

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**Proposta de nova metodologia para obtenção de
plasma rico em plaquetas.**

RICARDO SCHMITUTZ JAHN

São Paulo - SP
2002

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**Proposta de nova metodologia para obtenção de
plasma rico em plaquetas.**

RICARDO SCHMITUTZ JAHN

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de Santo Amaro, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Implantodontia

Orientador: Prof. Dr. Wilson Roberto Sendyk

São Paulo - SP

2002

B. B012 3976
Class. 617.69
Cutter J24m
Patri nº
Tipo entrada
Nota Fiscal
Data rec. 1.12.1
Preço
Origem

Jahn, Ricardo Schmitutz

J24m Metodologia para obtenção de plasma rico em plaquetas. Orientação do Prof. Dr. Wilson Roberto Sendyk. São Paulo : 2002.
50p.

Dissertação (Mestrado). Implantodontia.
Faculdade de Odontologia. Universidade de Santo Amaro.

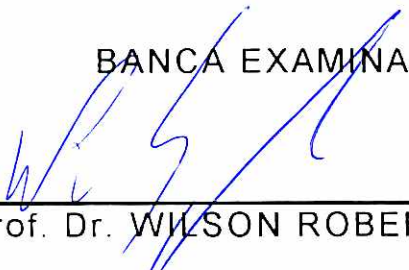
1. Plaquetas 2. Contagem de plaquetas sangüneas 3. Fator de crescimento derivado de plaquetas. I. Título

**Proposta de nova metodologia para obtenção de
plasma rico em plaquetas.**

Ricardo Schmitutz Jahn

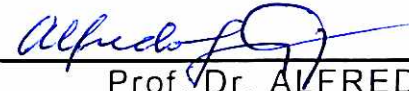
Aprovada em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA



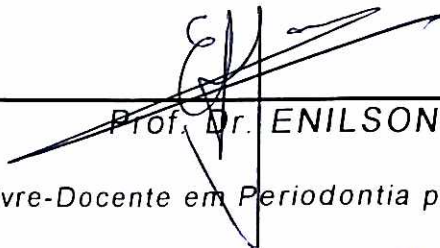
Prof. Dr. WILSON ROBERTO SENDYK

Mestre em Odontologia e Doutor em Periodontia pela F.O.U.S.P.



Prof. Dr. ALFREDO GROMATZKY

Mestre em Odontologia e Doutor em Periodontia pela F.O.U.S.P.



Prof. Dr. ENILSON A. SALLUM

Livre-Docente em Periodontia pela F.O.P. - UNICAMP

CONCEITO FINAL: _____

Aprovado e Louvor

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Anna e Harry
que fizeram de mim um homem
ao me ensinarem, com amor, o caminho da dignidade e da fé.
À minha esposa Rosangela,
levo você em meu olhar, levo você em meu coração.

“Ainda que eu falasse a língua dos homens e dos anjos,
ainda que eu tivesse o dom de profecia
e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência,
e ainda que eu tivesse toda a fé,
de maneira tal que transportasse os montes,
e não tivesse amor,
nada seria”

1 Coríntios 13:1-7

Agradecimentos:

A Deus.

Ao Prof. Dr. WILSON ROBERTO SENDYK, meu mestre e orientador, pelo apoio, incentivo, oportunidades e pelo exemplo que norteia meus ideais profissionais, dedico minha amizade, admiração e respeito.

Às Prof^{as} MARNA COSTA RIBEIRO CARDOSO e CLAUDIA RENATA TORRES, pela amizade, dedicação e empenho nesta pesquisa, minha perene gratidão.

Aos meus companheiros e irmãos de periodontia Prof. DANIEL JONAS LOWCZYK, Prof. ANTONIO LUIZ PRATES LISBOA, ERIC MOTTA PEÇANHA, RACHEL CÉSAR DE A. SANTOS, CARMEM LUQUE, CLEBER KIMURA pelo apoio incondicional em nossas jornadas.

Aos meus amigos e irmãos do Mestrado, em especial aos pioneiros deste curso, Prof^s JOÃO JOSÉ LEME, LUIZ FERNANDO GUIMARÃES, MARTA BROCHADO SCHREIBER, MARIA LÚCIA LEME, MARISE S. SUGA MATUMOTO, CARLOS ALBERTO TAVARES, RONALDO PÍSPICO e ODRAMIR BRUNO BANDETINI que ajudaram a superar as dificuldades, pelo incentivo, mas acima de tudo pela experiência de vida e amizade compartilhada.

Ao Prof. Dr. NEIL FERREIRA NOVO e Prof^a Dr^a YARA JULIANO pela enorme assistência, paciência e carinho.

Ao Prof. Dr. NELSON VILLA, Diretor da Faculdade de Odontologia da UNISA, que iniciou todo o processo do nosso Mestrado.

Ao Prof. Dr. ALFREDO GROMATZKY pelo apoio, paciência e incentivo.

Às minhas amigas JOELY ANGELA O. LEITÃO e MARTA PINTO PEREIRA, pelo apoio e incentivo.

Ao Prof. Dr. JOSÉ LUIZ DE LORENZO, pela amizade consolidada e pela paternal revisão deste trabalho.

Aos membros da disciplina de Periodontia e Implantodontia da UNISA que me apoiaram, colaboraram e facilitaram minhas atividades, ou simplesmente torceram por mim.

À T.H.D. MIRIAM CARLA MENDES e A.C.D. IVANMEIRES A. CARMO, que tanto colaboraram para que nada faltasse a esta pesquisa.

À Faculdade de Biomedicina da UNISA pelo apoio, em especial à Prof^a Dr^a INGRID DRAGAN TARICANO, Prof^a Dr^a GLAUCIA G. MAHANA, Ac. NICOLE KARSOKAS, Prof^a Dr^a MARIA REGINA A. A. OLIVEIRA, Prof. ALEXANDRE STREIT e todos os funcionários dos laboratórios.

À Faculdade de Medicina da UNISA e ao Hospital Geral do Grajaú, em especial à equipe do Prof. Dr. NATALINO ANJULA nas figuras de MARCO ZUCATTO e ALICE HIGASHINAKA, pela paciência e amizade na realização dos exames laboratoriais.

À Universidade de Santo Amaro – UNISA e seus funcionários. E à Reitoria de Pós-Graduação pela oportunidade e pela bolsa a mim concedida.

À Biblioteca Milton Soldani Afonso, e à LUCIANA COSTA, pela sua atenção.

Aos meus pais e minha esposa por compreenderem os momentos de ausência e, ainda, sempre me incentivarem com grande amor.

“É impossível ser feliz sozinho”

Tom Jobim

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	ix
Lista de tabelas	x
Lista de gráficos	xi
Resumo	xii
Abstract	xiii
1 Introdução	1
2 Proposição	2
3 Revista da Literatura	3
3.1. As plaquetas e os fatores de crescimento	3
3.2. Variações nas técnicas de obtenção de PRP	8
3.3. Considerações sobre aplicações clínicas do PRP	14
4 Material e método	19
5 Resultados	23
6 Discussão	27
7 Conclusões	40
Referências bibliográficas	41
Anexo I	47
Anexo II	48
Anexo III	49
Anexo IV	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BMP	= Proteína morfogenética de osso
EGF	= Fator de crescimento epidérmico
FGF	= Fator de crescimento de fibroblastos
FCR	= Força centrífuga relativa
FNT α	= Fator de necrose tumoral alfa
g	= Gravidade
IGF	= Fator de crescimento similar à insulina
IL-1	= Interleucina tipo 1
kDa	= Quilodalton
PDGF	= Fator de crescimento derivado de plaquetas
PPP	= Plasma pobre em plaquetas
PRP	= Plasma rico em plaquetas
rpm	= Rotações por minuto
TGF	= Fator de crescimento e transformação
μ l	= Microlitro
μ g	= Micrograma
$\Delta\%$	= Diferença percentual

LISTA DE TABELAS:

Tabela I :

Amostra de sangue de pacientes ou alunos da Faculdade de Odontologia da UNISA, segundo o número de plaquetas (em milhares/ μ l) observado por terços (superior, médio e inferior) em tubos de centrífuga, após uma centrifugação a 10 minutos, dupla centrifugação, ambas a 10 minutos e dupla centrifugação sendo a 1ª em 10 minutos e a 2ª em 15 minutos.23

Tabela II :

Amostra de sangue de pacientes ou alunos da Faculdade de Odontologia da UNISA, segundo as diferenças percentuais ($\Delta\%$) observadas entre o número de plaquetas/ μ l do sangue total e os obtidos por terços (superior, médio e inferior) em tubos de centrífuga, após uma centrifugação a 10 minutos, dupla centrifugação, ambas a 10 minutos e dupla centrifugação sendo a 1ª em 10 minutos e a 2ª em 15 minutos.24

LISTA DE GRÁFICOS :

Gráfico I :

Amostra de sangue de pacientes ou alunos da Faculdade de Odontologia da UNISA, segundo o número de plaquetas (em milhares/ μ l) observado por terços (superior, médio e inferior) em tubos de centrífuga, após uma centrifugação a 10 minutos, dupla centrifugação, ambas a 10 minutos e dupla centrifugação sendo a 1ª em 10 minutos e a 2ª em 15 minutos.25

Gráfico II :

Amostra de sangue de pacientes ou alunos da Faculdade de Odontologia da UNISA, segundo as diferenças percentuais ($\Delta\%$) observadas entre o número de plaquetas/ μ l do sangue total e os obtidos por terços (superior, médio e inferior) em tubos de centrífuga, após uma centrifugação a 10 minutos, dupla centrifugação, ambas a 10 minutos e dupla centrifugação sendo a 1ª em 10 minutos e a 2ª em 15 minutos.26

RESUMO

O uso do plasma rico em plaquetas (PRP) vem se difundindo, como importante fonte de fatores de crescimento, nos procedimentos cirúrgicos na Odontologia, especialmente na Periodontia e Implantodontia. Os fatores de crescimento mais freqüentemente citados são o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento e transformação (TGF) e fator de crescimento similar à insulina (IGF) que estão contidos nos alfa grânulos das plaquetas.

A proposta deste trabalho foi desenvolver um protocolo para obtenção do PRP com tecnologia simplificada possibilitando seu uso em ambulatório.

A metodologia utilizada para a separação dessas plaquetas do sangue foi desenvolvida utilizando-se de protocolo de dupla centrifugação, sendo a primeira a 200 g por 10 minutos e a segunda a 200 g por 10 ou 15 minutos.

Os resultados mostraram que a técnica de dupla centrifugação é eficiente para a separação de plaquetas no plasma, levando a uma concentração média de plaquetas de 370,2 % no terço inferior do tubo, após a segunda centrifugação por 15 minutos, quando comparado com a concentração de plaquetas no sangue total do indivíduo. Esta metodologia é simples, viável, segura e econômica.

ABSTRACT

In the last 5 years we have seen the widespread use of platelet-rich plasma (PRP), as an important source of growth factors, in surgical procedures in periodontology and implantology. The most frequent growth factors found in literature are platelet derived growth factor (PDGF), transforming growth factor (TGF) and insulin-like growth factor (IGF), that are presents in platelets alfa granules.

A technique aiming to achieve separation of these blood platelets was developed using a double spin protocol, the first at 200 g for 10 minutes and the second for 200 g for 10 or 15 minutes.

The results showed that the double spin technique is very successful to separate the platelets obtaining a concentration of 370,2 %, after the second spin for 15 minutes, when compared to the original platelet count at individual full blood.

1. INTRODUÇÃO

Desde meados da década de 1970, muitos estudos têm buscado modalidades de tratamento que visam estimular e regular o processo de reparação dos tecidos periodontais. Isto se tornou um desafio ainda maior com o advento da Implantodontia moderna e a necessidade de reparar áreas com grandes perdas ósseas. As tentativas de regeneração óssea passaram pela regeneração tecidual guiada com membranas não absorvíveis e absorvíveis, enxertos ósseos autógenos, alógenos e xenógenos, e agentes condicionadores de raízes como ácido cítrico ou tetraciclina (THE AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 1996). Os fatores de crescimento começaram então a ser estudados com a finalidade de melhorar a reparação. Assim, na última década, esforços foram concentrados no entendimento da Biologia molecular e celular e na tentativa de melhor entender os fatores de crescimento, maneiras de obtenção e seu papel na cicatrização e regeneração dos tecidos.

Muitos dos indivíduos que são candidatos à reabilitação bucal através de implantes osseointegrados, não têm osso suficiente para a instalação das fixações de titânio, e nesses casos, é necessária a promoção de crescimento ósseo, nessas situações, o cirurgião pode utilizar-se de vários materiais de enxertia, sejam eles alógenos, autógenos, xenógenos ou sintéticos.

Com o uso do plasma rico em plaquetas (PRP) seria possível utilizarmos material de enxertia do próprio paciente (osso autógeno) ou outros biomateriais misturados com vários fatores de crescimento, como IGF (fator de crescimento similar à insulina), TGF (fator de crescimento e transformação), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), que estão contidos nos alfa (α) grânulos das plaquetas, o que poderia levar a uma melhor reparação óssea, com melhor qualidade de tecido do leito receptor do implante. Apesar disto, os resultados descritos na literatura não são confiáveis por falta de protocolo de obtenção, o que torna a técnica suspeita e as pesquisas ocasionalmente não reproduzíveis; o que torna mais importante nossa proposta de estabelecer uma nova metodologia para obtenção de plasma rico em plaquetas.

2. PROPOSIÇÃO

A nossa proposta é desenvolver metodologia e tecnologia simplificadas para a obtenção de PRP , baixando custos e viabilizando o seu uso em ambiente ambulatorial. Para isto precisamos responder aos seguintes quesitos:

- a) a centrifugação concentra plaquetas ? Qual sua quantidade em relação às plaquetas encontradas no sangue total ?
- b) a dupla centrifugação concentra mais plaquetas ? Qual sua quantidade e eficiência em relação à técnica anterior ?

3. REVISTA DA LITERATURA

3.1 As plaquetas e os fatores de crescimento

Urist , em 1965, afirmou que, onde quer que ocorra a indução óssea, existe um conjunto de células tronco, células osteoprogenitoras e pequenos capilares que são circundados por grandes osteoblastos. Células indiferenciadas móveis são guiadas por fatores teciduais específicos que controlam a migração, agrupamento, translocação e reagrupamento. O autor mostrou que a formação óssea ocorreu em regiões que receberam implantes extraesqueletais de matriz óssea descalcificada no interior de perfurações , e os novos osteoblastos são derivados, não de elementos do tecido doado, mas da proliferação e desenvolvimento de células do hospedeiro.

Sob o ponto de vista de seqüência de reparação de feridas, Knighton *et al.* , em 1982, postularam que a liberação de plaquetas inicia a resposta celular da reparação, sendo responsável pelo início da síntese de colágeno e neovascularização. As plaquetas são as primeiras células a iniciar o processo de reparação de um local ferido (PIERCE *et al.*, 1991).

Slater *et al.* , em 1995, afirmaram que os osteoblastos se apresentam sensíveis à ação de uma grande quantidade de fatores de crescimento, e que alguns destes têm sido isolados de plaquetas que são liberadas localmente em resposta a injúrias. Para estes autores, um meio suplementado de plaquetas estimula a proliferação e mantém a função diferenciada de osteoblastos humanos.

Lind, em 1996, apresentou uma revisão de literatura, na qual mostrou a importância dos fatores de crescimento como ativadores do metabolismo de células ósseas. Esses fatores de crescimento ósseo, que consistem em menos do que 1 % das proteínas não colágenas do ser humano, são produzidos principalmente pelos osteoblastos e incorporados à matriz extracelular durante a formação óssea. Algumas quantidades podem também ser capturadas no soro e incorporadas a essas matrizes. Os fatores de crescimento podem regular a atividade de osteoblastos e osteoclastos durante a remodelação óssea e iniciar e controlar a

reparação após um trauma. Esses fatores estimulam células vizinhas à região injuriada a proliferar e a sintetizar matriz (efeito parácrino). Por outro lado, os osteoblastos que produzem os fatores de crescimento podem se autoestimar, causando uma maior atividade metabólica (efeito autócrino).

A origem dessas plaquetas (trombocitopoese) está nas células-tronco multipotenciais (*stem cells*) que dão origem, por diferenciação, aos megacarioblastos. Estas células possuem a capacidade de proliferação, e assim, aumentam seu volume e geram os promegacariócitos, que maduros chamam-se megacariócitos. O citoplasma destes megacariócitos cresce e se fragmenta ocorrendo assim a liberação de milhares de plaquetas, que são elementos anucleados oriundos da fragmentação citoplasmática dos megacariócitos. Estas plaquetas têm cerca de 2 a 4 μm de diâmetro e uma vida útil no organismo em torno de nove dias. As plaquetas possuem um sistema canalicular de comunicação com o meio externo responsável pela liberação dos grânulos das plaquetas, entre eles os grânulos alfa (α) que contêm os fatores de crescimento (OLIVEIRA, 1998).

As plaquetas têm importante papel no início da reparação de fraturas e também podem ser utilizadas como fonte autóloga de múltiplos fatores de crescimento que aumentam a proliferação de osteoblastos *in vivo* e *in vitro* (SLATER *et al.*, 1995).

Os fatores de crescimento, presentes nas plaquetas, mais freqüentemente citados na literatura são PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), TGF- β (fator de crescimento e transformação beta), IGF (fator de crescimento similar à insulina) EGF (fator de crescimento epidérmico) e; a-FGF e b-FGF (fator de crescimento de fibroblastos ácido e básico respectivamente) (ASSOIAN *et al.*, 1984; SLATER *et al.*, 1995; SOLHEIM, 1998; MARX *et al.*, 1998; ANITUA, 1999). Para MARX (2001) os sete fatores de crescimento encontrados no PRP são PDGF $\alpha\alpha$, PDGF $\alpha\beta$, PDGF $\beta\beta$, TGF β_1 , TGF β_2 , VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e EGF.

Na degranulação, nos locais de fraturas, as plaquetas liberam PDGF, IGF, TGF- β e EGF. Os FGF (fator de crescimento de fibroblastos) são secretados pelos osteoblastos mas não estão presentes nas plaquetas (SLATER *et al.*, 1995).

O período de vida das plaquetas em um ferimento e a direta influência dos fatores de crescimento é menor do que cinco dias (MARX, 1998).

TGF, IGF tipo I (IGF-I), IGF tipo II (IGF-II), PDGF e EGF são liberados sob ativação, adesão ou agregação plaquetária. A mera presença de uma concentração aumentada de fatores de crescimento não é suficiente para resultar em sua incorporação na matriz óssea. O enorme efeito biológico de um pequeno volume de suplemento de plaquetas pode ser o reflexo da interação e, possivelmente, do sinergismo, de múltiplos conteúdos das plaquetas (SLATER *et al.*, 1995)

Os fatores de crescimento são polipeptídeos e funcionam como mediadores biológicos naturais, similarmente a hormônios (TERRANOVA e WIKESJÖ, 1987). São sintetizados por tecidos específicos, no quais, em muito baixa concentração, vão agir como reguladores locais das funções celulares. Estes fatores provocam sua ação ao aderirem a grandes receptores específicos na superfície celular de células alvo (LIND, 1996; SOLHEIM, 1998; PADGETT e PATTERSON, 2001). Aderindo à porção extracelular destes receptores ativam, na porção intracelular, suas enzimas. Estas enzimas ativam uma cascata que leva à transcrição do gene em um RNAm (RNA mensageiro) que é então traduzido em proteínas que podem ser utilizadas pela célula ou exportadas (SOLHEIM, 1998; PADGETT e PATTERSON, 2001). Geralmente o número de receptores ativos de uma célula diminui quando um fator de crescimento está em excesso (regulação para menos), enquanto eles aumentam quando há uma deficiência de fatores (regulação para mais) (SOLHEIM, 1998). Os receptores de membrana já haviam sido descritos em 1991, por Pierce *et al.* para as formas de PDGF.

Lynch *et al.*, em 1989, apresentaram estudo em que utilizaram cães com lesões periodontais e aplicaram PDGF purificado e IGF-I recombinante humano e encontraram histologicamente reparação periodontal, inclusive com nova formação de cemento, após duas semanas, indicando que esses fatores de crescimento têm um significativo potencial para a regeneração periodontal.

Lynch *et al.*, em 1991b, apresentaram outro trabalho realizado com 13 cães da raça Beagle nos quais aplicaram, em defeitos periodontais, os fatores de crescimento PDGF-B (fator de crescimento derivado de plaquetas tipo B) e IGF-I marcados com iodo radioativo e relataram a formação de novo osso, novo cimento e novo ligamento. Concluíram que o uso desses fatores estimula uma rápida osteogênese e que uma única aplicação durante o procedimento cirúrgico pode estimular a regeneração do aparato de inserção periodontal, incluindo cimento, com inserção de fibras colágenas e osso alveolar durante a fase inicial da reparação. Os autores citaram a importância deste fato para cirurgias de instalação de implantes dentários, instalação de próteses ortopédicas e remoção de cistos e tumores. Neste estudo também mostraram, por acompanhamento dos fatores com marcadores radioativos, que a meia vida, no local da aplicação, do IGF-I é de três horas enquanto que para o PDGF-B é de 4,2 horas. Esses níveis caem lentamente após 10 horas e, após 48 horas, restam aproximadamente 7% dos fatores marcados. Menos do que 4% do PDGF marcado permanece após 96 horas. Não existia nenhuma proteína marcada detectável após duas semanas de aplicação. Esses achados sugerem que os fatores de crescimento desencadeiam o processo de reparação, que continua, mesmo após sua ausência.

Lynch *et al.*, (1991a), em outro estudo, avaliaram o uso de PDGF-B e IGF-I em oito cães da raça Beagle e concluíram que a combinação de fatores de crescimento PDGF-B e IGF-I estimula a regeneração óssea ao redor de implantes de titânio de pressão na fase inicial de reparação até 21 dias e que o uso clínico destes fatores pode levar a uma osseointegração melhor e mais rápida, principalmente em locais de deficiência de densidade óssea.

A partida no início do processo de regeneração óssea é dada com a liberação de PDGF e TGF- β pela degranulação das plaquetas no enxerto (PIERCE *et al.*, 1991). O PDGF estimula a mitogênese das células tronco da medula e dos osteoblastos do endóstio, transferidos no enxerto, aumentando em várias vezes o seu número. Também inicia a angiogênese no interior do enxerto pela indução de mitose de células endoteliais (MARX *et al.*, 1998), porém não altera a seqüência normal da reparação, mas aumenta o padrão e a quantidade de deposição de matriz,

resultando em reparação mais rápida, sendo o mais potente agente mitogênico de células de origem mesenquimal (PIERCE *et al.*, 1991).

O PDGF é um dímero de dois peptídeos, A e B, que compartilham 60 % da cadeia de aminoácidos homólogos. Seu peso molecular varia de 28 a 35 kDa (quilodaltons). Age como fator de crescimento sistêmico e como fator de crescimento local no osso, especialmente na forma PDGF-AA. Esses PDGF são sintetizados pelas plaquetas, monócitos, macrófagos e células endoteliais e influenciam a maioria das células de origem mesodérmica. Duas subunidades de receptores de PDGF têm sido demonstradas, alfa e beta, e a ativação de ambas é necessária para que ocorra uma máxima resposta. Interleucina tipo-1 (IL-1), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e TGF- β 1 afetam a agregação de PDGF aos seus receptores (CANALIS *et al.*, 1992; SOLHEIM, 1998). O PDGF age como importante fator quimiotático para células mesenquimais (LIND, 1996; LORENZ *et al.*, 2001).

O TGF- β inicialmente ativa os fibroblastos e preosteoblastos à mitose e aumenta seu número, bem como promove sua diferenciação no sentido de se transformarem em osteoblastos maduros e funcionais. A extensão da reparação e a atividade de regeneração óssea são acompanhadas de dois mecanismos. O primeiro é o aumento da transformação de células tronco da medula em osteoblastos, que também secretam TGF- β . O segundo e mais dominante mecanismo é a quimiotaxia e ativação de macrófagos que substituem as plaquetas como principal fonte de fatores de crescimento a partir do terceiro dia (MARX *et al.*, 1998).

Os TGF- β formam uma superfamília de fatores de crescimento e são encontrados em grande quantidade nas plaquetas e osso (LIND, 1996) macrófagos, fibroblastos e queratinócitos (LORENZ *et al.*, 2001). Entre eles estão as BMP (proteínas morfogenéticas de osso), que não são encontradas nas plaquetas (LIND, 1996). Os TGF- β são homodímeros com 25 kDa que compartilham 60 a 80 % de similaridade em suas cadeias de aminoácidos (SOLHEIM, 1998). Os TGF- β influenciam, em pequenas doses, vários tipos de tecidos geralmente estimulando células de origem mesenquimal e inibindo células de origem ectodérmica (LIND, 1996).

Os TGF- β são produzidos pelos osteoblastos e armazenados na matriz óssea, fazendo do osso seu maior reservatório. Os osteoblastos têm o maior número de receptores para TGF- β . Os TGF- β melhoram a reparação em defeitos criados experimentalmente em crânios de coelhos e aumentam o crescimento ósseo ao redor de hastes de titânio poroso (SOLHEIM, 1998).

A família dos FGF consiste de nove membros de estruturas similares de polipeptídeos. Os mais comuns e abundantes no ser humano são as formas ácida (a-FGF) e básica (b-FGF), que têm 16 e 17 kDa de peso molecular, respectivamente, e aderem ao mesmo receptor. Parecem estar relacionados com processo de reparação normal (SOLHEIM, 1998). Possuem atividade mitogênica para células de origem mesodérmica e neuro-ectodérmica e efeito proliferativo sobre os osteoblastos; assim, provavelmente aumentam a formação óssea pelo aumento do número de células osteocompetentes. O b-FGF estimula a síntese de TGF- β pelos osteoblastos e também tem propriedades angiogênicas (LIND, 1996).

Os IGF podem ser do tipo I (IGF-I) ou II (IGF-II) com peso molecular de 7,5 e 8,7 kDa respectivamente. São produzidos por diferentes tipos de células, incluindo osteoblastos. IGF-II é o fator de crescimento encontrado em maior concentração na matriz óssea. IGF-I e II são encontrados em tecido de granulação, e em fraturas ósseas em reparação, o que suporta seu papel como fator de regulação local desses processos. O IGF-I está relacionado ao recrutamento e proliferação de células mesenquimais e o IGF-II é ativado mais tarde, no início do processo de calcificação óssea (SOLHEIM, 1998).

3.2 Variações nas técnicas de obtenção de PRP

Hartman *et al.*, (1992) descreveram método para obtenção de gel de fibrina para uso em cirurgia cardiovascular. É obtido de 60 a 180 ml de sangue venoso do paciente e acondicionado em seringas individuais de 60 ml contendo 0,5 ml de citrato de sódio a 46,7 %. A seringa é então tampada e imobilizada em posição invertida para aguardar a sedimentação dos componentes celulares durante o procedimento cirúrgico. Quando necessário para utilização, todo o plasma, menos a porção *buffy-*

coat (camada leuco-plaquetária) é colocado em separado em uma seringa de 30 ml. Uma segunda seringa é preparada contendo aproximadamente 20 a 40 U/ml de trombina bovina em adição a 0,04 ml de cloreto de cálcio a 10% por mililitro da solução. A preparação do gel de fibrina autóloga é criada pela aplicação do conteúdo das duas seringas. A camada *buffy-coat* de plasma próxima à interface de células vermelhas é descartada para evitar uma possível fibrinólise por elementos celulares. Para os autores, este método de obtenção é rápido, barato, seguro e promove um efeito hemostático adicional e não tem risco de transmissão de doenças.

O processo de separação, ou fracionamento, dos diversos componentes sangüíneos é realizado freqüentemente por centrifugação. A separação se baseia na diferença da densidade específica dos seus componentes. Para produzir plasma com o mínimo possível de células, é necessária a aplicação de uma força centrífuga relativa (FCR) forte, de cerca de 4750 g, por seis minutos ou, alternativamente, 3000 g por 10 minutos. Ao aplicar-se uma força centrífuga relativa muito intensa e/ou tempo muito longo, as plaquetas contidas no PRP podem formar agregados irreversíveis, comprometendo de modo definitivo a eficácia do componente. Para que o sangue seja processado em concentrado de plaquetas, deve ser coletado preferencialmente em até oito minutos e preparado no menor intervalo de tempo possível, de preferência, entre quatro e seis horas (FERREIRA e AMORIM FILHO, 2000). Porém os mesmos autores afirmam que para a separação de plaquetas, o componente pode ser preparado em até vinte horas, sem prejuízo da qualidade, desde que condicionado adequadamente à temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Para uso em transfusão, a validade das plaquetas pode ser de três a cinco dias. Não conservar as plaquetas, em nenhuma hipótese, em geladeira. Temperaturas abaixo de 20°C ativam de forma irreversível as plaquetas.

A técnica utilizada por Slater *et al.*, em 1995, utiliza duas centrifugações. A primeira a 700 g por 10 minutos para deposição de células vermelhas e brancas e a segunda a 300 g por 20 minutos para a obtenção de um botão de plaquetas.

Marx *et al.*, (1998) apresentaram um estudo mostrando a técnica de obtenção do PRP, sua aplicação clínica e resultados. Esta técnica de obtenção do PRP, que já havia sido proposta por Whitman, Berry e Green, em 1997, utiliza um separador celular por gradiente de densidade (Electro Medics 500) em que se obtém 400 a 450 ml de sangue do paciente e por centrifugação em duas etapas a 5600 rotações por minuto (rpm) e a 2400 rpm, são separadas as células vermelhas do PRP e do plasma pobre em plaquetas (PPP). Os autores, preconizam a captura da porção superior das células vermelhas do sangue (o que dá um aspecto avermelhado ao PRP), justificando que as plaquetas mais recentemente sintetizadas e de maior atividade estão presentes nesta região. Após a separação do PRP, as células vermelhas e a porção pobre em plaquetas do plasma são devolvidas à circulação do paciente. A geleificação é feita com uma mistura pré-manipulada de 10 ml de cloreto de cálcio a 10 % com 10.000 U.I. de trombina bovina. Essa mistura é acrescentada ao PRP na proporção de 1ml para 6 ml de PRP. Após seis a dez segundos de agitação, o PRP torna-se um gel. A contagem das plaquetas aferida pelos autores mostra um aumento na concentração em média de 338 % comparado à contagem no sangue total. Whitman, Berry e Green (1997); e Whitman e Berry (1998), justificaram o uso de trombina, pois esta ativaria as plaquetas que liberariam seus fatores para iniciar o processo de formação de coágulo de fibrina. Para Radosevich, Goubran e Burnouf (1996), a trombina quebra as cadeias da molécula de fibrinogênio, levando à formação de monômeros de fibrina. Estes monômeros se polimerizam com pontes de hidrogênio e reações eletrostáticas, formando uma estrutura tridimensional com aparência de gel. O fator XIII, após sua ativação em fator XIIIa pela trombina em presença de íon cálcio, liga as fibras das moléculas de fibrina levando à formação de um coágulo estável (insolúvel e não friável).

Fijnheer *et al.* (1990) mostraram a ativação das plaquetas em estudo com anticorpos monoclonais específicos para glicoproteínas expressadas em sua membrana durante a degranulação dos alfa-grânulos. Afirmaram, também, que o uso de trombina estimularia a adesão de anticorpos monoclonais (marcadores de ativação) durante a estocagem de plaquetas para fins de transfusão e consideraram esta ativação como desvantagem para tal fim. Explicaram, ainda, que a contínua ativação das plaquetas pode levar à sua deteriorização. As plaquetas ativadas têm

formato esférico e esta condição pode ser reversível, após dois dias, indicando a recuperação das plaquetas que voltam a ter formato discóide. Para os autores, a obtenção de plaquetas por técnicas de centrifugação já confere a estas uma forma esférica, bem como sua ativação, além da liberação de tromboglobulina que também estaria envolvida em seu processo de ativação.

Withman e Berry (1998), afirmaram que as plaquetas levadas pelo gel ao local da cirurgia devem ser ativadas e liberar seus fatores de crescimento no local cirúrgico.

As plaquetas separadas pela centrifugação mostraram intensa resposta em teste com anticorpos monoclonais para os fatores de crescimento PDGF e TGF- β . Isto confirma a presença e retenção destes fatores na preparação do PRP (MARX *et al.*, 1998).

Anitua (1999), preocupado com a utilização do PRP em ambiente ambulatorial descreveu uma técnica simplificada de obtenção de plaquetas. Alguns minutos antes de iniciar o procedimento cirúrgico e antes da realização de anestesia, 10 a 20 ml de sangue são coletados em tubos de 5,0 ml que contêm solução de citrato de sódio a 10 % como solução anticoagulante. Os tubos são centrifugados a 160 g por seis minutos em temperatura ambiente. O sangue é assim separado em três porções básicas: células vermelhas, plasma rico em fatores de crescimento e plasma pobre em fatores de crescimento. A porção pobre em fatores de crescimento do plasma é descartada. O plasma remanescente é então colhido, incluindo 1 ou 2 mm, mais superiores, da parte de células vermelhas do sangue e transferido para tubos de Eppendorf. 50 μ l de cloreto de cálcio a 10 % são adicionado a cada tubo contendo 1,2 ml de plasma rico em fatores de crescimento. Após 15 a 20 minutos é formado um gel que deveria preencher o defeito cirúrgico em 5 a 10 minutos. O autor mostra a técnica como uma vantagem para o paciente, pois traz benefícios sem riscos de infecção ou transmissão de doenças.

Venturelli (1999), utilizou um protocolo de obtenção de PRP em uma única centrifugação de 16 ml sangue colhido em uma seringa contendo 4 ml de citrato de sódio, em 800 a 1000 rpm durante 15 minutos. O autor afirmou que, para a

geleificação. é necessário o uso cloreto de cálcio e trombina. porém recomendou o uso de trombina autógena que pode ser obtida da seguinte forma: separam-se 4 a 5 ml de PRP da suspensão total obtida e se agregam 2 ml de cloreto de cálcio. Após 45 minutos se obtém a formação de um coágulo que deve ser espremido em uma gaze estéril. As gotas recuperadas contêm trombina ativa. O autor descreveu ainda a reparação óssea ao redor de implantes em que foi utilizado o PRP e comprovou maior aumento de formação óssea nos sítios onde foi aplicado o PRP.

Landesberg, Roy e Glickman, em 2000, testaram a metodologia de dupla centrifugação para obtenção de PRP com FCR de 100 e 200 g na primeira centrifugação de dois a 20 minutos e FCR de 100, 200, 250 e 400 g pelo tempo de dois a 10 minutos. Com esta pesquisa demonstraram que a maior concentração de plaquetas se dá quando utiliza-se FCR de até 200 g e por 10 minutos. Forças de 250 g resultam em agrupamento das plaquetas que não pode ser desfeito. Baseados nestes resultados sugeriram que todo preparo de PRP deve ser conduzido em FCR = 200 g em 10 minutos cada centrifugação. Os autores mostraram, ainda, que a coleta de sangue em tubos contendo EDTA não mantém a integridade das plaquetas e que os fatores de crescimento PDGF e TGF- β estão presentes na porção do plasma que contém plaquetas e, em muito baixa concentração, na porção de plasma livre de plaquetas. Apresentam, também, um preparado chamado por eles de ITA, cuja fórmula não foi descrita, que realizaria a geleificação do PRP tão rapidamente quanto a trombina e assim propuseram a substituição desses produtos.

Sonnleitner, Huemer e Sullivan (2000), mostraram uma técnica de obtenção de PRP com dupla centrifugação sendo a primeira a FCR = 160 g por 20 minutos e a Segunda, por 15 minutos a FCR = 400 g. Os autores denominaram plasma pobre em plaquetas (PPP) a porção superior do plasma e PRP a porção inferior do plasma.

Encinas *et al.* (2000) também apresentaram metodologia simplificada de obtenção de PRP na qual após coleta de 40 ml de sangue em oito tubos contendo citrato de sódio, estes eram centrifugados a 1000 rpm por 10 minutos. Eram pipetados apenas 500 μ l do terço inferior da porção de plasma de cada tubo, totalizando 4,0 ml de

PRP que recebiam 200 ml de cloreto de cálcio a 10 %. A mistura era então levada ao banho-maria a 37 ° C por 11, minutos formando o gel que pode ser levado à área cirúrgica.

Lozada *et al.* (2001) utilizaram dois métodos para obtenção de PRP com centrifugas eletrônicas conhecidas como "Dideco compact advanced" e "Harvest smartPReP". Ambas são centrifugas com microprocessadores que executam automaticamente o processo de dupla centrifugação e separação em dois estágios. Primeiro, o plasma do sangue e depois, a concentração de plaquetas no plasma. Na centrífuga "Dideco" inicia-se com um volume de 200 a 250 ml de sangue e, na "Harvest smartPReP", com 60 ml . Ambas as técnicas utilizam cloreto de cálcio e trombina para geleificação.

Marx (2001) afirmou que as centrifugas de laboratório não são adequadas para obtenção de PRP, pois não produzem quantidade suficiente de plaquetas, podem danificá-las e usam tubos pirogênicos. Além disso, não possuem a aprovação do órgão americano responsável pela sua vigilância, a FDA (Food and Drug Administration) para esta utilização.

Weibrich *et al.* (2002) compararam a contagem de plaquetas, por contagem eletrônica em sangue total, do PRP obtido em banco de sangue, com máquina de plasmaférese e do PRP obtido com centrífuga compacta. Mostraram que com a técnica de separação automatizada, o aumento na concentração de plaquetas é de aproximadamente cinco vezes (média de 1.366.000/ μ l), enquanto que com centrifugação o aumento foi de aproximadamente 3,5 vezes (média de 958.000/ μ l) partindo de um valor inicial médio de 255.170/ μ l. A técnica utilizada para o uso da centrífuga compacta utilizou duas centrifugações sendo a primeira a 2.400 rpm por 10 minutos e a segunda a 3.600 rpm por 15 minutos.

Para Marx, em 2000, o uso de anticoagulantes, como citratos, que não alterem as propriedades das plaquetas, é importante, uma vez que os fatores de crescimento são ativamente extrusados das plaquetas durante a exocitose. Durante este processo, ocorre a conclusão da molécula da proteína e a formação de sua estrutura

terciária. A fragmentação das plaquetas pode até liberar mais fatores de crescimento, porém a estrutura terciária destes estará alterada e, assim, sua atividade e efetividade serão reduzidas. O autor afirmou que PRP não é simplesmente a metade inferior do plasma, mas representa apenas algo como 20% do total da fração do plasma que contém um verdadeiro concentrado de plaquetas. O PRP deve concentrar aproximadamente 400% a contagem de plaquetas comparada ao sangue periférico, quando contado em um "Coulter counter" (contador de células eletrônico). O clínico não deve esperar mais do que 10% do volume de sangue obtido ser um verdadeiro PRP. Quanto à geleificação do PRP com trombina bovina, afirmou que a purificação do produto reduziu a presença de contaminantes de fator V a menos do que 0,2 μ g/ml.

Já em 2001 o mesmo autor afirmou, em tom de definição, que PRP é a concentração de pelo menos 1.000.000 de plaquetas por μ l de plasma em um volume de 5 ml e que não existiriam evidências que justificassem melhor reparação se não fosse alcançada essa contagem.

3.3 Considerações sobre aplicações clínicas do PRP

Knighton *et al.*, em 1986, apresentaram o uso de gel de plaquetas, obtido por centrifugação a 135 g por 20 minutos, em pacientes com ferimentos que não epitelizavam e mostraram que a aplicação de plaquetas topicamente sobre essas lesões estimulava a formação de tecido de granulação e acelerava a epitelização.

Ksander *et al.*, (1990) também mostraram a aceleração no processo de reparação de ferimentos em animais e atribuíram tal fato à liberação de PDGF e TFG- β e outros possíveis fatores de crescimento que atuariam com efeito sinérgico melhorando a reparação.

Rosenberg e Torosian, em 2000, apresentaram casos clínicos de elevação de assoalho de seio maxilar com o uso de PRP obtido pela técnica proposta por Marx *et al.* (1998), associado a materiais autógeno, alógeno ou xenógeno e realizaram a instalação dos implantes após apenas quatro meses. Após mais três meses foram

realizadas radiografias periapicais e panorâmicas para determinar se havia ocorrido adequada formação óssea e então as próteses foram instaladas. Os autores discutiram sobre o uso de trombina bovina ou trombina humana e deram preferência à humana, uma vez que a aplicação tópica de trombina bovina pode levar à hipersensibilidade. Outra possível complicação é o desenvolvimento de coagulopatias relacionadas aos fatores V e X da cascata de coagulação. Landesberg *et al.* (1998) alertaram para o risco do uso de trombina e explicaram que os preparados com trombina bovina contem fator V, resultando na estimulação do sistema imunológico quando apresentado a esta proteína. Assim, uma deficiência no fator V pode se apresentar devido a uma reação cruzada dos anticorpos contra o fator V bovino e humano. Este fenômeno não é dose-dependente, o que tem levado muitos cirurgiões (neurocirurgiões e cirurgiões cardiovasculares) a evitar seu uso. Para Christie, Carrington e Alvin (1997), a trombina bovina deve ser submetida a um processo de purificação que diminua os níveis de concentração de fator V a aproximadamente 0,2 µl/ml. O uso de trombina bovina impura pode desenvolver anticorpos contra o fator V bovino e, conseqüentemente, por reação cruzada, causar uma deficiência no fator V humano que pode ser severa o suficiente para induzir um excessivo sangramento e até a morte. Estas complicações ocorreriam em indivíduos foram submetidos a procedimentos cirúrgicos prévios com uso de trombina bovina.

Park *et al.* (1995) e Cho, Lin e Genco (1995), propuseram uma nova técnica chamada por eles de regeneração tecidual guiada modulada por PDGF, que consiste em usar fator de crescimento PDGF recombinante humano associado à membrana de politetrafluoretileno expandido (PTFE-e), em cães Beagle; mostraram histologicamente, a ocorrência de formação de novo osso, de novo ligamento e de novo cimento após 11 semanas. Já Garg, Garganese e Peace (2000) propuseram o uso de PRP para hidratar a membrana usada na regeneração óssea guiada, justificando seu uso pela grande concentração de fibrina e fatores de crescimento, entre eles PDGF e TGF- β que levariam a uma reparação mais rápida e efetiva.

Whitman e Berry (1998) apresentaram o uso do gel de plaquetas como importante meio para aglutinar enxerto ósseo e leva-lo em posição durante a cirurgia, assim como a liberação de fatores de crescimento.

Stefani *et al.*, em 1999, em revisão de literatura, apresentam PDGF e IGF como os principais fatores de crescimento e as BMPs para uso em implantodontia. Stefani *et al.*, em 2000, realizaram estudo em cães Mongrel nos quais instalaram implantes com aplicação de gel de metilcelulose contendo PDGF e IGF (ambos recombinantes humanos) e concluíram que a combinação e associação destes fatores com a instalação de implantes têm papel ativo nas fases iniciais da reparação óssea.

Kassolis, Rosen e Reynolds, em 2000, apresentaram estudo em humanos no qual realizaram procedimentos de elevação de assoalho de seio maxilar e aumento de rebordo, utilizando osso alógeno liofilizado em combinação com PRP. Em biópsias obtidas após quatro e cinco meses mostraram a formação óssea nas regiões que receberam enxertos. Concluíram, baseados em seus achados clínicos e histológicos, que o uso de PRP com osso liofilizado alógeno é uma terapêutica viável para preparo de áreas para receber implantes.

Yi, Yang e Kwon (2002) realizaram 48 implantes na tíbia de 12 coelhos e avaliaram a formação óssea após um a oito semanas. Mostraram que o grupo teste (com uso de PRP) apresentava maior contato entre novo osso e o implante do que o grupo controle. Seus achados implicam em que o PRP pode levar a uma reparação óssea inicial mais rápida levando a uma estabilidade secundária do implante mais rapidamente, especialmente em locais de osso de pobre qualidade.

Petrungaro (2001) advogou o uso de PRP como fonte de fatores de crescimento para a Implantodontia e Periodontia. Afirmou que o seu uso em cirurgias periodontais estéticas, bem como ao redor de implantes saudáveis e doentes, proporciona rápida e efetiva reparação. Cirurgias de elevação do assoalho de seio maxilar, enxertos de tecido ósseo em bloco ou particulado, extração e instalação imediata de implantes, enxerto gengival livre e interposto de conjuntivo também têm a indicação do uso de PRP. O autor justificou, ainda, a indicação de uso em pacientes idosos, afirmando que estes possuem menos células mesenquimais indiferenciadas e, portanto, teriam melhor benefício com os fatores de crescimento. O uso em pacientes idosos também é indicado por Tischler (2002).

Robiony *et al.* (2002) utilizaram o PRP obtido por técnica de dupla centrifugação, sendo a primeira por 15 minutos a 200 g e a segunda por 15 minutos a 560 g. O PRP foi misturado a osso autógeno obtido do osso ilíaco e utilizados em procedimentos de distração osteogênica na mandíbula. Os autores indicam a ativação do processo de expansão após 15 dias a partir da data da instalação do distrator e a instalação dos implantes após 60 dias de consolidação e encorajam a aplicação desta técnica na mandíbula.

Petrungaro (2002a) apresentou dois casos clínicos em que utiliza o PRP como parte do tratamento em implantes imediatos e com carga imediata. Propôs o uso de PRP associado a materiais de enxertia, para molhar o implante antes de sua instalação e como membrana. A porção pobre em plaquetas do plasma também é utilizada, sobre o enxerto de biomaterial associado ao PRP, como membrana e sobre a cirurgia fazendo o efeito de um cimento cirúrgico natural.

Em outro trabalho, Petrungaro (2002b) apresenta três casos clínicos de recobrimento radicular, em situações de recessão gengival, utilizando PRP associado a enxerto de tecido conjuntivo, em dois casos, e membrana de colágeno, em um caso. Apresentou o uso do PRP como um benefício por diminuir sangramento nas áreas doadora e receptora, diminuir a incidência de dor, ajudar na estabilização inicial do enxerto pelas propriedades coesivas e adesivas do PRP, promover rápida revascularização e diminuir o potencial de infecção pós-operatória.

Lekovic *et al.* (2002) sugeriram o uso de PRP em pacientes periodontais. Em estudo realizado em humanos com periodontite avançada e defeitos ósseos interproximais, utilizaram as combinações de PRP + osso bovino poroso mineralizado + regeneração óssea guiada e de PRP + osso bovino poroso mineralizado. O PRP foi obtido em uma centrifugação única de 5600 rpm por seis minutos. Em procedimento de reabertura cirúrgica, após seis meses notaram que os defeitos eram preenchidos de maneira similar, com ganho de inserção e concluíram que ambas as associações são efetivas no tratamento de defeitos intra-ósseos presentes em pacientes com periodontite crônica avançada.

Man, Plosker e Winland-Brown, em 2001, descreveram o uso de plasma pobre em plaquetas e de plasma rico em plaquetas em procedimentos de cirurgias estéticas com retalhos como levantamento de face, mamoplastias, abdominoplastias e lipoesculturas resultando em algumas vantagens como redução do tempo operatório, eliminação da necessidade de drenos, redução da necessidade de bandagens, e diminuição da dor e edema pós-operatórios, além da melhora na reparação devido a presença de fatores de crescimento e citocinas presentes nas plaquetas. O uso de PRP após o uso de laser para reepitelização resulta em reparação mais rápida e menor rubor. Para eles o uso de PRP e PPP leva a uma excelente hemostasia, já que a fibrina mimetiza os últimos estágios da cascata de coagulação (conversão de fibrinogênio em fibrina) levando à formação de um coágulo estável. O uso de um gel muito denso pode impedir o acesso das plaquetas, com seus fatores de reparação, ao local da ferida.

4. MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizadas amostras de sangue de 33 indivíduos, de ambos os generos, de 22 a 80 anos de idade. Os indivíduos foram informados verbalmente e por escrito sobre o sigilo de sua participação neste estudo, sobre os procedimentos a serem realizados e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (anexos II e III). O projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade de Santo Amaro (anexo IV).

Foram excluídos da pesquisa quaisquer indivíduos que apresentassem distúrbios sangüíneos e hemorrágicos conhecidos, bem como o uso de medicamentos, especialmente os anti-inflamatórios não hormonais, como a aspirina, que inviabiliza o preparo de concentrado de plaquetas, já que estas drogas alteram, de modo irreversível, a função plaquetária (FERREIRA e AMORIM FILHO, 2000).

Por punção venosa, das veias cubital mediana ou cefálica no antebraço, com um sistema de coleta de sangue tipo "Vacutainer" ¹ obtivemos 27 ml de sangue de cada indivíduo em seis tubos de 5,0 ml contendo 0,5 ml de anticoagulante citrato de sódio a 3,2 % tamponado ¹ (Fig. 1). Do primeiro tubo retiramos 1000 µl (1ml) de sangue para a contagem de plaquetas, após homogeneização da amostra, realizamos a contagem em um Coulter® MAXM analyzer ² que nos fornece o número de plaquetas (em milhares/µl). Os tubos contendo sangue foram centrifugados³ com uma força centrífuga relativa (FCR) de 200 g durante dez minutos. Após esse tempo, retiramos os tubos da centrífuga e notamos a separação do plasma e leucócitos (parte superior do tubo, de cor clara) das células vermelhas do sangue (parte inferior do tubo, de cor vermelha)(Fig.2). Aspiramos do segundo tubo toda a porção de plasma por terços para, após homogeneização, realizarmos a contagem de plaquetas, conforme descrito acima. Assim tivemos a possibilidade de contar as plaquetas nos terços superior, médio e inferior do plasma obtido pela primeira centrifugação. Todas as partes de plasma dos outros cinco tubos foram

¹ Becton Dickinson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, NJ

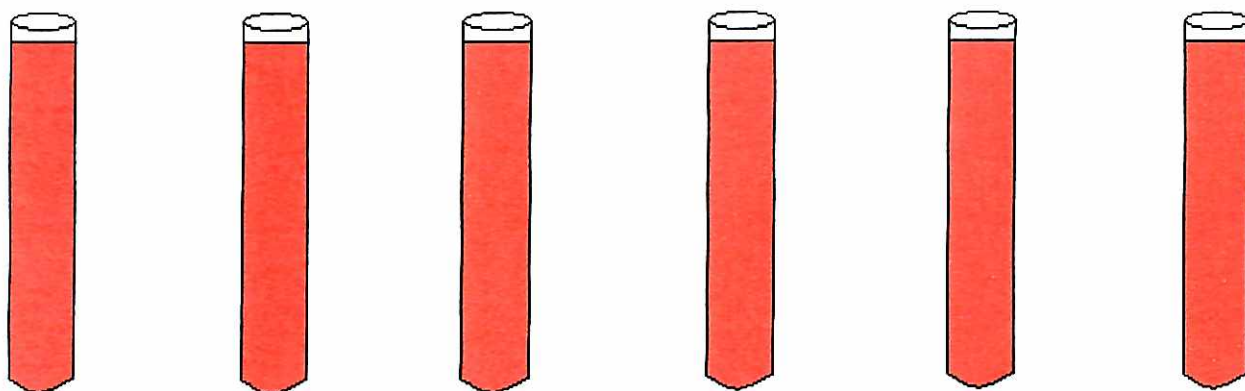
² Coulter corporation , Miami, FL

³ Centrífuga CELM mod. SIN-1200, São Paulo – SP

aspiradas com o auxílio de uma seringa de 3,0 ml⁴ e levadas a dois tubos estéreis sem anticoagulante ou qualquer outro aditivo, chamados tubos “secos”. Estando os novos tubos preenchidos e equilibrados com a mesma quantidade de plasma submetemos um deles a novo processo de centrifugação durante dez minutos em FCR = 200 g (JAHN, JAHN e SENDYK, 2002) e, outro, a novo processo de centrifugação durante 15 minutos em FCR = 200 g (Fig. 3). De cada um destes tubos a porção superior, média e inferior, visualizadas com o auxílio de uma régua transparente, foram coletados com o auxílio de uma micropipeta⁵, para contagem de plaquetas, também após homogeneização. Assim foram comparadas as contagens de plaquetas no sangue total e em cada fração após uma centrifugação de 10 minutos e após a segunda centrifugação em 10 e 15 minutos.

FIGURA 1

Foram obtidos 6 tubos de 4,5 ml de sangue de cada indivíduo. De um dos tubos foi colhido 1,0 ml para contagem de plaquetas no sangue total.

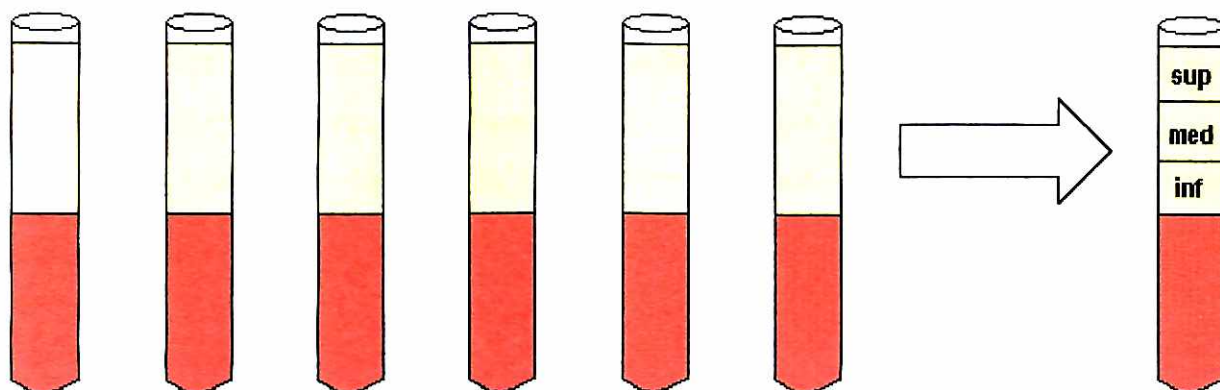


⁴ BD Plastipak 22G 1 1/4 0,70X30 Curitiba - PR

⁵ Biohit proline 100-1000 µl Helsinki, Finlândia

FIGURA 2

Os tubos foram então centrifugados por 10 minutos em FCR = 200 g, ocorrendo a separação das células vermelhas, dos leucócitos e plasma.

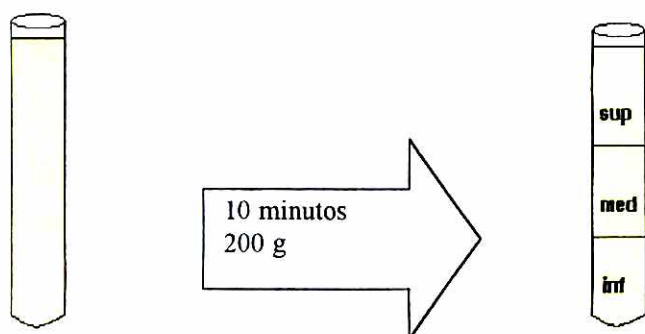


De um dos tubos foram coletados separadamente o terço superior, médio e inferior do plasma para contagem de plaquetas em cada fração do plasma.

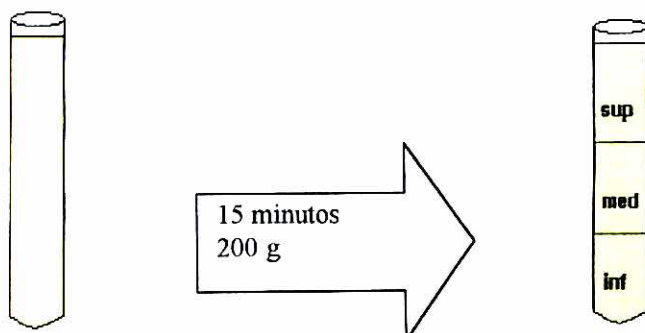
FIGURA 3

Dos outros tubos foi separado todo o plasma, para a segunda centrifugação. Assim obtivemos dois tubos apenas com plasma.

O primeiro foi submetido à segunda centrifugação por 10 minutos em 200g.



O segundo foi submetido à segunda centrifugação por 15 minutos em 200g.



As frações do plasma foram capturadas por terços para nova contagem de plaquetas, permitindo assim a comparação do efeito das centrifugações por fração do plasma em relação ao tempo.

O seguinte método estatístico foi utilizado:

Para análise dos resultados foram aplicados testes não paramétricos, levando-se em consideração a natureza das variáveis estudadas.

Foram aplicados os seguintes testes:

- 1- Análise de variância, por postos, de Friedman (SIEGEL e CASTELLAN, 1988), com o objetivo de comparar, em separado para cada tempo de centrifugação, o número de plaquetas observado nos terços superior, médio e inferior de cada tubo. Para realizar essa análise, utilizou-se a diferença percentual ($\Delta\%$) observada entre o número de plaquetas do sangue total e o respectivo número, após cada uma das centrifugações, por terços.

Para o cálculo da $\Delta\%$, aplicou-se a fórmula:

$$\Delta\% = \frac{\text{número de plaquetas}/\mu\text{l no terço} - \text{número de plaquetas}/\mu\text{l no sangue total}}{\text{número de plaquetas}/\mu\text{l no sangue total}} \times 100$$

- 2- Teste de Wilcoxon (SIEGEL e CASTELLAN, 1988) com a finalidade de comparar a contagem de plaquetas obtidas na primeira e segunda centrifugação, em separado, para os terços superior, médio e inferior. O mesmo teste foi aplicado, ainda, com o objetivo de comparar os tempos de 10 e 15 minutos, para a segunda centrifugação, em cada um dos terços estudados.

Em todos os testes, fixou-se em 0,05, ou 5 % o nível para a rejeição da hipótese de nulidade, assinalando-se com um asterisco, os valores significantes.

Os dados que deram origem aos resultados estão presentes no anexo I.

5. RESULTADOS

TABELA I
Amostra de sangue de pacientes ou alunos da Faculdade de Odontologia da UNISA, segundo o número de plaquetas (em milhares/ μ l) observado por terços (superior, médio e inferior) em tubos de centrífuga, após uma centrifugação a 10 minutos, dupla centrifugação, ambas a 10 minutos e dupla centrifugação sendo a 1ª em 10 minutos e a 2ª em 15 minutos.

1ª centrifugação 10 minutos			2ª centrifugação 10 minutos			2ª centrifugação 15 minutos		
Terço superior	Terço médio	Terço inferior	Terço superior	Terço médio	Terço inferior	Terço superior	Terço médio	Terço inferior
241	300	473	255	284	636	198	219	646
237	415	590	310	366	795	262	325	854
128	656	842	226	448	1474	298	430	1556
175	942	929	307	579	1246	284	283	1262
458	756	490	240	483	895	182	231	1184
217	557	687	319	332	612	255	288	670
211	342	478	240	262	606	189	214	568
332	478	481	323	356	722	268	289	796
205	615	614	434	430	699	240	303	832
295	542	580	286	429	779	332	347	780
416	688	759	454	477	739	417	481	840
124	382	602	233	352	692	215	232	731
288	404	528	129	299	758	166	225	800
350	670	760	474	482	861	405	428	950
349	529	623	344	339	910	267	309	1048
236	321	414	191	223	310	212	266	371
342	644	836	263	501	800	339	375	852
189	462	657	89	239	780	241	268	577
128	362	611	208	361	581	229	283	736
294	349	489	231	300	585	187	192	754
315	400	493	255	317	639	246	269	644
223	635	834	284	402	841	283	288	894
253	514	448	260	255	549	138	176	639
74	215	365	103	156	346	106	104	325
222	671	851	261	448	763	258	317	918
256	305	369	225	269	355	230	220	426
128	483	559	137	253	423	150	162	353
255	580	584	382	666	645	300	310	738
532	675	670	505	529	893	454	468	893
364	498	578	314	307	629	293	321	701
170	352	453	176	234	327	153	158	376
221	400	538	196	233	506	228	233	505
167	484	631	169	215	627	159	222	715
Média	254,4	503,8	267,4	358,4	697,7	248,0	279,9	755,6
Mediana	237,0	484,0	255,0	339,0	692,0	241,0	283,0	738,0

Análise de variância, por postos, de Friedman (terço superior X terceiro médio X terceiro inferior) X^2 r crítico = 5,99.

1ª centrifugação	2ª centrifugação	2ª centrifugação
10 minutos	10 minutos	15 minutos
X^2 r calc = 57,52* (p<0,001)	X^2 r calc = 56,79* (p<0,001)	X^2 r calc = 60,55* (p<0,001)
Inferior>médio>superior	Inferior>médio>superior	inferior>médio>superior

Teste de Wilcoxon

(1ª X 2ª centrifugação, para 10 minutos) Z crítico = 1,96.

TERÇO SUPERIOR	TERÇO MÉDIO	TERÇO INFERIOR
Z calc = 0,96 NS	Z calc = 4,83* (p<0,001)	Z calc = 2,90* (p<0,002)
Não significante	1ª centrif. > 2ª centrif.	2ª centrif. > 1ª centrif.

Teste de Wilcoxon

(2ª centrifugação 10 minutos X 15 minutos) Z crítico = 1,96.

TERÇO SUPERIOR	TERÇO MÉDIO	TERÇO INFERIOR
Z calc = 2,01* (p<0,025)	Z calc = 4,58* (p<0,001)	Z calc = 3,79* (p<0,001)
10 minutos > 15 minutos	10 minutos > 15 minutos	15 minutos > 10 minutos

TABELA II

Amostra de sangue de pacientes ou alunos da Faculdade de Odontologia da UNISA, segundo as diferenças percentuais ($\Delta\%$) observadas entre o número de plaquetas/ μl do sangue total e os obtidos por terços (superior, médio e inferior) em tubos de centrífuga, após uma centrifugação a 10 minutos, dupla centrifugação, ambas a 10 minutos e dupla centrifugação sendo a 1ª em 10 minutos e a 2ª em 15 minutos.

1ª centrifugação 10 minutos			2ª centrifugação 10 minutos			2ª centrifugação 15 minutos		
Terço superior	Terço médio	Terço inferior	Terço superior	Terço médio	Terço inferior	Terço superior	Terço médio	Terço inferior
34,6	67,6	164,2	42,5	58,6	255,3	10,6	22,3	260,9
97,5	245,8	391,7	158,3	205,0	562,5	118,3	170,8	611,6
-58,7	111,6	171,6	-27,1	44,5	375,5	-3,8	38,7	401,9
-27,4	290,9	285,5	27,4	140,2	417,0	17,8	17,4	423,6
85,4	206,0	98,4	-2,8	95,5	262,3	-26,3	-6,5	379,4
-10,3	130,2	183,9	31,8	37,2	152,9	5,4	19,0	176,8
27,1	106,0	187,9	44,6	57,8	265,0	13,8	28,9	242,2
51,6	118,3	119,6	47,5	62,6	230,0	22,4	32,0	263,5
-20,5	138,4	138,0	68,2	66,6	171,0	-7,0	17,4	222,5
28,8	136,7	153,3	24,9	87,3	240,2	45,0	51,5	240,6
61,9	167,7	195,3	76,6	85,6	187,5	62,3	87,2	227,0
42,5	339,1	592,0	167,8	304,6	695,4	147,1	166,6	740,2
164,2	270,6	384,4	183,5	174,3	595,4	52,3	106,4	634,0
27,3	143,6	176,4	72,4	75,3	213,1	47,2	55,6	245,5
53,7	133,0	174,5	51,5	49,3	300,9	17,6	36,1	361,7
214,7	328,0	452,0	154,7	197,3	313,3	182,6	254,7	394,7
69,3	218,8	313,9	30,2	148,0	296,0	67,8	85,6	321,8
76,6	331,8	514,0	-16,8	123,4	629,0	125,2	150,5	439,2
45,4	311,3	594,3	136,4	310,2	560,2	160,2	221,6	736,4
119,4	160,5	265,0	72,4	123,9	336,6	39,5	43,3	462,7
194,4	273,8	360,7	138,3	196,3	497,2	130,0	151,4	501,9
6,2	202,4	297,1	35,2	91,4	300,4	34,8	37,1	325,7
143,3	394,2	330,8	150,0	145,2	427,9	32,7	69,2	514,4
-20,4	131,2	292,5	10,7	67,7	272,0	14,0	11,8	249,5
57,4	375,9	503,5	85,1	217,7	441,1	83,0	124,8	551,0
156,0	205,0	269,0	125,0	169,0	255,0	130,0	120,0	326,0
45,4	448,9	535,3	55,7	187,5	380,7	70,4	84,1	301,1
12,8	156,6	158,4	69,0	194,7	185,4	32,7	37,1	226,5
66,2	110,9	109,4	57,8	65,3	179,0	41,9	46,2	179,1
56,9	114,6	149,1	35,3	32,3	171,1	26,3	38,4	202,2
53,1	217,1	308,1	58,5	110,8	194,6	37,8	42,3	238,7
108,5	277,4	407,5	84,9	119,8	377,4	115,1	119,8	376,4
25,5	263,9	374,4	27,0	61,6	371,4	19,5	66,9	437,6
Media	60,3	216,0	292,5	69,0	124,4	336,7	56,5	77,2
Mediana	53,1	205,0	285,5	57,8	110,8	300,4	39,5	51,5
								326,0

Análise de variância, por postos, de Friedman (terço superior X terceiro médio X terceiro inferior) X^2r crítico = 5,99.

1ª centrifugação	2ª centrifugação	2ª centrifugação
10 minutos	10 minutos	15 minutos
X^2r calc = 57,52* (p<0,001)	X^2r calc = 55,27* (p<0,001)	X^2r calc = 60,55* (p<0,001)
Inferior>médio>superior	Inferior>médio>superior	inferior>médio>superior

Teste de Wilcoxon

(1ª X 2ª centrifugação, para 10 minutos) Z crítico = 1,96.

TERÇO SUPERIOR	TERÇO MÉDIO	TERÇO INFERIOR
Z calc = 1,13 NS	Z calc = 4,90* (p<0,001)	Z calc = 2,44* (p<0,001)
Não significativa	1ª centrif. > 2ª centrif.	2ª centrif. > 1ª centrif.

Teste de Wilcoxon

(2ª centrifugação 10 minutos X 15 minutos) Z crítico = 1,96.

TERÇO SUPERIOR	TERÇO MÉDIO	TERÇO INFERIOR
Z calc = 2,06* (p<0,025)	Z calc = 4,26* (p<0,001)	Z calc = 3,64* (p<0,001)
10 minutos > 15 minutos	10 minutos > 15 minutos	15 minutos > 10 minutos

GRÁFICO I

Amostra de sangue de pacientes ou alunos da Faculdade de Odontologia da UNISA, segundo o número de plaquetas (em milhares/ μ l) observado por terços (superior, médio e inferior) em tubos de centrifuga, após uma centrifugação a 10 minutos, dupla centrifugação, ambas a 10 minutos e dupla centrifugação sendo a 1ª em 10 minutos e a 2ª em 15 minutos.

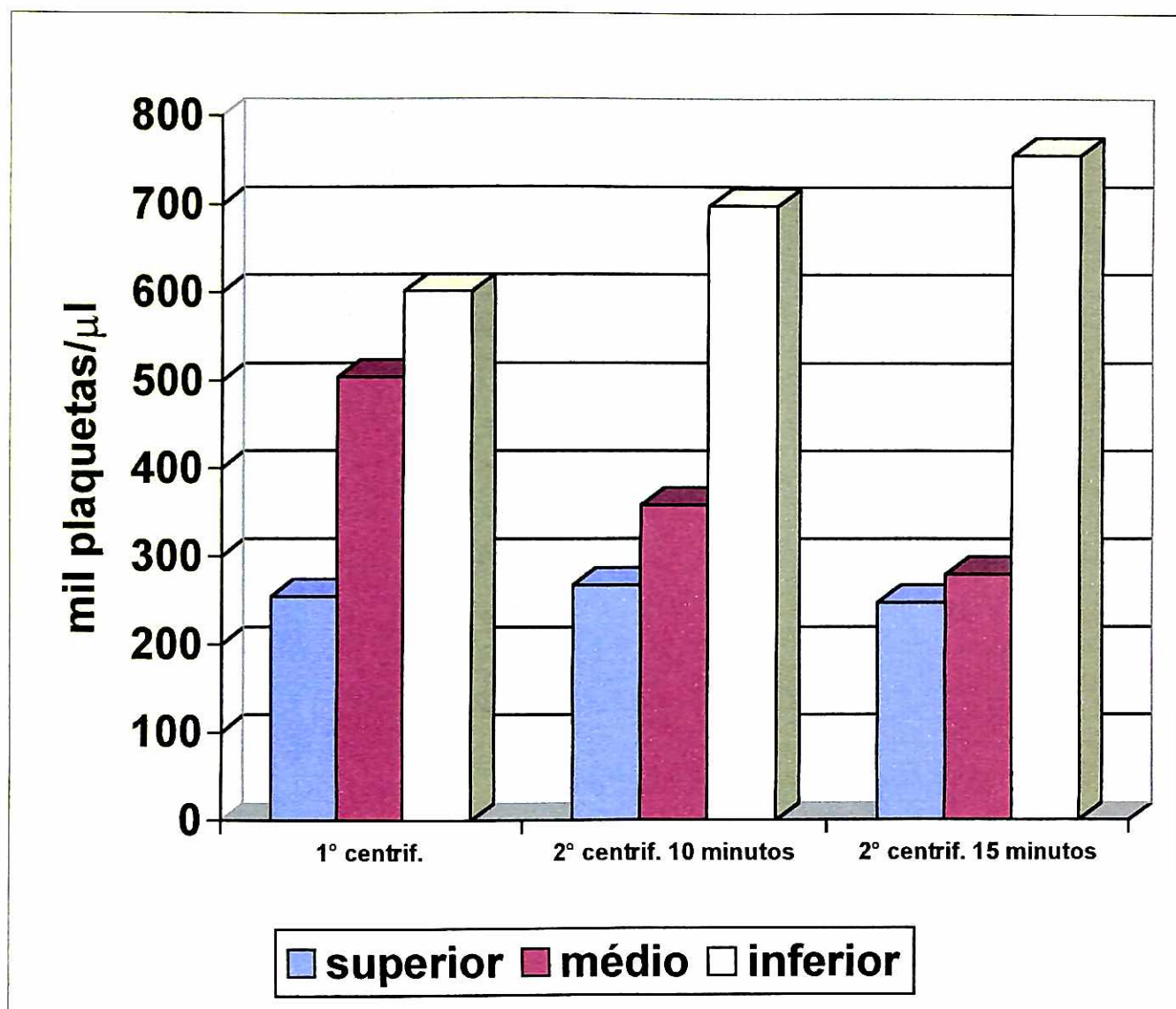
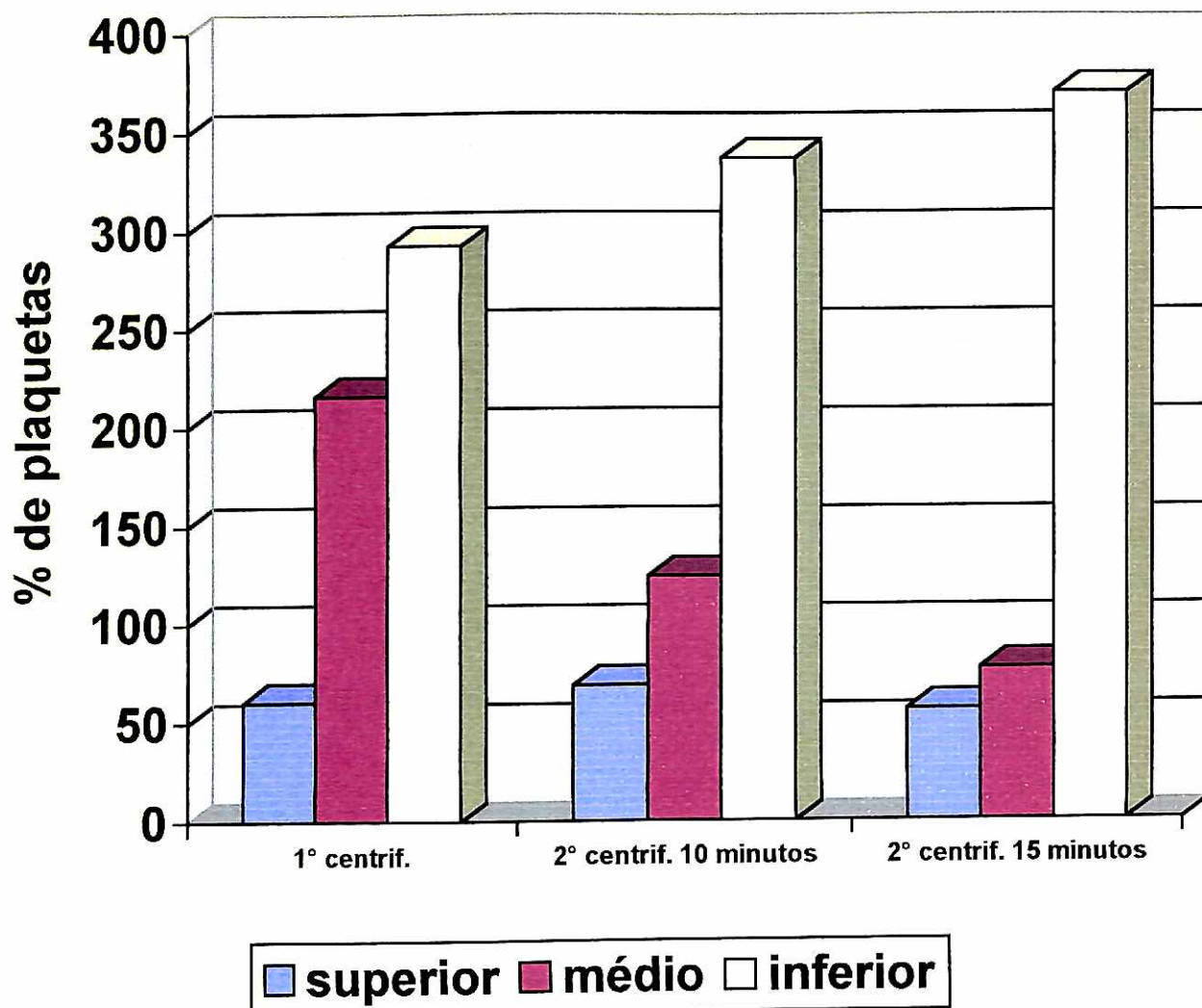


GRÁFICO II

Amostra de sangue de pacientes ou alunos da Faculdade de Odontologia da UNISA, segundo as diferenças percentuais ($\Delta\%$) observadas entre o número de plaquetas/ μl do sangue total e os obtidos por terços (superior, médio e inferior) em tubos de centrifuga, após uma centrifugação a 10 minutos, dupla centrifugação, ambas a 10 minutos e dupla centrifugação sendo a 1ª em 10 minutos e a 2ª em 15 minutos.



6. DISCUSSÃO

Nas décadas de 1980 e 1990, as plaquetas foram apresentadas como fatores importantes no início da reparação de fraturas, pela possibilidade de serem utilizadas como uma fonte autóloga e econômica de múltiplos fatores de crescimento que aumentam a proliferação de osteoblastos *in vivo* e *in vitro*. (KNIGHTON *et al.*, 1982; PIERCE *et al.*, 1991, SLATER *et al.*, 1995).

Apesar do propósito desta pesquisa não ser o de estudar os fatores de crescimento, torna-se fundamental a discussão de sua atuação já que a função do PRP nada mais é senão transportar estes fatores para a área cirúrgica.

Infelizmente, o custo de fatores de crescimento fabricados por Engenharia Genética ainda é proibitivamente alto para o uso clínico de rotina, enquanto o PRP autólogo representa uma fonte relativamente econômica de vários fatores de crescimento. O número total de fatores de crescimento que podem afetar a proliferação, diferenciação e funções de secreção das células relacionadas ao osso é ainda desconhecido, mas esse número vem aumentando continuamente como resultado de novas e mais avançadas técnicas no estudo das proteínas e Biologia Moleculares.

A ação de fatores de crescimento ao redor de hastes de titânio, promovendo crescimento ósseo, é um importante conhecimento para o desenvolvimento de novos materiais que possam ser utilizados de forma ativa na reparação óssea e no processo de osseointegração (SOLHEIM, 1998).

Da mesma forma, o fato de citocinas, como IL-1 e FNT- α , interferirem na adesão de fatores de crescimento como PDGF (CANALIS *et al.*, 1992; SOLHEIM, 1998) mostra a importância do controle do processo inflamatório durante a patogenia da doença periodontal.

A preocupação com o desenvolvimento de técnicas de obtenção de PRP não é recente. Hartman *et al.* (1992) descreveram uma técnica de obtenção de plasma

bastante simples, que foi utilizada em cirurgias cardiovasculares. O sangue era mantido imóvel para a precipitação espontânea dos seus componentes pela força da gravidade. Apesar da animadora simplicidade, tal procedimento apresentava riscos, uma vez que, sabemos que a precipitação das células sangüíneas leva de três a quatro horas para ocorrer o que inviabiliza o seu uso ambulatorial. Além disto, apesar de as seringas que contém o sangue serem hermeticamente tampadas, há risco de contaminação.

As primeiras tentativas de se apressar a obtenção de PRP lançavam mão de centrífugas.

A técnica utilizada por Slater *et al.*, em 1995, que utiliza duas centrifugações sendo a primeira a FCR = 700 g por 10 minutos e a segunda a FCR = 300 g por 20 minutos para a obtenção de um botão de plaquetas, parece concentrar as plaquetas. No entanto, dificulta a sua manipulação, uma vez que não cria volume suficiente para que possamos trabalhar clinicamente em situações de enxertia, especialmente quando a proposta é misturar o plasma rico em plaquetas com algum biomaterial.

Talvez o mais completo estudo sobre PRP tenha sido realizado por Marx *et al.* (1998) que demonstraram uma técnica de obtenção do PRP, sua aplicação clínica em casos cirúrgicos de reconstrução óssea e a avaliação dos resultados com quantificação de fatores de crescimento e cortes histológicos. A captura da porção superior de células vermelhas, preconizada pelos autores, quando da coleta do PRP é controversa; o argumento de que células recém-sintetizadas estejam presentes na região é discutível já que as plaquetas se originam da fragmentação do citoplasma de megacariócitos e não são diretamente sintetizadas por órgãos hematopoéticos. Além disso, Hartman *et al.* já haviam descrito, em 1992, a possibilidade de fibrinólise por elementos celulares quando da coleta de células vermelhas junto com o PRP.

O aumento médio da concentração de plaquetas de 338 % obtido por Marx *et al.* (1998), já parece bastante importante, tanto pela grande concentração, como pelos resultados clínicos apresentados, que mostraram maior reparação e maior

maturação óssea quando comparado com enxertos realizados sem PRP em seis meses.

A técnica proposta por Anitua (1999) para obtenção de PRP mostra significativo avanço na simplificação dos procedimentos de obtenção do plasma e, especialmente, aumenta muito a segurança de sua utilização, uma vez que elimina o uso de trombina de origem animal para a geleificação do PRP. No entanto, o trabalho descreve a técnica de maneira singela, sem a contagem de plaquetas nem sua qualificação; assim, não sabemos o que realmente está sendo aplicado nos pacientes. O autor ainda propõe o descarte da porção pobre em fatores de crescimento, ou pobre em plaquetas, o que no nosso entender é um erro, uma vez que o PPP foi mostrado como importante elemento no processo de hemostasia do ferimento cirúrgico (MAN, PLOSKER e WINLAND-BROWN, 2000; HARTMAN *et al.*, 1992).

Venturelli (1999) descreveu o uso de PRP em cirurgias de implantes, com resultados favoráveis; porém, a técnica de obtenção do PRP não foi bem definida, pois não fica claro se o autor utilizou 800 ou 1000 RPM, nem se sabe o raio da centrífuga, assim seus resultados tornam-se irreprodutíveis. Bastante interessante a informação de que o líquido obtido pelo ato de espremer em gaze estéril após a geleificação parte do PRP contém trombina autóloga e merece ser mais estudado, porém o tempo que leva para sua obtenção (45 minutos, segundo o autor) e a forma de manipulação nos faz temer pelo risco de contaminação do preparado.

O trabalho de Weibrich *et al.*, de 2001, comparou e atestou a eficiência da metodologia de dupla centrifugação para a concentração de plaquetas. Apesar de mais uma vez os autores se referirem ao número de rotações por minuto, conhecendo o raio da centrífuga Kendro-Heraeus utilizada, chegamos à conclusão de que utilizaram uma FCR = 730 g na primeira centrifugação e de FCR = 1643 g na segunda centrifugação. Os resultados mostram uma concentração de plaquetas na ordem de 3,5 vezes o valor inicial. Os autores questionam a presença dos fatores de crescimento nessas plaquetas e sugerem mais estudos neste campo. Interessante notar que em 10% dos 158 casos utilizados não houve concentração de plaquetas.

Os autores atribuem o fato de o separador por plasmaférese concentrar mais plaquetas devido à passagem por sucessivos passos de separação celular, o que minimiza a possibilidade de erro, já que se houver alguma falha em uma das etapas essa seria compensada nas etapas seguintes.

A necessidade de transformação do PRP em gel também deve ser questionada, pois apesar de a forma gel facilitar a manipulação e a condução do material para a área cirúrgica (WHITMAN e BERRY, 1998; PETRUNGARO, 2001), ela não é necessária para que os fatores de crescimento sejam atuantes na área. Assim, o PRP pode ser incorporado a materiais de enxertia ou ainda ser utilizado para lavar a área operada, com todos os benefícios inerentes aos fatores de crescimento.

O uso de um gel muito denso pode impedir o acesso das plaquetas, com seus fatores de reparação, ao local da ferida. (MAN, PLOSKER e WINLAND-BROWN, 2000)

Vários autores (WHITMAN *et al.*, 1997; MARX *et al.*, 1998; VENTURELLI, 1999; ANITUA, 1999; LOZADA *et al.*, 2001) citam em suas técnicas de obtenção de PRP a velocidade da centrifugação, dado esse que pouco interessa se o leitor não souber qual o raio da centrífuga utilizada para poder calcular qual a força centrífuga relativa (FCR) que está sendo aplicada ao sangue. Assim, os autores deveriam sempre se referir a FCR expressa em g (gravidade).

O uso de trombina bovina é questionado por Landsberg *et al.* (1998). Os autores afirmaram que o uso de trombina bovina pode estar associado à formação de anticorpos para os fatores V e XI e, assim sendo, sua utilização poderia levar ameaça à vida. Além disso, as coagulopatias são de muito difícil tratamento. Sugeriram, ainda, que os clínicos que utilizaram PRP ativado por trombina devem considerar a possibilidade de realização de testes, em seus pacientes, de tempo de tromboplastina parcial, tempo de protrombina e tempo de trombina, que podem estar elevados por seis meses ou mais. Concluíram que novas metodologias para geleificação do PRP devem ser testadas.

Este mesmo tema foi pesquisado, em 1997, por Christie, Carrington e Alving que já haviam relacionado as complicações que ocorrem em indivíduos que receberam trombina bovina com o grau de impureza desta. Se a trombina bovina industrializada tiver um baixo grau de contaminação de fator V, não ocorre sensibilização do indivíduo.

A substituição da trombina bovina por trombina humana também é proposta por Rosenberg e Torosian (2000), com o objetivo de evitar coagulopatias.

Apesar de não encontrarmos fortes evidências que contra-indiquem o uso de trombina animal (MARX, 2000), é importante questionarmos a sua utilização em procedimentos em que não necessitamos da geleificação imediata do PRP, como é o caso da maioria das cirurgias odontológicas, já que após 11 minutos temos uma coagulação do gel que permite sua utilização com o uso de apenas cloreto de cálcio a 10 % na proporção de 5 % em relação à quantidade de PRP (ENCINAS *et al.*, 2001).

Fijnheer *et al.* (1990) mostraram que a ativação das plaquetas pode deteriorá-las, e que a própria técnica de centrifugação já causa sua ativação. Além disso Slater *et al.* (1995) afirmaram que a liberação dos fatores de crescimento pode ser iniciada pela ativação, adesão ou agregação plaquetária.

O trabalho de Sonnleitner, Huemer e Sullivan (2000) mostrou divergências quanto a FCR, pois os dados apresentados não são possíveis matematicamente aplicando-se a fórmula de cálculo de FCR. Desta forma, todos os resultados apresentados ficam invalidados.

A centrífuga a ser utilizada para a separação das plaquetas deve possibilitar uma força centrífuga relativa (FCR) = 200 g e tempo regulável. Várias centrífugas encontradas no mercado podem proporcionar essas características. Para calcular a velocidade de rotação desejada, para alcançar uma determinada FCR de uma centrífuga, basta aplicar a fórmula:

$$FCR = 1,118 \times 10^{-5} \times R \times RPM^2 ,$$

onde R = raio do rotor da centrífuga em centímetros.

Importantes são as observações feitas por Landesberg, Roy e Glickman, em 2000, sobre a FCR = 200 g como ideal para a obtenção de plaquetas viáveis, fato que tem a concordância de Marx (2000) em seus comentários sobre o trabalho dos autores citado anteriormente. No entanto, no mesmo trabalho os autores preconizam o uso de um novo agente geleificador, denominado ITA, que se mostrou pouco convincente especialmente porque não foram descritas sua composição ou modo de ação.

Marx (2000) também foi categórico ao afirmar que o verdadeiro PRP é aquele que concentra as plaquetas em 400% e que a quantificação dos fatores de crescimento pode não ser uma boa maneira de avaliar sua eficácia já que é importante que a estrutura terciária destes esteja definida para que sejam eficazes. No entanto, o mesmo autor se contradisse em 2001, talvez em uma evolução de seu pensamento, ou acreditando na evolução da metodologia, quando afirmou que o PRP deve ter uma concentração mínima de 1.000.000 de plaquetas por μl de plasma em um volume de 5 ml. Tal afirmação é conflitante com seu próprio estudo publicado em 1998, em que mostrou a excelência do padrão de reparação óssea, precocemente, em áreas que receberam PRP, com 338 % de concentração de plaquetas, quando comparadas a áreas que não receberam enxerto ou que receberam enxerto de osso autógeno obtido do osso ilíaco.

Ainda teremos que aguardar até que estudos clínicos bem controlados sejam publicados para que tais afirmações possam ser aceitas.

De qualquer forma, determinar um número fixo para a obtenção parece ser um erro, uma vez que temos que considerar qual é a quantidade de plaquetas no sangue total do indivíduo. Além disso, o uso de PRP pode ser ainda mais útil para indivíduos que tenham uma deficiência na quantidade de plaquetas (trombocitopenia) e que necessitam de um procedimento cirúrgico periodontal ou para instalação de implantes. Estes contariam naturalmente com uma menor quantidade de fatores de crescimento e, assim, um pequeno aumento já poderia trazer grandes benefícios.

Tudo isso sem considerar a regulação, para mais ou para menos, realizada pelos receptores de membrana já citada por Solheim (1998).

As plaquetas são células pequenas, ricas em lipídeos, e por isso “flutuam” no plasma, ao passo que as demais células, mais pesadas, tendem a se sedimentar durante a centrifugação. Se a centrifugação for intensa e/ou o tempo de centrifugação muito longo, as plaquetas podem descer para junto dos glóbulos vermelhos, assim, sua recuperação fica enormemente dificultada (FERREIRA e AMORIM FILHO, 2000). A obtenção de um botão de plaquetas pode nos oferecer um grande concentrado de plaquetas porém sem aplicação clínica. Por este motivo, necessitamos de uma adequada concentração de plaquetas em um volume de plasma que facilite e de condições de manipulação, seja através da geleificação, ou do seu uso para hidratar e incorporar algum biomaterial.

Os trabalhos apresentados por Lynch *et al.*, em 1989 e 1991, mostram resultados bastante promissores para o uso dos fatores de crescimento, apesar de não terem utilizado a técnica do plasma rico em plaquetas; porém algumas informações devem ser aproveitadas, como o fato de os fatores de crescimento terem uma meia-vida na área cirúrgica de apenas três horas para o IGF-I e 4,2 horas para o PDGF-B e de que apenas 7 % de fatores de crescimento estão presentes na área após 48 horas; mesmo assim, os resultados histológicos mostraram a formação de novas estruturas periodontais. Como sabemos que os fatores de crescimento contidos no PRP só irão iniciar o processo de reparação e que outras células, como os macrófagos (MARX *et al.*, 1998) e os próprios osteoblastos (LIND, 1996), que contêm esses fatores, serão atraídos para a região, o processo não perde seu valor pelo fato de terem curta duração, afinal novos fatores de crescimento chegarão à ferida trazidas por outras células.

Quanto ao uso dos fatores de crescimento PDGF-B e IGF-I ao redor dos implantes instalados em regiões com má qualidade óssea, os autores, (LYNCH *et al.*, 1991) se mostraram bastante otimistas, o que nos encoraja no desenvolvimento de pesquisas de uso de PRP em locais de osso pouco denso.

Os TGF- β parecem ter atividade em doses muito menores do que as BMPs, os TGF- β agem em níveis de μg enquanto as BMPs em nível de mg (LIND, 1996). Isso concorda com a proposta de Kasander *et al* (1990) de que o uso de fatores de crescimento purificados seria mais efetivo.

Os autores que descreveram o uso de PRP em enxertos no seio maxilar (ROSENBERG e TOROSIAN, 2000; KASSOLIS, ROSEN e REYNOLDS, 2000; PETRUNGARO, 2001) falam sobre resultados animadores, porém mostram apenas casos clínicos e não apresentam avaliações histológicas, grupo controle ou qualquer comprovação dos fatos.

Park *et al*. (1995) e Cho, Lin e Genco (1995), propuseram a utilização de PDGF como modulador no processo de regeneração óssea guiada em lesões de furca em cães da raça Beagle e mostraram o efeito benéfico do PDGF na repopulação rápida de fibroblastos do ligamento periodontal que contribuem para a completa regeneração periodontal sem levar à reabsorção radicular ou anquilose.

Já o uso de PRP para hidratar a membrana parece bastante adequado, uma vez que utiliza da barreira como carreador de fatores de crescimento que atuam no lado interno da área cirúrgica, onde queremos reparação óssea e, no externo, para melhor reparação de tecidos moles.

A proposta de tratamento de lesões periodontais feita por Lekovic *et al* (2002) também não apresenta um grupo controle, mas propôs o uso de PRP associado à regeneração óssea guiada e ao uso de osso bovino poroso mineralizado como boas alternativas para preenchimento de defeitos ósseos intra-ósseos. Também não foi declarada a FCR que este processo utilizou. Como sabemos pela prática clínica, esses tipos de defeitos são sempre os mais favoráveis para a reparação, assim, os próprios autores sugerem que mais estudos sejam realizados com outros tipos de defeitos e sem o uso de regeneração óssea guiada.

O uso de PRP associado a enxerto de osso ilíaco em casos de distração osteogênica utilizando uma técnica de dupla centrifugação, em centrífuga de laboratório também mostrou resultados promissores (ROBIONY *et al.*, 2002)

O trabalho em coelhos do grupo de coreanos Yi, Yang e Kwon (2002), apesar de poucos casos, mostra resultados promissores em relação à utilização de PRP associado a implantes em regiões de osso de pobre qualidade.

Petrungaro (2001, 2002a e 2002b) parece ser o mais entusiasta dos autores quando propõe o uso de PRP nas mais variadas situações em Periodontia e Implantodontia. Certamente melhoras nos resultados de tecidos moles e duros devem ser esperadas, porém mais estudos clínicos devem ser realizados para que esse entusiasmo seja acompanhado de evidências científicas.

O uso de PRP em indivíduos idosos (PETRUNGARO 2001; TISCHLER 2002), bem como com dificuldades de reparação e baixa contagem inicial de plaquetas, parece ser promissor e talvez de maior valia do que em indivíduos que já tem uma contagem de plaquetas alta em seu sangue.

O uso da porção pobre em plaquetas, como proposto por Petrungaro (2002a), é bastante recomendado dado à presença de plaquetas e, provavelmente, de seus fatores de crescimento, nessa porção. Nos parece bastante desejável que a porção chamada de pobre em plaquetas do plasma tenha uma quantidade de plaquetas maior do que a do sangue total do indivíduo, assim, sempre teremos o efeito benéfico com qualquer porção do plasma que seja utilizada. Talvez a tentativa de obter uma porção de plasma totalmente isenta de plaquetas não seja de tanta valia, assim, podemos ter uma porção de plasma com grande concentração de plaquetas para ser utilizada em áreas de maior necessidade e uma porção com uma quantidade menor de plaquetas que pode ser utilizada em tecidos que têm reparação mais rápida e previsível, mas que nem por isso não necessita de maior estímulo para iniciar sua reparação.

Certamente o efeito sinérgico dos vários fatores de crescimento contidos no PRP leva a uma reparação mais rápida seja do tecido ósseo como de tecidos moles. A maior dificuldade de utilização de fatores de crescimento hoje é um adequado sistema de liberação, talvez em um futuro próximo tenhamos biomateriais com fatores de crescimento incorporados em suas matrizes.

Assim, ao analisarmos os resultados do nosso experimento, percebemos a grande importância do desenvolvimento de uma técnica para obtenção de PRP que seja simples, rápida, eficiente, reproduzível, segura, econômica e confiável. Os trabalhos discutidos até aqui não são concordantes entre suas propostas, chegando ao ponto até de não concordarem com o que é PRP, e até de mudarem seus próprios conceitos de maneira incompreensível. Certamente muita tecnologia e muitos interesses estão envolvidos no sentido de melhores resultados.

A metodologia apresentada neste trabalho utilizando centrífuga de laboratório, mostrou-se eficaz na concentração de plaquetas no plasma para obtenção de PRP, chegando à média de 336,7 % de concentração de plaquetas na porção inferior do tubo, quando comparada ao sangue total, quando utilizado o regime de dupla centrifugação, sendo a primeira a 200 g por 10 minutos e a segunda a 200 g por mais 10 minutos. Na porção média e superior do tubo, a porcentagem de concentração de plaquetas foi 124,4 % e 69,0 %, respectivamente.

Essa concentração aumenta, ainda mais, quando a segunda centrifugação é feita por 15 minutos, atingindo 370,2 % em média na porção inferior do tubo e 77,2 % e 56,5 % na porção média e superior, respectivamente. Tais resultados são comparáveis aos propostos por Weibrich *et al.* (2001) que propuseram uma concentração de 3,5 vezes ou 350 % utilizando uma técnica de dupla centrifugação porém com FCRs muito maiores, de 730 g e 1643 g na primeira e segunda centrifugação respectivamente. É concorde, também, com o trabalho de Marx *et al.* de 1998 no qual propuseram 338% de concentração, em um estudo em que os autores apresentaram resultados histológicos, mostrando a reparação óssea em áreas cirúrgicas, onde utilizaram o PRP com excelentes resultados. Nossos resultados são muito próximos ainda à proposta de Marx (2000) de que PRP deve

ter uma concentração de 400% de plaquetas em relação ao sangue total do indivíduo.

O fato de, após a segunda centrifugação, restar uma porção de plasma ainda com maior quantidade de plaquetas do que no sangue total do indivíduo, nos parece uma vantagem, pois permite ao cirurgião uma maior versatilidade no aproveitamento deste material. Mais estudos neste sentido devem ser realizados para verificar os benefícios clínicos da utilização dessa porção de plasma com menor quantidade de plaquetas que alguns autores chamam de PPP, porém que contém de 56,5 a 77,2 % a mais de plaquetas do que no sangue total.

Essa metodologia, portanto, permite que tenhamos uma boa concentração de plaquetas no PRP e um volume de produto que seja facilmente manipulável para as várias aplicações clínicas.

Os resultados mostraram também que qualquer que seja a metodologia de centrifugação, a maior concentração de plaquetas sempre estará no terço inferior do tubo, seguido pelo terço médio e superior. Tal metodologia tem limitações devido ao peso das plaquetas. Como a captura do plasma nas várias etapas é feita por aspiração, as plaquetas que "flutuam" no plasma sofrem movimentação, o que torna virtualmente impossível obter uma porção de plasma totalmente livre de plaquetas. Para conseguirmos esse feito, deveríamos levar à formação de um botão de plaquetas na porção mais inferior do tubo, porém nesta situação teríamos dificuldades na aplicação clínica do material por falta de volume manipulável. É evidente que a separação de células, como as plaquetas, por equipamentos eletrônicos, apresenta uma maior precisão e pode nos oferecer um produto mais concentrado de plaquetas; no entanto, o custo é um fator de dificuldade para o uso ambulatorial. Já o custo de uma centrifuga e de materiais descartáveis para a obtenção e manipulação do PRP é comparável ao de outros equipamentos encontrados normalmente nos consultórios odontológicos. Devemos também ressaltar que este método permite a obtenção de PRP a partir de uma coleta de apenas 27ml de sangue do paciente, o que é bem diferente da coleta de 450ml de sangue feita em hemocentros ou hospitais.

Assim a nossa proposta para a utilização do PRP em ambulatório é a seguinte:

Obtenção do sangue por punção venosa, na veia cubital mediana, cefálica ou outra na região de antebraço, realizada por profissional competente. O sangue deve ser colhido preferencialmente por sistema a vácuo tipo "Vacutainer" em tubos estéreis contendo 0,5 ml de citrato de sódio tamponado a 3,2 %. A coleta do sangue deve ser feita antes de qualquer procedimento odontológico ou anestesia. A quantidade de sangue obtida deve ser compatível com o procedimento a ser realizado, o PRP obtido será aproximadamente 10 a 15 % do volume total de sangue colhido.

Após homogeneização do sangue nos tubos colocá-los nas caçapas da centrífuga e programá-la para funcionamento em 200 g por 10 minutos. (Medir o raio do rotor da centrífuga e aplicar a fórmula $FCR = 1,118 \times 10^{-5} \times R \times RPM^2$).

Depois da parada total da centrífuga, remover os tubos com cuidado, sem virá-los ou incliná-los, e identificar a porção celular (vermelha) e a porção plasmática (amarelada). Abrir os tubos e com uma seringa estéril de 3,0 ml aspirar toda a porção do plasma, de todos os tubos, evitando capturar a porção vermelha. O plasma deve ser colocado dentro de novos tubos estéreis, chamados secos, preenchendo até a marca indicadora de volume de cada tubo.

Tampar e submeter os tubos preenchidos com plasma a nova centrifugação a 200 g por 15 minutos.

Depois da parada total da centrífuga, remover os tubos com cuidado, sem virá-los ou incliná-los, marca-los com caneta marcadora, dividindo em três partes iguais.

Separar por aspiração lenta, preferencialmente utilizando micropipeta de 1000 µl com ponta descartável estéril, os dois terços superiores do plasma e colocá-los em outro tubo estéril ou em uma placa de Petri estéril.

A porção inferior de cada tubo, agora chamada de PRP, deve ser separada de acordo com a conveniência de uso do cirurgião. Cada porção de PRP separada deve ser medida com o auxílio de micropipetas, para um bom controle do volume.

Caso o cirurgião deseje a geleificação do PRP, deve acrescentar cloreto de cálcio a 10 %, também estéril, na proporção de 5 % em relação ao volume de PRP. Materiais de enxertia podem ser acrescentados imediatamente após o cloreto de cálcio na proporção desejada pelo cirurgião (é recomendado o uso de 1:1). Aguardar a geleificação por 10 a 11 minutos em temperatura ambiente.

Aplicar o material no local desejado quando estiver com consistência adequada para manipulação.

O PRP pode ser utilizado nas mais diversas áreas da odontologia sendo aplicado em cirurgias periodontais, exodontias e, junto a materiais de enxertia, em procedimentos de elevação da parede do seio maxilar, aumento de espessura de rebordo, preenchimento de lesões císticas e alvéolos ou em qualquer procedimento em que o Cirurgião-Dentista pode contar com os efeitos benéficos dos fatores de crescimento.

O uso clínico do PRP deve ser mais bem estudado para obtermos maiores evidências científicas da validade desta terapêutica.

7. CONCLUSÕES

A metodologia para obtenção de PRP pode ser simples, viável, segura e econômica.

A centrifugação por 10 minutos em 200 g concentra plaquetas no terço inferior do plasma na razão de 292,5 % em média, em relação ao sangue total.

A dupla centrifugação para o tempo de 10 minutos cada, concentra plaquetas de forma mais eficaz que a centrifugação única na razão de 336,7 %, em média, no terço inferior do tubo, em relação ao sangue total.

A dupla centrifugação para o tempo de 10 minutos, seguida por outra de 15 minutos, concentra plaquetas de forma mais eficaz que a centrifugação única, na razão de 370,2 %, em média, no terço inferior do tubo, em relação ao sangue total.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

1. THE AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY . The potential role of growth and differentiation factors in periodontal regeneration. Position paper. **J. Periodontol.**, v.67, n. 5, p.545-553, 1996.
2. ANITUA, E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 14, n. 4, p. 529-535, 1999.
3. ASSOIAN, R.K.; GROTH, G.R.; MILLER, D.M. SPORN, M.B. Cellular transformation by coordinated of three peptide growth factors from human platelets. **Nature**, v. 309, n. 5971, p. 804-806, 1984.
4. CANALIS, E.; VARGHESE, S.; MCCARTHY, T.L.; CENTRELLA, M. Role of platelet derived growth factor in bone cell function. **Growth regul.** v. 2, n. 4, p. 151-155, 1992.
5. CHO, M.I.; LIN, W.L.; GENCO, R.J. Platelet-derived growth factor-modulated guided tissue regenerative therapy. **J. Periodontol.**, v. 66, n. 6, p. 522-530, 1995.
6. CHRISTIE, R.J.; CARRINGTON, L.; ALVING, B. Postoperative bleeding induced by topical bovine thrombin: Report of two cases. **Surgery**, v.121, n.6, p. 708-710, 1997.
7. ENCINAS, M.B.; KARSOKAS, N.; JAHN, R.S.; SENDYK, W.R. Plasma rico em plaquetas (PRP) uma nova tecnologia em reparação de tecidos. 4º Congresso de iniciação científica da UNISA 2001, caderno de resumos. São Paulo: Universidade de Santo Amaro, 2001. p. 263
8. FERREIRA, T.M.; AMORIM FILHO, L. Preparação de componentes sanguíneos. In: FRETZ et al. **Hemoterapia**. 20. ed. Rio de Janeiro : Editora Fiocruz. 2000. Vol. II, Cap. 8, p. 15-39.
9. FIJNHEER, R.; PIETERSZ, R.N.I.; DE KORTE, D.; GOUWEROK, C.W.N.; DEKKER, W.J.A.; REESINK, H.W.; ROOS, D. Platelet activation during preparation of platelet concentrates: a comparison of platelet-rich plasma and the buffy coat methods. **Transfusion**, v.30, n. 7, p. 634-638, 1990.

¹ De acordo com NBR 6023: Referências Bibliográficas, de 2001, da Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT, e abreviatura dos títulos de periódicos em conformidade com a base de dados Word List.

10. GARG, A.K.; GARGENESE, D.; PEACE, I. Using platelet-rich plasma to develop an autologous membrane for growth factor delivery in dental implant therapy. **Dent. Implant. Update**, v.11, n.6, p.41-44, 2000.
11. HARTMAN, A.R.; GALANAKIS, D.K.; HONIG, M.P.; SEIFERT, F.C.; ANAGNOSTOPOULOS, C.E. Autologous whole plasma fibrin gel. Intraoperative procurement. **Arch. Surg.**, v. 127, n. 3, p. 357-359, 1992.
12. JAHN, R.S.; JAHN, M.R.; SENDYK, W.R. Plasma rico em plaquetas (PRP) – Inovação e avanço em reparação tecidual. **Rev. Assoc. Paul. Cirurg. Dent.**, v.56, supl, p. 29, 2002.
13. KASSOLIS, J.D.; ROSEN, P.S.; REYNOLDS, M.A. Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft : Case series. **J. Periodontol.**, v.71, n. 10, p.1654-1661, 2000.
14. KNIGHTON, D.R.; CIRESI, K.F.; FIEGEL, V.D.; AUSTIN, L.L.; BUTLER, E.L. Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. **Ann. Surg.**, v.204, n. 3, p.322-329, 1986.
15. KNIGHTON, D.R.; HUNT, T.K.; THAKRAL, K.K.; GOODSON, W.H. Role of platelets and fibrin in the healing sequence. **Ann. Surg.**, v. 196, n. 4, p. 379-388, 1982.
16. KSANDER, G.A.; SAWAMURA, S.J.; OGAWA, Y.; SUNDSMO, J.; McPHERSON, J.M. The effect of platelet release on wound healing in animal models. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.22, n. 5, p. 781-791, 1990.
17. LANDESBURG, R.; MOSES, M.; KARPATKIN, M. Risks of using platelet plasma gel. **J. Oral Maxillofac Surg.**, v. 56, n. 9, p.1116-1117, 1998.
18. LANDESBURG, R.; ROY, M.; GLIKMAN, R.S. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 58, n. 3, p. 297-300, 2000.
19. LEKOVIC, V.; CAMARGO, P.M.; WEINLAENDER, M.; VASILIC, N.; BARRIE KENNEY, E. Comparison of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral, and guided tissue regeneration versus platelet-rich plasma and bovine porous mineral in the treatment of intrabony defects: a reentry study. **J. Periodontol.**, v. 73, n. 2, p. 198-205, 2002.
20. LIND, M. Growth factors: possible new clinical tools. A review. **Acta Orthop. Scand.**, v. 67, n. 4, p. 407-417, 1996.

21. LORENZ, H.P.; HEDRICK, M.H.; CHANG, J.; MEHRARA, B.J.; LONGAKER, M.T.
The impact of biomolecular medicine and tissue engineering on plastic surgery in the 21st century. **Plast. Reconst. Surg.**, v.105, n.7, p.2467-2481, 2000.
22. LOZADA, J.L.; CAPLANIS, N.; PROUSSAEFS, P.; WILLARDSSEN, J.;
KAMMEYER, G. Platelet-rich plasma application in sinus graft surgery: Part I –
Background and processing techniques. **J. Oral Implantol.**, v.27, n. 1, p. 38-49,
2001.
23. LYNCH, S.E.; BUSER, D.; HERNANDEZ, R.A.; WEBER, H.P.; STICH, H.; FOX,
C.H.; WILLIAMS, R.C. Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like
growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants.
Results of a pilot study in beagle dogs. **J. Periodontol.**, v.62, n. 11, p. 710-716,
1991a.
24. LYNCH, S.E.; CASTILLA, G.R.; WILLIAMS, R.C.; KIRISTY, C.P.; HOWELL, T.H.;
REDDY, M.S.; ANTONIADES, H.N. The effects of short-term application of a
combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal
wound healing. **J. Periodontol.**, v.62, n. 7, p. 458-467, 1991b.
25. LYNCH, S.E.; WILLIAMS, R.C.; POLSON, A.M.; HOWELL, T.H.; REDDY, M.S.;
ZAPPA, U.E.; ANTONIADES, H.N. A combination of platelet-derived and insulin-
like growth factors enhances periodontal regeneration. **J. Clin. Periodontol.**,
v.16, n. 8, p. 545-548, 1989.
26. MAN, D.; PLOSKER, H.; WINLAND-BROWN, J.E. The use of autologous platelet-
rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in
cosmetic surgery. **Plast. Reconst. Surg.**, v.107, n. 1, p. 229-236, 2001.
27. MARX, R.E. Discussion – Quantification of growth factor levels using a simplified
method of platelet-rich plasma gel preparation. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.58,
n.3, p. 300-301, 2000.
28. MARX, R.E. Platelet-rich plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP?
Implant Dent., v.10, n. 4, p. 225-228, 2001.
29. MARX, R.E.; CARLSON, E.R.; EICHSTAEDT, R.M.; SHIMMLE, S.R.;
STRAUSS, J.E.; GEORGEFF, K.R. Platelet-rich plasma. Growth factor
enhancement for bone grafts. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.**
Endod., v. 85, n. 6, p. 638-646, 1998.

30. OLIVEIRA, M.R.A.A. **Hematologia Básica** Fisiopatologia e estudo laboratorial 2. ed. São Paulo: Editora American Med, 1998. p. 38-166.
31. PADGETT, R.W.; PATTERSON, G.I. New developments for TGF β . **Developmental Cell.**, v. 1, p.343-349, 2001.
32. PARK, J.B.; MATSUURA, M.; HAN, K.Y.; NORDERYD, O.; LIN, W.L.; GENCO, R.J.; CHO, M.I. Periodontal regeneration in class III furcation defects of beagle dogs using guided tissue regenerative therapy with platelet-derived growth factor. **J. Periodontol.**, v.66, n. 6, p. 462-477, 1995.
33. PETRUNGARO, P. Immediate restoration of multiple tooth implants for aesthetic implant restorations. **Implant Dent.**, v.11, n. 2, p. 118-127, 2002a.
34. PETRUNGARO, P. Platelet-rich plasma for dental implants and soft-tissue grafting. **Dent. Implant. Update**, v.12, n. 6, p. 41-46, 2001.
35. PETRUNGARO, P. Using platelet-rich plasma to accelerate soft tissue maturation in esthetic periodontal surgery. **Compendium.**, v.22, n.9, p. 729-746, 2002b.
36. PIERCE, G.F.; MUSTOE, T.A.; ALTROCK, B.W.; DEUEL, T.F.; THOMASON, A. Role of platelet-derived growth factor in wound healing. **J. Cell. Biochem.**, v.45, p. 319-326, 1991.
37. RADOSEVICH, M.; GOUBRAN, H.A.; BOURNOUF, T. Fibrin sealant: scientific rationale, production methods, properties, and current clinical use. **Vox Sang.**, v.72, p. 133-143, 1997.
38. ROBIONY, M.; POLINI, F.; COSTA, F.; POLITI, M. Osteogenesis distraction and platelet-rich plasma for bone restoration of the severe atrophic mandible: preliminary results. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 60, n. 6, p. 630-635, 2002.
39. ROSENBERG, E.S.; TOROSIAN, J. Sinus grafting using platelet-rich plasma – Initial case presentation. **Pract. Periodont. Aesthet. Dent.**, v.12, n. 9, p. 843-850, 2000.
40. SIEGEL, S.; CASTELLAN JR., N.J. **Nonparametrics statistics**, 2nd ed. New York McGraw-Hill Int. , 1988, 399p.
41. SLATER, M.; PATAVA, J.; KINGHAM, K.; MASON, R.S. Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity. **J. Orthop. Res.**, v. 13, n. 5, p. 655-663, 1995.
42. SOLHEIM, E. Growth factors in bone **Int. Orthopaedics**, v.22, n. , p. 410-416, 1998

43. SONNLEITNER, D.; HUEMER, P.; SULLIVAN, D. A simplified technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate for intraoral bone grafting techniques: A technical note. **Int. J. Oral. Maxillofac. Implants**, v.15, n. 6, p. 879-889, 2000.
44. STEFANI, C.M.; MACHADO, M.A.N.; CESCO, R.T.; NOGUEIRA F^O, G.R.; SALLUM, E.A.; NOCITI Jr., F.H. Uso de fatores de crescimento em implantologia. **Revista Periodontia**, v. 8, n. 2, p. 39-45, 1999.
45. STEFANI, C.M.; MACHADO, M.A.N.; SALLUM, E.A.; SALLUM, A.W.; TOLEDO, S.; NOCITI, F.H. Platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-1 combination and bone regeneration around implants placed into extraction sockets: a histometric study in dogs. **Implant Dent.**, v. 9, n. 2, p. 126-130, 2000.
46. TERRANOVA, V.P.; WIKESJÖ, U.M.E. Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cells of the periodontium. **J. Periodontol.**, v. 58, n. 6, p. 371-380, 1987.
47. TISCHLER, M. Platelet-rich plasma. The use of autologous growth factor to enhance bone and soft tissue grafts. **NY State Dent. J.**, v. 68 , n. 3 , p.22-24, 2002.
48. URIST, M.R. Bone: Formation by autoinduction. **Science**, v. 150, n. 3698, p.893-899, 1965.
49. VENTURELLI, A. Regeneración ósea: Plasma rico en plaquetas. **Rev. Asoc. Odontol. Argent.**, v. 87, n. 6, p. 459-467, 1999.
50. WEIBRICH, G.; KLEIS, W.K.G.; KUNZ-KOSTOMANOLAKIS, M.; LOOS, A.H.; WAGNER, W. Correlation of platelet concentration in platelet-rich plasma to the extraction method, age, sex, and platelet count of the donor. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v.16, n. 5, p. 693-699, 2001.
51. WHITMAN, D.; BERRY, R.L. A technique for improving the handling of particulate cancellous bone and marrow grafts using platelet gel. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 56, n.10, p. 1217-1218, 1998.
52. WHITMAN, D.H.; BERRY, R.L.; GREEN, D.M. Platelet gel: An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.55, n. 11, p. 1294-1299, 1997.

53. YI, Y.J.; YANG, J.H.; KWON, S.H. Bone response to implants treated with autologous platelet rich plasma (PRP) in the rabbits. **IADR/AADR/CADR 80th General Session** Abstr 2833, March 2002 San Diego.

ANEXO I

Tabela de dados colhidos a partir de amostras do sangue de pacientes ou alunos da Faculdade de Odontologia da UNISA, segundo o número de plaquetas (em milhares/ μ l) observado por terços (superior, médio e inferior) em tubos de coleta de sangue ou de centrifugação após uma centrifugação a 10 minutos, dupla centrifugação, ambas a 10 minutos e dupla centrifugação sendo a 1ª em 10 minutos e a 2ª em 15 minutos.

Sangue total	Terço superior 1ª centrif.	Terço médio 1ª centrifugação	Terço inferior 1ª centrifugação	Terço superior 2ª centrifugação	Terço médio 2ª centrifugação	Terço inferior 2ª centrifugação	Terço superior 15' centrifugação	Terço médio 15' centrifugação	Terço inferior 15' centrifugação
179	241	300	473	255	284	636	198	219	646
120	237	415	590	310	366	795	262	325	854
310	128	656	842	226	448	1474	298	430	1556
241	175	942	929	307	579	1246	284	283	1262
247	458	756	490	240	483	895	182	231	1184
242	217	557	687	319	332	612	255	288	670
166	211	342	478	240	262	606	189	214	568
219	332	478	481	323	356	722	268	289	796
258	205	615	614	434	430	699	240	303	832
229	295	542	580	286	429	779	332	347	780
257	416	688	759	454	477	739	417	481	840
87	124	382	602	233	352	692	215	232	731
109	288	404	528	129	299	758	166	225	800
275	350	670	760	474	482	861	405	428	950
227	349	529	623	344	339	910	267	309	1048
75	236	321	414	191	223	310	212	266	371
202	342	644	836	263	501	800	339	375	852
107	189	462	657	89	239	780	241	268	577
88	128	362	611	208	361	581	229	283	736
134	294	349	489	231	300	585	187	192	754
107	315	400	493	255	317	639	246	269	644
210	223	635	834	284	402	841	283	288	894
104	253	514	448	260	255	549	138	176	639
93	74	215	365	103	156	346	106	104	325
141	222	671	851	261	448	763	258	317	918
100	256	305	369	225	269	355	230	220	426
88	128	483	559	137	253	423	150	162	353
226	255	580	584	382	666	645	300	310	738
320	532	675	670	505	529	893	454	468	893
232	364	498	578	314	307	629	293	321	701
111	170	352	453	176	234	327	153	158	376
106	221	400	538	196	233	506	228	233	505
133	167	484	631	169	215	627	159	222	715

ANEXO II

CARTA DE INFORMAÇÃO**METODOLOGIA PARA OBTENÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS.**

Estas informações estão sendo fornecidas para a sua participação voluntária neste estudo que visa desenvolver metodologia para obtenção de plasma rico em plaquetas a partir de sangue do paciente.

Os procedimentos realizados serão os rotineiros para a coleta de sangue através de punção venosa periférica de veia do antebraço. Será coletada uma pequena quantidade de sangue (40 ml) o que não causa qualquer tipo de risco ou malefício ao doador. Pequeno desconforto ou manchamento temporário podem ocorrer na região da punção.

Não há benefício direto para o participante da pesquisa.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimentos de eventuais dúvidas. O principal investigador é o C.D. Ricardo S. Jahn que pode ser encontrado na Universidade de Santo Amaro (Rua Prof. Enéas Siqueira Neto, 340 Telefone 5929.5477). Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-UNISA) Rua Prof. . Enéas Siqueira Neto, 340 Telefone 5929.5477 , Fax: 520.9160;

É garantida a liberdade de retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição;

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

Não há despesas pessoais para o participante do estudo em qualquer fase deste estudo, incluindo exames e consultas relativas à pesquisa. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na instituição, bem como indenizações legalmente estabelecidas.

O pesquisador se compromete a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Obrigado.

Prof. Ricardo Jahn – Disciplina de Periodontia e Implantodontia UNISA

ANEXO III

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Metodologia para obtenção de plasma rico em plaquetas". Eu discuti com C.D. Ricardo S. Jahn sobre a minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos deste estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e compensação financeira e que tenho garantia de tratamento nesta instituição se necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento na instituição.

Data: / / .

Assinatura do paciente/representante legal

Data: / / .

Assinatura da testemunha

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Data: / / .

Assinatura do responsável pelo estudo.

ANEXO IV



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP



UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
Comitê de Ética em Pesquisas
Registro CONEP nº 306
Aprovado em 16/05/2000

PARECER Nº 41/2002

REGISTRO CEP UNISA Nº 63/2002 – Apresentado em 02/09/2002

Projeto de Pesquisa : “Metodologia para obtenção de plasma rico em plaquetas”.

Pesquisador Responsável : Prof. Dr. Ricardo Schmitutz Jahn

Instituição: Universidade de Santo Amaro – UNISA – SP – Faculdade de Odontologia

Área Temática : Odontologia

Prezado Pesquisador:

Ao se proceder à análise do processo em questão, cabe a seguinte consideração:

As informações apresentadas atendem aos aspectos fundamentais das Resoluções CNS 196/96, 251/97 e 292/99, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas – CEP UNISA, de acordo com as atribuições da Resolução 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto a ser realizado na Universidade de Santo Amaro – UNISA – SP, Faculdade de Odontologia.

Situação: Aprovado em 02/09/2002

São Paulo, 26 de Setembro de 2002

PROF. DR. LIBERATO JOHN ALPHONSE DI DIO
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisas
UNISA - Universidade de Santo Amaro

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução total ou parcial , desde que citada a fonte.

Ricardo Schmitutz Jahn
e-mail : jahn@apcd.org.br