor quantidade bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2013). A associação do fosfato e do cálcio formam cristais de hidroxiapatita (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2013), que associado a fibras colágenas é responsável pela rigidez e resistência do tecido ósseo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

O tecido ósseo é separado, histologicamente, em: tecido imaturo ou primário e tecido maduro ou secundário, ambos possuem as mesmas células e constituintes da matriz (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). O tecido primário se apresenta com disposição irregular, com fibras colágenas sem orientação definida e menor quantidade de cristais de hidroxiapatita, já o tecido secundário possui fibras colágenas dispostas em lamelas paralelas ou concêntricas (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2013). Além disso o osso primário possui menor quantidade de minerais e maior proporção de osteócitos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A parede externa do osso compacto possui uma membrana de tecido conjuntivo osteogênico, denominado periôsteo, onde existe uma alta porcentagem de células osteoprogenitoras, as quais se multiplicam por mitose e se diferenciam em osteoblastos, os quais possuem papel importante no crescimento e reparação óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). A parede interna do osso compacto e esponjoso é revestida por uma camada de células ósseas que recebe a denominação de endósteo o qual também contribuiu para o processo regenerativo e remodelativo do osso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A regeneração óssea é um processo de várias etapas que requer a combinação de várias moléculas de sinalização, como diferentes fatores de crescimento e tipos de células, incluindo células inflamatórias, células vasculares, células progenitoras mesenquimais e osteócitos (MADHURAKKAT PERIKAMANA et al., 2020). A remodelação óssea corre naturalmente

em consequência a atividade das células osteoblásticas, responsáveis pela deposição óssea, e osteoclásticas, responsáveis pela absorção óssea, (KUCI, 2017).

Os processos celulares e moleculares, que contribuem para a regeneração óssea após a fratura, têm muitas características semelhantes às que ocorrem durante o desenvolvimento esquelético embrionário e pós-natal (GERSTENFELD et al., 2003). A formação do osso envolve a proliferação e migração das células osteoprogenitoras e a diferenciação dos osteoblastos (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2013). Em seguida ocorre a produção da matriz cartilaginosa, que ao ser mineralizada se ossificara, enfim ocorre a remodelação onde o calo ósseo inicial é modificado, por formação e absorção óssea secundária, para assim restaurar a estrutura anatômica (GERSTENFELD et al., 2003).

## **2.2 Biomateriais**

Biomaterial é entendido como: toda substância ou combinação de substâncias, de origem natural ou sintética (que não drogas ou fármacos), que podem ser usadas durante qualquer período de tempo, como parte ou todo de sistemas que tratam, aumentam ou substituem qualquer tecido, órgão ou função do corpo (HUDECKI; KIRYCZYŃSKI; ŁOS, 2018). Segundo ALMEIDA et al. (2014), o biomaterial é uma substância que foi projetada para tomar forma, a qual sozinha ou como parte de um sistema complexo, é usada para direcionar, pelo controle das interações com os componentes dos sistemas vivos, o curso de qualquer tratamento terapêutico ou procedimento de diagnóstico.

Sendo assim, biomateriais tanto de origem natural quanto sintética, são utilizados para o desenvolvimento de dispositivos que entram em contato com os sistemas biológicos, com o objetivo de reparar perdas teciduais ou restaurar funções comprometidas (SILVA et al., 2018). Por isso esses biomateriais precisam ser imprescindivelmente biocompatíveis, não devendo estimular ou provocar o mínimo de reação alérgica ou inflamatória (COSTA, B. D. et al., 2015). Além disso devem possuir requisitos predeterminados como: ter estrutura estável, ter rapidez na incorporação com o tecido ósseo, promover osteocondução, gerar pouca ou nenhuma complicaçāo associada ao seu uso, não toxico (a menos que seja sua função), não pirogênico e não cancerígeno (HUDECKI; KIRYCZYŃSKI; ŁOS, 2018). Também devem dar conta da estrutura e função dos tecidos e órgãos circundantes, para que não os perturbem, assim as propriedades de um biomaterial ideal podem mudar dependendo da localização exata de sua implantação e até do histórico médico do paciente (ALMEIDA et al., 2014).

A sinterização é o tratamento térmico que é dado as amostras de cerâmica que apresentam quase nenhuma propriedade mecânica. Nesse processo ocorre a transição do estado de aglomeração de partículas para uma unidade na qual as partículas fundem-se umas às outras (ROSA; SHAREEF; NOORT, VAN, 2000). Essa sintetização desses materiais pode ocorrer nas mais diversas formas de apresentação como: em blocos, grânulos, membranas e microesferas; e possuir variadas composições (ALMEIDA et al., 2014). Podendo ser metálicos, cerâmicos, derivados de materiais biológicos, bioderivados de macromoléculas, polímeros sintéticos e ainda, compósitos (HUDECKI; KIRYCZYŃSKI; ŁOS, 2018). A definição da forma que esse material será usado é dada de acordo com o defeito ósseo (COSTA, B. D. et al., 2015). Quando utilizados para reconstrução de defeitos ósseos, funcionam através da promoção de um arcabouço para a angiogênese e consequente neoformação óssea (KUCI, 2017).

No caso de aloenxertos, a rejeição de tecidos e a transferência de doenças apresentam riscos, como uma alternativa promissora, a engenharia de tecidos dos ossos evoluiu em relação aos materiais que induzem a formação óssea em resposta ao tecido vizinho (YADAV; SRIVASTAVA, 2019). Onde esses materiais desempenham um modelo para as células ósseas semeadas que apoiam a ligação, proliferação, migração e produção de matriz extracelular (MEC), dessa forma são biocompatíveis com o crescimento osteoprogenitor, promovem a diferenciação das células-tronco mesenquimais em osteoblastos e a produção, seguida da manutenção, da matriz extracelular pelo osteoblasto (YADAV; SRIVASTAVA, 2019).

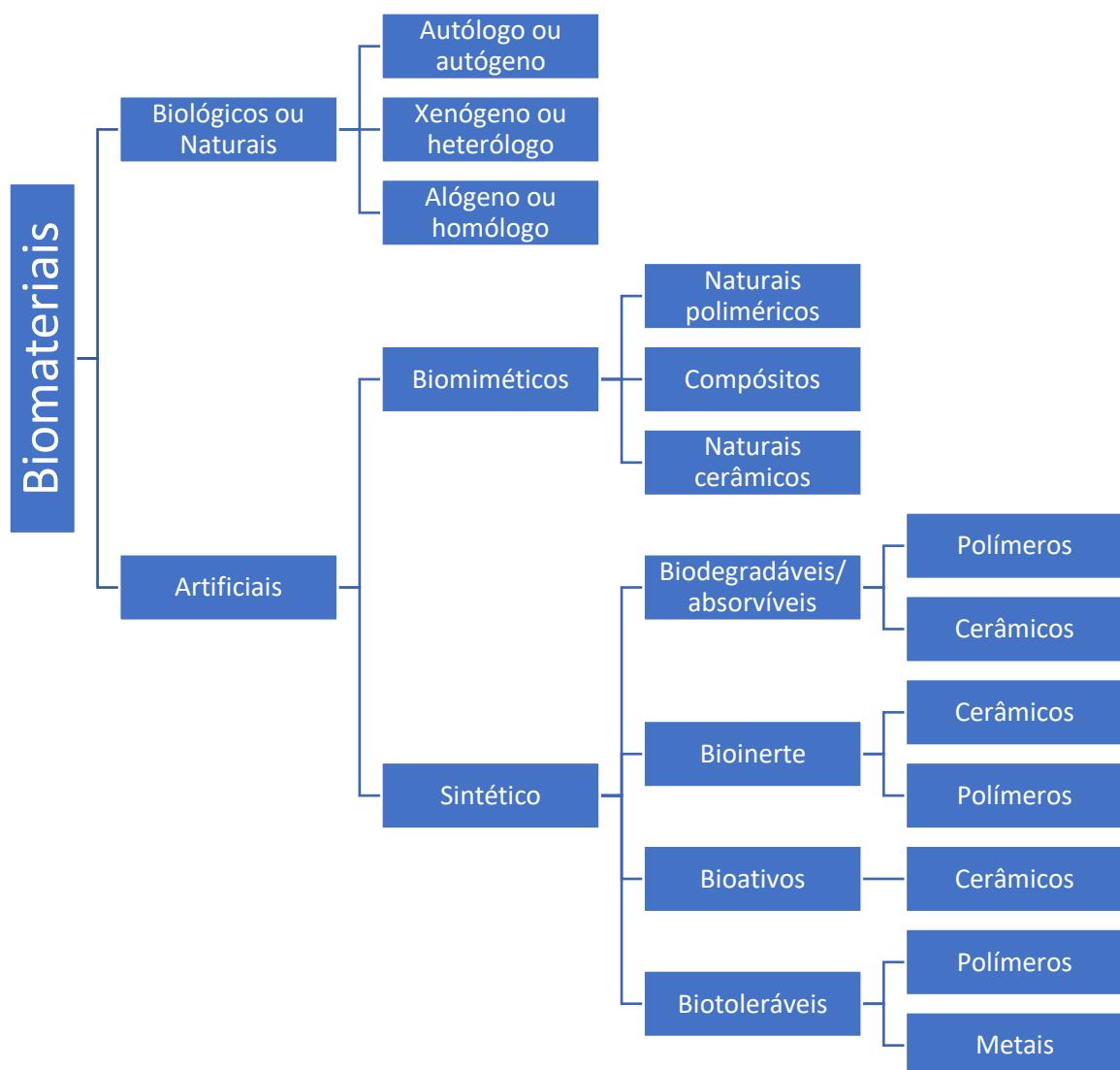
Existem diversas classificações para os biomateriais, sendo que eles serão corretamente classificados de acordo com múltiplos princípios, mas basicamente podem ser divididos em duas categorias: materiais reabsorvíveis, que após a implantação são desintegrados e reabsorvidos; e materiais não reabsorvíveis que não serão desintegrados e reabsorvidos (ABLA et al., 2009).

Os biomateriais podem ser divididos em quatro categorias, dependendo da sua origem, que são: enxerto autógeno, alógeno, aloplásicos e xenógeno (MARQUES et al., 2019). Enxertos de origem autógena, ou seja, provenientes do mesmo indivíduo, são os que representam maior potencial para uso por sua combinação favorável de propriedades (osteogênese, osteocondução e osteoindução) e também pelo risco mínimo de rejeição, porém sua aplicação é limitada por fatores como a localização e o tamanho do defeito (SILVA et al., 2018).

Os biomateriais alógenos (provenientes de outro indivíduo de mesma espécie) e xenógeno (proveniente de um indivíduo de espécie diferente) (KUCI, 2017) têm sido estudados para superar os riscos associados ao osso autógeno, porém seu uso é limitado uma vez que possui problemas como: rejeição, sequestro ósseo e infecção, também possui risco potencial de

disseminação de doenças (VARGAS, 2018). Os biomateriais são correspondentes aos enxertos aloplásicos (materiais sintéticos ou naturais) e podem ser classificados de acordo com sua origem: natural (onde a matéria prima vem de organismos vivos) ou sintético (onde a base mescla materiais naturais e manufaturados); sua composição química: metal, cerâmica, polimérico ou compósitos; além de seus comportamento fisiológico como demonstrado na figura 1 (ALMEIDA et al., 2014).

Figura 1 - Classificação dos biomateriais segundo comportamento fisiológico



Fonte: Adaptado da aula do prof. Nelson Camargo

As biocerâmicas nanoestruturadas a base de cálcio (Ca/P) oferecem características diferenciadas ao comparadas com biomateriais convencionais como: bioatividade, área superficial de grãos e microporos, além de apresentar semelhança cristalográfica com a apatita

óssea do esqueleto humano e biocompatibilidade (KUCI, 2017). Os materiais cerâmicos podem ser sintéticos, como a hidroxiapatita, o beta fosfato tricálcico, o fosfato de cálcio e os vidros bioativos; ou naturais como o carbonato de cálcio obtido dos corais e a hidroxiapatita obtida do osso bovino (HUDECKI; KIRYCZYŃSKI; ŁOS, 2018).

Além disso possuem densidade moderada, elevada biocompatibilidade e boa resistência a compressão, podendo substituir tecidos duros como ossos e dentes, porém apresentam baixa tenacidade a fratura e dificuldade de processamento, alguns deles, inclusive, sofrem degradação de algumas propriedades mecânicas em meio fisiológico (HUDECKI; KIRYCZYŃSKI; ŁOS, 2018). Porém são materiais policristalinos muito frágeis, sensíveis a presença de rachaduras ou outros defeitos e tem pouca resistência contra força de tensão, por outro lado exibem dureza, grande resistência, rigidez, baixa densidade e são resistentes a desgaste e a corrosão (ZAVAGLIA, 2011).

A maioria dos materiais cerâmicos é biocompatível, sendo classificados em: bioinerte, bioativos e biorreabsorvíveis (ZAVAGLIA, 2011). As cerâmicas bioinertes tem como exemplos: a alumina, a zircônia, e materiais carbonosos; já as bioativas tem como exemplo: a hidroxiapatita, o biovidro e alguns vitro-cerâmicos; enquanto o sulfato de cálcio e o fosfato tricálcico são exemplos de cerâmicas biorreabsorvíveis (HUDECKI; KIRYCZYŃSKI; ŁOS, 2018). A cerâmica bioinerte mantem sua estrutura dentro do corpo após a implantação e não induz nenhuma reação imunológica, a cerâmica bioativa forma ligações químicas diretas com o osso ou mesmo com os tecidos moles de um organismo vivo (COSTA, B. D. et al., 2015).

A cerâmica de fosfato de cálcio é um material reabsorvível e bioativo, e uma de suas principais características é a porosidade, uma vez que o tamanho do poro ideal para essas biocerâmicas é próximo ao do osso esponjoso (HUDECKI; KIRYCZYŃSKI; ŁOS, 2018). O controle da macro e microporosidade é um fator importante para a eficiência do material enxertado, uma vez que a colonização celular dos substitutos ósseos depende das características de porosidade do biomaterial (KUCI, 2017). As interconexões entre os macroporos formam um sistema de túneis que permitem o acesso e o retorno dos fluidos biológicos e a entrada de células ósseas, as quais irão facilitar a neoformação óssea no interior dos macroporos do biomaterial (KUCI, 2017).

A porção inorgânica do osso é composta por cálcio e fosfato sendo caracterizado como um cristal de hidroxiapatita com pequenas quantidades de outros elementos como os fluoretos, que favorecem a cristalização e endurecem os ossos (LEGEROS, 2002). Os materiais bioativos do fosfato de cálcio formam uma camada de apatita semelhante ao osso na superfície para se ligar ao osso vivo (COSTA, B. D. et al., 2015). Estudos indicam que um biomaterial capaz de

formar apatita em sua superfície *in vivo* se liga ao osso circundante através dessa camada, enquanto um material incapaz de formar a apatita em sua superfície *in vivo* não se liga ao osso (KOKUBO; YAMAGUCHI, 2019). Vale lembrar que existem alguns casos excepcionais observados para certas cerâmicas reabsorvíveis, como por exemplo o fosfato tricálcico  $\beta$ , que se liga ao osso vivo sem formar uma camada de apatita em sua superfície (KOKUBO; YAMAGUCHI, 2019).

### **2.3 Hidroxiapatita**

A hidroxiapatita está entre o grupo de minerais chamados apatitas, possuindo a fórmula química  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , e seu uso como biomaterial tem sido pesquisado desde 1970, sendo bastante comentado na literatura (PARETSIS et al., 2017). Considera-se que qualquer material capaz de se ligar ao osso vivo deve se basear em fosfato de cálcio, uma vez que o osso natural é composto de 75% em peso de fosfato de cálcio de hidroxiapatita e 25% em peso de colágeno orgânico (KOKUBO; YAMAGUCHI, 2019).

Apresenta ausência de toxicidade local e sistêmica, ausência de respostas inflamatórias e excelente propriedades de biocompatibilidade e estoconduvidade, permitindo a proliferação de células ósseas como fibroblastos e osteoblastos. Porém possui um baixo índice de bioatividade e lenta taxa de degradação, fatores que limitam a sua utilização já que absorção é uma das características desejada em biomateriais (SINHORETI; VITTI; CORRER-SOBRINHO, 2013).

A hidroxiapatita comercial de origem natural é derivada de espécies especiais de corais (Porites) ou de osso bovino, sendo que não são puras, porém contêm alguns dos elementos menores e vestigiais presentes originalmente no coral ou no osso (ABLA et al., 2009). Representa uma classe de materiais considerado duro, com característica de fratura frágil, a resistência a fratura é referida como  $1.0 \text{ MPa m}^{1/2}$ , a qual é extremamente baixa comparada a do osso natural cortical que é entre  $2$  a  $12 \text{ MPa m}^{1/2}$  (SIQUEIRA, 2009).

A hidroxiapatita é um sal de fosfato de cálcio com organização cristalina complexa, esse sal possui papel importante no processo de cicatrização óssea, que quando sinterizado a uma temperatura de  $1300^\circ\text{C}$  terá a estrutura de apatita (SIQUEIRA, 2009). Há dois tipos de hidroxiapatitas que devem ser considerados: as sintetizadas em altas temperaturas apresentando boa cristalinidade e tamanho de cristais grandes; e as sintetizadas em baixas temperaturas que

apresentam baixa cristalinidade e cristais pequenos, a qual possui características similares as do tecido ósseo e dentário (COSTA, A. C. F. M. et al., 2009).

A apatita é apresentada e comercializada em diversas formas como cerâmicas, com consistência porosa ou densa, blocos ou grânulos, vem sendo objeto de estudos em diferentes porosidades e associações (PARETSIS et al., 2017). A produção de poros na fabricação da cerâmica visa o crescimento celular dentro deles (SIQUEIRA, 2009). E os grânulos porosos são estudados por serem bem tolerados pelo tecido ósseo, facilitarem a infiltração e proliferação de osteoblastos, tanto no contorno dos grãos quanto nas suas microporosidades, além disso promovem a proliferação de vasos sanguíneos (DANTAS et al., 2010), pois a estrutura porosa da hidroxiapatita funciona como um suporte passivo a neoformação vascular (VITAL et al., 2006).

Quanto maior o número de poros pequenos para uma dada porosidade total, mais resistente será o material. Quando se reduz o tamanho dos grânulos, diminui o tamanho dos poros e, assim, aumenta a resistência mecânica, então os poros atuam como concentradores de força sobre a massa, e a redução em seu tamanho também diminui a magnitude do campo associado de intensidade de força (GRANDI et al., 2011).

A hidroxiapatita sintética possui biocompatibilidade e osteointegração a torna substituta do osso humano em implantes e próteses (COSTA, A. C. F. M. et al., 2009), segundo Almeida et al (2014) esse alto potencial de osteoindução promove uma estrutura potente para ser usada em substituição óssea ortopédica. Possui uma matriz mineral biocompatível que apresenta similaridade com a composição do osso mineral, capacidade de osteocondução e pode ser utilizada associada ou não a outros compostos e enriquecida com magnésio (ALMEIDA et al., 2014). Sendo assim ela imita o componente inorgânico do osso liberando fosfato de cálcio (CaP) estimulando as células osteogênicas e acelerando a regeneração óssea (YADAV; SRIVASTAVA, 2019). Além disso favorece o crescimento ósseo para os locais onde se encontra, permite a proliferação de fibroblastos, osteoblastos e outras células ósseas e a superfície da HA permite a interação de ligações do tipo dipolo que faz com que as moléculas de água, colágeno e proteínas sejam absorvidas na superfície o que induz a regeneração tecidual (GRANDI, 2007).

Quanto ao processo de degradação da hidroxiapatita ele ocorre simultaneamente a reposição do osso em formação (SINHORETI; VITTI; CORRER-SOBRINHO, 2013). Estudos demonstram que a superfície da hidroxiapatita é osteocondutiva, onde o resultado dessa atividade leva a deposição de tecido ósseo diretamente sobre a superfície da hidroxiapatita implantada sem evidência de encapsulação ou tecido de granulação (BORGES et al., 2000).

Sendo assim a hidroxiapatita vem sendo o biomaterial mais utilizado em diferentes técnicas regenerativas ósseas devido; a sua biocompatibilidade, semelhança com componentes inorgânicos do osso, não transmitir doenças, ser osteofílico e osteocondutor (HUDECKI; KIRYCYŃSKI; ŁOS, 2018). Sua aplicação não é indicada em locais sujeitos a tração devido a sua alta cristalinidade e demais propriedades mecânicas (LEVANDOWSKI JUNIOR, 2014).

## 2.4 Fosfato Tricálcico

O fosfato tricálcico (TCP) sintético possui formula química  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  e possui quatro formulas alotrópicas: TCP-  $\beta$  (fase romboédrica), TCP-  $\alpha$  (fase monocíclica), TCP-  $\alpha'$  (fase super alfa) e TCP-  $\gamma$  (a qual só ocorre a altas pressões) (SEO, 2015). As composições de fosfato tricálcico alfa e beta (TCP- $\alpha$  e  $\beta$ ), estão entre os fosfatos de cálcio que mais se destacam como substitutos ósseos (DALMÔNICO, 2011) sendo o TCP-  $\beta$  mais estável, podendo ser aplicado tanto na forma porosa quanto densa (LEVANDOWSKI JUNIOR, 2014). Além disso o TCP-  $\beta$  possui características de bioatividade e boa biocompatibilidade levando a um maior interesse pelos centros de pesquisa (DALMÔNICO, 2011).

Os TCPs são materiais porosos, reabsorvíveis e biocompatíveis, provocam pouca ou nenhuma resposta inflamatória, permitem o crescimento de células e vasos e têm uma conexão direta com a estrutura óssea (GRANDI et al., 2011). É um biomaterial de fácil dissolução em meio biológico, sua capacidade de dissolução é doze vezes maior que a hidroxiapatita (SINHORETI; VITTI; CORRER-SOBRINHO, 2013). Pois diferente da hidroxiapatita, é menos estável em solução aquosa ou presença de umidade, por isso destaca-se pela capacidade de solubilidade em meio biológico (PAULA; TRICHÈS, 2018).

Esse material apresenta-se em duas formas estruturais (TCP- $\alpha$  e  $\beta$ ), onde, em contato com fluido tecidual, o TCP- $\alpha$  é convertido em hidroxiapatita não reabsorvível e o TCP-  $\beta$  atua como arcabouço para formação óssea sendo substituído gradualmente por tecido ósseo (MARQUES et al., 2019). Uma das características que se destaca é a similaridade química e cristalográfica com a matriz óssea dos tecidos duros (PAULA; TRICHÈS, 2018), além disso possuiu presença de poros em sua estrutura que permite a formação de osso entre eles (SEO, 2015).

Sinteticamente, pode ser encontrado nas formas de pó (grânulos microporosos) e em gel, sendo que a forma em pó favorece a microporosidade entre os grânulos estimulando a proliferação de células osteoprogenitoras contribuindo com os processos de osteoindução,

osteointegração e formação de tecido ósseo (SINHORETI; VITTI; CORRER-SOBRINHO, 2013). O TCP-  $\beta$  apresenta-se de forma variada com grânulos em diferentes tamanhos que se adequam a diferentes defeitos ósseos, possui vários poros que permitem a impregnação com células sanguíneas e fatores de crescimento ou medula óssea (células osteoprogenitoras) propiciando a osteoindução (SEO, 2015).

O TCP-  $\beta$  promove a adesão, proliferação osteoblástica de células mesenquimatosas, e a produção de matriz de colágeno que sofre mineralização, sua presença também favorece o processo de neovascularização (PAULA; TRICHÈS, 2018). Após ser implantado o TCP se dissolve sendo substituído por um novo tecido, essa reabsorção é causada pela solubilidade do material e pH do meio, pela formação de novas fases superficiais, desintegração física do material em partículas menores devido ao ataque químico (que ocorre preferencialmente nos contornos de grãos) e fatores biológicos que podem influenciar nas condições do meio (PAULA; TRICHÈS, 2018). Sua biodegradação não ocorre apenas pela dissolução de seus constituintes, mas também pela sua morfologia como presença de poros ou tamanho e forma dos grânulos (SEO, 2015).

## 2.5 Plasma Rico em Plaquetas

O plasma rico em plaquetas (PRP) é uma concentração autóloga de plaquetas em um pequeno volume de plasma, possui fatores de crescimento e proteínas osteocondutoras, as quais servem de matriz para a migração epitelial e formação óssea e de tecido conectivo (VENDRAMIN et al., 2006). Sendo capaz de concentrar de 3 a 5 vezes a quantidade de plaquetas em comparação ao sangue basal (ALEIXO et al., 2017). Uma das propriedades do PRP salientada pela literatura são as propriedades regenerativas, uma vez que ele pode ser considerado um agente catalisador no processo de reparo (MACEDO, 2004).

Quando o objetivo é a modulação cicatricial as plaquetas representam o componente mais importante pois apresentam propriedades anti-inflamatórias e regenerativas, além disso há outros componentes atuando juntamente com o PRP, como os leucócitos e células brancas, além de fatores de crescimento complexos (COSTA, P. A. Da; SANTOS, 2016). A principal razão para ser obter uma quantidade maior de plaquetas se dá, pelo fato de que em seu interior existem pelo menos 60 substâncias biologicamente ativas, as quais, participam dos mecanismos de reparação tecidual. Para que essas substâncias possam agir é necessário que as plaquetas sejam ativadas por um fator agonista. Após essa ativação as plaquetas mudam de formato passando a

apresentar projeções membranosas (pseudópodes) e os grânulos em seu interior são rompidos levando a liberação do seu conteúdo (ALEIXO et al., 2017).

A constituição básica do PRP possui três componentes: plasma, leucócitos e plaquetas; onde: o plasma possui soro sanguíneo mais fatores de coagulação, os leucócitos conferem resistência natural (MACEDO, 2004) e as plaquetas liberam os mediadores biológicos dos quais os fatores de crescimento (FC) são o componente mais importante uma vez que são capazes de estimular diferentes processos celulares (ALEIXO et al., 2017).

As plaquetas participam ativamente do processo de reparo das feridas, são as primeiras células presentes no local do trauma (COSTA, P. A. Da; SANTOS, 2016). Também atuam no processo de hemostasia, cicatrização e re-epitelização, pois liberam diversos FC que estimulam a angiogênese, promovendo crescimento vascular e proliferação de fibroblastos (VENDRAMIN et al., 2006). Os fatores de crescimento são mediadores biológicos naturais que exercem vários efeitos sobre o processo de reparo e regeneração, sendo considerados os iniciadores universais de quase todos os processos de reparo (MACEDO, 2004).

Estudos demonstram que o PRP potencializa o processo de cicatrização tecidual por meio da liberação dos fatores de crescimento, sendo os principais envolvidos na recuperação tecidual: o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF $\beta$ ), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), o fator de crescimento epitelial (EGF), o fator de crescimento fibroblástico (FGF) e o fator de crescimento semelhante a insulina (IGF) (ALEIXO et al., 2017).

Os fatores de crescimento que atuam no tecido ósseo podem ser de origem local ou sistêmico, sendo secretados por células ósseas e difundindo-se no meio extracelular ou armazenados na matriz calcificada, sendo recrutados, respectivamente, de forma imediata ou tardia em casos de injuria tissular (PAGLIOSA; ALVES, 2007). Esses fatores de crescimento são liberados por grânulos alfa plaquetários, inicialmente o PDGF atua na angiogênese e na diferenciação celular inicial. O fator TGF- $\beta$  aprimora a diferenciação celular e estimula a maturação celular e o IGF-I termina a maturação e programa a consolidação da cicatrização (MACEDO, 2004). A ação destes fatores de crescimento é bem similar (tabela 1), porém nenhum deles capaz de restaurar uma lesão isoladamente, desta forma eles atuam em sinergismo no local da lesão (ALEIXO et al., 2017).

Tabela 1 - Principais funções dos fatores de crescimento

Fator de Crescimento	Principal função
Transformador beta (TGFβ)	Quimiotaxia, diferenciação celular e angiogênese
Derivado da plaqueta (PDGF)	Angiogênese, quimiotaxia, mitogênese e formação de colágeno
Fibroblástico (FGF)	Diferenciação de osteoblastos, proliferação de fibroblastos, angiogênese, mitogênese e quimiotaxia
Similar a insulina (IGF)	Mitogênese e diferenciação de células mesenquimais
Vascular endotelial (VEGF)	Quimiotaxia e proliferação de células endoteliais e aumento da permeabilidade vascular
Epitelial ou epidermal (EGF)	Mitogênese, atividade migratória e diferenciação de células epiteliais, fibroblastos, células renais e da glia.

Fonte: (ALEIXO et al., 2017)

O plasma rico em plaquetas (PRP) vem sendo empregado nas áreas de cirurgia oral, bucomaxilofacial, procedimento de reconstrução para implantodontia e para medicina estética, porém estudos tem demonstrado benefícios em diversas áreas da medicina, tais como no tratamento de problemas musculoesqueléticos e articular e para rápida cicatrização em atletas profissionais (COSTA, P. A. Da; SANTOS, 2016). Sua utilização em enxertos ósseos tem demonstrado uma consolidação mais rápida e uma mineralização do enxerto e 50% do tempo requerido além de apresentar um aumento de 15 a 30 % na densidade do osso trabecular (ALEIXO et al., 2017).

### 2.5.1 Obtenção do plasma rico em plaquetas

O PRP é obtido do sangue autógeno do paciente através de um processo que utiliza o princípio da separação celular por centrifugação (COSTA, P. A. Da; SANTOS, 2016). Faz-se a adição de trombina e glucanato de cálcio, os quais ativam o sistema de coagulação (VENDRAMIN et al., 2006). Sendo o resultado uma concentração atenuada de plaquetas em um volume reduzido de plasma, contendo sete fatores de crescimento e três proteínas (fibrina, fibronectina e vitronectina), que atuam como moléculas de adesão celular nos processos de migração epitelial, osteoindução e formação de matriz óssea e de tecido conjuntivo (PAGLIOSA; ALVES, 2007).

O volume sanguíneo depende do protocolo utilizado, na literatura podemos encontrar variados protocolos onde o mais utilizado em quantidade específica do preparado, para humanos, é em média 450 mL a 500 mL de sangue (COSTA, P. A. Da; SANTOS, 2016). Esses protocolos são realizados em bancos de sangue ou ambientes cirúrgicos hospitalares utilizando-se de bolsas de sangue coletoras e centrifugas de maior porte e complexidade (MACEDO, 2004). As bolsas possuem três compartimentos que vão sendo preenchidos de acordo com as etapas realizadas (COSTA, P. A. Da; SANTOS, 2016).

O processo de obtenção está dividido em três etapas:

#### Primeira etapa: Punção venosa

O PRP deve ser sempre autólogo devido ao risco de rejeição ou a impossibilidade de secreção de fatores de crescimento ativo (PAGLIOSA; ALVES, 2007). Além disso deve ser coletado através de punção venosa em local adequado, antes do início da cirurgia, pois a própria cirurgia leva a ativação do mecanismo de coagulação sanguínea, tendo maior aporte no sítio cirúrgico e diminuição de concentração no sangue total (COSTA, P. A. Da; SANTOS, 2016).

É de suma importância que o processo seja estéril e de precisão para se chegar a um concentrado de qualidade, também deve-se ter cuidado durante o processo de centrifugação para não provocar lise das plaquetas, pois caso isso ocorra perde-se a atividade de secreção dos fatores de crescimento (COSTA, P. A. Da; SANTOS, 2016).

O anticoagulante recomendado é o citrato de sódio, pois se liga aos íons de cálcio do sangue formando quelatos, impedindo a coagulação do plasma (ALEIXO et al., 2017). Outro fator é que o citrato de sódio não altera os receptores de membrana das plaquetas, sendo assim o processo de quelação pode ser revertido através da adição do cloreto de cálcio para a formação do gel de plaquetas (MACEDO, 2004).

#### Segunda etapa: Separação celular

O número de centrifugações (uma ou duas) dependerá do protocolo a ser utilizado (MACEDO, 2004). A centrifugação é a etapa essencial para a fabricação do PRP podendo ser realizada em um único momento ou em duas etapas (ALEIXO et al., 2017). Esse processo deve ser executado com precisão para separar as plaquetas das células vermelhas, obtendo um plasma com altas concentrações de plaquetas íntegras (ALEIXO et al., 2017).

#### Terceira etapa: Preparo do plasma

Após a primeira centrifugação ocorre a separação do plasma pobre em plaquetas dos eritrócitos e da crosta de coágulo (plaquetas e leucócitos), devido a variação das densidades (MACEDO, 2004). A camada superior, coloração amarelada, contém plasma rico em plaquetas, já a camada inferior, de coloração vermelha, contém os eritrócitos (COSTA, P. A. Da;

SANTOS, 2016), enquanto os leucócitos se localizam em uma zona intermediária (ALEIXO et al., 2017). A zona de nevoa é uma camada esbranquiçada contendo a junção das plaquetas e leucócitos (ALEIXO et al., 2017).

Após o descarte das hemácias o plasma retorna para a segunda centrifugação, o que leva a precipitação das plaquetas e das poucas hemácias restantes no fundo do tubo, em seguida a parte superior do plasma (plasma pobre em plaquetas) é descartado e o botão plaquetário do fundo do tubo é ressuspensionado no restante do plasma dando origem ao PRP (ALEIXO et al., 2017). Ou seja, o concentrado de plaquetas está localizado na porção inferior do tudo e corresponde a aproximadamente 20% do volume, sendo 80% do sobrenadante considerado plasma pobre em plaquetas (COSTA, P. A. Da; SANTOS, 2016).

Faz-se então a contagem plaquetária para avaliar a eficiência do protocolo de obtenção do PRP, o que, de acordo com a literatura deve ser de três a cinco vezes maior que a contagem inicial (COSTA, P. A. Da; SANTOS, 2016). Antes da adição do PRP na área de implante é necessária a adição de um fator coagulante, geralmente utiliza-se a trombina bovina a 100 Uml<sup>-1</sup> combinada ao cloridrato de cálcio a 10% (PAGLIOSA; ALVES, 2007). Essa combinação tem a função de formar uma rede de fibrina incorporada ao PRP capaz de permitir sua aderência ao local do implante e impedir a migração de células epiteliais e do tecido conjuntivo para fora da região de enxerto (PAGLIOSA; ALVES, 2007).

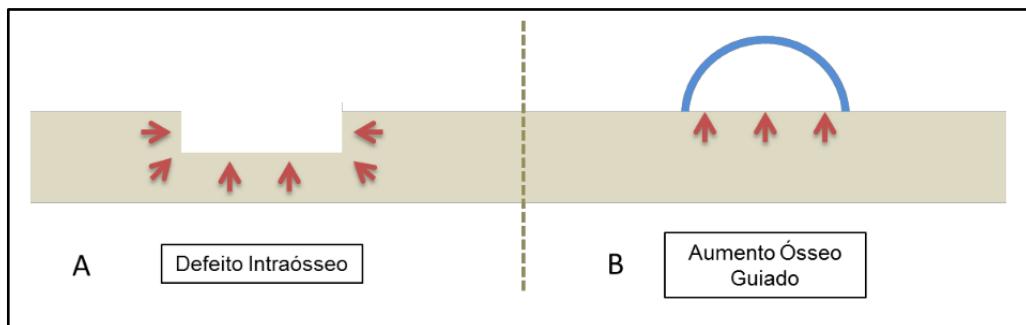
## **2.6 Crescimento guiado**

Atualmente para a realização de estudos e análises comparativas de biomateriais in vivo existem diversas metodologias utilizadas, tais como crescimento ósseo ectópico, preenchimento de defeito intraósseo e de tamanho crítico e também o crescimento ósseo guiado (KUCI, 2017). Sendo que cada método possui características próprias levando ao fornecimento de respostas diferentes e específicas do comportamento e desempenho do biomaterial (LEVANDOWSKI JUNIOR, 2014).

O crescimento ósseo guiado tem por objetivo criar um novo osso em um local onde não há tecido ósseo previamente, ou seja, trata-se de um crescimento ósseo exoesquelético (KUCI, 2017), como demonstrado na figura 2B. Sendo assim, baseado na criação de um espaço segregado onde ocorre a proliferação de neovascularização e de células osteoprogenitoras, as quais criam uma barreira contra o crescimento de tecidos alheios ao tecido ósseo (VARGAS, 2018). Para a realização desse tipo de crescimento é necessário o uso de dispositivos rígidos e

impermeáveis para estabilizar o biomaterial e promover o isolamento completo dos tecidos adjacentes, dessa forma isolando o biomaterial de qualquer tecido não osteogênico que possa vir a interferir no neocrescimento ósseo (KUCI, 2017).

Figura 2 - Esquema representativo de dois métodos de estudo: (A) defeito intraósseo e (B) aumento ósseo guiado. Notar a utilização de dispositivo sobre a superfície para estabilizar o biomaterial e promover seu isolamento.



Fonte: Adaptado de LEVANDOWSKI JUNIOR, 2014.

A regeneração óssea guiada segue princípios básicos como a exclusão de tecidos e células indesejáveis ao estudo, criação e manutenção do espaço, proteção do coágulo sanguíneo e estabilização dos materiais testados (SCHWARZ et al., 2007). Ao estabilizar o coágulo sanguíneo, os substitutos ósseos guiam um novo osso para a área de aumento (BUSENLECHNER et al., 2008).

Nesse estudo foram utilizadas guias de nylon (n6) para criar uma barreira e estabilizar o biomaterial, as guias têm o objetivo de isolar a interação entre o defeito ósseo criado na calvária e o espaço interno da guia. O crescimento guiado foi utilizado previamente com sucesso por Levandowski Junior (2014), Colombo (2016), Kuci, 2017 e Vargas (2018), porém as guias sendo fabricados com diferentes materiais.

## 2.7 Histomorfometria Óssea

Segundo KULAK; DEMPSTER (2010), a histomorfometria é uma avaliação histológica de uma região óssea calcificada com o objetivo de avaliar a remodelação estática e dinâmica além da estruturação óssea, ou seja, ela quantifica o processo de formação e reabsorção óssea (VARGAS, 2018).

A histomorfometria é tradicionalmente avaliada em duas dimensões por meio da histologia, onde os parâmetros estruturais e de remodelação são medidos em seções. Essas

medidas são feitas em microscópios e as variações avaliadas são área, perímetro e espessura (KULAK; DEMPSTER, 2010). Sendo os parâmetros divididos em duas categorias: estrutura, a qual fornece informações precisas sobre a massa óssea e remodelamento, onde é possível averiguar a quantidade de osso não mineralizado (osteóide) e a extensão da cavidade de absorção (KULAK; DEMPSTER, 2010). Sendo assim a histomorfometria é um método diagnóstico acurado (VARGAS, 2018).

### 3 Objetivos

#### **3.1 Objetivos gerais**

Este trabalho teve por objetivo a avaliação comparativa da neoformação óssea dos biomateriais hidroxiapatita (HA) e Fosfato tricálcico- $\beta$  (TCP- $\beta$ ) acrescidos de plasma rico em plaquetas ativado e não ativado.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Comparar em diferentes períodos de observação (60 e 90 dias) se o PRP apresenta a capacidade de acelerar a neoformação óssea, osteointegração e osteocondução dos biomateriais, hidroxiapatita (HA) e Fosfato tricálcico- $\beta$  (TCP- $\beta$ ).

Verificar qual dos biomateriais estudados, hidroxiapatita (HA) e Fosfato tricálcico- $\beta$  (TCP- $\beta$ ), apresenta melhor qualidade de tecido ósseo obtido através de microscopia óptica e histomorfometria.

## 4 Materiais e Métodos

Este estudo foi encaminhado ao Comitê de Ética e Experimentação Animal (CETEA) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), conduzido conforme as normas do COBEA e obteve aprovação sob o protocolo de número 5976070519.

### 4.1 Biomateriais estudados

Nesse estudo foram avaliados dois tipos de 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) e Fosfato Tricálcico Beta (TCP- $\beta$ ) (tabela 2). Os biomateriais utilizados nesse estudo apresentavam-se como morfologia de grânulos nanoestruturados sinterizados a temperatura de 1100°C durante 2 horas. A caracterização morfológica e microestrutural destes biomateriais foi realizada em colaboração com o Grupo do CCT/UDESC, através de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

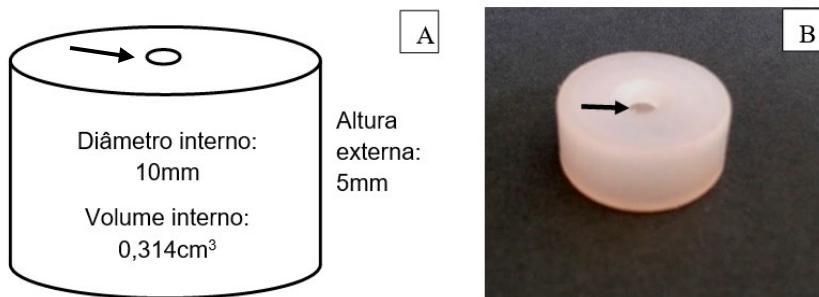
Tabela 2 - Biomateriais utilizados e sua composição química.

Biomaterial	Forma	Composição química
Hidroxiapatita (HA)	Grânulos	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
Fosfato tricálcico $\beta$ (TCP- $\beta$ )	Grânulos	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

Fonte: Produção do Grupo de Pesquisa em Biomateriais, UDESC.

A implantação dos biomateriais, associados ao PRP ativado ou não, nas calvárias foi feita através de um dispositivo de crescimento ósseo guiado, feito em nylon, um polímero termoplástico dúctil, com boa usinabilidade e propriedades mecânicas. O nylon possui estabilidade química, sendo bioinerte, com baixa molhabilidade em fluidos corpóreos. O dispositivo foi fabricado pelo CCT/UDESC com dimensões de 5 mm de altura e 10 mm de diâmetro interno, tendo então um volume interior com cerca de 0,314 cm<sup>3</sup> (Figura 3).

Figura 3 - (A) Desenho representativo do dispositivo de nylon que foi elaborado com as dimensões de 5 mm de altura e 10 mm de diâmetro interno, formando um volume interior de sua cúpula de aproximadamente  $0,314 \text{ cm}^3$ . (B) Guia de crescimento de nylon. Notar o orifício central (seta preta) por onde o parafuso cortical é introduzido, fixando a guia na calvária dos animais



Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC/CCT-Joinville.

#### 4.2 Plasma Rico em Plaquetas

A obtenção do plasma rico em plaquetas foi feita através da técnica adaptada de Vendramin et al (2006), com o processamento das amostras de sangue total imediatamente após a coleta de 3 ml (em seringa de 3ml com agulha hipodérmica 25x7mm) proveniente da artéria auricular. Esse volume foi armazenado em tubos com citrato de sódio como anticoagulante. A contagem das plaquetas foi feita manualmente em câmara de Neubauer para obtenção das quantidades basais.

Em seguida a amostra foi submetida a primeira centrifugação de 1000 rpm/min durante 10 minutos. O sobrenadante do plasma foi então separado e armazenado em tubos Falcon, sendo novamente submetido centrifugação, dessa vez de 500 rpm/min durante 10 min. O sobrenadante pobre em plaquetas foi descartado, restando cerca de 1 mL do plasma rico em plaquetas, foi realizada então a segunda contagem manual por câmara de Neubauer, com a contagem relativa na tabela 3.

Tabela 3 - Dados das contagens das plaquetas basais e contagem de plaquetas do plasma rico em plaquetas de cada unidade experimental (continua).

<b>Coelho</b>	<b>Plaquetas basal (x103/µL)</b>	<b>Plasma rico em plaquetas (x103/µL)</b>
<b>1</b>	249	757
<b>2</b>	240	480
<b>3</b>	195	828
<b>4</b>	227	1020
<b>5</b>	250	580
<b>6</b>	328	700
<b>7</b>	222	715
<b>8</b>	290	590
<b>9</b>	190	409
<b>10</b>	220	660
<b>11</b>	212	482
<b>12</b>	111	330
<b>13</b>	181	267
<b>14</b>	240	650
<b>15</b>	171	460
<b>16</b>	277	450
<b>Média</b>	<b>225,19</b>	<b>586,13</b>

Fonte: Produção pessoal

Dentro de cada grupo (90 e 60 dias) foi realizada uma subdivisão, onde 4 dos 8 animais receberam o biomaterial (tanto HA quanto TCP-  $\beta$ ) com PRP adicionado de gluconato de cálcio a 10 % (PRP ativado) e 4 animais receberam o biomaterial com PRP sem adição de gluconato (PRP não ativado). A adição de gluconato de cálcio a 10 % foi realizada na proporção de 400 $\mu$ L de gluconato para cada 1000 $\mu$ L de plasma.

#### **4.3 Unidade Experimental, Manejo e Cuidados**

Nesse estudo foram utilizados 16 coelhos machos, inteiros, linhagem Nova Zelândia, com idade aproximada de 10 meses e peso médio de 3,6 Kg. Os animais chegaram cerca de 15 dias antes do início do estudo para ambientalização e aclimatação, nesse período sua saúde foi verificada e todos foram desverminados. 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. As gaiolas estavam suspensas a 60

cm do chão (Figura 4), coberto por maravalha, em uma mesma sala com luz e temperatura ambiente.

Figura 4 – Gaiolas próprias para criação de coelhos suspensas a 60 cm do chão por estrados de madeira, os animais foram mantidos em uma mesma sala com luz e temperatura ambiente.



Fonte: Produção pessoal.

A alimentação foi feita através de ração peletizada apropriada e vegetais duas vezes ao dia, a água foi fornecida ad libitum. A medicação antiparasitária aplicada foi a base de ivermectina 1%, na dose de 0,4 mg/Kg, por via subcutânea (SC). Os animais foram separados aleatoriamente em dois grupos de 8 animais cada, sendo um grupo caracterizado em 60 dias e outro em 90 dias de avaliação pós-operatória. Tanto o grupo 60 quanto 90, receberam os mesmos biomateriais, Hidroxiapatita (HA) e Fosfato Tricálcico Beta (TCP- $\beta$ ), entretanto 4 animais de cada grupo receberam PRP ativado (em gel) adicionado ao biomaterial e 4 animais receberam PRP não ativado (líquido) adicionado ao biomaterial (tabela 5).

Tabela 4 - Esquema das unidades experimentais e seus tratamentos.

<b>Grupo</b>	<b>Total Animais</b>	<b>Subgrupo</b>
Grupo 60 dias	8 animais	4 PRP ativado (Gel)
		4 PRP não ativado (Líquido)
Grupo 90 dias	8 animais	4 PRP ativado (Gel)
		4 PRP não ativado (Líquido)

Fonte: Produção pessoal

#### **4.4 Pré-operatório e Anestesia:**

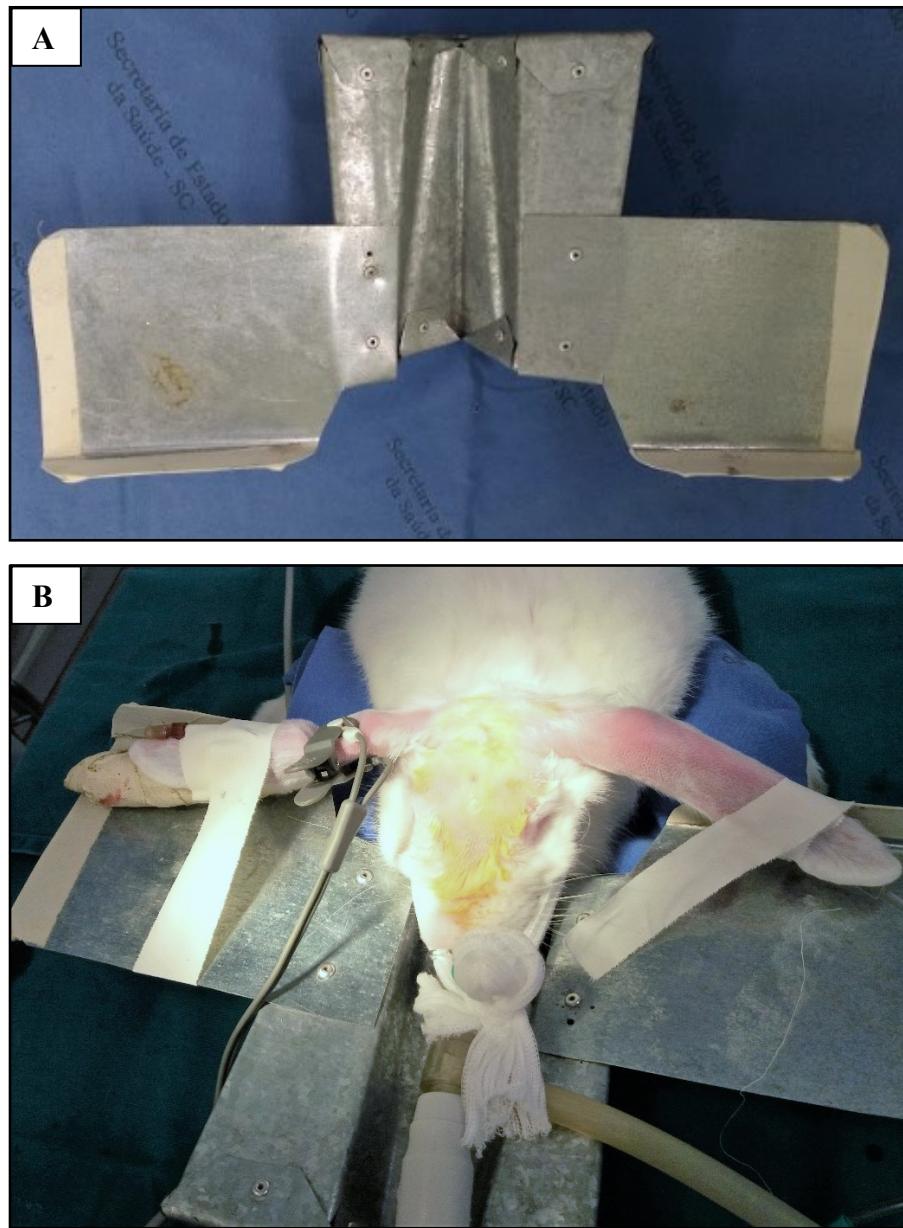
A tricotomia dos animais foi realizada previamente abrangendo a porção dorsal do crânio, estendendo-se das orelhas até o processo supraorbital rostral. Os limites laterais foram margeados nas pálpebras superiores. Também foi realizada a tricotomia das orelhas para acessos venoso e arterial. Os animais foram submetidos somente a jejum sólido de 4 horas, uma vez que o jejum hídrico não apresenta relevância para a espécie.

A medicação pré-anestésica (MPA) foi aplicada cerca de 30 minutos antes da indução, em ambiente silencioso, onde o animal foi mantido até a indução. A MPA foi composta da associação de cloridrato de cetamina (Cetamin®, Syntec, Santana de Panaíba/SP, Brasil) na dose de 10 mg/kg, midazolan (medicamento genérico, Hipolabor, Sabará/MG) na dose de 2 mg/kg e sulfato de morfina (Dimorf®, Cristália, Itapira/SP, Brasil) na dose de 0,5 mg/Kg. A aplicação foi realizada por via intramuscular (IM). Foi realizado acesso venoso com catéter 24 G na veia auricular periférica como via de administração de fluidoterapia e fármacos.

Para a indução anestésica foi utilizado isoflurano (medicamento genérico, BioChimico, Rio de Janeiro/RJ, Brasil) através de máscara cirúrgica, após relaxamento foi realizada a abertura da boca do animal, borrifando-se na região da glote cloridrato de lidocaína 100 mg/ml (medicamento genérico, Hipolabor, Sabará/MG, Brasil), em spray, para em seguida ser realizada a introdução da máscara laríngea (V-Gel®, DocsInnovent Ltda, London/UK) de tamanhos R3 ou R4, dependendo da compatibilidade com o tamanho do animal. A máscara laríngea foi utilizada para manutenção da anestesia inalatória com isoflurano a 1 CAM diluído em oxigênio a 100% em vaporizador calibrado, com fluxo variando entre 200-300 ml/Kg/min.

O animal foi então posicionado em decúbito esternal com a cabeça apoiada sobre uma calha especial (figura 5), e em seguida foi feita a coleta de sangue na artéria auricular para o desenvolvimento do PRP. Em seguida foi infiltrado, na linha de incisão, via subcutânea, cloridrato de lidocaína 2% (medicamento genérico, Hypofarma, Ribeirão das Neves/MG, Brasil) sem vaso constrictor, na dose de 7 mg/kg.

Figura 5 – (A) Calha especial criada por Dallabrida (2016) para o posicionamento ideal da cabeça dos coelhos durante procedimento cirúrgico. (B) Posicionamento do animal sobre a calha, com acesso para coleta de sangue na orelha direita, acesso para fluidoterapia na orelha esquerda, oxímetro de pulso na orelha direita e utilização da máscara laríngea.



Fonte: Produção pessoal

Os animais também receberam, antes do início do procedimento cirúrgico, antibiótico, via intravenosa (IV), enrofloxacino (Chemitril® 2,5%, Chemitec, São Paulo/SP, Brasil) na dose de 5 mg/kg.

#### 4.5 Procedimento Cirúrgico

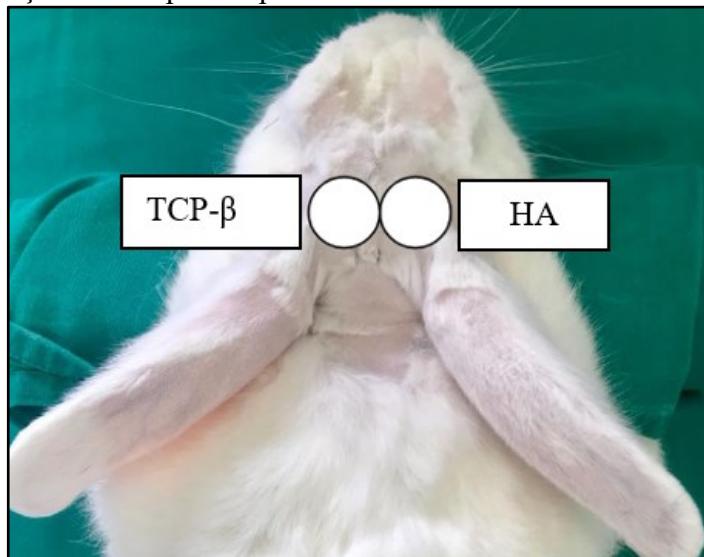
Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados pelo mesmo cirurgião, com os animais posicionados em decúbito esternal com a cabeça apoiada ventralmente sobre uma calha metálica. A antisepsia local foi baseada no protocolo álcool 70%- iodopovidona- álcool 70%. Após posicionamento do campo cirúrgico a incisão longitudinal era realizada em sentido rostrocaudal com cerca de 5 cm, na crista sagital, com lâmina de bisturi número 24. Após o periósteo foi incisado e lateralizado com auxílio de elevador periosteal (figura 6), expondo totalmente a região óssea da calvária. A disposição das guias de nylon era semelhante em todos os animais, sendo dividida a calvária, subjetivamente, em dois quadrantes longitudinais e aplicando-se uma guia de cada lado. Em todos os animais o quadrante direito recebeu hidroxiapatita e o quadrante esquerdo recebeu fosfato tricálcico beta (Figura 7).

Figura 6 - Periósteo sendo lateralizado, com auxílio de elevador de periósteo, após incisão expondo totalmente a região óssea da calvária.



Fonte: Produção pessoal.

Figura 7 - Imagem demonstrando a ordem da disposição dos tratamentos, lado direito com a aplicação da campânula preenchida com biomaterial hidroxiapatita e lado esquerdo com a aplicação da campânula preenchida de fosfato tricálcico beta.

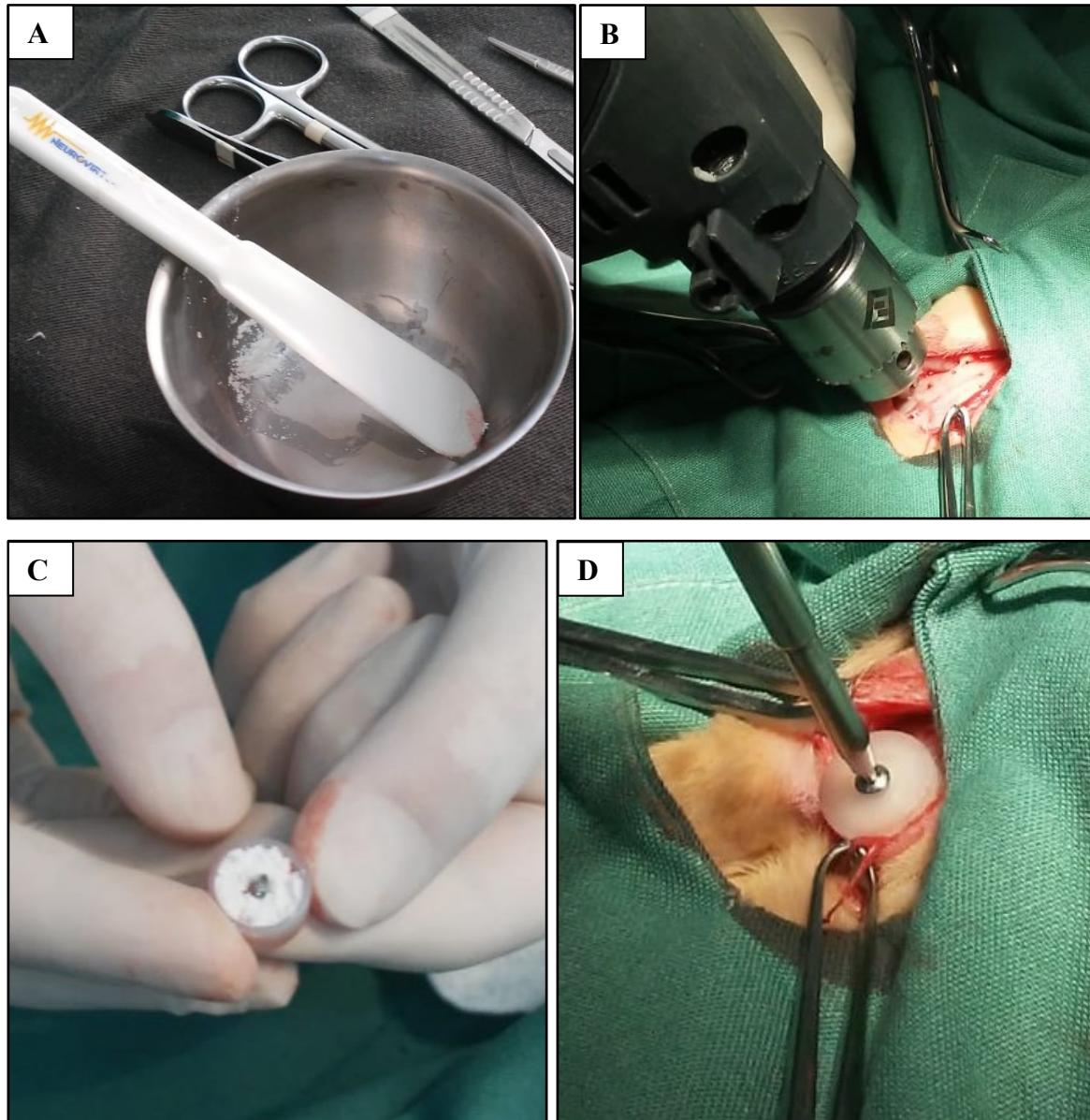


Fonte: Produção pessoal

No grupo 60 dias os animais 1, 2, 3 e 4 receberam a composição de biomaterial mais PRP ativado, sendo devidamente identificados, já os animais 5, 6, 7 e 8 receberam o biomaterial adicionado de PRP não ativado. Já no grupo 90 dias os animais 9, 10, 11 e 12 receberam a composição biomaterial mais PRP ativado e os animais 13, 14, 15 e 16 receberam o biomaterial adicionado de PRP não ativado. O biomaterial foi colocado, em pequenas porções, em cuba rim individual, onde em seguida foi adicionado o PRP. Essa união formava uma espécie de massa a qual era depositada nas campânulas (Figura 8).

A fixação das guias foi realizada através de perfurações corticais da calvária com broca ortopédica de 1,5 mm, seguida da introdução de parafusos corticais sextavados não bloqueados de 2.0 mm X 10 mm de comprimento, os quais foram fixados a cortical óssea com auxílio de chave hexagonal, fixando-se assim a guia de nylon a calvária (figura 8). Após a implantação procedeu-se a sutura dos tecidos moles com náilon monofilamentar 3-0 em padrão Wolf, com dermorrafia realizada também com náilon mono filamento 3-0 em padrão Wolf.

Figura 8 – Imagem demonstrando: (A) Cuba rim onde o biomaterial foi adicionado de PRP; (B) Perfuração cortical da calvária com broca ortopédica; (C) Biomaterial adicionado de plasma rico em plaqueta na campânula, notar a presença do parafuso sextavado; (D) Fixação dos parafusos corticais sextavados não bloqueados na cortical óssea.



Fonte: Produção pessoal

#### 4.6 Pós-Operatório

Ao final do procedimento os animais receberam dipirona sódica (D-500, Zoetis, Campinas/SP, Brasil) na dose de 25 mg/Kg, duas vezes ao dia por via subcutânea, meloxicam 0,2% (Maxican®, Ouro Fino, Cravinhos/SP, Brasil) na dose de 2 mg/kg, uma vez ao dia por

via subcutânea, e enrofloxacino 2,5% (Chemitril® 2,5%, Chemitec, São Paulo/SP, Brasil) na dose de 5 mg/Kg, duas vezes ao dia por via intramuscular, nos três dias subsequentes.

As feridas cirúrgicas foram avaliadas quanto a edema, contaminação hipertermia ou deiscência de suturas nos 10 dias após o procedimento, além disso os animais foram avaliados quanto a qualquer sintoma neurológico. A limpeza era realizada com solução de cloreto de sódio 0,9 % duas vezes ao dia. Durante todo o estudo os animais foram avaliados para qualquer tipo de alteração fisiológica ou comportamento que pudesse sugerir a necessidade de descarte ou substituição da amostra.

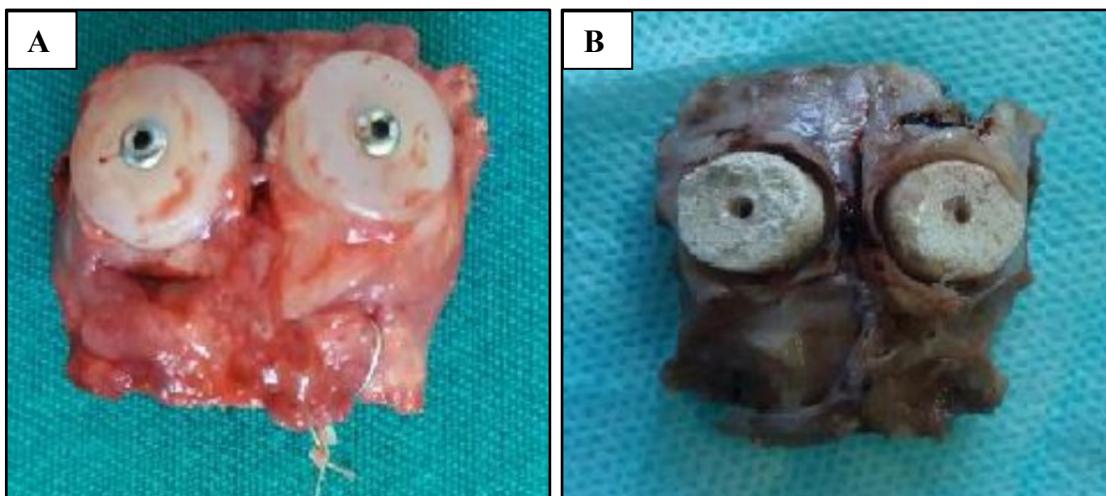
#### **4.7 Coleta das amostras**

Após o período experimental de cada grupo (60 e 90 dias) os animais foram submetidos a eutanásia para a realização da coleta das calvárias. A eutanásia ocorreu conforme a resolução nº 13 de 20 de setembro de 2013 do Conselho Nacional de Controle e Experimentação animal (CONCEA).

Para a eutanásia os animais receberam a medicação pré-anestésica com a associação de cetamina (Cetamin®, Syntec, Santana de Parnaíba/SP, Brasil) na dose de 20 mg/Kg e midazolan (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) na dose de 5 mg/Kg por via Intravenosa. Após atingir o plano anestésico adequado os animais receberam 10 mL de cloreto de potássio 19,1% (medicamento genérico, Hequiplex, Aparecida de Goiânia/GO, Brasil) por via intravenosa até completa parada cardiorrespiratória, confirmada através de auscultação por estetoscópio.

Para a obtenção das calvárias o procedimento foi similar ao procedimento cirúrgico. Inicialmente foi realizada a incisão de pele no mesmo local, com rebatimento das estruturas de tecidos moles. A secção das calvárias foi realizada com auxílio de um disco serrilhado acoplado a motor elétrico, retirando-se assim a porção do tecido ósseo craniano contendo as amostras (Figura 9). O armazenamento se deu em frascos plásticos individuais, devidamente identificados, contendo solução de formaldeído tamponado a 10 % durante 7 dias. Ocorreu então a retirada das guias de nylon e parafusos e divisão das calvárias em duas partes com auxílio de um disco serrilhado acoplado a um motor elétrico. Sendo novamente armazenado em frascos individuais com formaldeído tamponado a 10 % por mais 7 dias. Após esse período as amostras foram encaminhadas para análise histológica e histomorfométrica.

Figura 9 – (A) Porção do tecido ósseo craniano contendo as amostras, notar a presença das campânulas e parafusos; (B) Porção do tecido ósseo craniano contendo as amostras, já sem as campânulas e parafusos, ao final do tempo de conservação em folmaldeído tamponado a 10%.



#### 4.8 Avaliação Histológica

Para a avaliação histológica o processamento e análise foi realizado no Laboratório de Patologia Animal do CAV/UDESC- Lages/SC, sob coordenação do professor doutor Aldo Gava. Para isso as amostras foram descalcificadas em ácido nítrico a 15% por um período de 7 dias seguido de processamento histotécnico. Em seguida as amostras foram submetidas a desidratação com álcool, diafanização com xilol e introduzidas em cera de parafina. Esses blocos de parafina foram, então, seccionados através de micrótomo a uma espessura de 3 µm.

As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina de Harris para serem, por fim, analisadas por microscopia óptica (MO). A avaliação das lâminas foi realizada por um histologista cego aos tratamentos. O critério de avaliação, adaptado de VALIATI et al. (2012), foi baseado em atribuição da quantidade dos tipos celulares encontrados em cruzes, como demonstrado na tabela 6.

Avaliou-se neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoblastos (PO), biomaterial remanescente (BR), presença de formação de tecido mielóide (FTM), presença de neoformação de tecido ósseo (NTO), proporção de osso primário (OP) e neoformação vascular (NFV). Foi associado a ausência do parâmetro a marcação com nenhuma cruz, uma cruz para pouca quantidade, duas cruzes para quantidade moderada, três cruzes para quantidade acentuada.

Tabela 5 - Modelo de critérios de avaliação histológica baseado em atribuição de cruzes para quantificação de biomaterial remanescente (BR), neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), osso primário (OP), presença de osteoblastos (POT), formação de tecido mieloide (FTM), presença de macrófagos (MA) e neoformação vascular (NFV).

	<b>BR</b>	<b>NTO</b>	<b>DFC</b>	<b>OP</b>	<b>POT</b>	<b>FTM</b>	<b>MA</b>	<b>NFV</b>
<b>Ausência</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Leve</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Moderada</b>	++	++	++	++	++	++	++	++
<b>Acentuada</b>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Fonte: Adaptado de VALIATI et al. (2012).

#### 4.9 Avaliação Histomorfométrica

Após o corte das amostras para a avaliação por microscopia óptica os blocos foram enviados para o LABOPAVE/UFSC (Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Catarina) em Curitibanos/SC aos cuidados do professor doutor Adriano Tony Ramos.

As amostras foram seccionadas através de micrótomo na espessura de 3µm e coradas em Picrosírius. Foram então obtidas imagens fotográficas de cinco campos diferentes das amostras, com o mesmo aumento (10X), utilizando um microscópio óptico (Leica, modelo DM 500) com câmera fotográfica acoplada (Leica ICC 50 HD), conectada a um computador através de cabo USB. As imagens foram obtidas através de software específico (Leica Application Suite versão 3.0.0, 2013).

A avaliação foi feita por um avaliador cego aos tratamentos. Após calibração estabeleceu-se então o padrão azul para o tecido conjuntivo fibroso, pois a coloração Picrosírius é seletiva de tecido conjuntivo permitindo a diferenciação entre as fibras de colágenos tipos I e III, e vermelho para o tecido ósseo. Após calibragem o programa analisou a função “Macro” estabelecendo valores em pixel das áreas averiguadas, criando uma tabela.

## 5 Resultados

Os procedimentos cirúrgicos ocorreram sem nenhuma complicações, sendo classificado como de fácil aplicação. Nenhum animal teve complicações relacionadas ao procedimento, tendo sido avaliados diariamente. Não houve alterações comportamentais, todos alimentaram-se normalmente e não houve alterações neurológicas em nenhum animal.

Durante os procedimentos de eutanásia notou-se, macroscopicamente, que as amostras apresentavam uma boa integração dos biomateriais ao leito receptor, isso em ambos os grupos. Também pode-se observar que durante a remoção das calvárias, em todas as amostras, os parafusos ultrapassaram o limite interno da cortical óssea lesionando assim as meninges e o cérebro. Porém nenhum animal apresentou alterações fisiológicas, comportamentais ou neurológicas decorrentes do parafuso ultrapassar a cortical óssea.

### **5.1 Hidroxiapatita acrescido de PRP ativado**

#### **5.1.1 Grupo 60 dias**

Ao ser avaliado histologicamente o grupo HA + PRP ativado, aos 60 dias, apresentou neoformação de tecido ósseo moderada, sendo esse crescimento apenas de tecido ósseo primário (figura 10). Não observou-se osteoclastos, porém apresentou uma discreta quantidade de osteoblastos caracterizados por células redondas com reticulo citoplasmático abundante.

A neoformação óssea teve maior formação próximo ao osso da calvária, sendo abundante na base e diminuindo quando segue em direção ao ápice da campânula. No ápice, ou seja, mais afastado da calvária observou-se células alongadas com núcleos alongados ou ovoides, caracterizando as células osteoprogenitoras (Figura 10).

O biomaterial manteve-se presente em quantidade moderada. Em meio a neoformação óssea observou-se a proliferação de tecido mieloide moderado (medula óssea) caracterizada por adipócitos medulares e progenitores de células sanguíneas. Na Figura 10A, pode-se observar tecido hematopoiético junto aos adipócitos.

A neoformação vascular foi classificada como moderada. Apresenta-se na forma de uma camada de células endoteliais em forma de tubo de pequeno calibre com células sanguíneas no interior.

Pode se observar na imagem histomorfométrica (figura 12) a presença da calvária, caracterizado pela coloração verde entremeada de pouca coloração vermelha, verifica-se a presença de fibras colágenas organizadas em lamelas, paralelas umas às outras, e sua disposição em camadas concêntricas em torno dos canais com vasos (sistema de Havers).

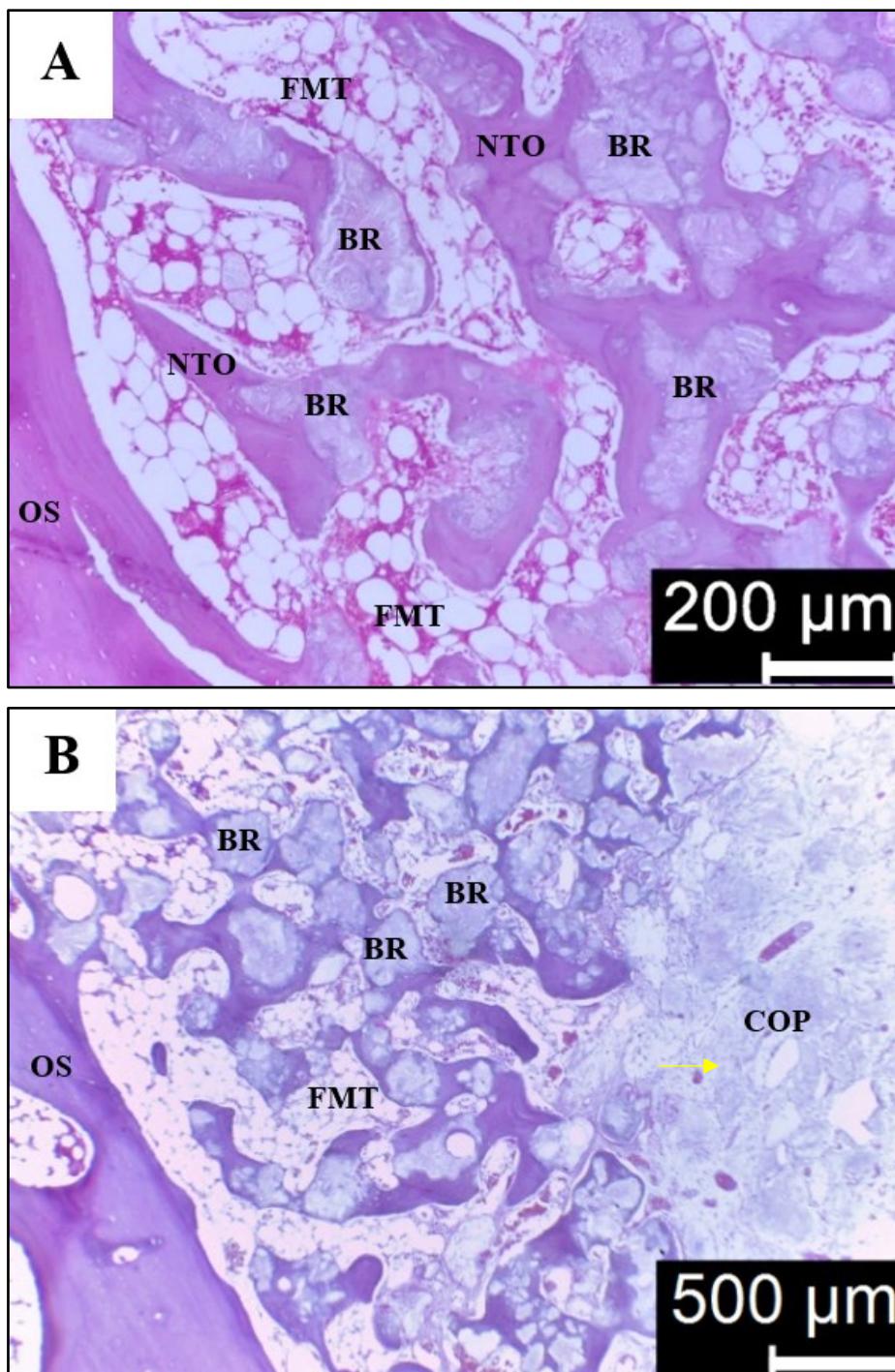
A tabela 7 apresenta os resultados da avaliação histológica obtida nas análises das amostras.

Tabela 6 - Resultados obtidos através da análise histológica de HA + PRP ativado, com evolução de 60 dias de pós-operatório, quanto a biomaterial remanescente (BR), neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), osso primário (OP), presença de osteoblastos (POT), formação de tecido mieloide (FTM), macrófagos (MA) e neoformação vascular (NFV).

BR	NTO	DFC	OP	POT	FTM	MA	NFV
++	++	++	+++	+	++	-	++

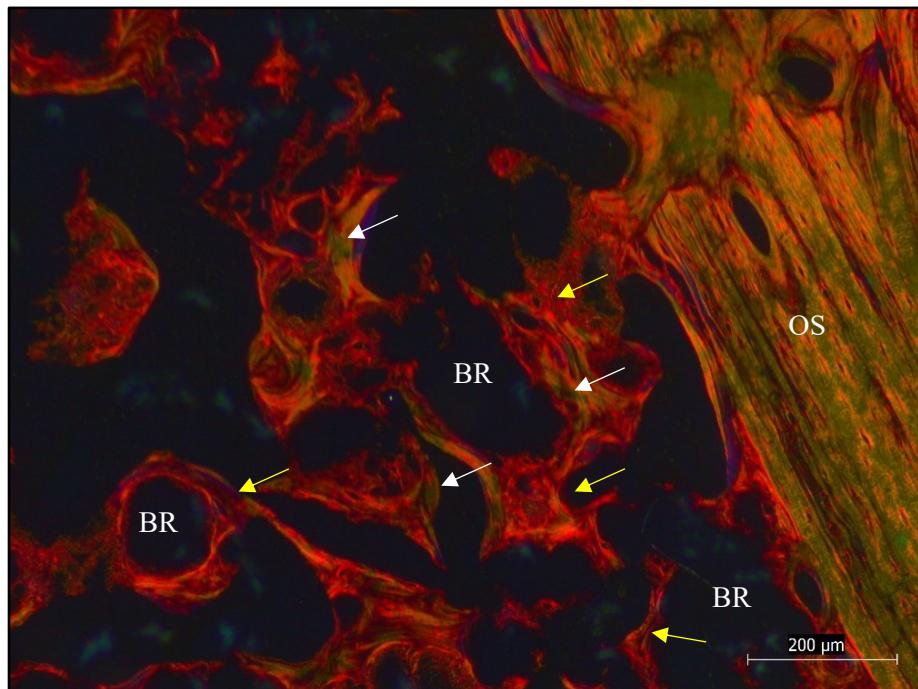
Fonte: Produção pessoal.

Figura 10 - Imagem histológica, para o tratamento HA + PRP ativado no período de evolução de 60 dias, com coloração Hematoxilina/Eosina (HE). A) Biomaterial remanescente (BR); neoformação de tecido ósseo (NTO); osso secundário (calvária) (OS); formação de tecido mieloide (FMT). Notar tecido medular amarelo com presença de células sanguíneas entremeado a neoformação de tecido ósseo e biomaterial remanescente. Aumento 10X. B) Notar, seta amarela, células沿ongadas com núcleos alongados ou ovoides, caracterizando as células osteoprogenitoras (COP). Aumento 4X.



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

Figura 11 - Imagem histomorfométrica para o tratamento HA + PRP ativado com tempo de evolução de 60 dias. Coloração Picosirius. (BR) Biomaterial remanescente (BR), osso secundário (calvária) (OS). Observar a presença de fibras colágenas organizadas em lamelas paralelas umas às outras e sua disposição em camadas concêntricas formando o sistema de Havers. Notar a presença de tecido conjuntivo em coloração vermelha (setas amarelas) e tecido ósseo em coloração verde (setas brancas). Aumento 10X.



Fonte: LABOPAVE - UFSC - Curitibanos- SC

### 5.1.2 Grupo 90 dias

No grupo de 90 dias pode-se observar a neoformação de tecido ósseo moderada, sendo esse crescimento apenas de tecido ósseo primário. Assim como no grupo de 60 dias a neoformação óssea teve sua maior formação próximo ao osso da calvária diminuindo em direção ao ápice da campâula.

Observa-se o biomaterial remanescente em quantidade acentuada. Novamente não observou-se osteoclastos, observando-se apenas uma discreta quantidade de osteoblastos, caracterizada por células redondas com reticulo citoplasmático abundante, as quais encontram-se enfileirados na margem da neoformação óssea como demonstrado na figura 12. Nessa mesma imagem é possível observar osteócitos, caracterizados por células achadas dispersas na neoformação óssea.

Observou-se também a proliferação de tecido mieloide discreta, caracterizada por adipócitos medulares progenitores de células sanguíneas. A neoformação vascular foi classificada como acentuada, apresentando-se na forma de uma camada de células endoteliais em forma de tubo de pequeno calibre com células sanguíneas no interior.

Na imagem histomorfométrica (figura 13) podemos observar a presença de tecido conjuntivo em coloração vermelha e tecido ósseo em coloração verde entremeados por biomaterial remanescente.

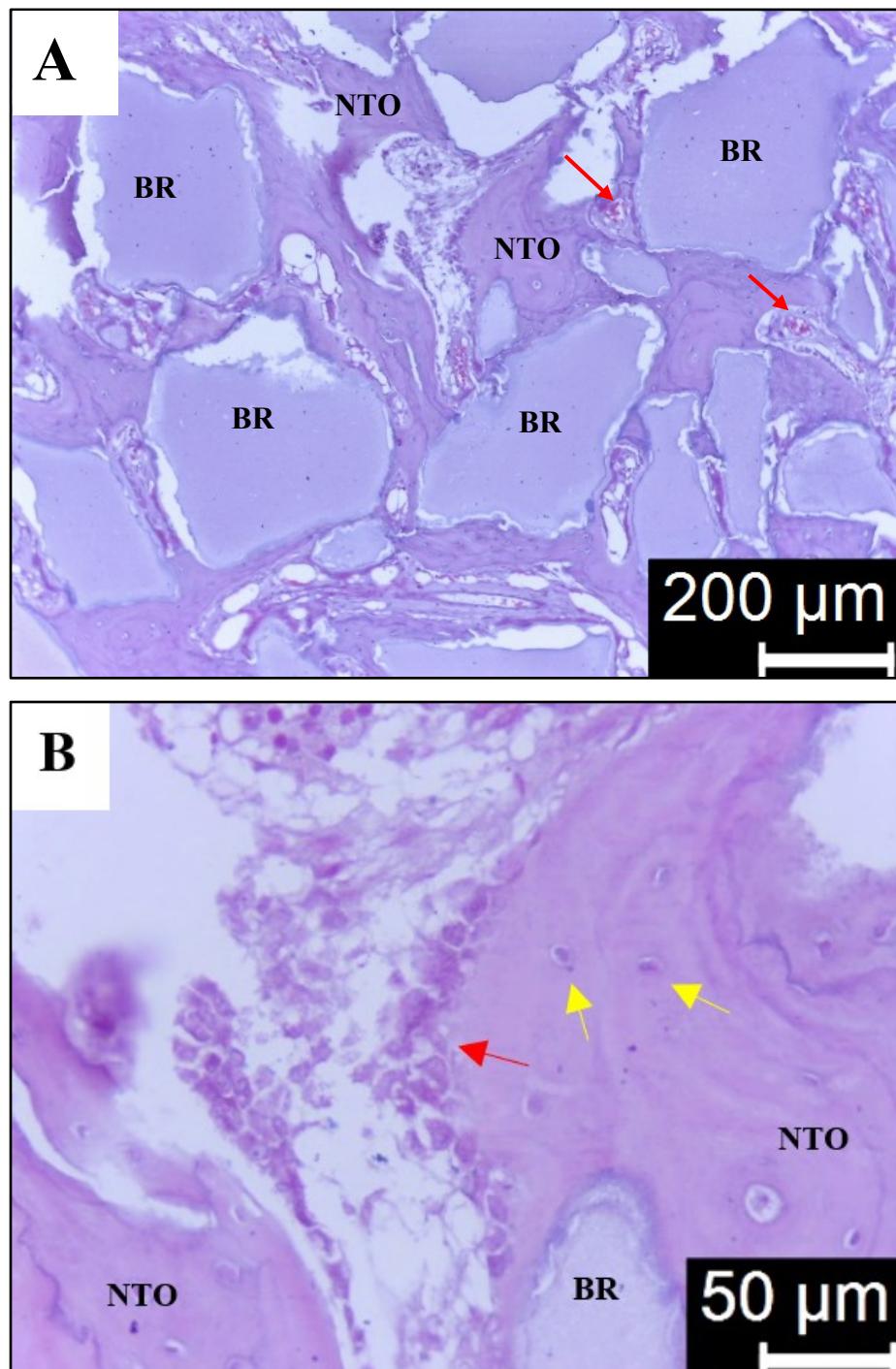
A tabela 8 apresenta os resultados da avaliação histológica obtida nas análises das amostras.

Tabela 7 - Resultados obtidos através da análise histológica de HA + PRP ativado, com evolução de 90 dias de pós-operatório, quanto a biomaterial remanescente (BR), neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), osso primário (OP), presença de osteoblastos (POT), formação de tecido mieloide (FTM), macrófagos (MA) e neoformação vascular (NFV).

BR	NTO	DFC	OP	POT	FTM	MA	NFV
+++	++	++	+++	+	+	-	+++

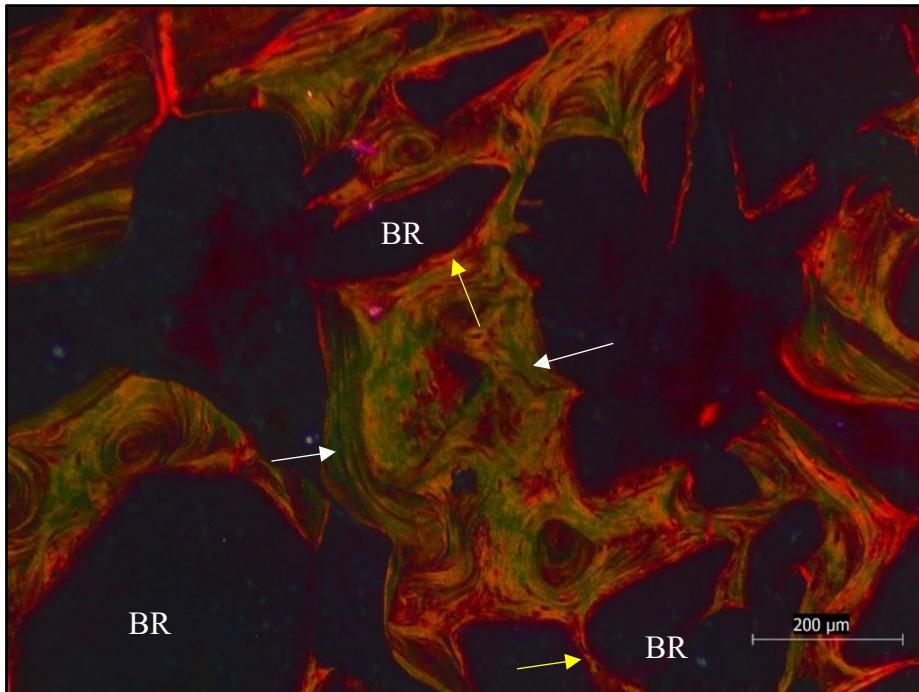
Fonte: Produção pessoal

Figura 12 - Imagem histológica, para o tratamento HA + PRP ativado no período de evolução de 90 dias, com coloração Hematoxilina/Eosina (HE). A) Biomaterial remanescente (BR); neoformação de tecido ósseo (NTO); osso secundário (calvária) (OS). Notar a neoformação vascular evidenciada pelas setas vermelha. Aumento 10X. B) Biomaterial remanescente (BR); neoformação de tecido ósseo (NTO). Notar a os osteócitos, evidenciados pelas setas amarelas e a linha de osteoblastos evidenciados pela seta vermelha. Aumento 40X.



Fonte: Laboratório de Patologia Animal CAV/UDESC- Lages- SC.

Figura 13 - Imagem histomorfométrica para o tratamento HA + PRP ativado com tempo de evolução de 90 dias. Coloração Picrosírius. Biomaterial remanescente (BR); Notar a presença de tecido conjuntivo em coloração vermelha (setas amarelas) e tecido ósseo em coloração verde (setas brancas). Aumento 10X.



Fonte: LABOPAVE - UFSC - Curitibanos- SC

## 5.2 Hidroxiapatita acrescida de PRP não ativado

### 5.2.1 Grupo 60 dias

A HA acrescida de PRP não ativado aos 60 dias apresentou neoformação de tecido ósseo moderada, sendo esse crescimento de tecido ósseo primário. Essa neoformação óssea foi abundante próximo ao osso da calvária diminuindo em direção ao ápice da campânula.

O biomaterial remanescente presente foi classificado como acentuado.

A proliferação de tecido mieloide foi quase inexiste, em apenas uma das amostras observou-se presença de adipócitos medulares e progenitoras de células sanguíneas, como observadas na figura 14. A neoformação vascular foi classificada como moderada, caracterizada na forma de uma camada de células endoteliais em forma de tubo de pequeno calibre com células sanguíneas no interior.

Observou-se apenas em uma das amostras a presença de macrófagos, caracterizado por células com núcleo redondo com material eosinófilo no citoplasma, as quais podem ser observadas na imagem 14.

A partir da imagem histomorfométrica (figura 15) podemos visualizar a presença abundante de tecido conjuntivo em coloração vermelha, já o tecido ósseo teve pouco crescimento (coloração verde), notar o crescimento a partir da calvaria do animal em direção ao ápice da campanula.

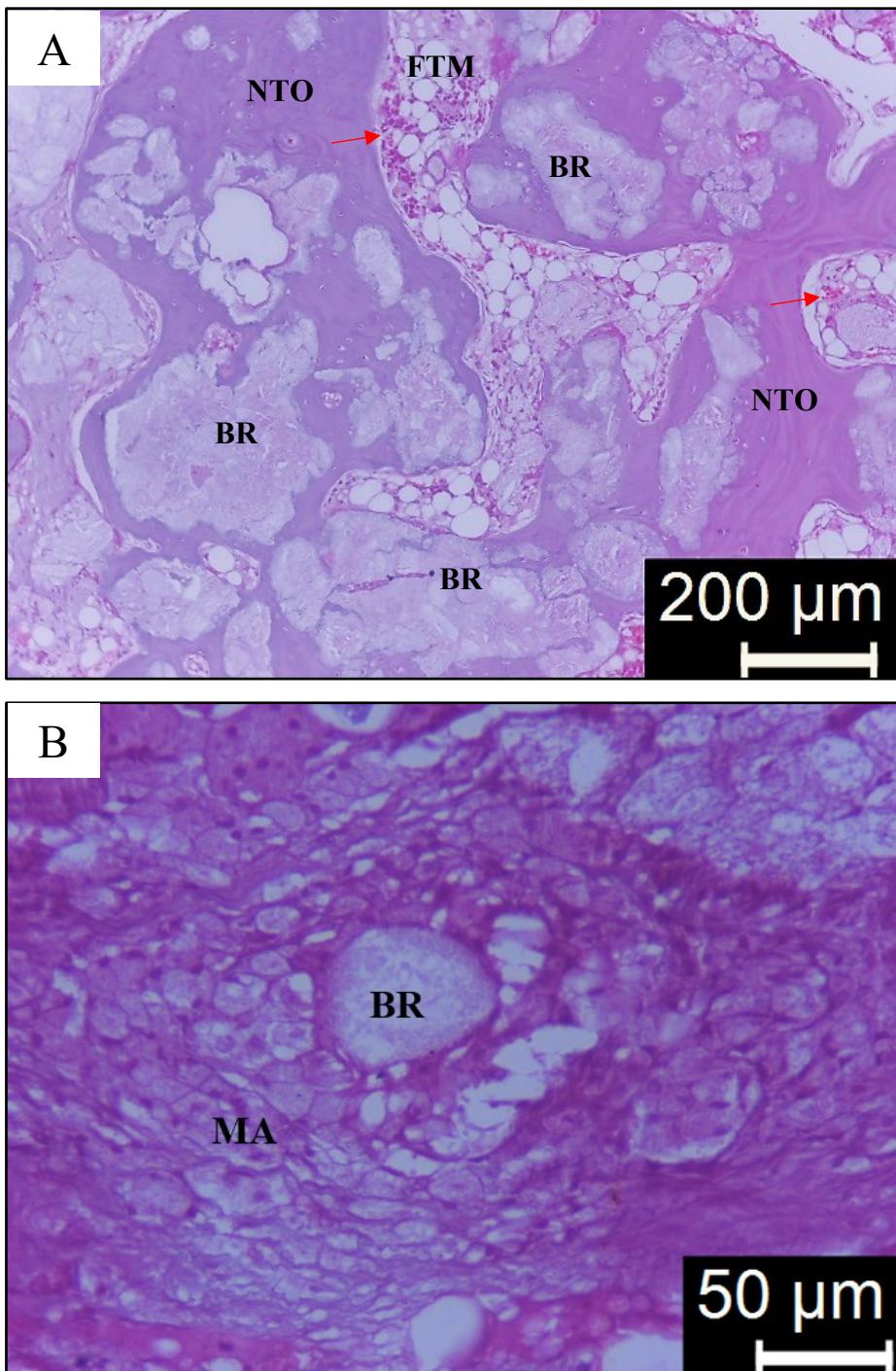
A tabela 9 apresenta os resultados da avaliação histológica obtida nas análises das amostras.

Tabela 8 - Resultados obtidos através da análise histológica de HA + PRP não ativado, com evolução de 60 dias de pós-operatório, quanto a biomaterial remanescente (BR), neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), osso primário (OP), presença de osteoblastos (POT), formação de tecido mieloide (FTM), macrófagos (MA) e neoformação vascular (NFV).

BR	NTO	DFC	OP	POT	FTM	MA	NFV
+++	++	++	+++	+	-	-	++

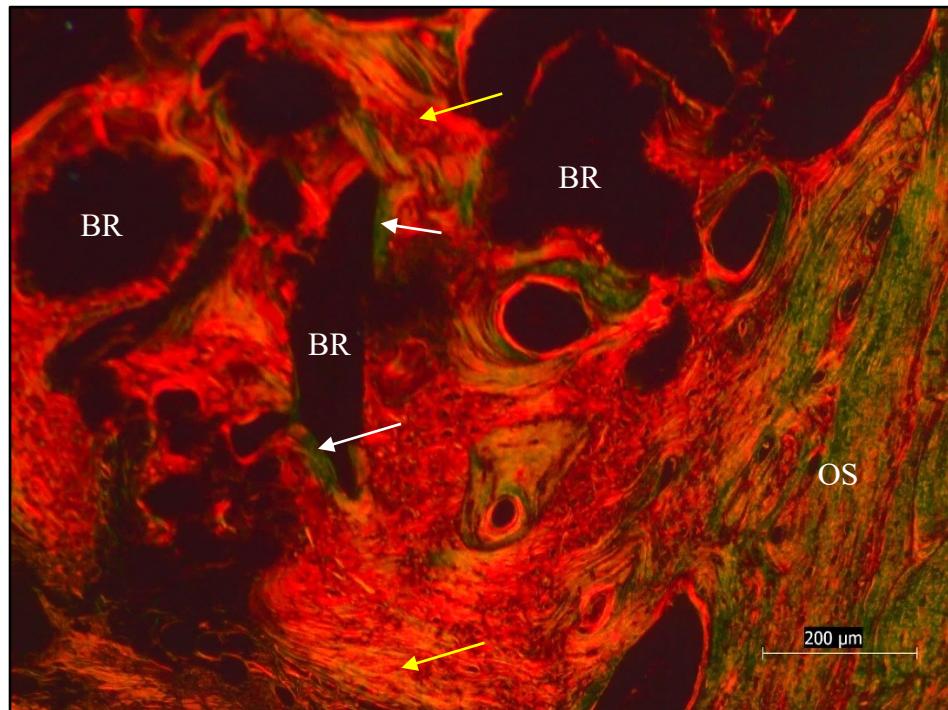
Fonte: Produção pessoal

Figura 14 - Imagem histológica, para o tratamento HA + PRP não ativado no período de evolução de 60 dias, com coloração Hematoxilina/Eosina (HE). (A) Biomaterial remanescente (BR); neoformação de tecido ósseo (NTO); formação de tecido mielóide (FTM). Notar os progenitores de células sanguíneas junto aos adipócitos medulares evidenciadas pelas setas vermelhas. Aumento 10X. B) Biomaterial remanescente (BR); neoformação de tecido ósseo (NTO); Macrófagos (MA). Notar os macrófagos, caracterizadas por células com núcleo redondo, ao redor do biomaterial remanescente. Aumento 40X.



Fonte: Laboratório de Patologia Animal CAV/UDESC- Lages- SC.

Figura 15 - Imagem histomorfométrica para o tratamento HA + PRP não ativado com tempo de evolução de 60 dias. Coloração Picrosírus. Biomaterial remanescente (BR); Tecido ósseo secundário (Calvaria) (OS). Observar o crescimento do tecido conjuntivo a partir da calvaria do animal. Notar a presença de tecido conjuntivo em coloração vermelha (setas amarelas) e tecido ósseo em coloração verde (setas brancas). Aumento 10X.



LABOPAVE - UFSC - Curitibanos- SC

### 5.2.2 Grupo 90 dias

Ao avaliar histologicamente o grupo HA + PRP não ativado, aos 90 dias, observou-se neoformação de tecido ósseo moderado, aonde esse crescimento foi de tecido ósseo primário. Esse crescimento foi abundante próximo ao osso da calvária diminuindo ao ápice da campânula.

Não observou-se osteoclastos assim como nos outros grupos, porém observou-se osteoblastos em quantidade discreta, caracterizada por células redondas com retículo citoplasmático abundante.

O biomaterial remanescente foi classificado como acentuado como mostrado na figura 16.

Não observou-se proliferação de tecido mieloide. E a neoformação vascular foi classificada como acentuada, apresentando-se na forma de uma camada de células endoteliais em forma de tubo de pequeno calibre com células sanguíneas no interior.

Na imagem histomorfométrica (figura 17) podemos observar o crescimento do tecido conjuntivo a partir da calvária do animal, observar a presença de tecido conjuntivo em coloração vermelha e tecido ósseo em coloração verde ao redor do biomaterial remanescente.

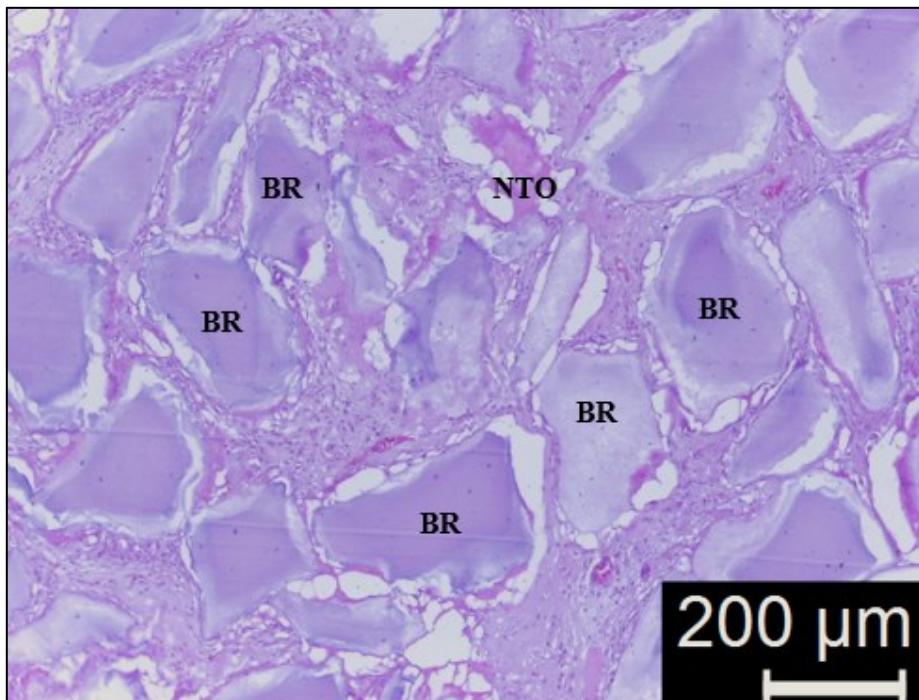
A tabela 10 apresenta os resultados da avaliação histológica obtida nas análises das amostras.

Tabela 9 - Resultados obtidos através da análise histológica de HA + PRP não ativado, com evolução de 90 dias de pós-operatório, quanto a biomaterial remanescente (BR), neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), osso primário (OP), presença de osteoblastos (POT), formação de tecido mieloide (FTM), macrófagos (MA) e neoformação vascular (NFV).

BR	NTO	DFC	OP	POT	FTM	MA	NFV
+++	++	++	+++	+	-	-	+++

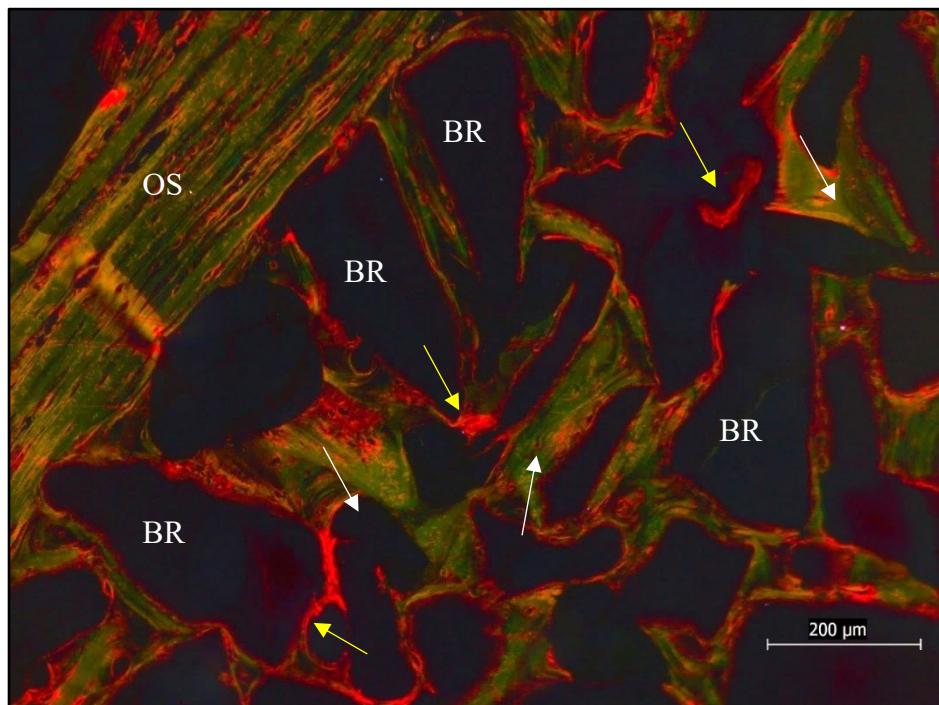
Fonte: Produção pessoal

Figura 16 - Imagem histológica, para o tratamento HA + PRP não ativado no período de evolução de 90 dias, com coloração Hematoxilina/Eosina (HE). Biomaterial remanescente (BR); neoformação de tecido ósseo (NTO). Notar a neoformação de tecido ósseo discreta. Aumento 10X



Fonte: Laboratório de Patologia Animal CAV/UDESC- Lages- SC.

Figura 17 - Imagem histomorfométrica para o tratamento HA + PRP não ativado com tempo de evolução de 90 dias. Coloração Picrosírius. Biomaterial remanescente (BR); Tecido ósseo secundário (Calvária) (OS). Observar o crescimento do tecido conjuntivo a partir da calvária do animal. Notar a presença de tecido conjuntivo em coloração vermelha (setas amarelas) e tecido ósseo em coloração verde (setas brancas). Aumento 10X.



Fonte: LABOPAVE - UFSC - Curitibanos- SC.

### 5.3 Fosfato Tricálcico $\beta$ acrescido de PRP ativado

#### 5.3.1 Grupo 60 dias

Esse tratamento apresentou neoformação de tecido ósseo discreta, sendo esse crescimento de tecido primário. Assim como os demais grupos não observou-se osteoclastos, apresentando uma discreta quantidade de osteoblastos, caracterizados por de células redondas com retículo endoplasmático abundante. A neoformação óssea foi abundante próximo ao osso da calvária, diminuindo em direção ao ápice da campanula, como pode ser observado na figura 18.

O biomaterial manteve-se presente em quantidade acentuada. Nesse grupo não observou-se proliferação de tecido mieloide. Observou-se rara presença de adipócitos medulares próximo a calvária em poucas amostras.

A neoformação vascular foi moderada apresentando-se na forma de tubo de pequeno calibre com uma camada de células endoteliais com células sanguíneas em seu interior (Figura 18). Na histomorfometria (figura 19) podemos notar o crescimento ao redor do biomaterial remanescente

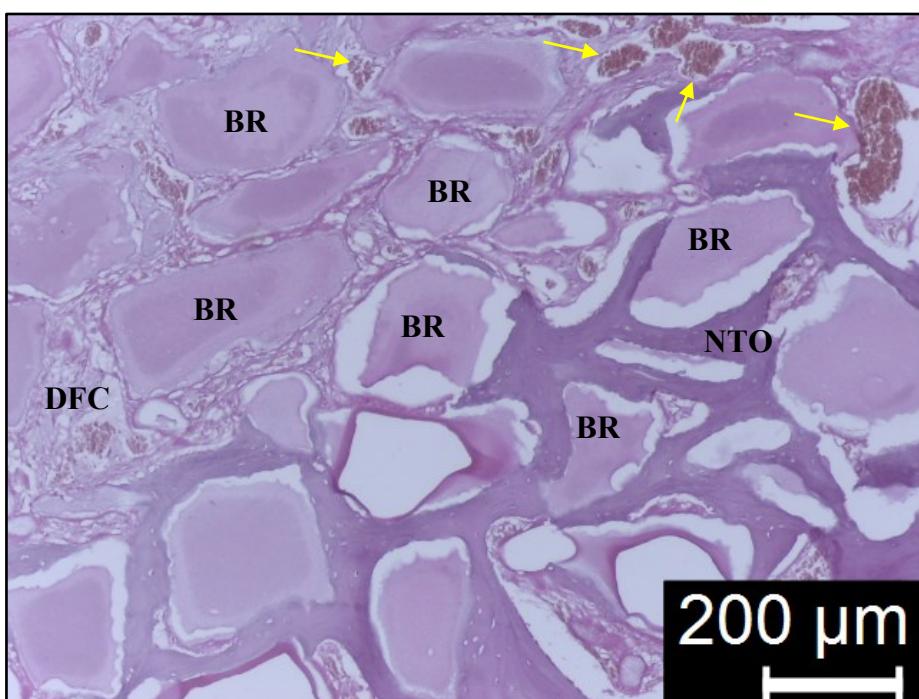
A tabela 11 apresenta os resultados da avaliação histológica obtida nas análises das amostras.

Tabela 10 - Resultados obtidos através da análise histológica de TCP  $\beta$  + PRP ativado, com evolução de 60 dias de pós-operatório, quanto a biomaterial remanescente (BR), neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), osso primário (OP), presença de osteoblastos (POT), formação de tecido mieloide (FTM), macrófagos (MA) e neoformação vascular (NFV).

BR	NTO	DFC	OP	POT	FTM	MA	NFV
+++	+	++	+++	+	-	-	++

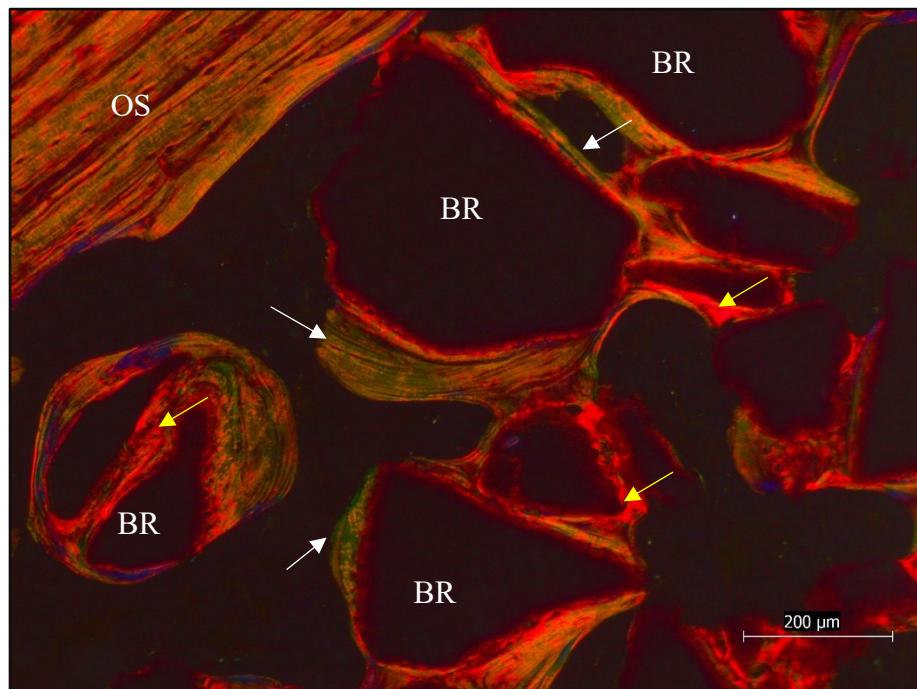
Fonte: Produção pessoal

Figura 18 - Imagem histológica, para o tratamento TCP  $\beta$  + PRP ativado no período de evolução de 60 dias, com coloração Hematoxilina/Eosina (HE). Biomaterial remanescente (BR); neoformação de tecido ósseo (NTO); Lacunas (LA); Deposição de fibras colágenas (DFC). Notar que a neoformação do tecido ósseo segue da direita para a esquerda, diminuindo em direção ao ápice da campânula, onde estão depositadas fibras colágenas. Observar a presença de vasos sanguíneos evidenciados pelas setas amarelas. Aumento 10X.



Fonte: Laboratório de Patologia Animal CAV/UDESC- Lages- SC.

Figura 19 - Imagem histomorfométrica para o tratamento TCP  $\beta$  + PRP ativado com tempo de evolução de 60 dias. Coloração Picosirius. Coloração Picosirius. Biomaterial remanescente (BR); Tecido ósseo secundário (Calvária) (OS). Observar o crescimento do tecido conjuntivo ao redor do biomaterial remanescente. Notar a presença de tecido conjuntivo em coloração vermelha (setas amarelas) e tecido ósseo em coloração verde (setas brancas). Aumento 10X.



Fonte: LABOPAVE - UFSC - Curitibanos- SC.

### 5.3.2 Grupo 90 dias

Aos 90 dias o grupo TCP  $\beta$  + PRP ativado apresentou neoformação de tecido ósseo moderada, sendo esse crescimento apenas de tecido ósseo primário. Não observou-se osteoclastos, observando-se uma leve quantidade de osteoblastos caracterizada por células redondas com reticulo citoplasmático abundante. Assim como nos demais grupos a neoformação óssea foi abundante próximo ao osso da calvária diminuindo em direção ao ápice da campâula.

O biomaterial remanescente manteve-se de forma moderada.

Observou-se em apenas uma amostra presença proliferação de tecido mieloide discreta (medula óssea), caracterizados por adipócitos medulares e progenitores de células sanguíneas. (figura 20A), porem a média do grupo foi classificada como ausente.

A neoformação vascular foi classificada como moderada. Apresentando-se na forma de uma camada de células endoteliais em forma de tubo de pequeno calibre com células sanguíneas no interior.

Observou-se moderada quantidade de macrófagos, caracterizada por células com núcleo redondo e material eosinófilo no citoplasma, os quais podem ser observados na imagem 20B.

Neste grupo pudemos observar a presença de grandes lacunas com a presença de biomaterial na luz, como demostrado na figura 20A.

Na figura histomorfométrica (imagem 21) podemos observar o pouco crescimento ósseo representado pela coloração verde, mesmo próximo a calvária do animal.

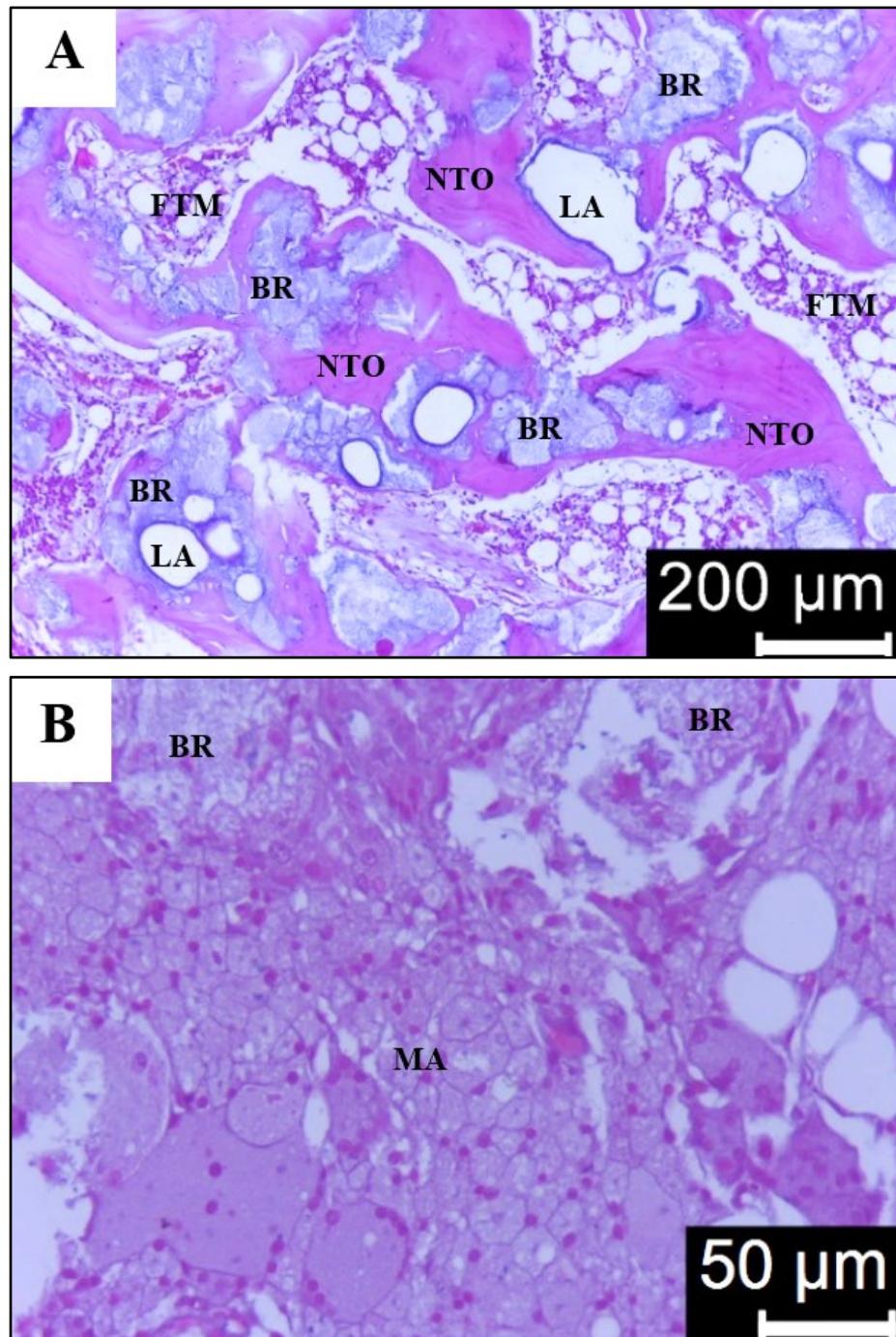
A tabela 12 apresenta os resultados da avaliação histológica obtida nas análises das amostras.

**Tabela 11 - Resultados obtidos através da análise histológica de TCP  $\beta$  + PRP ativado, com evolução de 90 dias de pós-operatório, quanto a biomaterial remanescente (BR), neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), osso primário (OP), presença de osteoblastos (POT), formação de tecido mieloide (FTM), macrófagos (MA) e neoformação vascular (NFV).**

BR	NTO	DFC	OP	POT	FTM	MA	NFV
++	++	++	+++	+	-	++	++

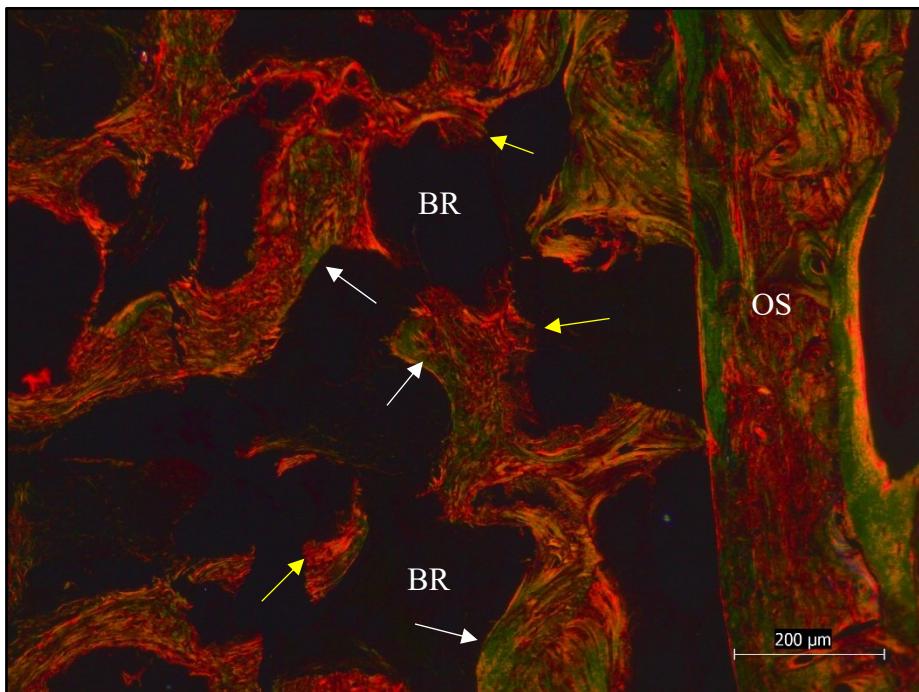
Fonte: Produção pessoal

Figura 20 - Imagem histológica, para o tratamento TCP  $\beta$  + PRP ativado no período de evolução de 90 dias, com coloração Hematoxilina/Eosina (HE). A) Biomaterial remanescente (BR); neoformação de tecido ósseo (NTO); formação de tecido mieloide (FTM); Lacunas (LA). Notar a presença de lacunas no meio do biomaterial. Aumento 10X. B) Macrófagos (MA). Notar a presença macrófagos, caracterizado por células com núcleo redondo e material eosinófilo no citoplasma, ao redor do biomaterial remanescente. Aumento 40X.



Fonte: Laboratório de Patologia Animal CAV/UDESC- Lages- SC.

Figura 21 - Imagem histomorfométrica para o tratamento TCP + PRP ativado com tempo de evolução de 90 dias. Coloração Picrosírus. Biomaterial remanescente (BR); Tecido ósseo secundário (Calvária) (OS). Notar a presença de tecido conjuntivo em coloração vermelha (setas amarelas) e tecido ósseo em coloração verde (setas brancas). Aumento 10X.



Fonte: LABOPAVE - UFSC - Curitibanos- SC.

## 5.4 Fosfato Tricálcico $\beta$ acrescido de PRP não ativado

### 5.4.1 Grupo 60 dias

Esse grupo apresentou neoformação de tecido ósseo discreta, sendo esse crescimento apenas de tecido ósseo primário. A neoformação óssea foi abundante próxima ao osso da calvária, e diminuindo em direção ao ápice. No ápice da campanula observou-se deposição de fibras colágenas (figura 22). Novamente não observou-se de osteoclastos, porém, apresentou uma discreta quantidade de osteoblastos, caracterizada por células redondas com retículo citoplasmático abundante.

O biomaterial remanescente presente apresentou-se de forma acentuada. A proliferação de tecido mieloide média foi classificada como ausente.

A neoformação vascular foi classificada como moderada. Apresenta-se na forma de uma camada de células endoteliais em forma de tubo de pequeno calibre com presença de células sanguíneas no interior.

A partir da imagem histomorfométrica (figura 23) podemos observar a presença de tecido conjuntivo em coloração vermelha em abundância, enquanto o tecido ósseo, em coloração verde, encontra-se de forma reduzida.

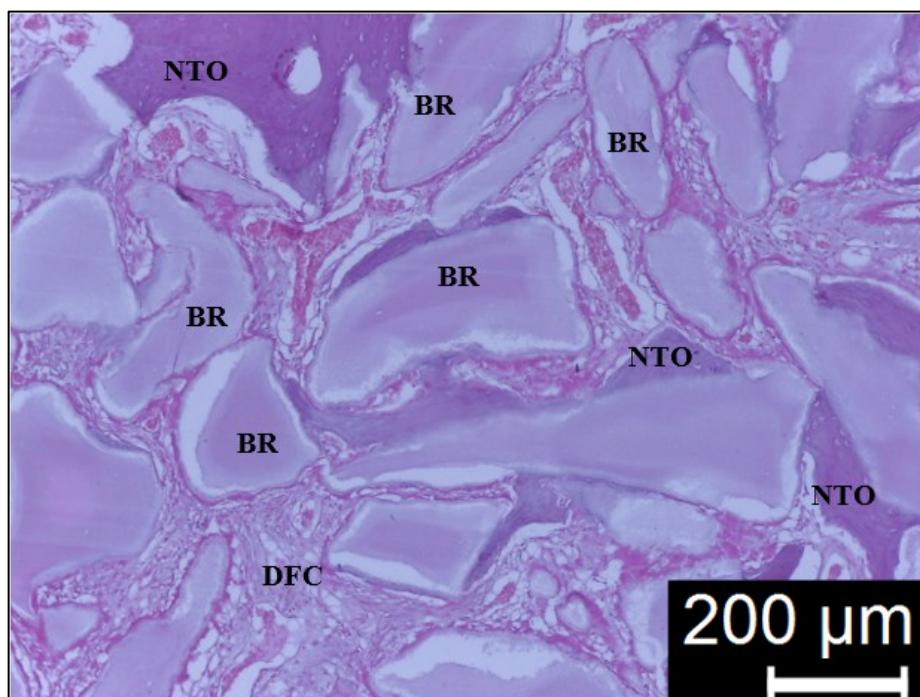
A tabela 13 apresenta os resultados da avaliação histológica obtida nas análises das amostras.

Tabela 12 - Resultados obtidos através da análise histológica de TCP  $\beta$  + PRP não ativado, com evolução de 60 dias de pós-operatório, quanto a biomaterial remanescente (BR), neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), osso primário (OP), presença de osteoblastos (POT), formação de tecido mieloide (FTM), macrófagos (MA) e neoformação vascular (NFV).

BR	NTO	DFC	OP	POT	FTM	MA	NFV
+++	+	++	+++	+	-	-	++

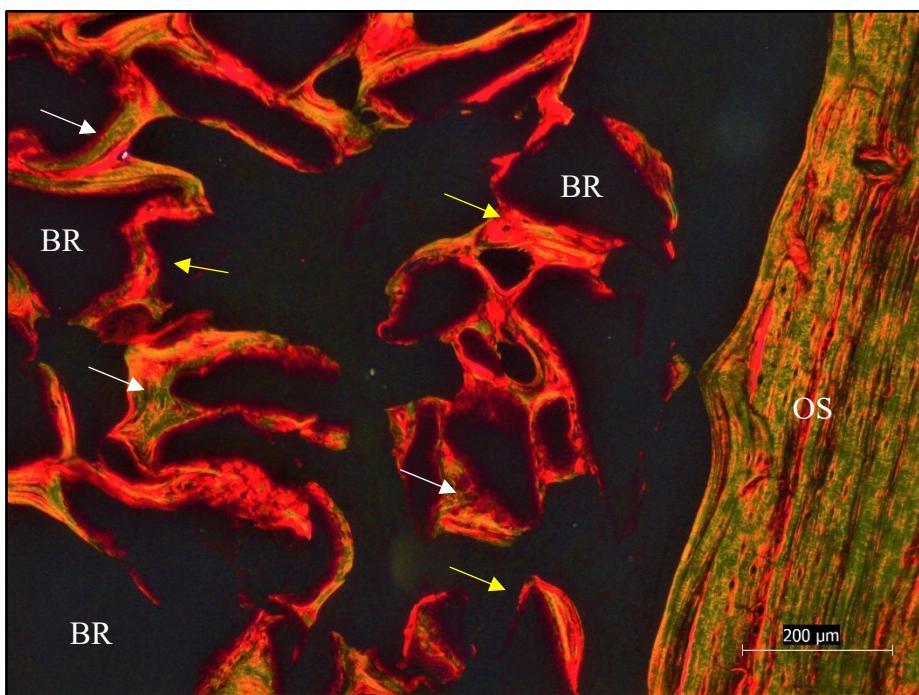
Fonte: Produção pessoal

Figura 22 - Imagem histológica, para o tratamento TCP  $\beta$  + PRP não ativado no período de evolução de 60 dias, com coloração Hematoxilina/Eosina (HE). Biomaterial remanescente (BR); neoformação de tecido ósseo (NTO); deposição de fibras colágenas (DFC). Notar a neoformação de tecido ósseo apenas próximo ao biomaterial. Aumento 10X.



Fonte: Laboratório de Patologia Animal CAV/UDESC- Lages- SC.

Figura 23 - Imagem histomorfométrica para o tratamento TCP  $\beta$  + PRP não ativado com tempo de evolução de 60 dias. Coloração Picosirius. Biomaterial remanescente (BR); Tecido ósseo secundário (Calvária) (OS). Notar a presença de tecido conjuntivo em coloração vermelha (setas amarelas) e tecido ósseo em coloração verde (setas brancas). Aumento 10X.



Fonte: LABOPAVE - UFSC - Curitibanos- SC.

#### 5.4.2 Grupo 90 dias

Ao ser avaliado histologicamente este grupo apresentou neoformação de tecido ósseo discreta, sendo esse crescimento apenas de tecido ósseo primário. A neoformação óssea teve maior formação próximo ao osso da calvária, sendo abundante na base e diminuindo em direção ao ápice da campânula. Não observou-se osteoclastos, porém observou-se uma quantidade de osteoblastos discreta, caracterizada por células redondas com reticulo citoplasmático abundante.

O biomaterial remanescente foi classificado como acentuado, como demonstrado na figura 24.

Assim como em outros grupos não foi observada, na maioria das amostras, a proliferação de tecido mieloide (medula óssea), sendo sua média classificada como nula. A neoformação vascular foi classificada como discreta, apresentando-se na forma de uma camada de células endoteliais em forma de tubo de pequeno calibre com presença de células sanguíneas no interior.

Observou-se discreta quantidade de macrófagos, sendo caracterizada por células com núcleo redondo e material eosinófilo no citoplasma.

A partir da imagem histomorfométrica (figura 25) podemos notar que o crescimento ósseo primário se dá a partir da calvaria sadia do animal e vai progredindo em direção ao biomaterial e ápice da campanula.

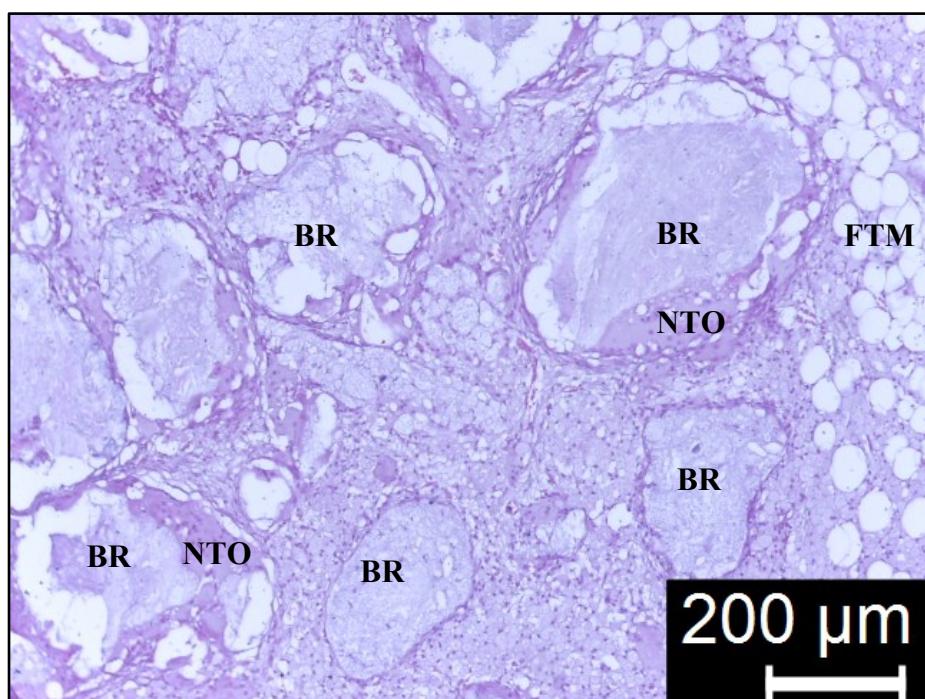
A tabela 14 apresenta os resultados da avaliação histológica obtida nas análises das amostras.

Tabela 13 - Resultados obtidos através da análise histológica de TCP  $\beta$  + PRP não ativado, com evolução de 90 dias de pós-operatório, quanto a biomaterial remanescente (BR), neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), tecido ósseo primário (OP), presença de osteoblastos (POT), formação de tecido mieloide (FTM), macrófagos (MA) e neoformação vascular (NFV).

BR	NTO	DFC	OP	POT	FTM	MA	NFV
+++	+	++	+++	+	-	+	+

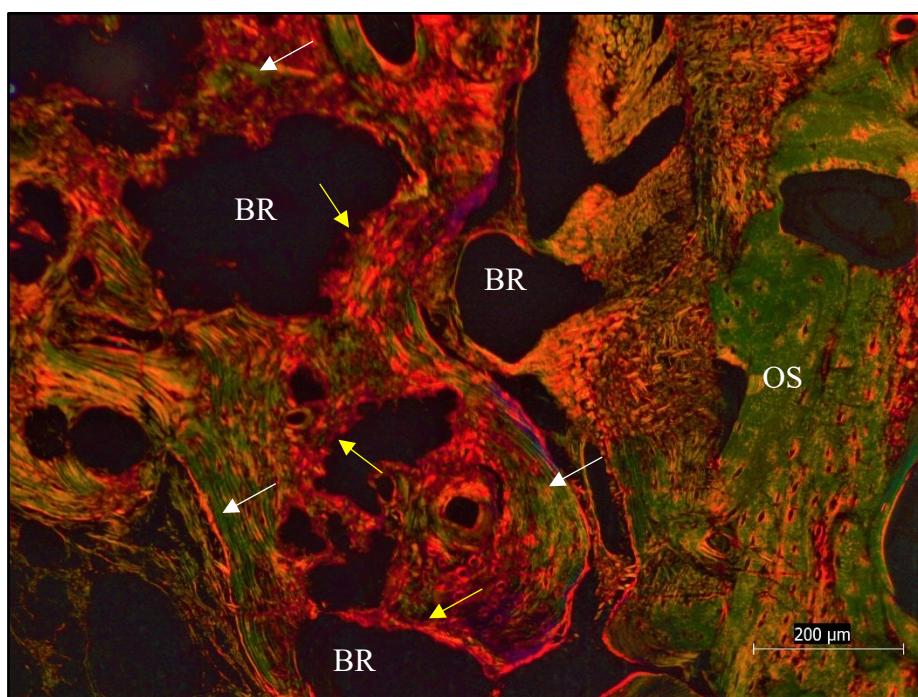
Fonte: Produção pessoal

Figura 24- Imagem histológica, para o tratamento TCP  $\beta$  + PRP não ativado no período de evolução de 90 dias, com coloração Hematoxilina/Eosina (HE). Biomaterial remanescente (BR); neoformação de tecido ósseo (NTO); Formação de tecido mieloide (FTM). Notar a discreta neoformação óssea apenas próximo ao biomaterial remanescente. Aumento 10X.



Fonte: Laboratório de Patologia Animal CAV/UDESC- Lages- SC.

Figura 25 - Imagem histomorfométrica para o tratamento TCP  $\beta$  + PRP não ativado com tempo de evolução de 90 dias. Coloração Picrosírius. Biomaterial remanescente (BR); Tecido ósseo secundário (Calvária) (OS). Notar a presença de tecido conjuntivo em coloração vermelha (setas amarelas) e tecido ósseo em coloração verde (setas brancas). Aumento 10X.



Fonte: LABOPAVE - UFSC - Curitibanos- SC.

## 5.5 Resultados comparativos

A tabela 15 compara os biomateriais estudados com suas respectivas associações ao PRP ativado ou não ativado, através dos critérios histológicos avaliados ao 60 e 90 dias de evolução de pós-operatório.

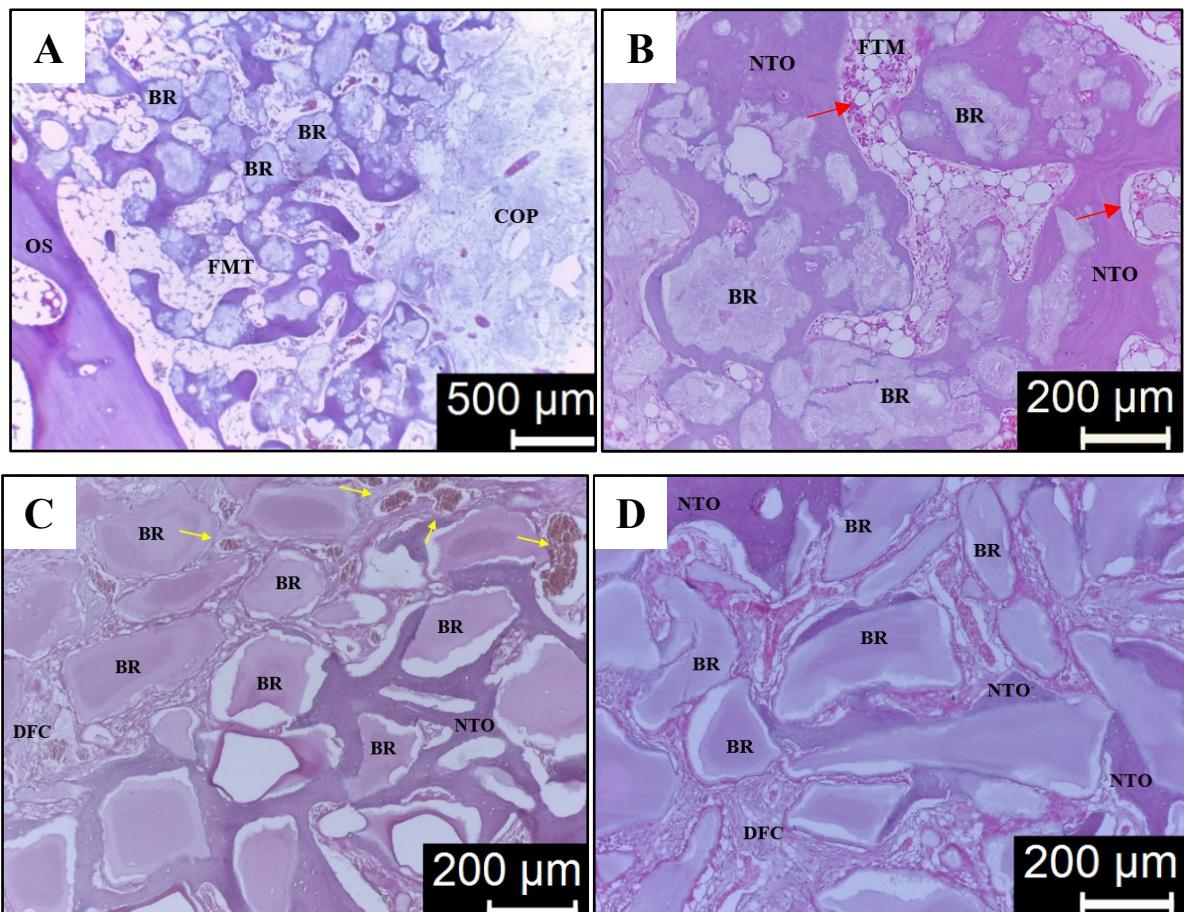
Tabela 14 - Resultados médios comparativos para cada tempo de tratamento, 60 e 90 dias de pós-operatório, obtidos em relação à biomaterial remanescente (BR), neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), osso primário (OP), presença de osteoblastos (POT), formação de tecido mieloide (FTM), macrófagos (MA) e neoformação vascular (NFV).

Tratamento	BR	NTO	DFC	OP	POT	FTM	MA	NFV
HA + PRP ativado	++	++	++	+++	+	++	-	++
60 dias								
HA + PRP ativado	+++	++	++	+++	+	+	-	+++
90 dias								
HA + PRP não ativado	+++	++	++	+++	+	-	-	++
60 dias								
HA + PRP não ativado	+++	++	++	+++	+	-	-	+++
90 dias								
TCP + PRP ativado	+++	+	++	+++	+	-	-	++
60 dias								
TCP + PRP ativado	++	++	++	+++	+	-	++	++
90 dias								
TCP + PRP não ativado	+++	+	++	+++	+	-	-	++
60 dias								
TCP + PRP não ativado	+++	+	++	+++	+	-	+	+
90 dias								

Fonte: Produção pessoal

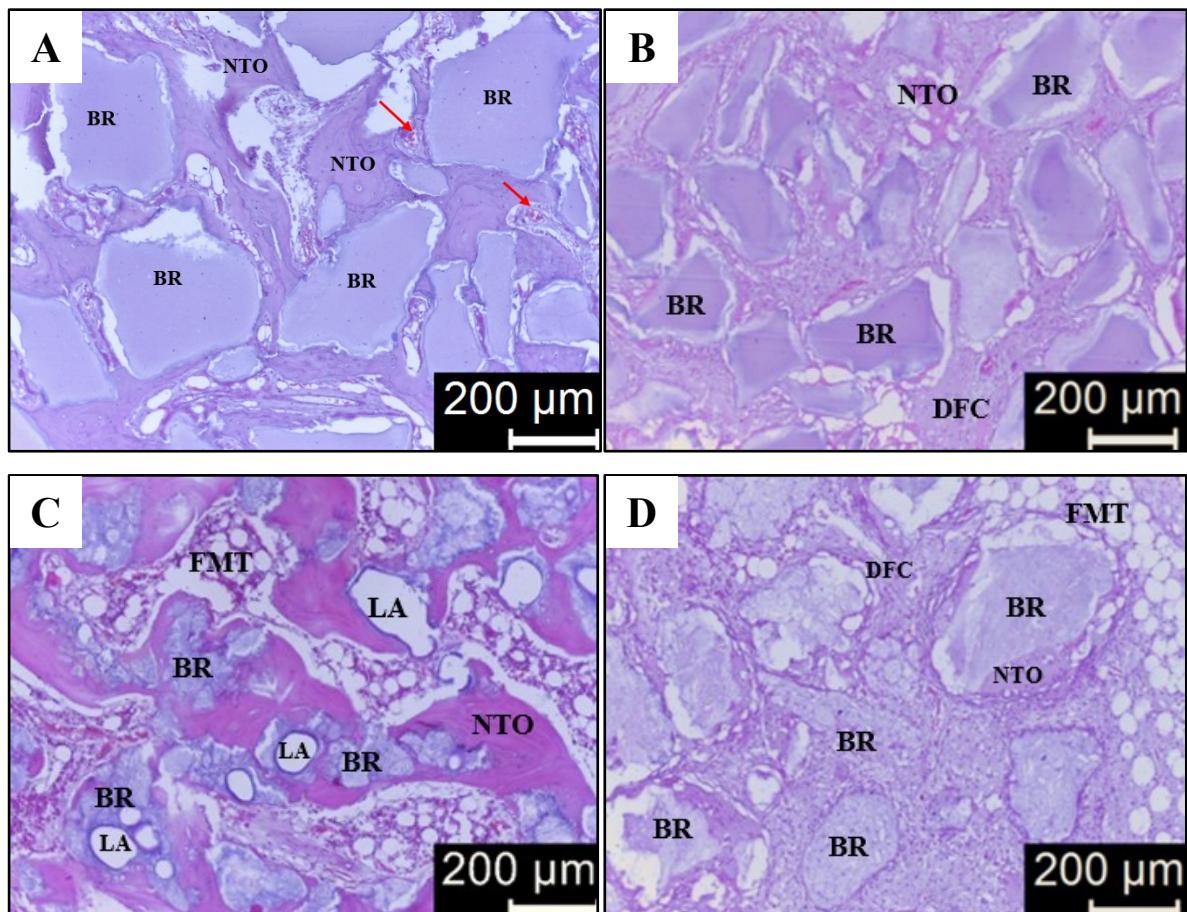
As figuras 26 e 27 ilustram comparativamente as micrografias obtidas na análise histológica aos tratamentos acrescidos de PRP ativado e não ativado aos 60 e 90 dias de tratamento.

Figura 26 - Imagem histológica comparativa dos tratamentos aos 60 dias de evolução de pós-operatório. Biomaterial remanescente (BR), neoformação de tecido ósseo (NTO), osso primário (OP), formação de tecido mieloide (FTM), células osteoprogenitoras (COP), deposição de fibras colágenas (DFC). (A) HA + PRP ativado, notar a presença de células osteoprogenitoras no ápice da campânula; (B) HA + PRP não ativado, notar os progenitores de células sanguíneas junto aos adipócitos medulares evidenciadas pelas setas vermelhas; (C) TCP  $\beta$  + PRP ativado, notar que a neoformação do tecido ósseo segue da direita para a esquerda, diminuindo em direção ao ápice da campânula, onde estão depositadas fibras colágenas, observar a presença de vasos sanguíneos evidenciados pelas setas amarelas; (D) TCP  $\beta$  + PRP não ativado, notar a neoformação de tecido ósseo apenas próximo ao biomaterial. (Figura 1. H&E, aumento 4X; Fig 2, 3 e 4, H&E, aumento 10X).



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

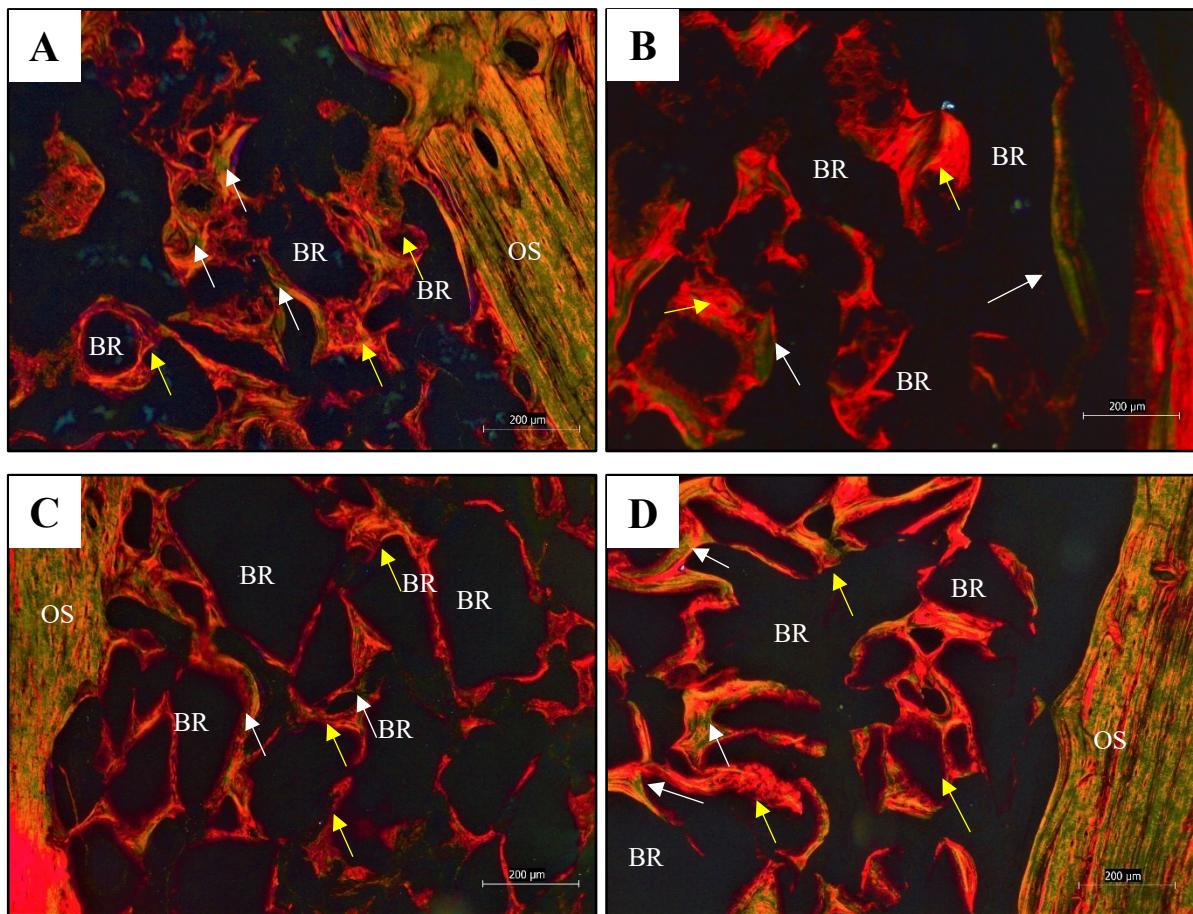
Figura 27 - Imagem histológica comparativa dos tratamentos aos 90 dias de evolução de pós-operatório. Biomaterial remanescente (BR); neoformação de tecido ósseo (NTO); formação de tecido mieloide (FTM); Lacunas (LA); Deposição de fibras colágenas (DFC). (A) HA + PRP ativado, notar a neoformação vascular evidenciada pelas setas vermelha; (B) HA + PRP não ativado, notar a discreta neoformação de tecido ósseo; (C) TCP  $\beta$  + PRP ativado, notar a presença de lacunas no meio do biomaterial; (D) TCP  $\beta$  + PRP não ativado, notar a discreta neoformação óssea apenas próximo ao biomaterial remanescente. (H&E, aumento 10X).



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

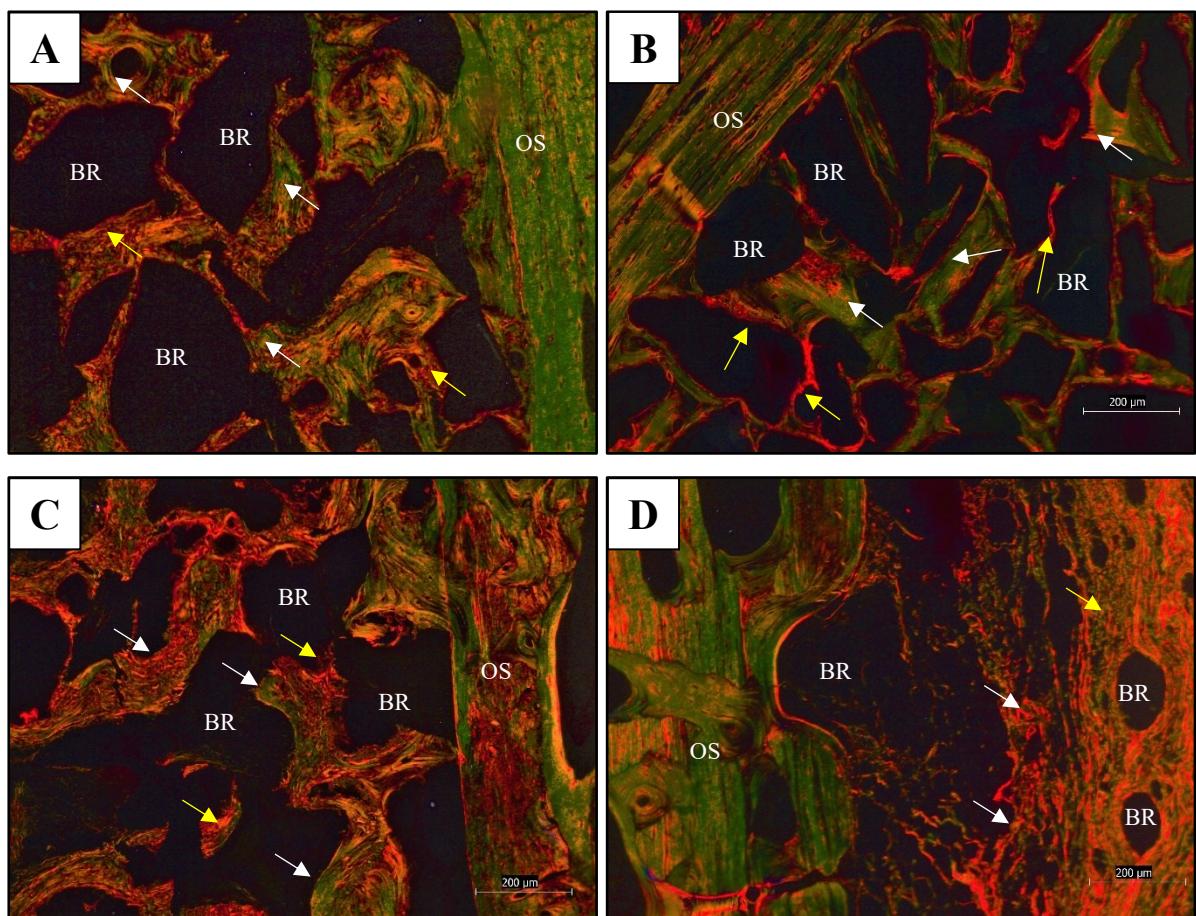
As imagens 28 e 29 ilustram as micrografias obtidas para a análises histomorfométrica dos tratamentos com biomaterial acrescidos de PRP ativado ou não ativado aos 60 e 90 dias de evolução.

Figura 28 - Imagem histológica comparativa dos tratamentos aos 60 dias de evolução de pós-operatório. Em vermelho evidencia-se o tecido conjuntivo fibroso. Em verde cora-se o tecido ósseo neoformado. Biomaterial remanescente (BR), osso secundário (calvária) (OS), formação de tecido mieloide (FTM). (A) HA + PRP ativado, notar o crescimento proveniente da calvária em direção ao biomaterial; (B) HA + PRP não ativado, notar a pouca presença de crescimento ósseo representado pela coloração verde; (C) TCP  $\beta$  + PRP ativado, notar novamente o crescimento proveniente da calvária em direção ao biomaterial; (D) TCP  $\beta$  + PRP não ativado. Tecido conjuntivo em coloração vermelha (setas amarelas) e tecido ósseo em coloração verde (setas brancas). (*Picosirius*, aumento 10X).



Fonte: LABOPAVE - UFSC - Curitibanos- SC.

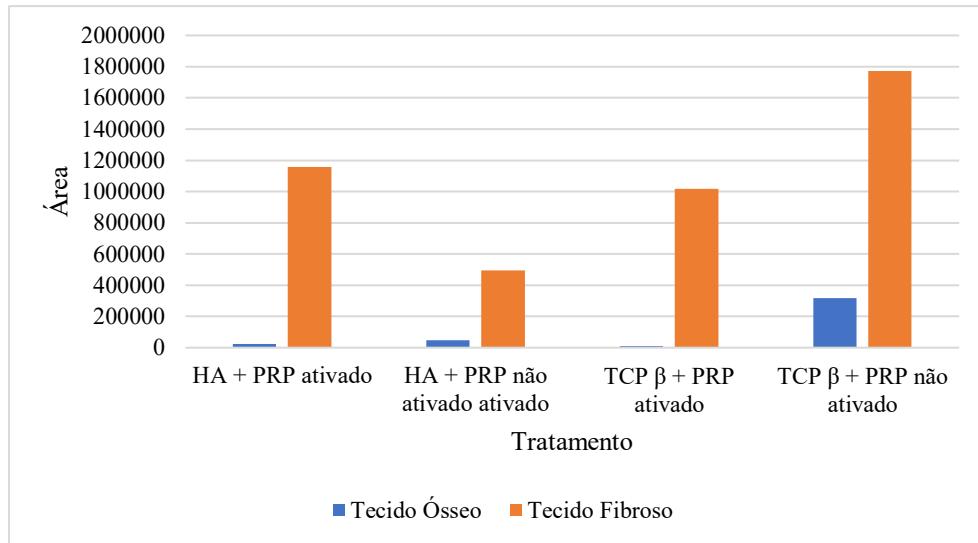
Figura 29 - Imagem histológica comparativa dos tratamentos aos 90 dias de evolução de pós-operatório. Em vermelho evidencia-se o tecido conjuntivo fibroso. Em verde cora-se o tecido ósseo neoformado. Biomaterial remanescente (BR); Osso secundário (calvária) (OS); Formação de tecido mielóide (FTM) (A) HA + PRP ativado notar a presença de fibras colágenas organizadas em lamelas, paralelas umas às outras a qual indica o osso secundário da calvária; (B) HA + PRP não ativado, notar a maior quantidade de tecido ósseo em coloração verde; (C) TCP  $\beta$  + PRP ativado, notar a maior presença de tecido conjuntivo em coloração vermelha; (D) TCP  $\beta$  + PRP não ativado, notar a mínima presença de tecido ósseo, representado pela coloração verde, entremeado ao tecido conjuntivo, representado pela coloração vermelha. Tecido conjuntivo em coloração vermelha (seta amarela) e tecido ósseo em coloração verde (seta branca). (Picosirius, aumento 10X).



Fonte: LABOPAVE - UFSC - Curitibanos- SC.

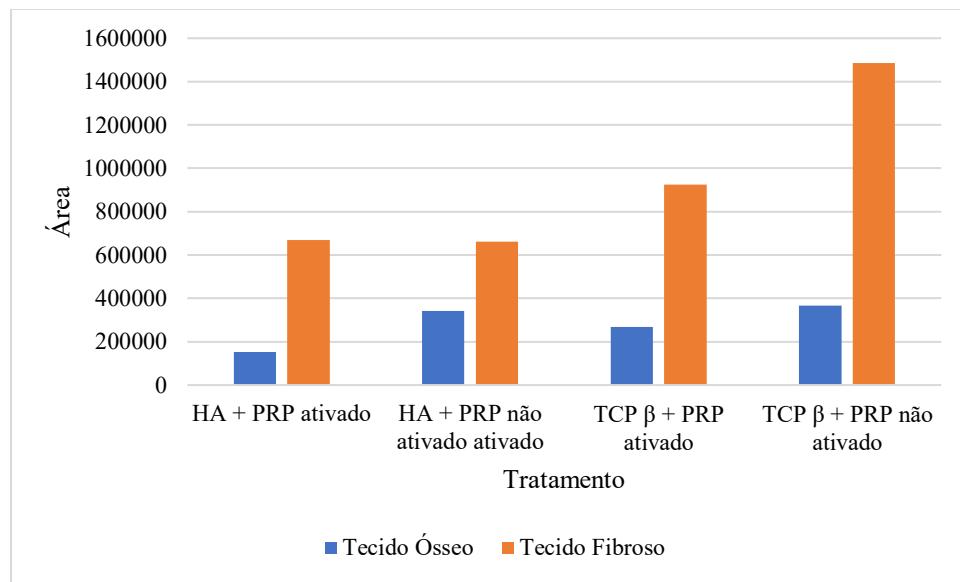
Também foram analisados e quantificadas quanto a formação de novo tecido ósseo e deposição de tecido fibroso em cada um dos tratamentos e seus respectivos tempos de evolução. As figuras 30 e 31 ilustram os resultados encontrados.

Figura 30 - Gráfico ilustrando os resultados da análise de histomorfometria, demonstrando a relação entre os tratamentos, para a neoformação de tecido ósseo (azul) e a deposição de tecido fibroso (laranja) aos 60 dias de evolução de pós-operatório.



Fonte: Produção pessoal

Figura 31 - Gráfico ilustrando os resultados da análise de histomorfometria, demonstrando a relação entre os tratamentos, para a neoformação de tecido ósseo (azul) e a deposição de tecido fibroso (laranja) aos 90 dias de evolução de pós-operatório.



Fonte: Produção pessoal

## 5.6 Análise estatística

A tabela 16 apresenta os valores das médias e desvios padrão relacionados aos valores encontrados na análise histomorfométrica dos tratamentos em relação ao tecido ósseo e a deposição de tecido fibroso aos 60 e 90 dias de evolução, respectivamente.

Tabela 15. Médias 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

	<b>Neoformação Óssea</b>	<b>Tecido Conjuntivo</b>		
	60 dias	90 dias	60 dias	
			90 dias	
<b>Hidroxiapatita + PRP ativado</b>	20239Aa ± 20138	38081Ab ±31467	289212 <sup>a</sup> ±183015	167051Ab ±64426
<b>Hidroxiapatita + PRP não ativado</b>	48105B ± 51867	322549 <sup>a</sup> ±298410	68629 ±55837	165244Ab ±75849
<b>TCP + PRP ativado</b>	10217Aa ±10120	66835b ±54215	254410 ±150424	231257 ±151300
<b>TCP + PRP não ativado</b>	17391Aa ±17541	91532Bb ±64124	293026 ±214707	371453B ±297041

\* One Way ANOVA seguido de Tukey- letras maiúsculas diferentes na mesma coluna significam diferença entre grupos no mesmo momento. Teste t de Student – letras minúsculas diferentes na mesma linha significam diferença entre momentos, dentro do mesmo grupo.

Fonte: arquivo pessoal.

As análises estatísticas foram desenvolvidas através do software GraphPad Prism, versão 8.3.1 para Windows, GraphPad software, San Diego, California, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com). Foi utilizado teste t de student para confrontar o uso do PRP ativado e não ativado com diferentes biomateriais e o teste ANOVA para analisar os tratamentos avaliando qual apresentava o melhor resultado estatisticamente.

Para a análise dos tratamentos entre o mesmo biomaterial e complementos diferentes, PRP ativado ou não, dentro do mesmo tempo de evolução, referente ao crescimento ósseo, usou-se o teste t de student. A HA acrescida de PRP não ativado teve o maior crescimento ósseo comparado aos outros grupos aos 60 dias de evolução, já aos 90 dias de evolução a HA associada ao PRP ativado teve menor crescimento ósseo que o grupo TCP associado ao PRP não ativado.

Com relação a formação de tecido conjuntivo (fibroso), os mesmos testes foram realizados, nas mesmas situações. Ao equiparar os resultados entre o mesmo biomaterial e seus diferentes complementos aos 60 dias não houve diferença estatística entre os grupos, já aos 90

dias a formação de tecido conjuntivo foi maior no grupo TCP associado ao PRP não ativado do que os dois grupos da HA.

Por fim foi realizada uma avaliação geral do desempenho de cada tratamento diante de todos os outros, utilizando-se do teste de ANOVA. Diante disso, ao avaliar os tratamentos aos 60 dias apenas o grupo HA associado ao PRP não ativado não apresentou diferença estatística, todos os outros tiveram um maior crescimento ósseo aos 90 dias. Com relação ao tecido fibroso apenas os grupos com HA tiveram diferença estatística tendo uma menor produção de tecido conjuntivo aos 90 dias, ou seja, houve uma redução do tecido fibroso dos 60 para os 90 dias.

## 6 Discussão

O uso de animais em pesquisas biomédicas tem sido recomendado para aperfeiçoar e validar procedimentos existentes, desenvolver novos materiais e entender os vários processos fisiológicos e patológicos, uma vez que não existem modelos *in vitro* capazes de imitar completamente a complexidade do organismo humano (CALASANS-MAIA et al., 2009). Sendo assim o modelo animal apresenta-se como uma ferramenta fundamental em estudos nas áreas da saúde, por promover uma situação similar a realidade, faz com que os estudos *in vivo* apresentem resultados fidedignos (VARGAS, 2018). Esse estudo procurou ter máximo cuidado com os animais visando seu bem-estar e consequentemente protegendo os resultados obtidos, uma vez que ambos possuem relevância nas áreas medicas.

A escolha do uso de coelhos como modelo experimental deu-se pela facilidade de manejo, porte pequeno, docilidade e baixo custo de manutenção. CALASANS-MAIA et al. (2009) em sua revisão sobre a utilização de coelhos como unidade experimental, citou como vantagens do uso desses animais: fácil manuseio e observação, permite trabalhar com grande número de indivíduos, permite padronização do meio ambiente e padronização genética, entre outras; além disso cita a espécie como possuindo grande quantidade de informação básica disponível, sendo assim de grande valia para o experimento realizado. Além disso o coelho é um modelo experimental bastante utilizado nos estudos ortopédicos, correspondendo a aproximadamente 35% de todos os estudos científicos do sistema músculo esquelético (LACRETA JUNIOR et al., 2010).

A região determinada para a realização dos implantes foi a calvária, compreende-se por calvária a área formada pelos ossos parietal e frontal e pelo processo intraparietal do osso occipital (SLATER, 2007). Essa região possuiu um formato que permite a fixação das guias de crescimento, também possui pouco suprimento sanguíneo, sendo, então, rotineiramente utilizada pra estudo de defeito crítico e crescimento ósseo guiado (COLOMBRO, 2016). A utilização dessa região baseou-se em outros estudos já realizados com sucesso relevante, utilizando-se de mesma metodologia de crescimento ósseo guiado *in vivo* (LEVANDOWSKI-Jr, 2014; COLOMBO 2016; KUCI, 2017 e VARGAS, 2018).

A utilização da técnica de crescimento guiado impede que ocorra o crescimento de tecidos moles na área de consolidação do enxerto, porem a formação de vasos sanguíneos pode ocorrer permitindo que a células progenitoras osteogênicas entrem na área aumentada e a utilização de pequenos furos permite que o sangue flutue nessa área fornecendo uma matriz extracelular provisória para a migração de células de reparo (BUSENLECHNER et al., 2008).

No presente trabalho a campanula de nylon impediu o crescimento de tecidos moles dentro da área do biomaterial e ainda permitiu a neoformação vascular e a formação de tecido mieloide, além disso podemos perceber células osteoprogenitoras em várias amostras através das imagens histológicas.

BUSENLECHNER et al. (2008) relatou em seu estudo que um pequeno número de hemisférios, que serviram de proteção ao biomaterial, foi deslocado pela forte formação óssea periosteal, porém a colocação estável desses hemisférios foi dada através de fricção o que pode levar mais facilmente a soltura. No presente trabalho foram utilizados parafusos corticais sextavados não bloqueados para fixação, o qual proveu boa fixação, além de, através da perfuração, permitir que o sangue fluísse para a área isolada fornecendo assim matriz extracelular provisória.

A implantação das guias de crescimento seguiu o modelo proposto por Levandowsky Jr (2014) optando-se pelo uso de apenas duas guias, uma vez que em estudos anteriores as guias ultrapassaram os limites supraorbitais, devido ao tamanho das calvárias dos coelhos, permitindo que houvesse pontos sem contato entre as guias e o leito receptor. Da mesma forma escolheu-se a utilização de guias de nylon (n6) como aparato para o crescimento guiado, uma vez que nos estudos de Colombo (2016), Kuci (2017) e Vargas (2018) as guias não apresentaram interferência nos resultados, vedaram de forma eficiente os sítios de crescimento ósseo e não apresentaram qualquer tipo de rejeição. A utilização desse método provou-se, no presente estudo, mais uma vez eficaz, não demonstrando qualquer problema com os biomateriais e nem com os animais utilizados.

O protocolo utilizado para a obtenção de plasma rico em plaquetas escolhido foi o método adaptado de (VENDRAMIN et al., 2006), pois segundo seu estudo com este protocolo foi conseguido alcançar uma concentração plaquetária em média quatro vezes superior ao da amostra de sangue do paciente. Sendo maior que a observada em outros protocolos e semelhante as concentrações obtidas pelos métodos atomizados. Esse protocolo se mostrou eficiente uma vez que a contagem das plaquetas obteve um aumento de 2 a 4 vezes ao da amostra inicial de cada animal.

Numerosos modelos animais demonstraram os efeitos positivos do PRP na promoção da regeneração óssea em defeitos de calvária, defeitos mandibulares, defeitos da tibia e defeitos femorais (YIN et al., 2016). Em sua pesquisa WILSON; BARBIERI; MAZZER (2006) indicaram que o PRP realmente estimula uma reação favorável em ossos longos uma vez que a avaliação radiológica demonstrou que a falha óssea já estava cicatrizada no grupo associado ao PRP as 4 semanas enquanto os outros grupos demonstraram essa cicatrização com 8 e 12

semanas. No entanto, não está claro se o PRP deve ser usado de forma não ativada ou se deve ser ativado pela adição de gluconato de cálcio e / ou trombina, uma vez que a ativação “artificial” das plaquetas resulta em uma liberação imediata, substancial e descoordenada de fatores de crescimento poucas horas após a aplicação, mas com tempo limitado (ATASHI et al., 2019).

No presente estudo a HA associada ao PRP ativado demonstrou-se estatisticamente mais vantajosa quando comparada ao TCP- $\beta$  associado ao PRP ativado uma vez que possui características de diminuição da produção fibrosa ao longo do tempo, ao contrário do TCP- $\beta$  o qual demonstrou aumento da produção de tecido fibroso o que não é vantajoso na cicatrização óssea. OLSSON et al. (2008) explica que quanto mais extensa a espessura da camada de tecido fibroso formada, menor a tolerabilidade dos tecidos ao material, sendo assim a formação de uma capsula fibrosa entre o implante e o hospedeiro deve ocorrer apenas nas fases iniciais da sua aplicação.

A HA teve maior formação óssea aos 60 dias e o TCP- $\beta$  aos 90 dias quando associados ao PRP não ativado, porém a HA teve um aumento de crescimento ósseo aos 90 dias quando associado ao PRP ativado, quanto ao crescimento conjuntivo os piores desempenhos foram associados ao PRP não ativado o que leva a acreditar que a ativação do PRP leva sim a uma melhora na atuação dos biomateriais. A ativação do PRP geralmente ocorre antes da aplicação para que a degranulação das plaquetas ocorra e consequentemente para que os fatores de crescimento sejam liberados dos grânulos  $\alpha$  das plaquetas (YIN et al., 2016). Desde que Whitman em 1997 defendeu pela primeira vez que o PRP pode ser uma fonte de fatores de crescimento autólogo muitos esforços foram dedicados para avaliar os efeitos deste na regeneração óssea (YIN et al., 2016). Os fatores de crescimento são altamente instáveis e não duram muito em estado livre na corrente sanguínea, sendo então o PRP um veículo adequado para aumentar sua concentração nos tecidos (WILSON; BARBIERI; MAZZER, 2006).

Com relação a facilidade de manejo a utilização do PRP em gel (ativado) acabou se revelando mais difícil, no presente trabalho, uma vez que a quantidade de PRP acabava sendo muito pequena e sua manipulação acabava sendo mais difícil do que a do PRP líquido (não ativado). Com relação a formação de pasta com os biomateriais ambas as formulações de PRP providenciaram o mesmo tipo de consistência, com boa liga e de fácil manipulação.

Através da avaliação histológica pode-se observar maior produção de tecido mieloide nos biomateriais acrescidos de PRP ativado quando comparados ao seu uso com PRP não ativado, além disso todos os grupos tiveram bom crescimento de tecido vascular. Isso pode ser explicado uma vez que o PRP possui a capacidade de estimular a proliferação de células

indiferenciadas podendo formar novos vasos sanguíneos. Em estudos usando o PRP na cicatrização em úlceras vasculares de diferentes causas, com comprometimento vascular e extremamente sujeitos à infecções e à amputações pela deficiência de vascularização periférica, já está estabelecido que o fator de crescimento celular endotelial vascular (VEGF) presente no PRP é capaz de estimular a angiogênese (CAMPOS, 2018).

Observou-se também que tanto aos 60 quanto aos 90 dias ocorreu formação óssea a partir da base do osso da calvária em direção ao ápice da guia de crescimento, demonstrando um bom potencial osteocondutor dos biomateriais, assim como encontrado nos estudos de Levandowski (2014) e Colombo (2016).

Através da histologia podemos observar que ouve presença de osteoblastos de forma homogênea e moderada, também ficou claro a falta de osteoclastos o que comprovou a presença de apenas tecido ósseo primário. O primeiro tecido ósseo que aparece é do tipo primário (não lamelar), sendo substituído gradativamente por tecido lamelar ou secundário, apresenta fibras colágenas dispostas em várias direções sem organização definida, tem menor quantidade de minerais e maior proporção de osteócitos do que o tecido ósseo secundário (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). A presença de tecido ósseo secundário pode não ter ocorrido devido ao tempo do estudo ser somente de 90 dias.

Nesse estudo, assim como nos estudos realizados anteriormente por Levandowski Jr (2014) e Vargas (2018) optou-se pela análise através da histomorfometria, uma vez que a histomorfometria avalia parâmetros estruturais e de remodelação óssea (KULAK; DEMPSTER, 2010). Sendo assim, foi realizada a análise quantitativa através da histomorfometria, sendo possível identificar os resultados obtidos pela associação da HA 100% e TCP-β 100% associado ao PRP ativado e não ativado, permitindo a análise estatística deste estudo.

## 7 Conclusão

Através da metodologia empregada e dos resultados obtidos nesse estudo pode-se observar que todas as associações apresentaram capacidade de promover neoformação óssea, porém, os tratamentos e associações demostram diferentes evoluções nos diferentes grupos.

Pode-se observar que a HA possuiu vantagem a longo prazo sobre o TCP- $\beta$  uma vez que ao longo do tempo possuiu uma menor produção fibrosa a qual é mais vantajosa no uso de implantes. Além disso demostrou-se que a associação dela com o PRP ativado tem um acrescimento no crescimento do tecido ósseo ao longo do tempo.

Dessa forma observou-se que a associação do PRP ativado a HA torna-se benéfica aumentando o crescimento ósseo e reduzindo o crescimento de tecido fibroso.

## BIBLIOGRAFIA

- ABLA, M. et al. **Utilização de biomaterial e osso autógeno em levantamento de seio maxilar: relato de caso clínico com avaliação histológica.** *ImplantNews*, [s.l.], v. 6, nº 5, p. 561–566, 2009.
- ALEIXO, G. A. de S. et al. **Plasma rico em plaquetas: mecanismo de ação, produção e indicações de uso - Revisão de literatura.** *Medicina Veterinária (UFRPE)*, [s.l.], v. 11, nº 4, p. 239–245, 2017.
- ALMEIDA, R. dos S. et al. **Avaliação da fase inicial do reparo ósseo após implantação de biomateriais.** *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, Salvador, v. 13, nº 3, p. 331–336, 2014.
- ANDIA, D.; CERRI, P.; SPOLIDORIO, L. **Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos.** *Revista de Odontologia da UNESP*, [s.l.], v. 35, nº 2, p. 191–198, 2013.
- ANDRADE, M. G. M. G. et al. **Utilização de plasma rico em plaquetas de coelhos com poucos leucócitos e hemácias para a consolidação de ossos.** *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, [s.l.], v. 68, nº 2, p. 276–282, 2016. ISSN: 16784162, DOI: 10.1590/1678-4162-8304.
- ATASHI, F. et al. **Does non-activated platelet-rich plasma (PRP) enhance fat graft outcome? An assessment with 3D CT-scan in mice.** *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*, [s.l.], v. 72, nº 4, p. 669–675, 2019. ISSN: 18780539, DOI: 10.1016/j.bjps.2018.12.039.
- BORGES, A. P. B. et al. **Hidroxiapatita sintética como substituto ósseo em defeito experimental provocado no terço proximal da tíbia em cão: Aspectos à microscopia eletrônica de transmissão.** *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, [s.l.], v. 52, nº 6, p. 616–620, 2000. ISBN: 0102093520, ISSN: 01020935, DOI: 10.1590/s0102-0935200000600011.
- BUSENLECHNER, D. et al. **Simultaneous in vivo comparison of bone substitutes in a guided bone regeneration model.** *Biomaterials*, [s.l.], v. 29, nº 22, p. 3195–3200, 2008. ISSN: 01429612, DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.04.021.
- CALASANS-MAIA, M. D. et al. **The rabbit as an animal model for experimental surgery.** *Acta Cirurgica Brasileira*, [s.l.], v. 24, nº 4, p. 325–328, 2009. ISSN: 01028650, DOI: 10.1590/S0102-86502009000400014.
- CAMPOS, R. de A. **Efeitos do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) fresco e liofilizado na regeneração de pele em ratos.** 65 p. - Universidade de São Paulo, 2018.
- CASTRO JUNIOR, A. F. et al. **Embriologia e histofisiologia do tecido ósseo: revisão de literatura e bases histofisiológicas das principais doenças ósseas metabólicas.** *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução*, [s.l.], v. 27, nº 1/2, p. 27–32, 2008.

COLOMBRO, B. B. **Análise de três formulações de biocimentos aplicados através de guias de crescimento na calvária de coelhos.** 134 p. - Universidade do Estado de Santa Catarina, 2016.

COSTA, A. C. F. M. et al. **Hidroxiapatita : Obtenção , caracterização e aplicações.** *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, [s.l.], v. 4, nº 3, p. 29–38, 2009.

COSTA, B. D. et al. **Neoformação óssea e osteointegração de biomateriais micro e nanoestruturados em ovinos.** *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, [s.l.], v. 35, nº 2, p. 177–187, 2015. ISSN: 16785150, DOI: 10.1590/S0100-736X2015000200015.

COSTA, P. A. Da; SANTOS, P. **Plasma rico em plaquetas: uma revisão sobre seu uso terapêutico.** *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, [s.l.], v. 48, nº 4, p. 12, 2016. ISSN: 2448-3877, DOI: 10.21877/2448-3877.201600177.

DALMÔNICO, G. M. L. **Síntese e caracterização de fosfato de cálcio e hidroxiapatita: elaboração de composições bifásicas HA/TCP-β para aplicação biomédica.** 99 p. - Universidade do Estado de Santa Catarina, 2011.

DANTAS, A. K. et al. **Avaliação histológica de hidroxiapatita com colágeno quatro e dez meses após levantamento de seio maxilar.** *Revista ImplantNews*, [s.l.], v. 7, nº 5, p. 6, 2010.

DIAS, M. I. R. et al. **Enxertos e substitutos ósseos em cirurgia ortopédica reconstrutiva nos animais de companhia - Uma breve revisão.** *Revista Brasileira de Medicina Veterinaria*, [s.l.], v. 35, nº 4, p. 339–350, 2013. ISSN: 01002430.

GERSTENFELD, L. C. et al. **Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation.** *Journal of Cellular Biochemistry*, [s.l.], v. 88, nº 5, p. 873–884, 2003. ISSN: 07302312, DOI: 10.1002/jcb.10435.

GRANDI, G. **Análise Histomorfométrica Comparativa Entre O Cimento De A -Tcp E Os Grânulos De B -Tcp / Ha No.** 75 p. - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2007.

GRANDI, G. et . al.. **Comparative histomorphometric analysis between α-Tcp cement and β-Tcp/Ha granules in the bone repair of rat calvaria.** *Materials Research*, [s.l.], v. 14, nº 1, p. 11–16, 2011. ISSN: 15161439, DOI: 10.1590/S1516-14392011005000020.

HUDECKI, A.; KIRYCZYŃSKI, G.; ŁOS, M. J. **Biomaterials, Definition, Overview.** *Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine*, [s.l.], nº ii, p. 85–98, 2018. ISBN: 9780128122587, DOI: 10.1016/b978-0-12-812258-7.00007-1.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica Texto & Atlas.** 12 ed. Rio de Janeiro: Koogan Guanabara, 2013. 558 p. ISBN: 9788527723114.

KOKUBO, T.; KIM, H. M.; KAWASHITA, M. **Novel bioactive materials with different mechanical properties.** *Biomaterials*, [s.l.], v. 24, nº 13, p. 2161–2175, 2003. ISBN: 8175753552, ISSN: 01429612, DOI: 10.1016/S0142-9612(03)00044-9.

KOKUBO, T.; YAMAGUCHI, S. **Simulated body fluid and the novel bioactive materials derived from it.** *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, [s.l.], v. 107, n° 5, p. 968–977, 2019. ISSN: 15524965, DOI: 10.1002/jbm.a.36620.

KUCI, C. C. **Neoformação óssea comparativa de biomateriais micronanoestruturados aplicados através de um sistema guiado em calvária de coelhos *Oryctolagus cuniculus*.** 82 p. - Universidade do Estado de Santa Catarina, 2017.

KULAK, C. A. M.; DEMPSTER, D. W. **Histogramorfometria óssea: Uma revisão concisa para endocrinologistas e clínicos.** *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, [s.l.], v. 54, n° 2, p. 87–98, 2010. ISSN: 16779487, DOI: 10.1590/S0004-27302010000200002.

LACRETA JUNIOR, A. C. C. et al. **Modelo experimental de falha óssea por meio de osteotomia do rádio em coelhos.** *Biotemas*, [s.l.], v. 23, n° 3, p. 149–153, 2010. ISSN: 2175-7925, DOI: 10.5007/2175-7925.2010v23n3p149.

LEGEROS, R. Z. **Properties of Osteoconductive Biomaterials: Calcium Phosphates.** *Clinical Orthopaedics and Related Research*, New York, v. 395, n° , p. 81–98, 2002.

LEVANDOWSKI JUNIOR, N. **Análise comparativa de diferentes substitutos ósseos sintéticos microporosos em calvária de coelhos.** 152 p. - Universidade do Estado de Santa Catarina, 2014.

MACEDO, A. P. **Plasma rico em plaquetas: uma análise quantitativa e qualitativa de dois protocolos de obtenção.** 63 p. - Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

MADHURAKKAT PERIKAMANA, S. K. et al. **Frontiers in research for bone biomaterials.** *Dental Implants and Bone Grafts*. [s.l.]: Elsevier Ltd., 2020. 307–332 p. ISBN: 9780081024782, DOI: 10.1016/b978-0-08-102478-2.00013-1.

MARQUES, D. oliveira et al. **Uso do b-tricálcico fosfato no preenchimento de defeitos ósseos peri-implantares.** *Revista Uningá*, [s.l.], v. 56, n° S5, p. 78–86, 2019.

OLSSON, D. C. et al. **Comportamento biológico de matriz scaffold acrescida de células progenitoras na reparação óssea.** *Ciencia Rural*, [s.l.], v. 38, n° 8, p. 2403–2412, 2008. ISSN: 01038478, DOI: 10.1590/S0103-84782008000800051.

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*, [s.l.], v. 37, n° 4, p. 1202–1205, 2007.

PARETSIS, N. F. et al. **Avaliação histológica e histogramorfométrica da regeneração óssea a partir da utilização de biomateriais em tibias de ovinos.** *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, [s.l.], v. 37, n° 12, p. 1537–1544, 2017. ISSN: 16785150, DOI: 10.1590/S0100-736X2017001200029.

PAULA, C. G. De; TRICHÊS, E. S. **Preparation and characterization of β-tricalcium phosphate scaffolds by freeze casting method.** *Ceramica*, [s.l.], v. 64, n° 372, p. 553–558, 2018. ISSN: 16784553, DOI: 10.1590/0366-69132018643722415.

**ROCHA, C. A. Avaliação comparativa da neoformação óssea após enxertia de HA/TCPP, Bio-Oss e osso autógeno associados ou não ao PRP em cirurgias de levantamento de seio maxilar de coelhos.** 178 p. - Universidade de São Paulo, 2015.

**ROSA, A. L.; SHAREEF, M. Y.; NOORT, R. VAN. Efeito das condições de preparação e sinterização sobre a porosidade da hidroxiapatita.** *Pesquisa Odontológica Brasileira*, [s.l.], v. 14, nº 3, p. 273–277, 2000. ISSN: 1517-7491, DOI: 10.1590/s1517-7491200000300015.

**SCHWARZ, F. et al. Guided bone regeneration at dehiscence-type defects using biphasic hydroxyapatite + beta tricalcium phosphate (Bone Ceramic®) or a collagen-coated natural bone mineral (BioOss Collagen®): an immunohistochemical study in dogs.** *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, [s.l.], v. 36, nº 12, p. 1198–1206, 2007. ISSN: 09015027, DOI: 10.1016/j.ijom.2007.07.014.

**SEO, J. Fosfato tricálcico e hidróxido de cálcio no reparo ósseo em coelho. Estudo histológico e histomorfométrico.** 95 p. - São Paulo, 2015.

**SILVA, S. A. et al. Citotoxicidade in vitro de nanopartículas de fosfato tricálcico-β sintetizado via reação em estado sólido.** *Matéria (Rio de Janeiro)*, [s.l.], v. 23, nº 4, p. 12, 2018. ISSN: 1517-7076, DOI: 10.1590/s1517-707620180004.0605.

**SINHORETI, M. A. C.; VITTI, R. P.; CORRER-SOBREINHO, L. Biomateriais na Odontologia: panorama atual e perspectivas futuras Biomaterials in Dentistry: current view and future perspectives.** *Rev assoc paul cir dent*, [s.l.], v. 67, nº 3, p. 178–86, 2013.

**SIQUEIRA, L. C. B. Formulação E Caracterização De Biomateriais Compósitos Com Hidroxiapatita.** 119 p. - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2009.

**SLATER, D. Manual de cirurgia de pequenos animais V.2.** 3 ed. Barueri, SP: Manole, 2007. 2713 p.

**VALIATI, R. et al. Effect of low-level laser therapy on incorporation of block allografts.** *International Journal of Medical Sciences*, [s.l.], v. 9, nº 10, p. 853–861, 2012. ISSN: 14491907, DOI: 10.7150/ijms.4440.

**VARGAS, C. B. Estudo in vivo do comportamento e neoformação óssea de biomateriais acrescidos de plasma rico em plaquetas implantados em calvárias de coelhos.** 86 p. - Universidade do Estado de Santa Catarina, 2018.

**VENDRAMIN, F. S. et al. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de preparo e utilização em cirurgia plástica.** *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, [s.l.], v. 33, nº 1, p. 24–28, 2006. DOI: 10.1590/s0100-69912006000100007.

**VITAL, C. C. et al. Biocompatibilidade e comportamento de compósitos de hidroxiapatita em falha óssea na ulna de coelhos.** *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, [s.l.], v. 58, nº 2, p. 175–183, 2006. ISSN: 01020935, DOI: 10.1590/S0102-09352006000200005.

WILSON, E. M. K.; BARBIERI, C. H.; MAZZER, N. **Estimulação da cicatrização óssea pelo plasma autógeno rico em plaquetas: estudo experimental em coelhos.** *Acta Ortopédica Brasileira*, [s.l.], v. 14, nº 4, p. 208–212, 2006. DOI: 10.1590/s1413-78522006000400006.

YADAV, N.; SRIVASTAVA, P. **Osteoblast studied on gelatin based biomaterials in rabbit Bone Bioengineering.** *Materials Science and Engineering C*, [s.l.], v. 104, nº , p. 8, 2019. ISSN: 18730191, DOI: 10.1016/j.msec.2019.109892.

YAMADA, A. L. M. **Efeito do implante autólogo de plasma rico em plaquetas (PRP) e células tronco mensenquimais na reparação de lesões condrais articulares induzidas experimentalmente em equinos.** 111 p. - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”, 2011.

YIN, W. et al. **Advantages of pure platelet-rich plasma compared with leukocyte- and platelet-rich plasma in promoting repair of bone defects.** *Journal of Translational Medicine*, [s.l.], v. 14, nº 1, p. 1–19, 2016. ISBN: 1296701608259, ISSN: 14795876, DOI: 10.1186/s12967-016-0825-9.

ZAVAGLIA, F. de C. **Síntese, Caracterização e processamento de beta fosfato tricálcico para manufatura de implantes personalizados.** 70 p. - Universidade Estadual de Campinas, 2011.