

... POR ANÁLISE HISTOLÓGICA, DA EFICÁCIA
... RICO E POBRE EM PLAQUETAS NO
... TO DA REPARAÇÃO ÓSSEA DE ALVEÓLOS
... ANOS DESTINADOS À RECEPÇÃO DE



B0122555

U617.69 R671c 2005 ex.1.

CONSULTA

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO

Faculdade de Odontologia

ROGÉRIO DE LIMA ROMEIRO

COMPARAÇÃO, POR ANÁLISE HISTOLÓGICA, DA EFICÁCIA DOS
ASMAS RICO E POBRE EM PLAQUETAS NO ACELARAMENTO
A REPARAÇÃO ÓSSEA DE ALVEÓLOS DENTÁRIOS HUMANOS
DESTINADOS À RECEPÇÃO DE IMPLANTES

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

ROGÉRIO DE LIMA ROMEIRO

**COMPARAÇÃO, POR ANÁLISE HISTOLÓGICA, DA EFICÁCIA DOS PLASMAS
RICO E POBRE EM PLAQUETAS NO ACELERAMENTO DA REPARAÇÃO
ÓSSEA DE ALVÉOLOS DENTÁRIOS HUMANOS DESTINADOS À RECEPÇÃO
DE IMPLANTES**

SÃO PAULO

2005

ROGÉRIO DE LIMA ROMEIRO

**COMPARAÇÃO, POR ANÁLISE HISTOLÓGICA, DA EFICÁCIA DOS PLASMAS
RICO E POBRE EM PLAQUETAS NO ACELARAMENTO DA REPARAÇÃO
ÓSSEA DE ALVÉOLOS DENTÁRIOS HUMANOS DESTINADOS À RECEPÇÃO
DE IMPLANTES**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação, nível de Mestrado, da Faculdade de Odontologia da Universidade de Santo Amaro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Implantodontia

Orientador: Prof. Dr. José Luiz De Lorenzo

SÃO PAULO

2005

B. 2012 2555
Class. U617.69
Cutter R671c
Patri nº 2842
Tipo entrada DOPLAS
Nota Fiscal
Data rec. 03/10/05
Preço
Origem UNISA Fac.
de Odontologia

Ficha Catalográfica elaborada pela
Biblioteca Dr. Milton Soldani Afonso – Campus I

Romeiro, Rogério de Lima
R671c Comparação, por análise histológica, da eficácia dos
plasmas rico e pobre em plaquetas no aceleração da
reparação óssea de alvéolos dentários destinados à
recepção de implantes / Rogério de Lima Romeiro.
Orientação do Prof. Dr. José Luiz De Lorenzo. -- São
Paulo: 2005.
101 p.

Dissertação (Mestrado). Área de Concentração em
Implantodontia. Faculdade de Odontologia da
Universidade de Santo Amaro.

1. Implantes Dentários 2. Regeneração Óssea
3. Plaquetas 4. Fibrina I. Título

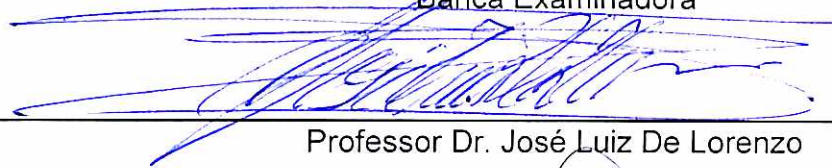
Rogério de Lima Romeiro

**COMPARAÇÃO, POR ANÁLISE HISTOLÓGICA, DA EFICÁCIA DOS PLASMAS
RICO E POBRE EM PLAQUETAS NO ACELERAMENTO DA REPARAÇÃO
ÓSSEA DE ALVÉOLOS DENTÁRIOS HUMANOS DESTINADOS À RECEPÇÃO
DE IMPLANTES.**

Dissertação apresentada à Universidade de Santo
Amaro, para obtenção do título de mestre, pelo programa
de Pós-Graduação em Odontologia. Área de
concentração em Implantodontia, sob orientação do Prof.
Dr. José Luiz De Lorenzo.

APROVADA EM 24/10/2005

Banca Examinadora



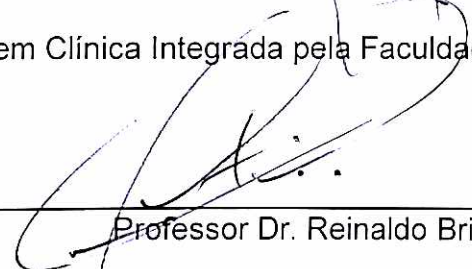
Professor Dr. José Luiz De Lorenzo

Doutor em Ciências, Área Microbiologia, pelo Instituto de Ciências Biomédicas da USP



Professora Dra. Fátima Neves Faraco

Doutora em Clínica Integrada pela Faculdade de Odontologia da USP



Professor Dr. Reinaldo Brito e Dias

Professor Titular do Departamento de Cirurgia, Prótese e Traumatologia
Maxilofaciais da Faculdade de Odontologia da USP

Média Final de Aprovação: _____

Menção: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

à Cláudia,

minha fiel companheira,

minha amada namorada,

pela participação direta e indireta nesse trabalho;

Aos meus Pais, José Antônio e Abiany, que fizeram de mim um homem

ao me ensinarem, com amor, o caminho da dignidade e da fé.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Luiz De Lorenzo, pelo apoio, incentivo e confiança com que orientou este trabalho.

Aos amigos companheiros de Uberaba:

Sérgio Henrique Ferreira de Oliveira, minha dupla e meu grande companheiro.

Pedro Feitosa, pelo bom humor e atenção de sempre.

Paulo Kawakami, um admirável profissional e uma pessoa que dispensa comentários.

Aos amigos da Van:

Marcelo Harduin Couto (Urso) pelos momentos de descontração.

Adriano Campos (Dri-dri) pelas lições de vida.

Alexandre Gonçalves (Tranqueira) pelo grande aprendizado em Implantodontia.

Alessandra Castro (Lelê) pela amizade.

Aos amigos de Mestrado: Marcelo Corsini, Marcelo Vitale, Marcelo Lima, Rafael Manfro, Vânia Coutinho, Donata de Souza Soares, Fabiano Fonseca, Jorge Breda, Macson Bergamin, Charles Duvosin, Walter Rosa, Luiz Macedo Mngueira, Nivaldo Noboru pela experiência de vida e amizade compartilhada.

Aos Profs. Sérgio de Oliveira e Newton De Bortoli Júnior, meus maiores mestres na Implantodontia, responsáveis pela minha dedicação a essa área.

À empresa De Bortoli, em nome do Prof. Dr. Newton De Bortoli Júnior, que gentilmente cedeu a centrífuga e os implantes e da funcionária Amanda Bonani Migueis, sempre atenciosa e eficaz.

Ao Prof. Davi Romeiro Aquino, meu primo e companheiro, que sempre me auxiliou na execução desse trabalho e ainda foi responsável pela análise estatística.

À Profa. Dra. Cláudia R. G. C. M. de Oliveira pela realização da análise histológica.

Ao Prof. Márcio Antônio de Faria pela apoio e orientação histológica.

Ao Prof. Alexandre Streit pela orientação nas questões referentes a hematologia.

À funcionária do Departamento de Histologia da UNISA Kay Áquila pela dedicação com que realizou as lâminas histológicas.

Aos pacientes que possibilitaram a execução desse trabalho.

Às funcionárias da Biblioteca Luciana da Silva Costa e Renata Santos da Silva pela atenção e eficiência.

Às funcionárias Juliana Selma Oliveira e Sabrina Moraes pelo apoio e dedicação incondicional a todos os mestrandos.

RESUMO

A capacidade ósseo-indutora do plasma rico em plaquetas (PRP), uma fonte autógena e altamente concentrada de fatores de crescimento, tem sido atestada por muitos pesquisadores. No entanto, existe carência de trabalhos destinados a avaliar se o plasma pobre em plaquetas (PPP), que apresenta plaquetometria em torno de dez vezes menor que a do PRP, mas contém alta concentração de fibrina, pode também acelerar esse processo. O objetivo deste estudo foi comparar, por análise histológica, a reparação óssea processada 28 dias após o preenchimento de alvéolos dentários com PRP, PPP ou de forma natural pelo coágulo sangüíneo (controle), imediatamente após três exodontias realizadas nas mesmas arcadas dentárias. Para possibilitar essa análise foram estabelecidos, como parâmetros de reparação, os graus de neovascularização e de fibrose, a atividade de osteoblastos e osteoclastos e a presença de osso imaturo e lamelar, aos quais foram atribuídos escores de zero a três, em ordem crescente do grau de ocorrência. Dos cinco parâmetros analisados, o PRP apresentou melhor resultado em relação à neovascularização ($p=0,0255$) e atividade de osteoblastos e osteoclastos ($p<0,01$). Não houve diferença significativa entre os cinco parâmetros ao compararmos os alvéolos preenchidos com PPP aos alvéolos-controle. Em síntese, os resultados mostraram que, em relação ao coágulo sangüíneo, em 28 dias o PRP é efetivo no aceleração da reparação óssea de alvéolos e que o PPP não altera o grau dessa reparação.

Palavras-chave: implantes dentários, regeneração óssea, plaquetas, fibrina

ABSTRACT

The osseous-inductive capability of the platelet rich plasma, a self and highly intent source of growing factors, has been certified for many researchers. However, there is lack of studies to evaluate if the platelet poor plasma (PPP), that presents ten times less platelets than the PRP, but is fibrin highly concentrate, may also speed up this process. The objective of this study was to compare, in histological analysis, the processed bone repairing 28 days after the fulfilling of dental alveolus with PRP, PPP or natural clot (control), immediately after three teeth extractions in the same dental arches. To make possible this analysis, repairing parameters had been established, as the degrees of new vascular formation and fibrosis, the osteoblasts and osteoclasts activity and the presence of immature and lamellar bone, to which had been attributed scores from zero to three, orderly increasing in occurrence degree. Of the five analyzed parameters, the PRP presented better results in relation of new vascular formation ($p=0,0255$) and osteoblasts and osteoclasts activity ($p<0,01$). It didn't have significant difference betewen the five parameters comparing the alveolus filled in with PPP and controuls ones. In synthesis, the results had shown that, comparing to the blood clot, in the period of 28 days the PRP is effective to speed up the alveolus bone repairing and that the PPP does not modify the degree of this repairing.

Keywords: dental implants, bone regeneration, blood platelet, fibrin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Tubos com citrato de sódio para a coleta do sangue.....	37
Figura 2 – Coleta do sangue.....	38
Figura 3 – Primeira centrifugação.....	39
Figura 4 – Separação do plasma pobre em plaquetas.....	39
Figura 5 – Separação do plasma rico em plaquetas.....	40
Figura 6 – Separação de leucócitos e plaquetas jovens (<i>buffy – coat</i>).....	40
Figura 7 – Colocação dos plasmas no tubo seco.....	41
Figura 8 – Segunda centrifugação.....	41
Figura 9 – PPP e PRP após a segunda centrifugação.....	42
Figura 10 – Gel de plasma pobre em plaquetas.....	42
Figura 11 – Gel de plasma rico em plaquetas (PRP).....	43
Figura 12 – Caso clínico.....	44
Figura 13 – PPP inserido no alvéolo após a exodontia.....	45
Figura 14 – PRP inserido no alvéolo após a exodontia.....	45
Figura 15 – Suturas.....	46
Figura 16 – Guia cirúrgico.....	47
Figura 17 – Remoção do espécime ósseo.....	47
Figura 18 – Espécime ósseo fixado em solução de Boin.....	48
Figura 19 – Esfregaço do PRP, corado por HE, utilizado na padronização para atestar a integridade das plaquetas após as duas centrifugações (100X).....	54
Figura 20 – Neovascularização (N) em grau discreto (score 1) constatada em 28 dias na amostra óssea de alvéolo preenchido com PPP (caso 3) (coloração HE, 200X).....	55

Figura 21 – Neovascularização (N) em grau acentuado (escore 3) constatada em 28 dias na amostra óssea de alvéolo preenchido com PRP (caso 9)(coloração HE, 200X).....	55
Figura 22 – Ausência de fibrose (escore 0) constatado em 28 dias na amostra óssea do alvéolo-controle preenchido com coágulo sangüíneo (caso 3)(coloração HE, 100X).....	56
Figura 23 – Fibrose (F) em grau acentuado (escore 3) constatado em 28 dias na amostra óssea de alvéolo preenchido com PRP (caso 9)(coloração HE, 100X).....	56
Figura 24 – Presença de osso imaturo (OI) constatados em 28 dias na amostra óssea de alvéolo preenchido com PRP (caso 9)(coloração HE, 200X).....	57
Figura 25 – Quadro gerado pelo Software BioEstat 2.0, quando da comparação da neovascularização ocorrida em 28 dias nos alvéolos-controle (3) e nos que receberam aplicação do PRP (1) e PPP (2).....	69
Figura 26 – Distribuição média dos escores atribuídos ao parâmetro neovascularização observado em 28 dias nos alvéolos preenchidos com PRP, PPP e coágulo sangüíneo (controle).....	69
Figura 27 – Quadro gerado pelo Software BioEstat 2.0, quando da comparação da fibrose constatada em 28 dias nos alvéolos-controle (3) e nos preenchidos com PRP (1) e PPP (2).....	70
Figura 28 – Distribuição média dos escores atribuídos ao parâmetro fibrose observado em 28 dias nos alvéolos preenchidos com PRP, PPP e coágulo sangüíneo (controle).....	70

Figura 29 – Quadro gerado pelo Software BioEstat 2.0, quando da comparação da atividade de osteoblastos e osteoclastos constatada em 28 dias nos alvéolos-controle (3) e nos preenchidos com PRP (1) e PPP (2).....	71
Figura 30 – Distribuição média dos escores obtidos atribuídos ao parâmetro atividade de osteoblastos e osteoclastos observado em 28 dias nos alvéolos preenchidos com PRP, PPP e coágulo sangüíneo (controle).....	71
Figura 31 - Quadro gerado pelo Software BioEstat 2.0, quando da comparação da presença de osso imaturo constatada em 28 dias nos alvéolos-controle (3) e nos preenchidos com PRP (1) e PPP (2).....	72
Figura 32 – Distribuição média dos escores atribuídos ao parâmetro presença de osso imaturo observado em 28 dias nos alvéolos preenchidos com PRP, PPP e coágulo sangüíneo (controle).....	72
Figura 33 – Quadro gerado pelo Software BioEstat 2.0, quando da comparação da presença de osso lamelar constatada em 28 dias nos alvéolos-controle (3) e nos preenchidos com PRP (1) e PPP (2).....	73
Figura 34 – Distribuição média dos escores obtidos atribuídos ao parâmetro presença de osso lamelar observado em 28 dias nos alvéolos preenchidos com PRP, PPP e coágulo sangüíneo (controle).....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação dos dentes com necessidade de exodontia em cada paciente.....	35
Tabela 2 - Relação dos alvéolos preenchidos com PRP ou com PPP ou com coágulo sanguíneo (controle).....	36
Tabela 3 – Escores atribuídos aos parâmetros (neovascularização, fibrose, atividade de osteoblastos e osteoclastos) utilizados na verificação do reparo ósseo em 28 dias.....	51
Tabela 4 –. Contagem de plaquetas no sangue, no PRP e no PPP de quatro pacientes aleatoriamente escolhidos, com a finalidade de padronizar previamente a metodologia de obtenção do PRP e PPP.....	53
Tabela 5 – Resultados da análise dos critérios empregados na verificação da reparação óssea ocorrida em 28 dias nos três alvéolos do caso 1.....	58
Tabela 6 – Resultados da análise dos critérios empregados na verificação da reparação óssea ocorrida em 28 dias nos três alvéolos no caso 2.....	59
Tabela 7 – Resultados da análise dos critérios empregados na verificação da reparação óssea ocorrida em 28 dias nos três alvéolos no caso 3.....	60
Tabela 8 – Resultados da análise dos critérios empregados na verificação da reparação óssea ocorrida em 28 dias nos três alvéolos no caso 4.....	61
Tabela 9 – Resultados da análise dos critérios empregados na verificação da reparação óssea ocorrida em 28 dias nos três alvéolos no caso 5.....	62
Tabela 10 – Resultados da análise dos critérios empregados na verificação da reparação óssea ocorrida em 28 dias nos três alvéolos no caso 6.....	63
Tabela 11 – Resultados da análise dos critérios empregados na verificação da reparação óssea ocorrida em 28 dias nos três alvéolos no caso 7.....	63

Tabela 12 – Resultados da análise dos critérios empregados na verificação da reparação óssea ocorrida em 28 dias nos três alvéolos no caso 8.....	65
Tabela 13 -- Resultados da análise dos critérios empregados na verificação da reparação óssea ocorrida em 28 dias nos três alvéolos no caso 9.....	66
Tabela 14 -- Resultados da análise dos critérios empregados na verificação da reparação óssea ocorrida em 28 dias nos três alvéolos no caso 10.....	67
Tabela 15 -- Resultados da análise dos critérios empregados na verificação da reparação óssea ocorrida em 28 dias nos três alvéolos no caso 11.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PRP: plasma rico em plaquetas

PPP: plasma pobre em plaquetas

PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas

TGF: fator de crescimento de transformação

VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular

FGF: fator de crescimento de fibroblastos

EGF: fator de crescimento endotelial

IGF: fator de crescimento semelhante à insulina

GH: hormônio de crescimento

DFDBA: aloenxerto ósseo desmineralizado, seco e congelado

e-PTF-E: politetrafluoretileno

PRGF: plasma rico em fatores de crescimento

GFC: cimento de fatores de crescimento

FCR: força centrífuga relativa

G: gravidade

R: raio

N: velocidade de rotação

rpm: rotação por minuto

CaCl₂: cloreto de cálcio

HE: hematoxilina-eosina

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. PROPOSIÇÃO.....	18
3. REVISTA DA LITERATURA.....	19
3.1. Processo de reparo ósseo alveolar.....	19
3.2. Plaquetas e fatores de crescimento delas derivados.....	20
3.3. Aplicação de fatores de crescimento ósseo (BGF) na reparação óssea.....	23
3.4. Plasma rico e plasma pobre em plaquetas.....	25
3.5. Protocolos de obtenção do PRP e do PPP.....	29
3.6. Coagulação do PRP e do PPP (formação do gel).....	30
4. MATERIAIS E MÉTODO.....	33
4.1. Atendimento aos princípios da Bioética.....	33
4.2. Seleção dos pacientes.....	33
4.3. Padronização da metodologia.....	36
4.4. Técnica utilizada para a obtenção do PRP e PPP.....	37
4.5. Atos cirúrgicos.....	43
4.6. Coleta de material ósseo para biópsia.....	46
4.7. Análise histológica.....	48
4.8. Análise estatística.....	51
5. RESULTADOS.....	53
5.1. Contagem de plaquetas no sangue, PRP e PPP.....	53
5.2. Análise histológica.....	54
5.3. Análise estatística.....	69

6. DISCUSSÃO.....	74
6.1. Concentração plaquetária.....	77
6.2. Processo de coagulação do PRP e PPP.....	78
6.3. Aspectos conceituais referentes à metodologia e resultados.....	79
7. CONCLUSÃO.....	84
8. REFERÊNCIAS.....	85
ANEXOS.....	94

1. INTRODUÇÃO

A reabilitação bucal com implantes osseointegráveis exige uma quantidade suficiente de osso para permitir uma boa ancoragem dos mesmos (PIKOS, 1998; PIKOS, 2000). Adequadas altura e largura são necessárias para acomodar implantes de dimensões apropriadas, com uma angulação axial que permita a confecção da prótese (LYNCH et al., 1991). Um dos problemas enfrentados pelo implantodontista é que a perda dos dentes compromete o volume e a posição do rebordo alveolar, especialmente quando ocorre como consequência de periodontite (GARG et al., 1998).

Alguns reparos anatômicos também se impõem como restrições às técnicas convencionais, desde que não haja um preparo prévio do leito receptor dos implantes. Diversas alternativas, tais como a elevação do soalho do seio maxilar ou da fossa nasal, bem como o reposicionamento do nervo alveolar inferior, têm sido documentadas para qualificar uma região da maxila ou da mandíbula como apta a receber implantes (GARG et al., 1998; PIKOS, 2000; SCHER et al., 1999).

A reconstrução da altura e da largura do rebordo tem sido mais bem obtida por enxertia com osso autógeno, considerada o padrão de ouro nas reconstruções dos maxilares (PIKOS, 2000). Entre as regiões doadoras de osso, a crista ilíaca e a tibia têm se destacado como os principais sítios extrabucais. A remoção de osso da sínfise ou ramo mandibular oferece, entretanto, melhor acesso além de baixa morbidade. O enxerto dessa região está também associado a uma menor reabsorção durante sua integração, uma vez que sua bioquímica é similar à da área receptora (GARG et al., 1998).

Para melhorar o sucesso das enxertias ósseas autógenas, o plasma rico em plaquetas (PRP), obtido a partir da centrifugação de sangue periférico do próprio paciente, tem se mostrado um importante coadjuvante nas reconstruções maxilares. As plaquetas são depósitos de importantes fatores de crescimento intensificando, assim, a regeneração óssea e minimizando os efeitos da absorção do enxerto em sua fase de integração. O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e os fatores transformadores de crescimento $\beta 1$ e $\beta 2$ (TGF- $\beta 1$ e TGF- $\beta 2$) estão associados a diversos eventos celulares que melhoram o reparo ao redor de enxertos periodontais (OBARRIO et al., 2000).

Um número considerável de pesquisas, desenvolvidas inclusive por alunos do Curso de Mestrado em Implantodontia da nossa Universidade, tem comprovado a eficácia do PRP na reparação principalmente do osso, mas resta a possibilidade de que o plasma pobre em plaquetas (PPP) ou rico em fibrina também possa favorecê-la.

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi comparar, por análise histológica realizada 28 dias após exodontias processadas na mesma arcada de seis pacientes candidatos a receberem implantes nesses locais, o grau de reparação óssea ocorrido em alvéolos preenchidos no ato cirúrgico com plasma rico em plaquetas ou com plasma pobre em plaquetas, tendo como controles alvéolos preenchidos naturalmente com o coágulo sangüíneo.

3. REVISTA DA LITERATURA

3.1. Processo de reparo ósseo alveolar

O processo de reparo ósseo depende de dois parâmetros indispensáveis: suprimento sanguíneo e suporte mecânico.

A estrutura dos ossos faciais é determinada por seus componentes e propriedades mecânicas. Os ossos cortical e medular da mandíbula e da maxila são similares quanto à composição, mas se diferenciam pela distribuição geométrica com que são formados. Os ossos do terço médio da face são formados por uma porção cortical delgada e outra esponjosa, menos compacta que a da mandíbula. Conseqüentemente, permitem maior vascularização, que por sua vez promove maior nutrição, favorecendo a reparação óssea (PEREIRA FILHO et al., 2004). De acordo com Boyne (1966), em quatro semanas, o alvéolo dentário deverá estar preenchido com osso imaturo e, segundo Amler (1969), o reparo do alvéolo dentário humano após exodontia está completo ao redor de 60 dias.

O reparo dos alvéolos dentários se processa em quatro fases (OHTA et al., 1993):

a) angiogênica inicial: desenvolvida na semana que se segue à exodontia e na qual, a partir das terminações dilaceradas dos vasos, forma-se o coágulo sanguíneo. Após 48 a 72 horas ocorre a contração do coágulo e o início da formação do tecido de granulação, com grande proliferação de vasos sanguíneos e fibroblastos imaturos a partir da porção apical do alvéolo. Em 96 horas observa-se proliferação epitelial para a margem da ferida;

b) formação de novo osso: entre a segunda e a terceira semana após a exodontia, o alvéolo inteiro está preenchido por tecido de granulação, observando-se a presença de tecido conjuntivo jovem e a formação de tecido osteóide a partir do fundo do alvéolo. Durante esse período o osso cortical da crista do rebordo continua a ser reabsorvido, especialmente na região intersseptal e na lâmina cortical mais delgada;

c) crescimento ósseo: começa na quarta semana após a exodontia, com a mineralização do tecido osteóide e a formação de osso novo a partir das paredes do alvéolo e da região apical, em direção à porção central. A cobertura epitelial sobre a ferida está praticamente completada;

d) reorganização do osso: ocorre pelo menos seis semanas após a exodontia, com as trabéculas primárias do osso se remodelando para formar uma camada esponjosa mais espessa. A lâmina cortical ao redor do alvéolo não é totalmente reabsorvida. A fase de remodelação continua de quatro a seis meses após a exodontia.

A cronologia do reparo alveolar apresentada nessas quatro fases pode variar de indivíduo para indivíduo, de acordo com a idade e condições sistêmicas e locais.

3.2. Plaquetas e fatores de crescimento delas derivados

As plaquetas são corpúsculos anucleados com forma de pequenos discos arredondados, com 1,0 a 3,0 μ m de diâmetro e espessura de 0,5 a 1,0 μ m. Derivam de prolongamentos citoplasmáticos desprendidos dos megacariócitos da medula óssea; cada megacariócito pode produzir duas mil a três mil plaquetas, que apresentam uma vida média de cerca de dez dias no sangue circulante. Em

condições normais, sua concentração no sangue é entre 150 mil e 400 mil plaquetas/cc e entre as suas principais funções estão a hemostasia e a promoção da coagulação sangüínea. O citoplasma da plaqueta é viscoso e contém numerosas organelas e grânulos de vários tipos; os principais são as mitocôndrias, os grânulos densos e os grânulos α . Estes contêm o fator plaquetário IV, que participa dos fenômenos de coagulação do sangue e contém ainda β -tromboglobulina, fibrinogênio e fatores de crescimento (NURDEN, 1977).

Durante o processo de degranulação muitas proteínas são liberadas, dentre elas os polipeptídios denominados genericamente de fatores de crescimento. Os mais conhecidos são os fatores de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), de crescimento do endotélio vascular (VEGF), de crescimento de fibroblastos (FGF), de crescimento de transformação beta (TGF- β), de crescimento endotelial (EGF) e de crescimento semelhante à insulina (IGF). Nessas circunstâncias, caso as plaquetas sejam empregadas como fontes exógenas de fatores de crescimento, passará a existir um reforço das concentrações já existentes, formando um estímulo adicional para as atividades celulares, potencializando o reparo local (ANITUA, 1999).

Os fatores de crescimento funcionam como mediadores naturais, regulando eventos celulares relacionados à regeneração tecidual, quimiotaxia, diferenciação e proliferação celular e síntese de matriz (KIRITSY et al., 1993). Outro importante achado atribuído a essas citocinas é o estímulo da angiogênese.

Seu principal modo de ação é parácrino, ou seja, são sintetizados especialmente por plaquetas e seus efeitos são exercidos em fibroblastos e precursores de osteoblastos (MARX, 1999).

Embora nos grânulos alfa das plaquetas ocorra a maior síntese de PDGF, TGF- β 1 e β 2, linfócitos, neutrófilos, macrófagos e endotélio participam também desse processo (ANITUA, 1999; MARX et al., 1998).

O PDGF é constituído por duas cadeias de aminoácidos, ambas igualmente potentes em estimular a síntese de DNA em fibroblastos (WANG, 1994). Apesar de ter sido relatada a síntese de colágeno aumentada no osso e nas culturas celulares ósseas após a exposição ao PDGF, a produção de células geradoras de colágeno não parece ser afetada. Ao invés disso, o aumento na síntese de colágeno é relacionado ao aumento do número de células secundárias e à replicação celular acentuada. A ligação dessa proteína a receptores do tipo tirosina-cinase presentes em células mesenquimais indiferenciadas, angioblastos, macrófagos e fibroblastos, induz mitose e liberação de citocinas que promovem a quimiotaxia de precursores de osteoblastos (ANTONIADES; HUNKAPILLER, 1983; BECKER et al., 1992; GIANNOBILLE et al., 1994; HOWELL et al., 1997; WANG, 1994). Os macrófagos ativados ainda secretam citocinas que irão intensificar a angiogênese.

Os IGF são caracterizados por regularem significativamente o crescimento e a função celular. A maior parte dos IGF-I é produzida no fígado em resposta aos níveis de hormônio de crescimento (GH) no soro, mas os IGF também são sintetizados em outros tecidos, tanto esqueléticos como não-esqueléticos (KOKA; VANCE; MAZE, 1995).

O IGF-II, primeiramente referido como um fator de crescimento esquelético, tem uma seqüência aproximadamente 60% homóloga ao IGF-I. Também promovem aumento de replicação celular e da síntese e absorção de colágeno (KOKA; VANCE; MAZE, 1995).

O TGF- β , anteriormente chamado de fator I de crescimento derivado do osso, está presente em grandes quantidades tanto nas células ósseas como na

matriz óssea, sendo este seu maior reservatório. Sua principal atividade é induzir a mitose de células mesenquimais indiferenciadas, fibroblastos e macrófagos que assim estimulados, também passam a sintetizar este fator de crescimento. O TGF- β 1 e β 2 funcionam como quimiotáticos e mitogênicos de pré-osteoblastos, induzem a secreção de colágeno por essas células iniciando a reparação óssea e inibem osteoclastos favorecendo a deposição da matriz (SEYEDEDIN, 1989).

3.3. Aplicação de fatores de crescimento ósseo (BGF) na reparação óssea

A literatura sobre implantes dentários oferece informações promissoras, mas limitadas, a respeito do uso de fatores de crescimento ósseo. O mecanismo de ação dos BGF é vital para nossa compreensão da acentuação da osseointegração, tanto para a formação óssea rápida quanto para o aumento do prognóstico para osseointegração em áreas de pobre qualidade óssea.

Conforme Lynch et al. (1989), o PDGF e o IGF-I estimulam a regeneração periodontal em cães da raça Beagle, pois são mitogênicos e quimiotáticos para fibroblastos e osteoblastos.

Em outro trabalho, Lynch et al. (1991) desenvolveram a hipótese de que a combinação de 3 μ g de PDGF e IGF-I, em curto prazo de tempo, pode acentuar a regeneração dos componentes moles e duros do periodonto. A análise dos resultados revelou aumento significativo de cinco a dez vezes no osso e cimento. A altura e área total do osso novo continuaram a aumentar em duas a cinco semanas. O osso novo apresentava processo de maturação normal e foi também constatada formação de ligamento periodontal fisiológica entre o osso novo e o cimento novo. Não houve aumento de anquilose nos locais tratados.

Também em 1991, Lynch et al. publicaram um trabalho com o objetivo de avaliar os eventos precoces de reparação óssea ao redor de implantes de titânio inseridos com e sem a aplicação da associação de PDGF com IGF-I. Os resultados sugeriram que a combinação PDGF/IGF-I pode estimular a regeneração óssea ao redor de implantes de titânio ajustados por pressão.

Becker et al. (1992) avaliaram a deposição óssea em torno de implantes comparando o uso de membrana de e-PTF-E (politetrafluoreileno), isolada ou associada ao DFDB (aloenxerto ósseo desmineralizado, seco e congelado), com a combinação PDGF/IGF-I. Os resultados mostraram mais altas taxas de densidade óssea em sítios tratados com membrana e-PTF-E mais PDGF/IGF-I em torno dos implantes que nos tratados com membrana e-PTF-E sozinha ou associada ao DFDB.

Giannobile et al. (1994) estabeleceram que a aplicação única da associação de PDGF/IGF-I, após terapia periodontal, é capaz de promover regeneração dos tecidos periodontais, constatação corroborada por Howell et al. (1997).

Conforme Lind et al. (1998), os fatores de crescimento são promissores para a melhora da reparação óssea em osteotomias e na fixação biológica de implantes.

Meraw et al. (2000) trataram defeitos de perimplantite com combinação de fatores de crescimento, para avaliar o benefício do uso da combinação desses fatores como guia de regeneração óssea ao redor dos implantes dentários. Os resultados indicaram um efeito significativo dos fatores de crescimento no aumento do contato osso-implante e na quantidade de osso por área de superfície. Em comparação com o controle, a aplicação do cimento simples causou somente ligeiro aumento nessa área.

Estudos futuros podem ser benéficos para determinar a vantagem do uso dos fatores de crescimento em outras aplicações regenerativas.

3.4. Plasma rico e plasma pobre em plaquetas

O plasma rico em plaquetas (PRP) é uma preparação autógena, com alta concentração de plaquetas obtida a partir da centrifugação do sangue total (LANDESBURG; MOSES; KARPATKIN 1998; LANDESBURG; ROY; GLICKMAN, 2000). O sangue coletado é tratado com um anticoagulante adequado e assim mantido até a centrifugação. Devido à diferença de densidade, as células sangüíneas irão se organizar durante a centrifugação em três níveis diferentes. As hemácias ocupam a porção mais inferior, enquanto o plasma contendo as plaquetas ocupa a porção mais superior. Nesse plasma ainda podem se diferenciar dois níveis, sendo que o PRP ocupará a porção intermediária, entre as células vermelhas e o plasma pobre em plaquetas ou PPP (RODRIGUES; KATAYAMA, 2002; RUTHERFORD et al., 1993). A plaquetometria do PRP oscila entre 500 mil a um milhão de plaquetas por microlitro de sangue (OBARRIO et al., 2000).

O plasma pobre em plaquetas (PPP) também é referido como plasma rico em fibrina ou como cola alógena de fibrina. Nele são detectadas cerca de 30 a 70 mil plaquetas por microlitro de sangue (EFEUGLU; AKÇAY; ERTÜRK, 2004). A Ortopedia e a Cirurgia Plástica têm se valido das propriedades adesivas da fibrina e da aplicação de um derivado de fibrinogênio em hemorragias cerebrais e hepáticas. O PPP mimetiza os últimos passos da cascata de coagulação com a conversão de fibrinogênio em fibrina, cuja função primária é a obtenção de hemostasia e a adesão dos retalhos. Sua eficácia no selamento de capilares controla facilmente o sangramento, reduzindo a formação de edemas e hematomas em cirurgias plásticas (MAN; PLOSKER; WINLAND-BROMN, 2001).

Depois de obtido, o PRP, que além das plaquetas contém leucócitos, pode ser transformado em gel pela adição de trombina bovina e cloreto de cálcio (SHMITZ; HOLLINGER, 2001). Na presença de íons cálcio, a trombina promove a clivagem do fibrinogênio plasmático em fibrina. Forma-se, então, um composto insolúvel, de consistência semelhante a um gel, que estimula a degranulação das plaquetas e liberação de citocinas que funcionam como fatores de crescimento (OBARRIO et al., 2000; WHITMAN et al., 1997). O PPP também pode se tornar gel pela adição das mesmas substâncias.

O PRP tem ampla indicação na Cirurgia Buco-maxilo-facial, Periodontia e Implantodontia, especialmente no que diz respeito à sua utilização para melhorar a incorporação de enxertos autógenos. O gel de plaquetas permite que os enxertos particulados possam ser adaptados e mantidos no leito receptor, sem o risco de extrusão facilitando, assim, as reconstruções mandibulares, os reparos de fissuras e fístulas buconasais ou sinusais e reconstruções necessárias à colocação de implantes (WHITMAN; BERRY, 1998).

O PRP contém um número de fatores de crescimento/citocinas que podem ajudar a acelerar a maturação do enxerto ósseo. A bioquímica do tecido receptor e do próprio enxerto é altamente intrigante. Porém, atualmente, estudos e experiências com o PRP adicionado ao enxerto têm mostrado consolidação do enxerto na metade do tempo, além de incremento de 15 a 30% na densidade do osso trabecular (MARX et al., 1998). A liberação de citocinas que funcionam como fatores de crescimento melhora o processo de reparo ao redor do enxerto, intensificando o seu aproveitamento (YAMAZAKI et al., 2004). A esses fatores, tem sido atribuída a capacidade de aumentar a densidade e quantidade de osso ao redor de implantes (BECKER et al., 1992).

O PDGF parece ser o primeiro fator de crescimento presente na ferida e inicia a reparação dos tecidos conjuntivo e ósseo. As atividades específicas mais importantes do PDGF incluem mitogênese (aumento da população de células, principalmente as envolvidas na reparação), angiogênese (mitose endotelial), ativação de macrófagos e origem da segunda fase dos fatores de crescimento para o reparo continuado e regeneração óssea. Há aproximadamente 0,06ng de PDGF por milhão de plaquetas ou cerca de 1.200 moléculas de PDGF por plaqueta, demonstrando o grande potencial destas (ROSSI JÚNIOR; LEMOS; PÍSPICO, 2001).

A teoria é que essas propriedades aumentam a quantidade inicial de PDGF, o que propicia uma maior atividade da célula osseocompetente de forma mais completa do que quando ocorre no enxerto e no meio do coágulo apenas. Além disto, acredita-se que o aumento da rede de fibrina criado pelo PRP aumenta a ósseo-indução do início ao fim da consolidação do enxerto. As proteínas TGF- β 1 e β 2 são os fatores de crescimento mais protéicos envolvidos com o reparo do tecido conjuntivo em geral e regeneração óssea. Os TGF- β representam um mecanismo que mantém o módulo de regeneração óssea e a reparação em longo prazo e, com o tempo, se transformam em um fator de remodelação óssea. A função mais importante do TGF- β 1 e β 2 parece ser a quimiotaxia e a mitogênese dos precursores de osteoblastos e sua habilidade para estimular a deposição de matriz de colágeno e óssea na reparação da ferida e do osso (MARX et al, 1998). Além disto, as duas proteínas TGF inibem a formação de osteoclastos e a reabsorção óssea e, assim, favorecem mais a formação do que a reabsorção óssea por dois mecanismos diferentes (DIAS; BARROS; ANDRADE, 2002).

Um modelo razoável tem sido desenvolvido para a regeneração óssea em enxertos celulares de medula esponjosa baseado em trabalhos anteriores e em

conhecimentos recentes. Este modelo também aponta para dois fatores fundamentais que influenciam a regeneração óssea normalmente e mostram, como as quantidades aumentadas de cada um, fornecidas pelo PRP, produzem maior rapidez de formação óssea e quantidade maior de osso. A ampliação da influência do PDGF e do TGF- β pela técnica de seqüestro e concentração de plaquetas no PRP é vista como ferramenta disponível e prática para aumentar a taxa de formação óssea e a quantidade de osso formado.

Vários pesquisadores mostraram, no homem, grandes ou pequenas vantagens na associação do PRP com outros materiais de enxertia, principalmente o osso autógeno (CHAGAS; OLIVEIRA; DE BORTOLI JÚNIOR, 2004; MAZOR et al., 2004; OYAMA et al., 2004; THOR, 2002). No entanto, em animais de experimentação como carneiros e porcos, os resultados não foram convincentes (FURST et al., 2003; GRAGEDA et al., 2005; JACKSE et al., 2003; WILTFANG et al., 2003; WILTFANG et al., 2004), a não ser no sentido de acelerar a osseointegração (ZECHNER et al., 2003).

Como o objetivo de nossa pesquisa foi avaliar a ação isolada do PRP e PPP na reparação óssea em humanos, limitar-nos-emos a analisar somente os trabalhos congêneres.

Anitua (1999), utilizando um protocolo de obtenção de PRGF (plasma rico em fatores de crescimento), avaliou o processo de reparação de feridas cirúrgicas produzidas por exodontias em 20 pacientes e destinadas à colocação de implantes. Foram utilizados dois grupos de estudo, nos quais dez pacientes designados casualmente fizeram parte do grupo experimental em que os alvéolos foram preenchidos com PRGF. Em cinco, o PRGF foi misturado com osso autógeno. Nos sítios-controle o PRGF não foi utilizado. Biópsias foram realizadas após dez e 16 semanas para análise histológica que permitiu constatar que em todos os casos a

epitelização foi completa e significativamente melhor que nas áreas não tratadas com PRGF. Entre os pacientes que tiveram áreas tratadas com PRGF, oito mostraram amadurecimento do osso compacto, com trabéculas bem organizadas e morfologia normal. Os outros dois tratados com PRGF apresentaram tecido conjuntivo com trabéculas não organizadas. No grupo-controle observou-se uma situação homogênea, com presença de tecido conjuntivo contendo trabéculas ósseas. Em nenhum caso ocorreu amadurecimento ósseo. O grau de organização trabecular foi significativamente diferente entre as amostras teciduais coletadas na 10ª e na 16ª semana.

Fontana et al. (2004) avaliaram os efeitos do PRP sobre a resposta do osso perimplantário em ratos *Wistar*, constatando que a quantidade de osso recém-formado no grupo teste (com PRP) foi significativamente maior que no controle.

Quanto à ação do PPP no reparo ósseo, não nos foi possível encontrar nenhum trabalho na literatura.

3.5. Protocolos de obtenção do PRP e do PPP

Os protocolos para obtenção do PRP variam basicamente no número e tempos de centrifugação e na força gravitacional desenvolvida pela centrífuga, que é diretamente proporcional ao raio da centrífuga utilizada e as rotações por minuto. A fórmula adotada é $FCR = 0,00001118 \times R \times N^2$, sendo FCR a força centrífuga relativa medida em gravidade (G), R o raio da centrífuga e N o número de rotações. Aplicando essa fórmula podemos utilizar qualquer centrífuga e adaptá-la a qualquer protocolo.

No entanto, na literatura encontramos um número muito grande de variações que dificultam sobremaneira a opção pela metodologia mais adequada:

- Anitua (1999) – uma centrifugação a 160G por 6 min.;
- Landesberg; Roy; Glickman (2000) – duas centrifugações a 200G por 10 min.;
- Sonnleitner et al. (2000) – dupla centrifugação: 120G por 20 min. e 400G por 15 min.;
- Rossi Júnior; Lemos; Píspico (2001) – uma centrifugação a 750 rpm por 10 min.;
- Jahn (2002) – dupla centrifugação: 200G por 10 min. e 200G por 15 min.;
- Gonshor (2002) – dupla centrifugação na centrífuga Ace®: 160G por 10 min. e 400G por 10 min.;
- Efeoglu; Arçay; Ertürk (2004) – dupla centrifugação: 300G por 10 min. e 5.000G por 5 min.;
- Weibrich (2005) – dupla centrifugação: 3.000 rpm por 3,65 min. e 3.000 rpm por 13 min.

3.6. Coagulação do PRP e do PPP (formação do gel)

A separação dos componentes do sangue só é possível com o sangue em estado líquido, obtido pela adição de um anticoagulante. No entanto, para que possamos utilizar o PRP em procedimentos clínicos, se faz necessário promover sua coagulação, transformando-o em gel (MARX, 1999). Para isso, encontramos na literatura vários protocolos tais como associação de cloreto de cálcio com trombina bovina (MARX et al., 1998), Botropase® (VERCELOTTI; RUSSO; GIANOTI, 2002), a formulação ITA® (LANDESBERRG; ROY; GLICKMAN, 2000) ou apenas o cloreto de cálcio, com ou sem controle de temperatura (ANITUA, 1999).

A utilização de cloreto de cálcio e trombina bovina para ativar a coagulação do PRP é defendida por vários autores (GONSHOR, 2002; MARX et al., 1998; WHITMAN et al., 1997). O procedimento consiste na adição, ao PRP, de cloreto de cálcio a 10%, na proporção de 1:8 e dez mil unidades de trombina bovina (MARX, 1999), ou de 1:10 e cinco mil unidades de trombina bovina (GONSHOR, 2002). O cloreto de cálcio é utilizado para neutralizar o efeito anticoagulante do citrato de sódio e a trombina bovina inicia a cascata de coagulação.

A utilização da trombina bovina foi criticada por Ortel et al. (1994) e Sara et al. (1994), por ser imunogênica e induzir a formação de anticorpos para os fatores de coagulação V, VIII e à própria trombina humana, propiciando o aparecimento de hemorragia. Além do mais, esse fenômeno não parece ser dose-dependente. Assim, outro agente geleificante, o ácido etilenodiaminotetracético, foi sugerido como alternativa para a trombina bovina na geleificação do PRP. O gel resultante da adição deste composto foi semelhante em quantidade e consistência ao obtido com a adição de trombina, embora a retração inicial tenha sido mais rápida no segundo preparo (LANDESBURG; MOSES; KARPATKIN, 1998). Em função dos riscos associados à utilização da trombina xenóloga, tem-se preferido a utilização desta à simples adição do cloreto de cálcio. Esta metodologia permite que o gel de plaquetas seja obtido em tempo adequado e numa consistência final ideal que permita a sua manipulação, com maior segurança imunológica.

No entanto, segundo Marx (2004), a trombina bovina usada como hemostático em cirurgias ortopédicas e neurológicas raramente provoca sangramento, pois menos de 20 casos desse evento foram relatados em mais de dez milhões de cirurgias. Isso não ocorreu pela formação de um anticorpo contra a trombina bovina, mas sim um anticorpo contra o fator bovino "V a", um contaminante do processo de preparação da trombina. Desde 1997, a trombina

bovina Gentrac® tem reduzido a contaminação da trombina bovina com o fator "Va" de níveis de 50mg/ml para 0,2mg/ml. Além disso, a trombina bovina usada como hemostático é aplicada em altas doses (maiores que dez mil unidades) e diretamente sobre a ferida, o que não ocorre com a utilizada no PRP.

Em função da literatura controversa a respeito da trombina bovina e até em função do custo, muitos autores utilizam apenas o cloreto de cálcio para reverter o efeito anticoagulante do citrato de sódio. Anitua (1999) e Sonnleitner et al. (2000) defendem protocolos que utilizam apenas o cloreto de cálcio a 10% na concentração de 50µl de CaCl₂ a 10% para 1cc de PRP. A realização do procedimento a uma temperatura de 37°C acelera a formação do gel. Com a trombina bovina o processo dura em torno de dois a três minutos, enquanto que com uso apenas do cloreto de cálcio, o tempo necessário é de dez a 20 minutos. Além da temperatura, a adição de pequena quantidade de sangue total também pode acelerar o processo (MARX; GARG, 2002).

4. MATERIAIS E MÉTODO

4.1. Atendimento aos princípios da Bioética

Esta pesquisa obedeceu às normas preconizadas pela Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS sobre diretrizes e normas reguladoras de pesquisa envolvendo seres humanos e também à Declaração de Helsinque, tendo sido aprovada pela Comissão de Ética da Universidade de Santo Amaro, UNISA, Parecer 167/2004 (ANEXO 1).

A pesquisa foi prospectiva, comparativa, controlada e randomizada. Suas fases clínicas (cirurgias, acompanhamento pós-operatório e avaliações clínicas) foram executadas em pacientes atendidos nas clínicas do Curso de Mestrado em Implantodontia da UNISA. Após a avaliação dos pacientes, lhes foram fornecidas informações detalhadas a respeito dos procedimentos que seriam realizados (Carta de Informação - ANEXO 2) e a respeito do termo de consentimento (ANEXO 3). Os dados da anamnese foram colocados em uma ficha (ANEXO 4).

4.2. Seleção dos pacientes

Foram selecionados sete pacientes de ambos os sexos e com idades entre 20 e 65 anos, totalizando 33 alvéolos (Tabela 1), de acordo com os seguintes critérios:

1º. indicação de extração de três, seis ou nove dentes superiores ou inferiores na mesma arcada, com indicação de posterior reabilitação com implantes;

2º. entendimento do propósito da pesquisa e aceitação de assinar o termo de consentimento;

3º. ausência de infecções nas mucosas próximas ao local da extração e de outras patologias infecciosas como gengivite e periodontite;

4º. ausência de discrasias sangüíneas, uso de anticoagulantes, antiagregantes plaquetários e antiinflamatórios, e de patologias sistêmicas que pudessem contra indicar o tratamento proposto.

Para atender aos dois últimos quesitos os candidatos foram submetidos à avaliação por anamnese geral e específica e por exames pré-operatórios que consistiram em hemograma completo, coagulograma e glicemia. Além disso, foram submetidos à tomada de radiografias panorâmica e periapicais. Os pacientes foram orientados a não fazerem uso de nenhum medicamento sem que o pesquisador fosse informado.

Por outro lado, os critérios de exclusão adotados foram:

1º. ausência de entendimento dos fatores de inclusão acima mencionados;

2º. desistência, abandono ou falta de colaboração;

3º. ocorrência de gravidez até o momento da remoção do material a ser examinado histologicamente;

4º. ocorrência de qualquer estado de enfermidade que impedisse a continuidade do estudo.

Tabela 1 – Relação dos dentes com necessidade de exodontia em cada paciente.

NOME DO PACIENTE	DENTES
J.C.	34, 37, 43
	11, 22, 27
	12, 21, 26
R. M. S.	13, 14, 23
M. S. S.	24, 26, 27
A. C.	22, 24, 25
	37, 46, 42
B. R. M.	13, 17, 23
R. N.	23, 24, 25
	44, 45, 46
	21, 17, 27

Desta forma, a amostra foi constituída por 33 alvéolos (n=33), sendo 22 usados como testes (11 preenchidos com PRP e 11 com PPP) e 11 como controles (preenchidos naturalmente com coágulo sangüíneo). A escolha dos alvéolos foi determinada por sorteio, sendo estabelecido que o do meio sempre seria o controle, o que estivesse à sua direita receberia o PPP e, o que estivesse à esquerda, o PRP (Tabela 2).

Tabela 2 - Relação dos alvéolos preenchidos com PRP ou com PPP ou com coágulo sangüíneo (controle).

Caso	Paciente	PRP	PPP	Coágulo sangüíneo (controle)
1	J. C.	37	43	34
2		27	11	22
3		26	12	21
4	R. M. S.	23	13	14
5	M. S. S.	27	24	26
6	A. C.	25	22	24
7		37	46	42
8	B. R. M.	23	17	13
9	R. N.	44	46	45
10		27	17	21
11		25	23	24

4.3. Padronização da metodologia

Inicialmente foi realizada a verificação da eficácia da técnica utilizada na obtenção do PRP. Para isso, foi coletado sangue de quatro pacientes e realizada a contagem de plaquetas do sangue total, do PRP e do PPP pela técnica padronizada por Gonshor (2002) para a centrífuga ACE®¹. Para verificar a viabilidade das plaquetas foi realizado um esfregaço em lâmina de microscopia, que recebeu coloração por hematoxilina-eosina (HE).

Ainda para a padronização da metodologia, foi selecionado um paciente que apresentava os mesmos requisitos para a seleção dos pacientes-teste. Nos dois meses que antecederam o início da fase cirúrgica, esse paciente foi submetido aos mesmos procedimentos realizados nos participantes efetivos, mas os resultados nele observados não foram inseridos no trabalho, tendo sua importância na padronização da metodologia por nós adotada.

¹ Ace Surgical Supply and Surgical Science, USA

4.4. Técnica utilizada para obtenção do PRP e PPP

Para a coleta do sangue foram utilizados quatro tubos de vidro siliconizados Vacutainer² contendo o anticoagulante citrato de sódio a 3,8% (Figura 1). O citrato de sódio capta os íons cálcio que se encontram no sangue e os neutralizam, formando um composto químico chamado quelato que impede a coagulação do sangue. Além disso, não altera os receptores contidos na membrana das plaquetas, permitindo a reversão do processo quando se adiciona o cloreto de cálcio.

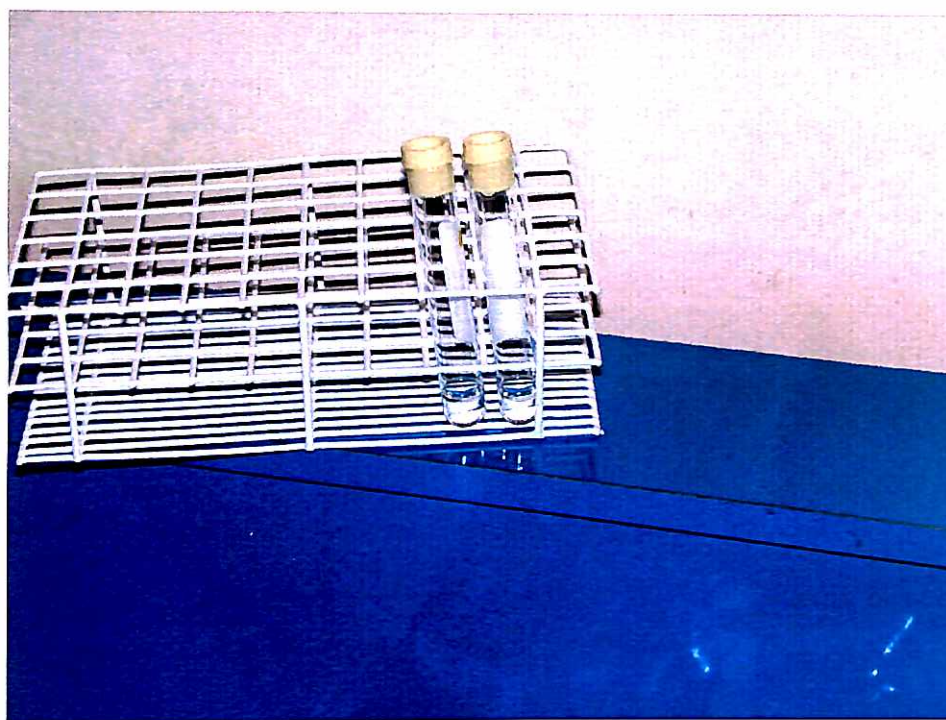


Figura 1 - Tubos com citrato de sódio para a coleta do sangue.

A coleta das amostras de sangue foi realizada após o paciente ser posicionado na cadeira cirúrgica, a limpeza do braço com água e sabão e a assepsia com álcool etílico a 70%. O sangue foi coletado de forma mais

² Becton Dickinson, USA

atraumática possível de uma veia calibrosa da face cubital do antebraço (veia basilíca ou cefálica) e recolhido em quatro tubos de Vacutainer 10ml (Figura 2). Os tubos foram homogeneizados manualmente para que todo o conteúdo entrasse em contato com o citrato de sódio. Os tubos contendo o sangue anticoagulado foram colocados em uma centrífuga Ace® (Figura 3) operada a 160G por dez minutos para que o sangue se separasse, em função da densidade, em três componentes básicos (do menos denso para o mais denso): o PPP, o PRP e os glóbulos vermelhos. Segundo Marx e Garg (1998), 1,0 a 3,0ml da parte superior do extrato de glóbulos vermelhos contêm plaquetas maiores e mais recentemente produzidas e leucócitos (*buffy-coat*), portanto, esta parte foi incluída no PRP. Com o auxílio de uma seringa de 5ml e uma agulha de 63mm, o PPP (Figura 4), o PRP (Figura 5) e o *buffy-coat* (Figura 6) foram aspirados e colocados em Vacutainer vazios (Figura 7) a seguir centrifugados, de forma balanceada, a 400G por dez minutos (Figura 8), procedimento este que promoveu a separação dos componentes em dois grupos, sendo os dois terços superiores formados pelo PPP e o terço inferior pelo PRP.

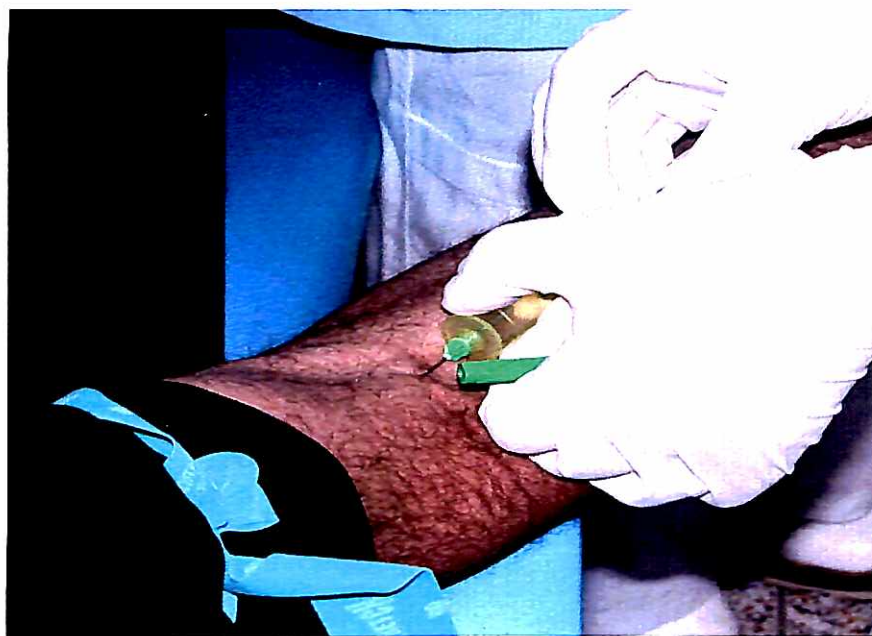


Figura 2 - Coleta do sangue.

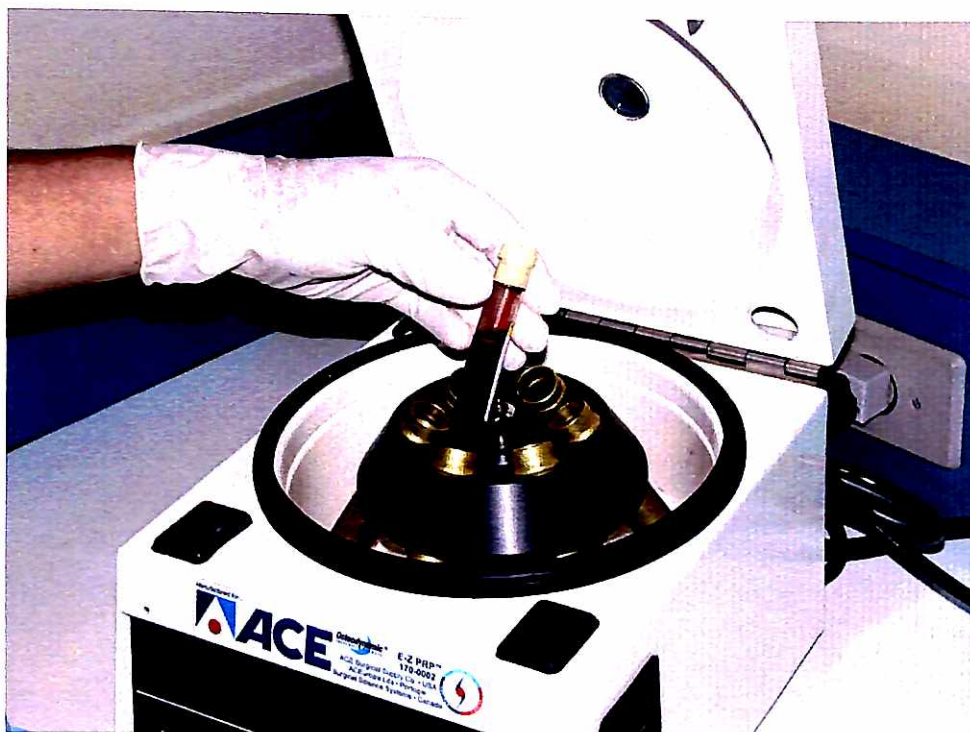


Figura 3 - Primeira centrifugação.

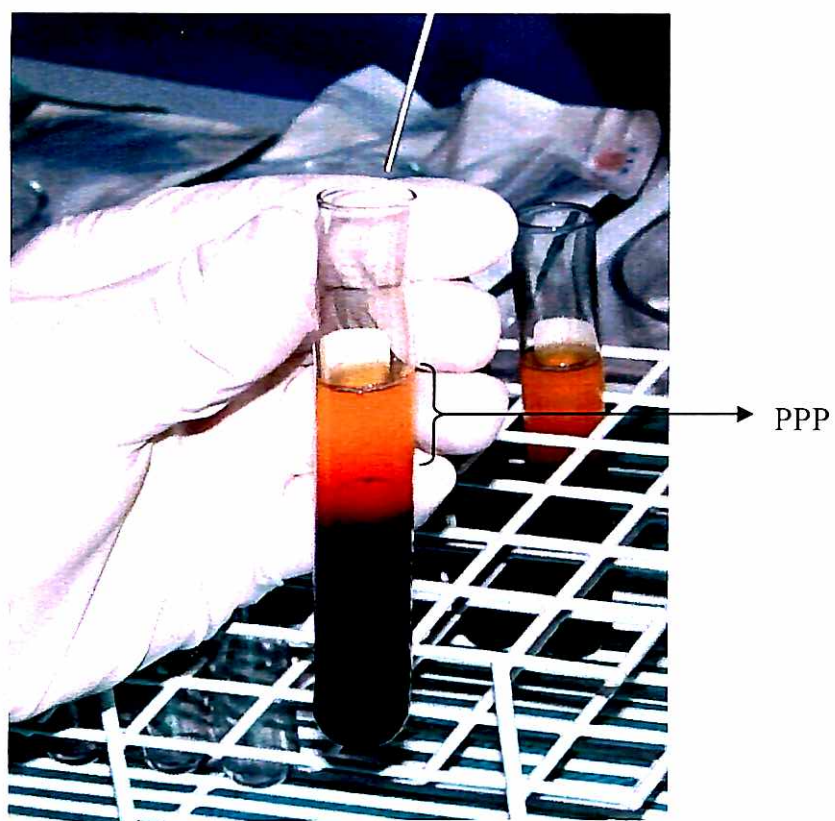


Figura 4 - Separação do plasma pobre em plaquetas.

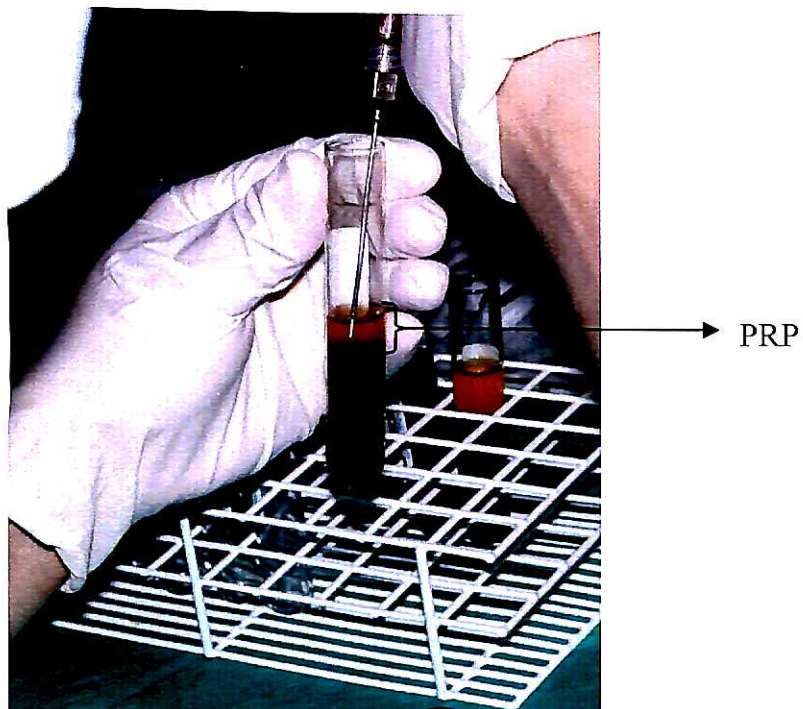


Figura 5 - Separação do plasma rico em plaquetas.

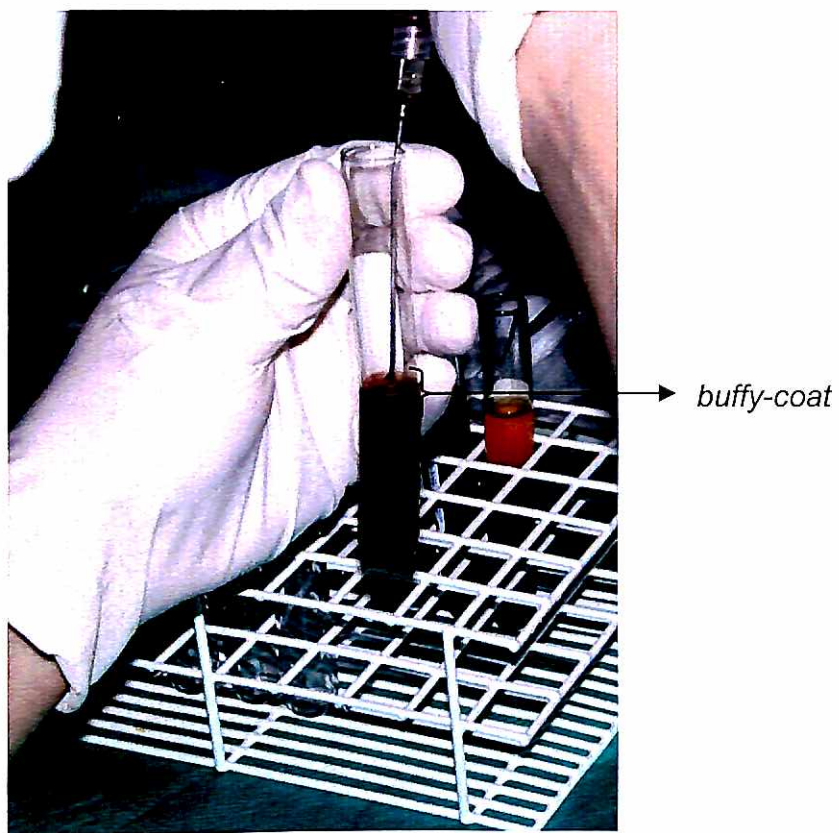


Figura 6 - Separação de leucócitos e plaquetas jovens (*buffy-coat*).



Figura 7 - Colocação dos plasmas no tubo seco.



Figura 8 - Segunda centrifugação.

O PPP e o PRP são então aspirados (Figura 9) e colocados separadamente em placas de Petri. Para iniciar o processo de coagulação, do volume de PRP e PPP produzidos, foram acrescentados cloreto de cálcio a 10% na proporção de 1:10 e 5000 unidades de trombina bovina (Figuras 10 e 11).

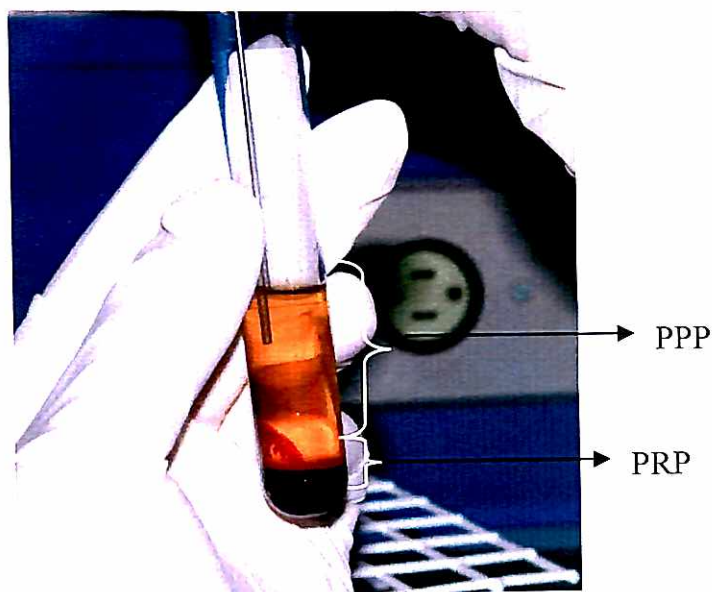


Figura 9 – PPP e PRP após a segunda centrifugação.

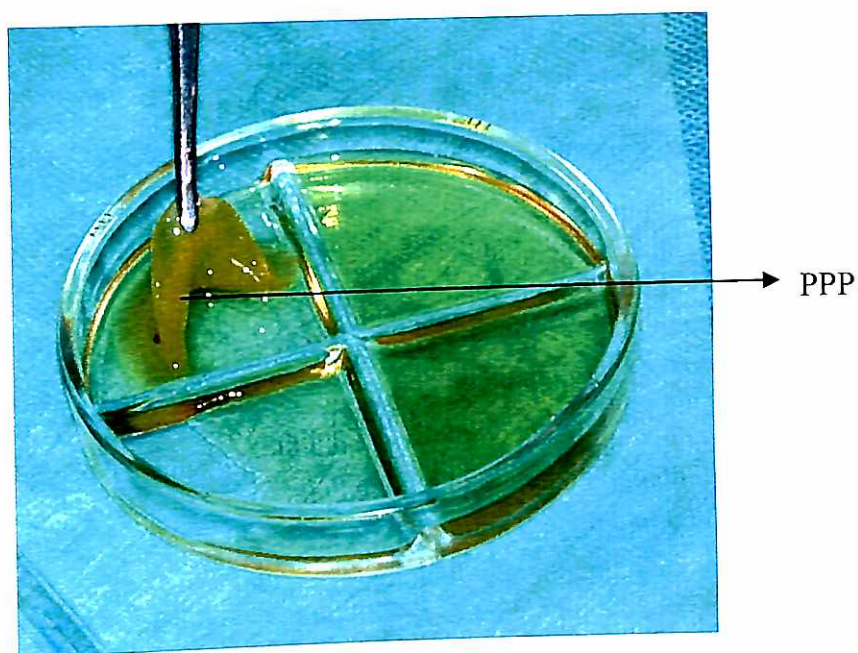


Figura 10 – Gel de plasma pobre em plaquetas (PPP).

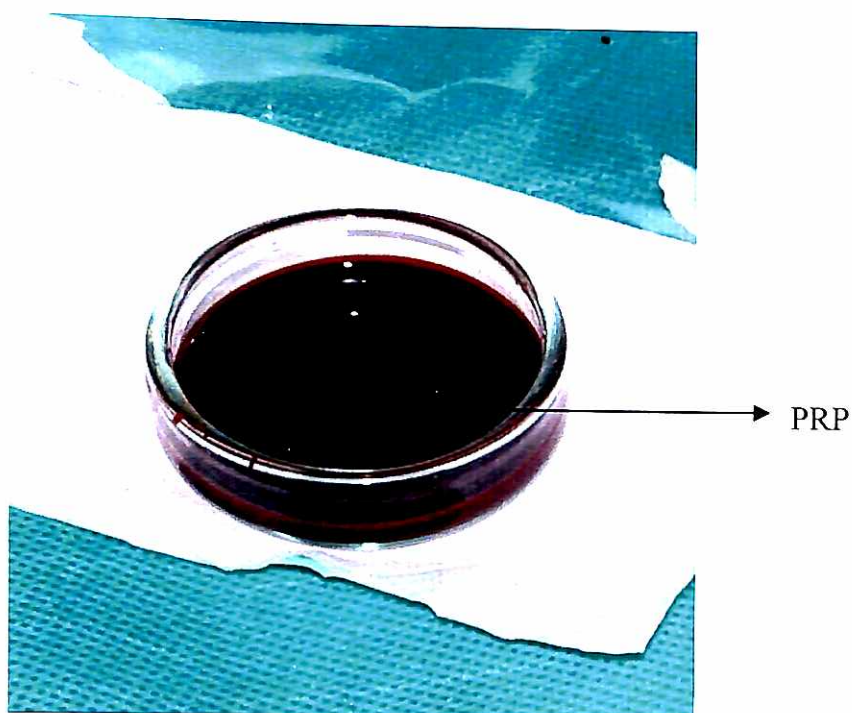


Figura 11 - Gel de plasma rico em plaquetas (PRP).

4.5. Atos cirúrgicos

Depois de selecionados os casos (Figura 12), as cirurgias foram realizadas seguindo padrões rigorosos de biossegurança. A antisepsia da cavidade bucal foi realizada com solução de digluconato de clorexidina a 0,12%³ e a extrabucal com solução de clorexidina a 2%⁴, após as quais foram colocados campos cirúrgicos estéreis. A anestesia local foi realizada utilizando-se mepivacaína a 2% com levonordefrin⁵, devido ao seu rápido início de ação e grande poder de difusão nos tecidos. A técnica cirúrgica incluiu um retalho mucoperiósteo com duas incisões relaxantes no lado vestibular do rebordo alveolar, adjacentes aos locais das exodontias. A opção por este tipo de incisão teve como objetivo melhorar a

³ Periogard, Colgate Palmolive, São Bernardo do Campo – Brasil.

⁴ Farmavale, Lorena – Brasil.

⁵ DFL, Rio de Janeiro – Brasil.

visibilidade do campo operatório, mas principalmente garantir o fechamento total da ferida cirúrgica, proporcionando uma reparação por primeira intenção. As exodontias foram realizadas por via alveolar, utilizando preferencialmente um fórceps apropriado para cada grupo de dentes e os alvéolos foram rigorosamente curetados com o objetivo de remover as fibras remanescentes do ligamento periodontal. Em seguida, os alvéolos-teste foram preenchidos com PPP (Figura 13) ou PRP (Figura 14) até a margem da crista óssea e as feridas foram suturadas com fio de seda 0000⁶ (Figura 15). Os alvéolos-controle foram preenchidos naturalmente por coágulo sangüíneo e também suturados de forma semelhante aos alvéolos-teste.



Figura 12 - Caso clínico.

⁶ Ethicon®, Johnson&Johnson, São José dos Campos, Brasil.

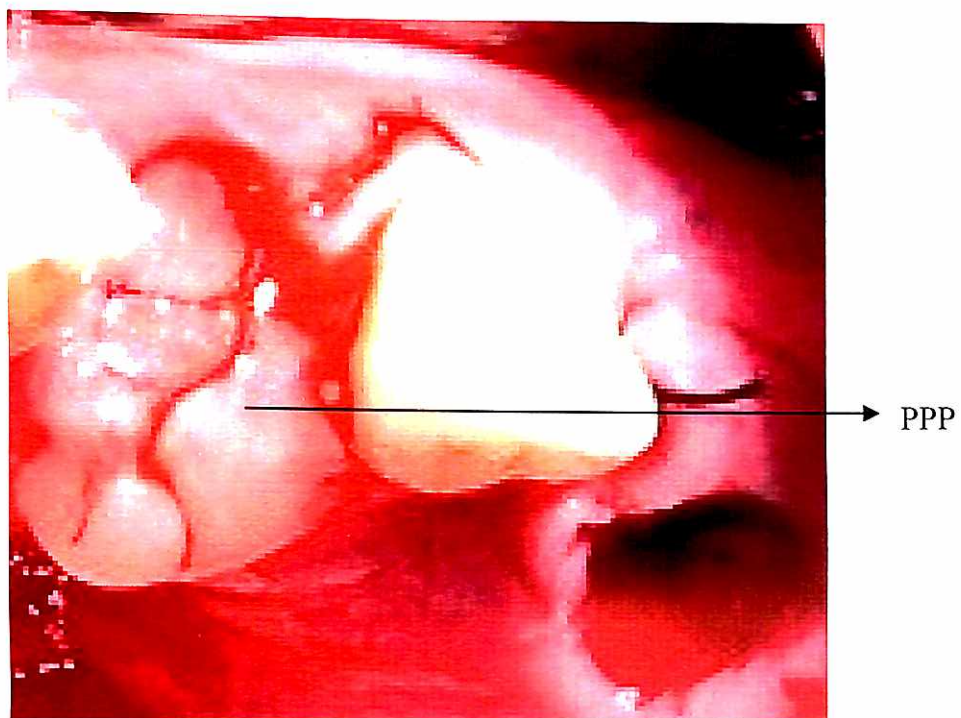


Figura 13 – PPP inserido no alvéolo após a exodontia.

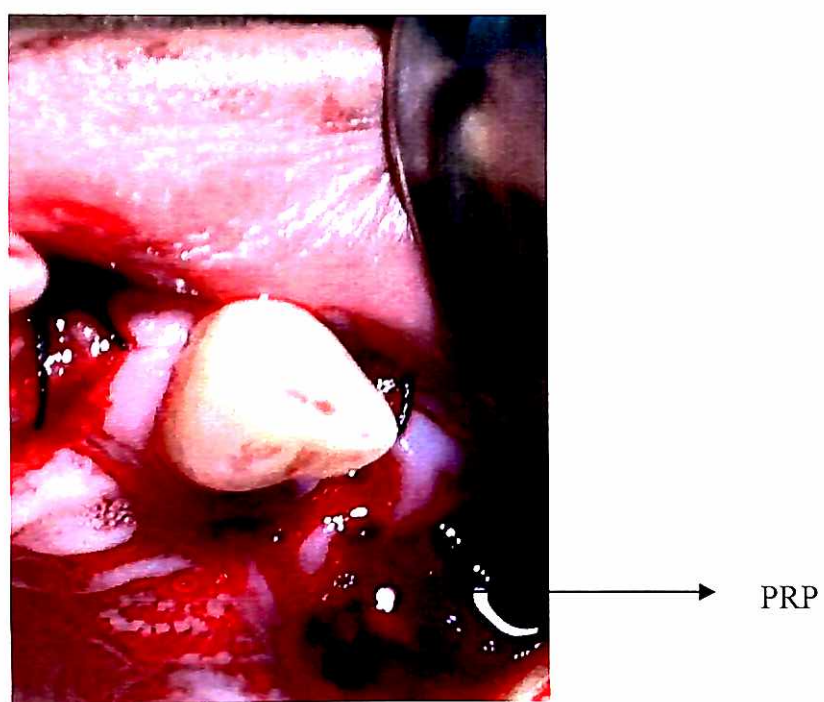


Figura 14 - PRP inserido no alvéolo após a exodontia.

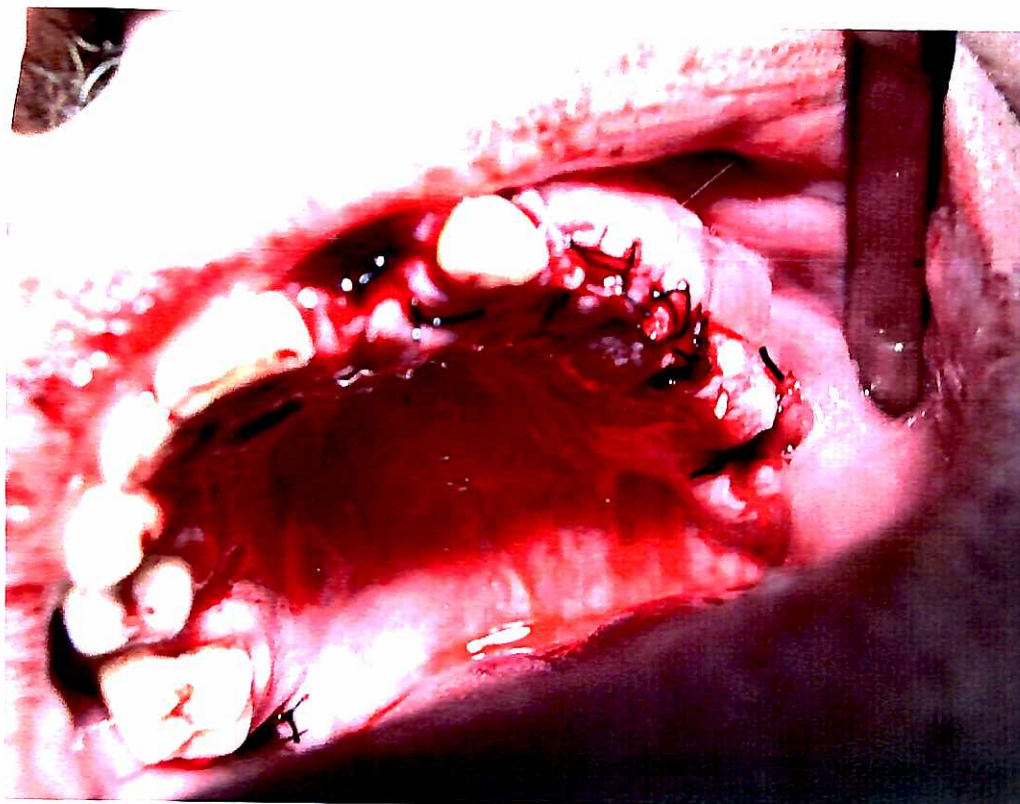


Figura 15 - Suturas.

4.6. Coleta de material ósseo para biópsia

Para testar se o PRP e o PPP seriam capazes de intensificar o processo de regeneração óssea, foi necessário escolher um tempo para realização das biópsias que antecederesse o tempo de reparação fisiológica e que proporcionasse osso regenerado. Assim, a coleta dos materiais para análise histológica foi realizada 28 dias após a cirurgia, pelo mesmo cirurgião que executou as exodontias, utilizando broca trefina Swede/De Bortoli⁷ com 3,5mm de diâmetro para remover um bloco de, em média, 8,0mm de profundidade no centro da área tratada (Figura 17). Para garantir essa homogenização, foram usadas guias cirúrgicas confeccionadas antes das exodontias com acrílico transparente, que serviram de

⁷ Swede/ De Bortoli, São Paulo, Brasil.

orientação no momento da abertura para coleta dos blocos ósseos, bem como na colocação dos implantes (Figura 16). As amostras ósseas coletadas foram fixadas em solução de Boin e enviadas para o processamento histológico (Figura 18).

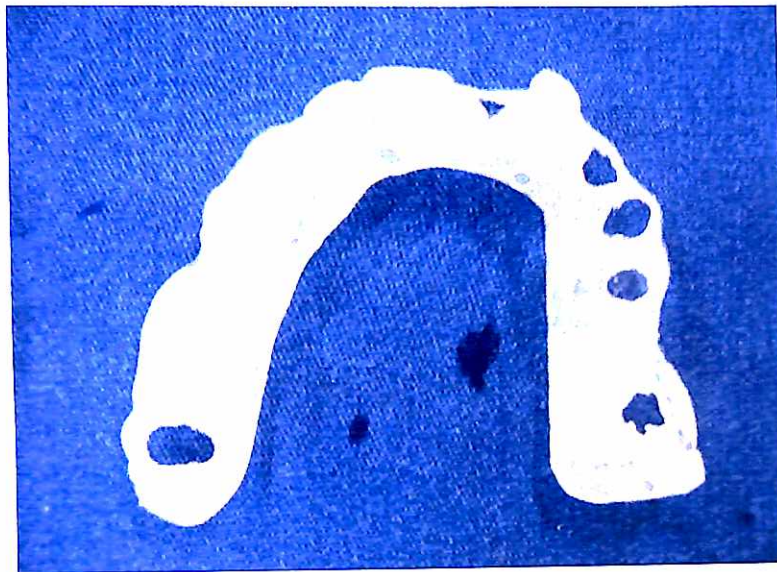


Figura 16 - Guia cirúrgico.

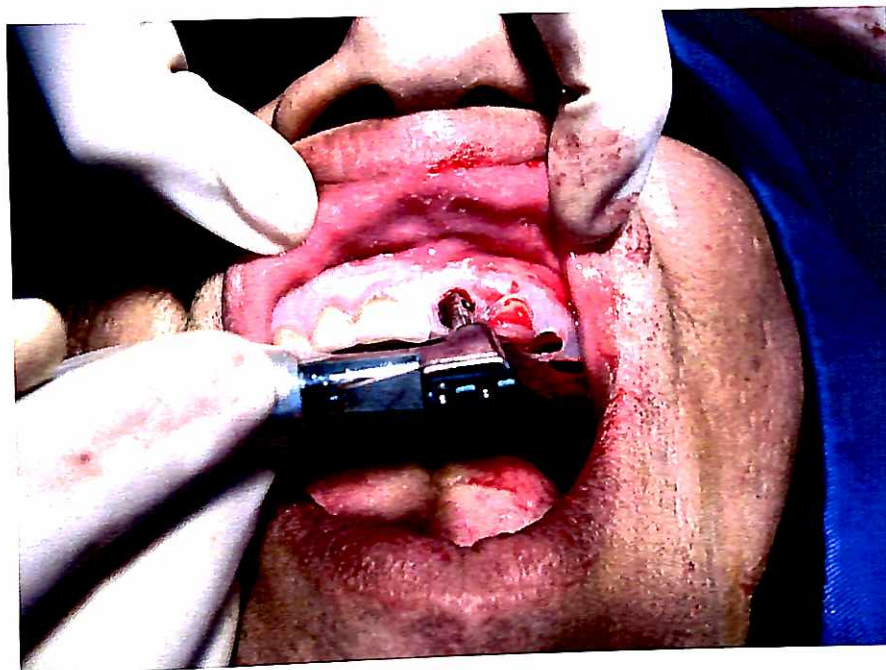


Figura 17 - Remoção do espécime ósseo.



Figura 18 - Espécime ósseo fixado em solução de Boin.

Após a coleta dos espécimes e, quando possível, aproveitando as perfurações realizadas pela broca trefina, foram realizadas as inserções de implantes osseointegráveis ACE®, com superfície tratada, escolhidos de acordo com a quantidade de osso disponível em cada área. A estabilidade primária dos implantes foi alcançada na região apical dos alvéolos originais.

4.7. Análise histológica

Após terem permanecido dois dias imersos em solução de Boin, os fragmentos ósseos foram colocados em solução desmineralizadora de EDTA a 10% tamponado, por aproximadamente quatro semanas. O controle da desmineralização foi feito pela técnica do estilete. Posteriormente a desmineralização, as amostras foram preparadas para estudos histológicos, procedendo-se à inclusão do material conforme as etapas abaixo:

a) desidratação: executada em séries crescentes de álcool (70%, 80%, 90%, 95%, absoluto I, absoluto II, absoluto III), com um tempo de 30 minutos em cada banho;

b) diafanização: procedida em três banhos de xilol, com duração de 15 minutos cada;

c) infiltração: foram realizados três banhos em parafina a 60°C, com duração de 20 minutos cada. Após o último o material foi incluído em parafina.

Em seguida, os blocos de parafina foram levados ao micrótomo, para se obter cortes transversais seriados com 6µm de espessura. Os cortes foram fixados em lâminas de vidro, mantidos em estufa por três horas e corados com HE.

Todas as amostras previamente codificadas (Tabela 2) e sem identificação do grupo a que pertenciam, foram enviadas para análise no Laboratório de Patologia Óssea do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da USP e analisadas, com o uso de microscópio óptico Nikon⁸, por um mesmo histopatologista (ANEXO 5).

Para essa análise foram introduzidas pequenas modificações nos parâmetros de reparo alveolar inicialmente propostos por Amler (1969), Boyne (1966) e Ohta (1993) segundo a presença e características da angiogênese, matriz orgânica, células osteoblásticas, estrutura fibroblástica, núcleos de mineralização e presença de osso neoformado. Assim, para que pudéssemos comparar os graus de reparo nos grupos-teste e controle, utilizamos os parâmetros de reparação óssea baseados no estudo de Marx et al. (1998):

a) o grau de neovascularização (atividade angiogênica) no tecido ósseo, que reflete o quanto a região foi estimulada pelos fatores de crescimento presentes nas plaquetas, como o PDGF (estimula a mitose de células vasculares e a

⁸ Nikon Eclipse E 200, Japão

angiogênese) e o EGF (age diretamente no endotélio vascular). Dessa forma, o espécime que apresentasse maior grau de neovascularização, apresentaria maior nível de reparação;

b) o grau de fibrose em que o tecido se encontrava. Como a fibrose é um tecido conjuntivo que antecede o tecido osteóide, quanto maior a fibrose constatada no espécime, maior o grau de reparação;

c) a atividade de osteoblastos e osteoclastos, que talvez seja o parâmetro mais adequado para a avaliação da reparação óssea em 28 dias. O nível de atividade reflete diretamente o grau de formação óssea, pois é a partir da quarta semana que se inicia o ciclo de reabsorção e reposição óssea. Além disso, esse parâmetro é um indicativo de atividade de PDGF, TGF- β , e IGF- β 1 e 2;

d) a presença ou ausência de osso imaturo e osso lamelar. A presença de osso imaturo (organizado em finas trabéculas) no alvéolo 28 dias após uma exodontia indica que a reparação óssea está em um estágio avançado. A presença de osso lamelar indica um tecido em um nível de reparação óssea ainda mais adiantado.

Nessa análise foram atribuídos escores de zero a três para quantificar os parâmetros analisados acima descritos (Tabela 3).

Tabela 3 – Escores atribuídos aos parâmetros (neovascularização, fibrose, atividade de osteoblastos e osteoclastos) utilizados na verificação do reparo ósseo em 28 dias.

Escores	Parâmetro
0	Ausente
1	Discreto
2	Moderado
3	Acentuado

4.8. Análise estatística

Após a atribuição dos diferentes escores aos parâmetros utilizados na análise histológica esses dados foram submetidos a um tratamento estatístico específico com o auxílio do Software BioEstat 2.0. Inicialmente os dados foram testados quanto à característica de distribuição amostral e então foi selecionado o teste apropriado. Para a avaliação dos parâmetros neovascularização, fibrose e atividade de osteoblastos e osteoclastos constatados em todos os alvéolos, independentemente do seu preenchimento, como os valores numéricos indicaram características de normalidade, foram aplicados os testes Análise de Variância (ANOVA) e *t* de Student ou Newman-Keuls, com significância estatística de 95% ($p < 0,05$). A avaliação da presença de osso imaturo e lamelar foi realizada pelo teste

Kruskal-wallis, também com 95% de confiabilidade, por apresentarem características não-paramétricas de distribuição amostral.

5. RESULTADOS

5.1. Contagem de plaquetas no sangue, PRP e PPP

Na Tabela 4 encontram-se os resultados da contagem de plaquetas procedida no sangue, no PRP e no PPP dos quatro pacientes aleatoriamente escolhidos previamente ao início da pesquisa, para que pudéssemos, antes de passar à execução efetiva do experimento, padronizar a metodologia de confecção do PRP e PPP conforme o protocolo estabelecido por Gonshor (2002).

Tabela 4 - Contagem de plaquetas no sangue, no PRP e no PPP de quatro pacientes aleatoriamente escolhidos, com a finalidade de padronizar previamente a metodologia de obtenção do PRP e do PPP.

Paciente	Número de plaquetas por mm ^{3l} do sangue total	Número de plaquetas por mm ^{3l} do PRP	Número de plaquetas por mm ^{3l} do PPP
1	144.000	676.000	69.000
2	95.000	394.000	36.000
3	132.000	666.000	58.000
4	114.000	599.000	49.000

Na Figura 19 está a comprovação da integridade das plaquetas do PRP em esfregaços em lâminas de microscopia corados por hematoxilina-eosina (HE).

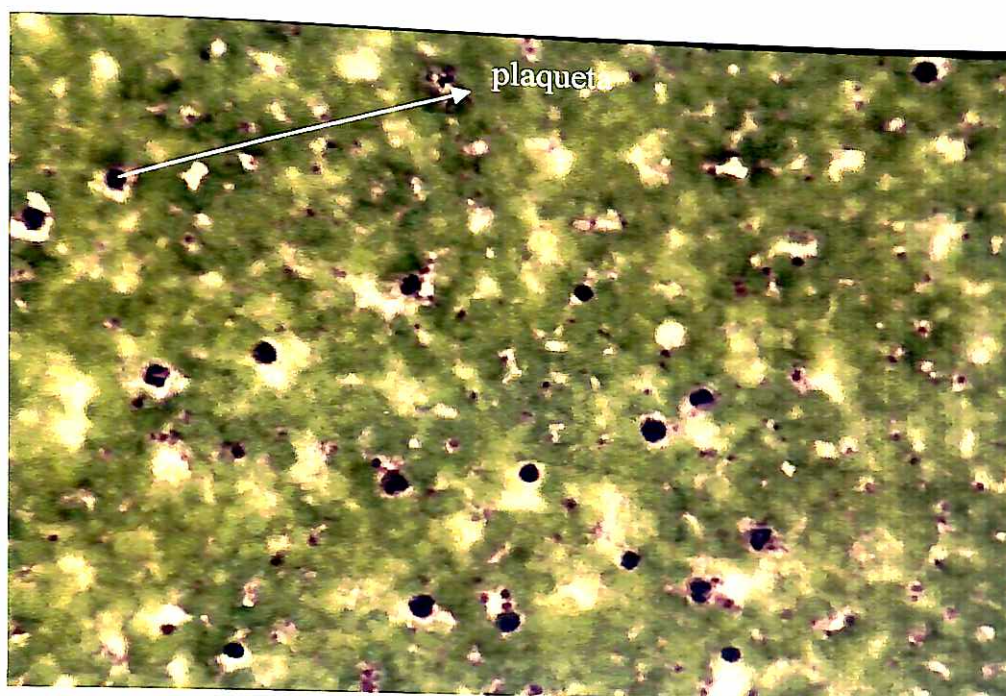


Figura 19 - Esfregaço do PRP, corado por HE, utilizado na padronização para atestar a integridade das plaquetas após as duas centrifugações (200X).

5.2. Análise histológica

Na análise histológica dos espécimes ósseos cilíndricos removidos dos alvéolos foram estudadas as características da região central do osso alveolar por varredura microscópica longitudinal, segundo os parâmetros de análise do reparo ósseo por nós adotados: grau de neovascularização (atividade angiogênica), grau de fibrose, atividade de osteoblastos e osteoclastos e a presença de osso imaturo e lamelar (Figuras 20 a 24).

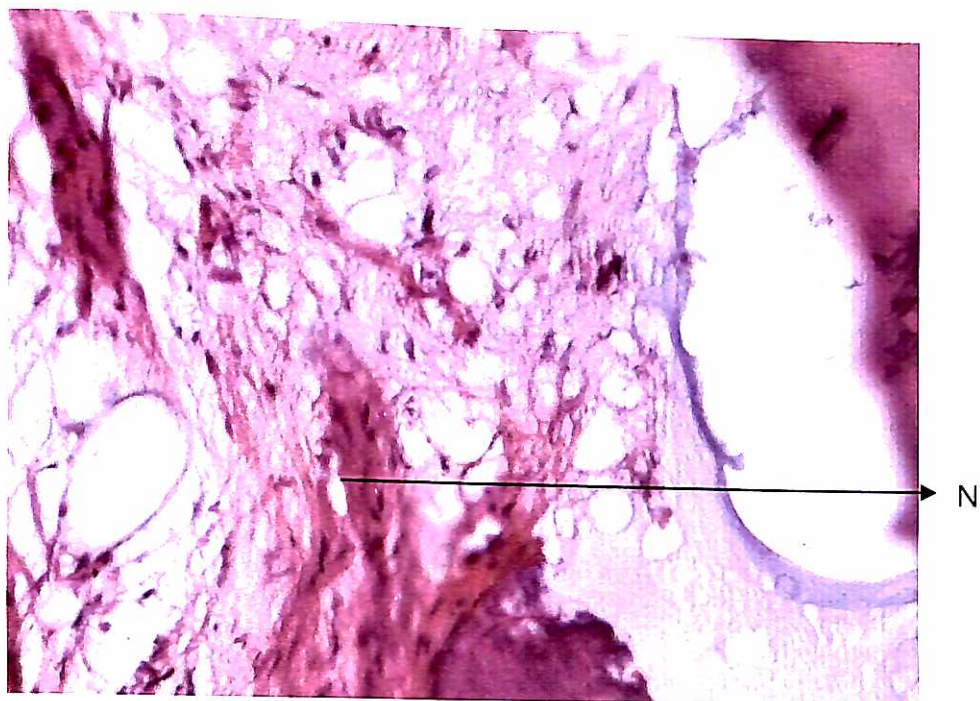


Figura 20 – Neovascularização (N) em grau discreto (escore 1) constatada em 28 dias na amostra óssea de alvéolo preenchido com PPP (caso 3) (coloração HE, 200X).

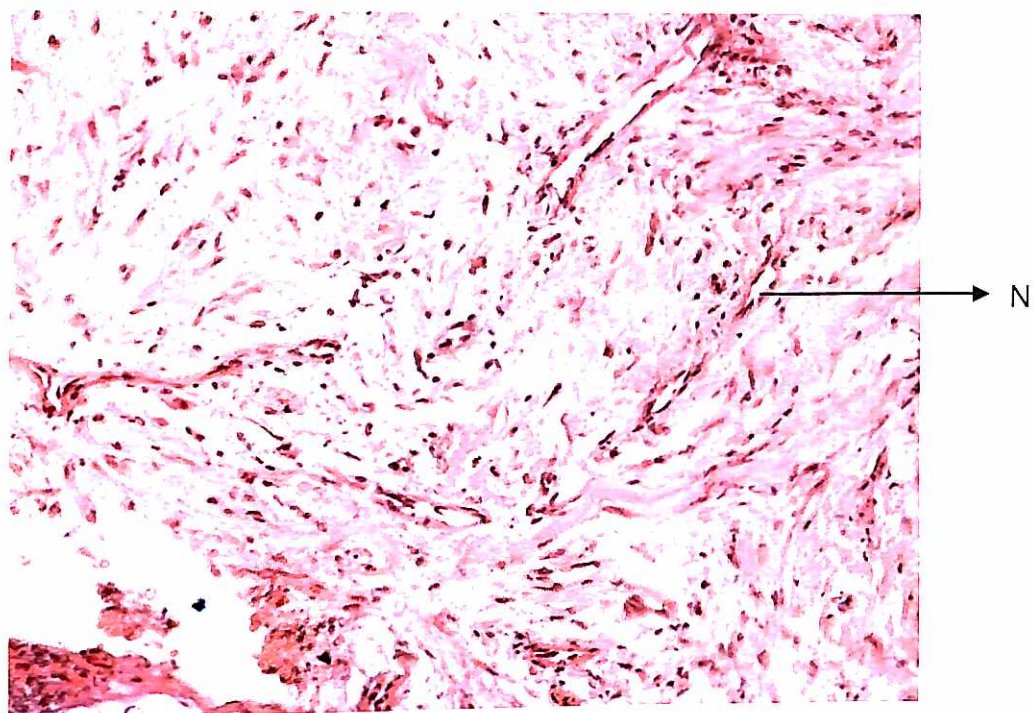


Figura 21 – Neovascularização (N) em grau acentuado (escore 3) constatada em 28 dias na amostra óssea de alvéolo preenchido com PRP (caso 9) (coloração HE, 200X).

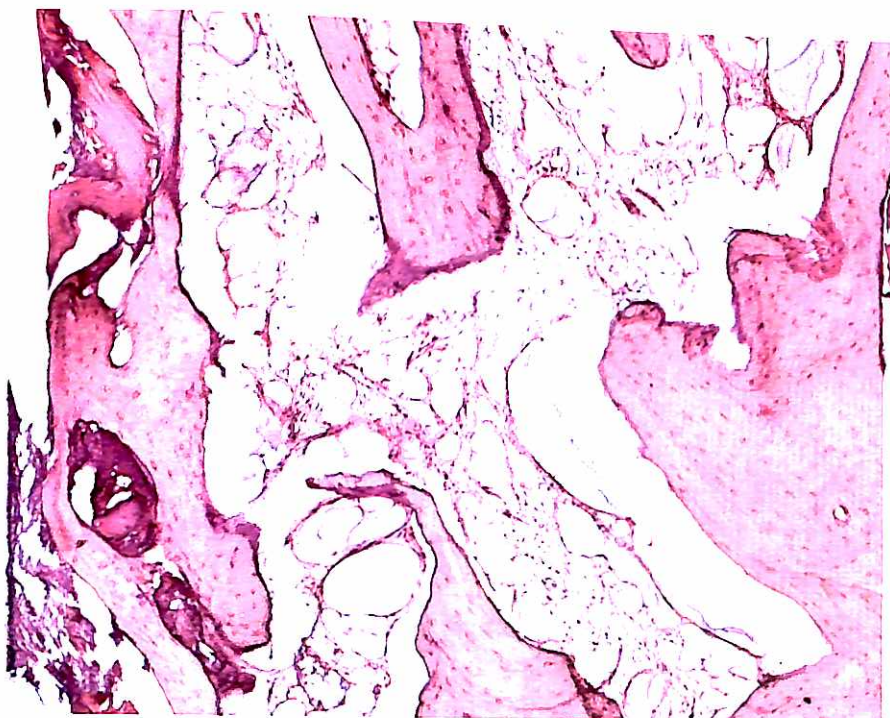


Figura 22 – Ausência de fibrose (escore 0) constatada em 28 dias na amostra óssea do alvéolo-controle preenchido com coágulo sangüíneo (caso 3) (coloração HE, 100X).

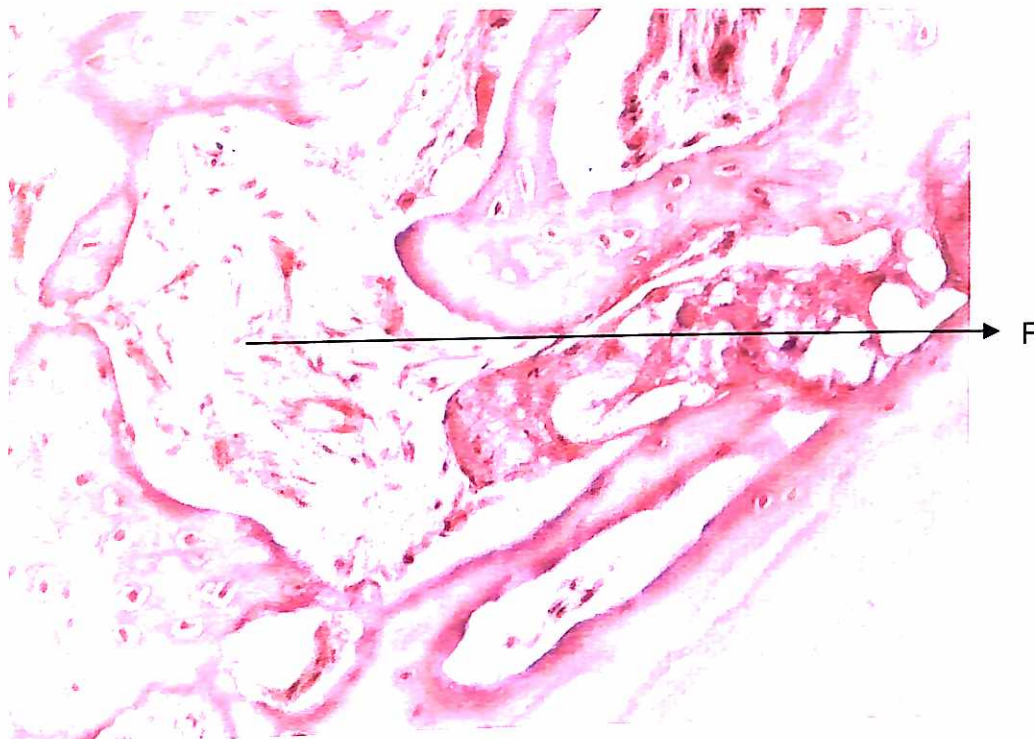


Figura 23 – Fibrose (F) em grau acentuado (escore 3) constatado em 28 dias na amostra óssea de alvéolo preenchido com PRP (caso 9) (coloração HE, 100X).

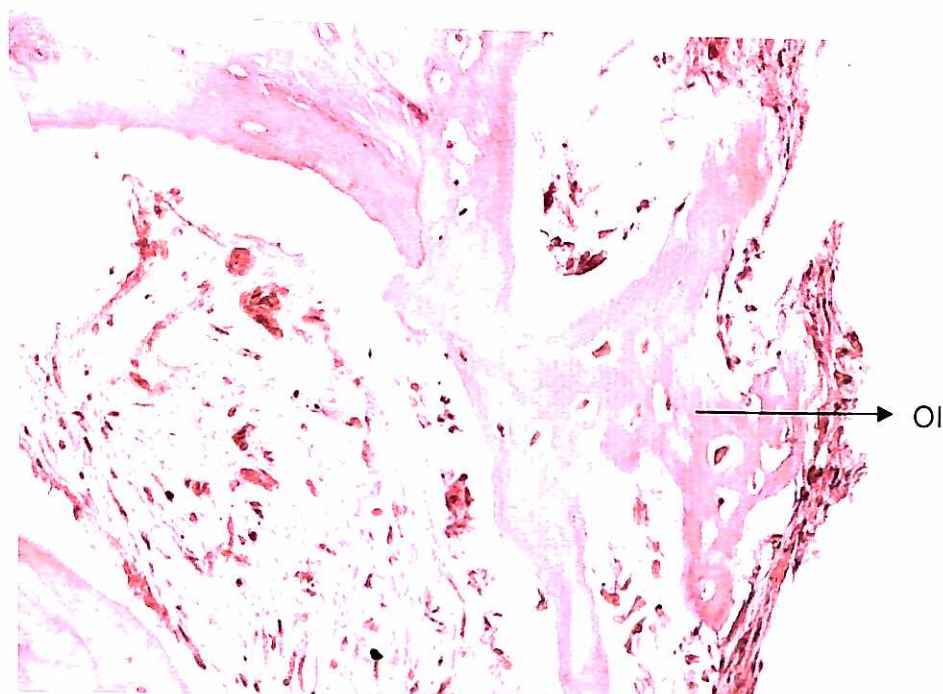


Figura 24 –Presença de osso imaturo (OI) constatados em 28 dias na amostra óssea de alvéolo preenchido com PRP (caso 9) (coloração HE, 200X).

Um importante detalhe a ser realçado é que em nenhum dos casos foi observada a formação de osso lamelar (Tabelas 5 a 12).

No caso 1 (Tabela 5), os alvéolos preenchidos com PRP apresentaram maiores atividades angioblástica e de osteoblastos e osteoclastos. O grau de fibrose foi equivalente ao encontrado nos alvéolos que haviam sido preenchidos por PPP e pelo coágulo sangüíneo.

Tabela 5 – Resultados da análise dos critérios empregados na verificação da reparação óssea ocorrida em 28 dias nos três alvéolos do caso 1.

EscORES atribuídos aos alvéolos preenchidos com Parâmetros	PRP	PPP	Coágulo sangüíneo (controle)
Neovascularização	2	1	1
Fibrose	1	1	1
Atividade de osteoblastos e osteoclastos	2	1	1
Osso imaturo	Presente	Presente	Presente
Osso lamelar	Ausente	Ausente	Ausente

No caso 2 (Tabela 6), os alvéolos tratados com PRP mostraram uma atividade angioblástica semelhante à verificada nos outros dois grupos e uma fibrose maior que a resultante do uso do PPP e semelhante ao controle. A atividade de osteoblastos e osteoclastos foi maior que a observada nos outros. Os três alvéolos apresentaram osso imaturo.

Tabela 6 - Resultados da análise dos critérios empregados na verificação da reparação óssea ocorrida em 28 dias nos três alvéolos do caso 2.

Escores atribuídos aos alvéolos preenchidos com Parâmetros	PRP	PPP	Coágulo sangüíneo (controle)
Neovascularização	2	2	2
Fibrose	2	0	2
Atividade de osteoblastos e osteoclastos	2	1	1
Osso imaturo	Presente	Presente	Presente
Osso lamelar	Ausente	Ausente	Ausente

No caso 3 (Tabela 7), o PRP promoveu uma atividade angioblástica acentuada, ao contrário da discreta promovida pelo PPP e pelo coágulo. A fibrose foi moderada e ausente nos demais alvéolos e a atividade de osteoblastos e osteoclastos foi maior que a constatada nos alvéolos-controle e nos preenchidos com PPP. Apenas o alvéolo com PRP apresentou osso imaturo.

Tabela 7 - Resultados da análise dos critérios empregados na verificação da reparação óssea ocorrida em 28 dias nos três alvéolos do caso 3.

Parâmetros \ Escores atribuídos aos alvéolos preenchidos com	PRP	PPP	Coágulo sangüíneo (controle)
Neovascularização	3	1	1
Fibrose	2	0	0
Atividade de osteoblastos e osteoclastos	2	1	1
Osso imaturo	Presente	Ausente	Ausente
Osso lamelar	Ausente	Ausente	Ausente

No caso 4 (tabela 8), o PRP induziu uma atividade angioblástica acentuada, não observada nos outros alvéolos, uma fibrose moderada em comparação com os demais e uma atividade de osteoblastos e osteoclastos que, embora discreta, foi maior que nos outros alvéolos. Apenas o alvéolo com PRP apresentou formação de osso imaturo.

Tabela 8 - Resultados da análise dos critérios empregados na verificação da reparação óssea ocorrida em 28 dias nos três alvéolos do caso 4.

Parâmetros	PRP	PPP	Coágulo sangüíneo (controle)
Neovascularização	3	0	0
Fibrose	2	0	0
Atividade de osteoblastos e osteoclastos	1	0	0
Osso imaturo	Presente	Ausente	Ausente
Osso lamelar	Ausente	Ausente	Ausente

No caso 5 (Tabela 9), em todos os alvéolos foi observada uma atividade angioblástica acentuada. Nos preenchidos com PPP e no controle a fibrose e a atividade de osteoblastos e osteoclastos foram maiores que nos que receberam PRP. Em todos os alvéolos constatou-se a presença de osso imaturo.

Tabela 9 - Resultados da análise dos critérios empregados na verificação da reparação óssea ocorrida em 28 dias nos três alvéolos do caso 5.

Parâmetros / Escores atribuídos aos alvéolos preenchidos com	PRP	PPP	Coágulo sangüíneo (controle)
Neovascularização	3	3	3
Fibrose	2	3	3
Atividade de osteoblastos e osteoclastos	1	2	2
Osso imaturo	Presente	Presente	Presente
Osso lamelar	Ausente	Ausente	Ausente

No caso 6 (Tabela 10), os alvéolos que receberam PRP apresentaram acentuada atividade angioblástica, que foi moderada nos outros alvéolos. A fibrose mostrou-se moderada em todos os alvéolos e a atividade de osteoblastos e osteoclastos foi maior nos que receberam PRP. Os alvéolos preenchidos com PRP e coágulo sangüíneo apresentaram osso imaturo.

Tabela 10 - Resultados da análise dos critérios empregados na verificação da reparação óssea ocorrida em 28 dias nos três alvéolos do caso 6.

Escores atribuídos aos alvéolos preenchidos com	PRP	PPP	Coágulo sangüíneo (controle)
Parâmetros			
Neovascularização	3	2	2
Fibrose	2	2	2
Atividade de osteoblastos e osteoclastos	3	1	1
Osso imaturo	Presente	Ausente	Presente
Osso lamelar	Ausente	Ausente	Ausente

Nos alvéolos do caso 7 (Tabela 11) preenchidos com PRP, observou-se discreta atividade angioblástica, que foi moderada nos outros grupos, uma fibrose acentuada e uma maior atividade de osteoblastos e osteoclastos. Apenas os que receberam o PRP apresentaram osso imaturo.

Tabela 11- Resultados da análise dos critérios empregados na verificação da reparação óssea ocorrida em 28 dias nos três alvéolos do caso 7.

Parâmetros / Escores atribuídos aos alvéolos preenchidos com	PRP	PPP	Coágulo sangüíneo (controle)
Neovascularização	1	2	2
Fibrose	3	2	2
Atividade de osteoblastos e osteoclastos	2	1	1
Osso imaturo	Presente	Ausente	Ausente
Osso lamelar	Ausente	Ausente	Ausente

No caso 8 (Tabela 12) todos os alvéolos apresentaram neovascularização e fibrose discretas, e nos preenchidos com o PRP, a atividade de osteoblastos e osteoclastos foi maior. Apenas o que recebeu PRP apresentou osso imaturo.

Tabela 12- Resultados da análise dos critérios empregados na verificação da reparação óssea ocorrida em 28 dias nos três alvéolos do caso 8.

Escores atribuídos aos alvéolos preenchidos com Parâmetros	PRP	PPP	Coágulo sangüíneo (controle)
Neovascularização	1	1	1
Fibrose	1	1	1
Atividade de osteoblastos e osteoclastos	2	1	1
Osso imaturo	Presente	Ausente	Ausente
Osso lamelar	Ausente	Ausente	Ausente

No caso 9 (Tabela 13), todos os alvéolos apresentaram um elevado grau de reparação óssea, mas o tratado com PRP apresentou melhor neovascularização e atividade de osteoblastos e osteoclastos.

Tabela 13 – Resultados da análise dos critérios empregados na verificação da reparação óssea ocorrida em 28 dias nos três alvéolos do caso 9.

Escores atribuídos aos alvéolos preenchidos com	PRP	PPP	Coágulo sangüíneo (controle)
Parâmetros			
Neovascularização	3	2	2
Fibrose	3	3	3
Atividade de osteoblastos e osteoclastos	3	2	2
Ossos imaturos	Presente	Presente	Presente
Ossos lamelares	Ausente	Ausente	Ausente

No caso 10 (Tabela 14), os alvéolos preenchidos com PRP mostraram atividades angioblástica e de osteoblastos e osteoclastos superiores às detectadas nos alvéolos preenchidos com o PPP e com o coágulo sangüíneo.

Tabela 14 – Resultados da análise dos critérios empregados na verificação da reparação óssea ocorrida em 28 dias nos três alvéolos do caso 10.

Parâmetros / Escores atribuídos aos alvéolos preenchidos com	PRP	PPP	Coágulo sangüíneo (controle)
Neovascularização	2	1	1
Fibrose	2	2	1
Atividade de osteoblastos e osteoclastos	3	0	1
Ossos imaturos	Presente	Ausente	Presente
Ossos lamelares	Ausente	Ausente	Ausente

No caso 11 (Tabela 15), nos alvéolos que receberam PRP foi observado que os graus de neovascularização e fibrose e a atividade de osteoblastos e osteoclastos eram superiores aos constatados nos preenchidos com PPP e coágulo sangüíneo.

Tabela 15 – Resultados da análise dos critérios empregados na verificação da reparação óssea ocorrida em 28 dias nos três alvéolos do caso 11.

EscORES atribuídos aos alvéolos preenchidos com Parâmetros	PRP	PPP	Coágulo sangüíneo (controle)
Neovascularização	3	2	2
Fibrose	3	2	1
Atividade de osteoblastos e osteoclastos	2	1	1
Osso imaturo	Presente	Presente	Presente
Osso lamelar	Ausente	Ausente	Ausente

5.3. Análise estatística

A análise estatística mostrou que houve diferença significativa ao se comparar o parâmetro neovascularização nos alvéolos preenchidos com PRP, com os preenchidos com PPP e coágulo sanguíneo ($p=0,0255$), o que não ocorreu quando comparamos os preenchidos com PPP ao controle ($p=1$) (Figuras 25 e 26).

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	2	4,909	2,455
Erro	30	20,000	0,667
F =	3,6818	---	---
(p) =	0,0362	---	---
Média (Coluna 1) =	2,3636	---	---
Média (Coluna 2) =	1,5455	---	---
Média (Coluna 3) =	1,5455	---	---
Teste t:	t	(p)	---
Médias (1 e 2) =	2,3500	0,0255	---
Médias (1 e 3) =	2,3500	0,0255	---
Médias (2 e 3) =	0,0000	1,0000	---

Figura 25 - Quadro gerado pelo Software BioEstat 2.0, quando da comparação da neovascularização ocorrida em 28 dias nos alvéolos-controle (3) e nos que receberam aplicação de PRP (1) e PPP (2).

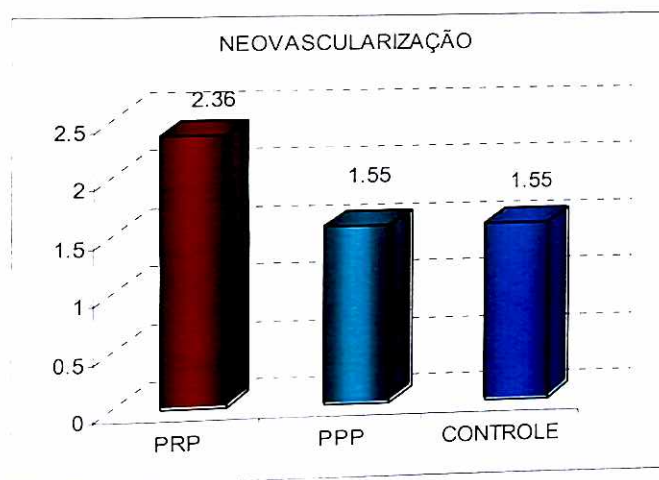


Figura 26 – Distribuição média dos escores atribuídos ao parâmetro neovascularização observado em 28 dias nos alvéolos preenchidos com PRP, PPP e coágulo sanguíneo (controle).

Em relação ao parâmetro fibrose, não houve diferença significativa quando foram comparados os alvéolos preenchidos com PRP, PPP e coágulo sanguíneo ($p=0,2233$) (Figuras 27 e 28).

Teste ANOVA: um critério			
Arquivo Editar			
FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	2	2.970	1.485
Erro	30	28.364	0.946
F =	1.5705	---	---
(p) =	0.2233	---	---

Figura 27 - Quadro gerado pelo Software BioEstat 2.0, quando da comparação da fibrose constatada em 28 dias nos alvéolos-controle (3) e nos preenchidos com PRP (1) e PPP (2).

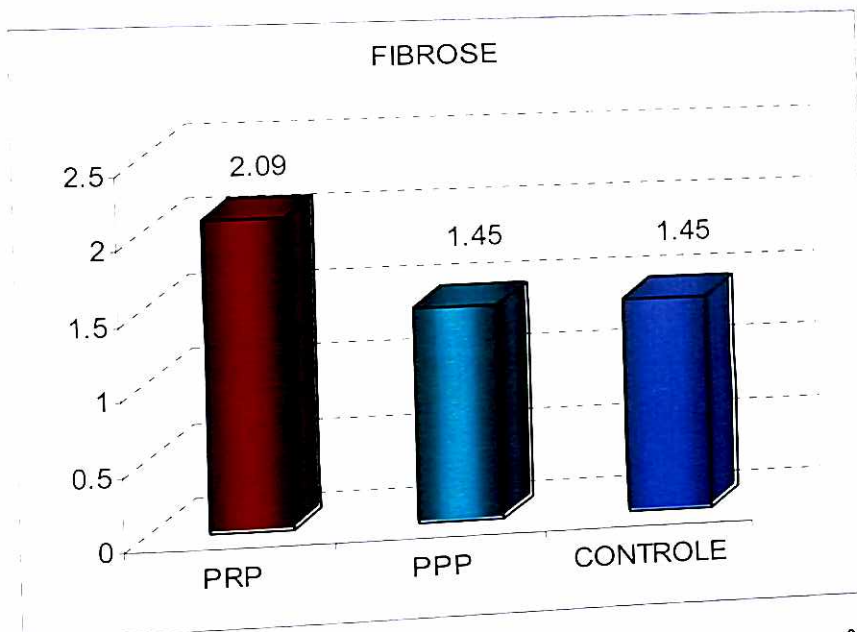


Figura 28 – Distribuição média dos escores atribuídos ao parâmetro fibrose observado em 28 dias nos alvéolos preenchidos com PRP, PPP e coágulo sanguíneo (controle).

Na avaliação da atividade de osteoblastos e osteoclastos, os alvéolos preenchidos com PRP apresentaram diferença significativa, quando comparados aos preenchidos com PPP e coágulo sanguíneo ($p < 0,01$), sendo que estes não apresentaram diferença significativa quando comparados entre si ($p > 0,05$) (Figuras 29 e 30).

Teste ANOVA: um critério			
Arquivo Editar			
FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	2	8.061	4.030
Erro	30	11.818	0.394
F =	10.2308	---	---
(p) =	0.0006	---	---
Média (Coluna 1) =	2.0909	---	---
Média (Coluna 2) =	1.0000	---	---
Média (Coluna 3) =	1.0909	---	---
Newman-Keuls:	Q	(p)	---
Médias (1 a 2) =	5.7649	< 0.01	---
Médias (1 a 3) =	5.2845	< 0.01	---
Médias (2 a 3) =	0.4804	> 0.05	---

Figura 29 - Quadro gerado pelo Software BioEstat 2.0, quando da comparação da atividade de osteoblastos e osteoclastos constatada em 28 dias nos alvéolos-controle (3) e nos preenchidos com PRP (1) e PPP (2).

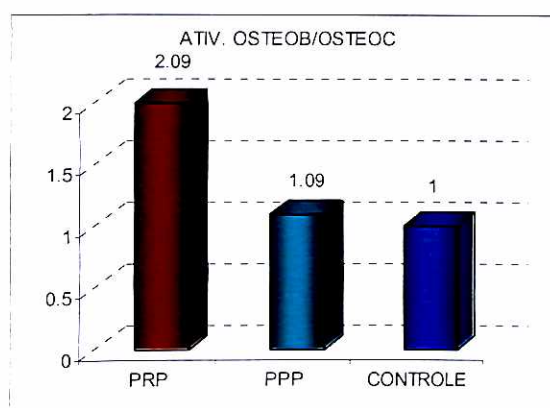


Figura 30 – Distribuição média dos escores obtidos atribuídos ao parâmetro atividade de osteoblastos e osteoclastos observado em 28 dias nos alvéolos preenchidos com PRP, PPP e coágulo sanguíneo (controle).

Na análise da presença de osso imaturo nas amostras, constatou-se que houve diferença significativa se compararmos o PRP ao PPP ($p=0,0290$), mas tanto o PRP ($p=0,1456$), quanto o PPP ($p=0,459$) não apresentaram diferença significativa em relação ao coágulo sanguíneo (Figuras 30 e 31).

Teste de Kruskal-Wallis	
Arquivo Editar	
	Resultados
H =	7.4667
Graus de liberdade =	2
(p) Kruskal-Wallis =	0.0239
R 1 =	242.0000
R 2 =	143.0000
R 3 =	176.0000
R 1 (posto médio) =	22.0000
R 2 (posto médio) =	13.0000
R 3 (posto médio) =	16.0000
p (1 e 2) =	0.0290
p (1 e 3) =	0.1456
p (2 e 3) =	0.4669

Figura 31 - Quadro gerado pelo Software BioEstat 2.0, quando da comparação da presença de osso imaturo constatada em 28 dias nos alvéolos-controle (3) e nos preenchidos com PRP (1) e PPP (2).

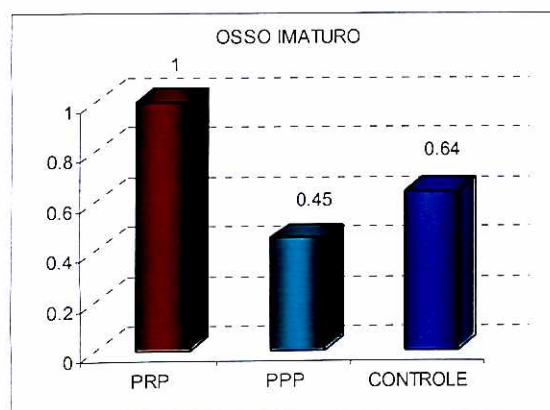


Figura 32 – Distribuição média dos escores atribuídos ao parâmetro presença de osso imaturo observado em 28 dias nos alvéolos preenchidos com PRP, PPP e coágulo sanguíneo (controle).

Como nenhuma amostra apresentou formação de osso lamelar, não houve diferença significativa em relação a esse parâmetro nos alvéolos preenchidos com PRP, PPP e coágulo sanguíneo (Figuras 33 e 34).

Teste de Kruskal-Wallis	
Arquivo Editar	
	Resultados
H =	0.0000
Graus de liberdade =	2
(p) Kruskal-Wallis =	1.0000

Figura 33 - Quadro gerado pelo Software BioEstat 2.0, quando da comparação da presença de osso lamelar constatada em 28 dias nos alvéolos-controle (3) e nos preenchidos com PRP (1) e PPP (2).

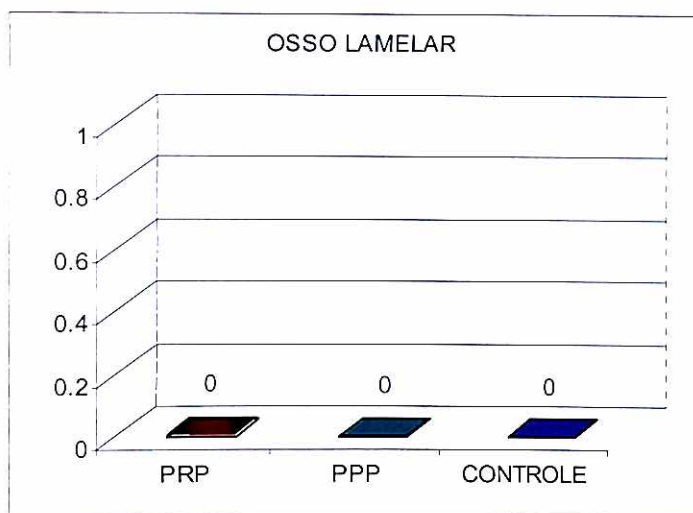


Figura 34 – Distribuição média dos escores obtidos atribuídos ao parâmetro presença de osso lamelar observado em 28 dias nos alvéolos preenchidos com PRP, PPP e coágulo sanguíneo (controle).

6. DISCUSSÃO

A perda de tecido ósseo, em altura e/ou espessura, limita ou até mesmo contraindica a colocação de implantes, principalmente quando ocorre próxima ao seio maxilar, fossa nasal e canal mandibular.

A constante evolução da Implantodontia nas últimas décadas tem se estendido à busca de técnicas de enxertia destinadas a incrementar a reparação do tecido ósseo perdido, para aumentar a qualidade da osseointegração.

Uma técnica muito utilizada para se obter volume adequado de osso emprega osso autógeno removido de áreas intra ou extrabuciais. A necessidade de enxerto de fragmento de osso extrabucal impõe ao paciente a obrigatoriedade de hospitalização e aumento do custo financeiro e da morbidade pós-operatória. Essas desvantagens levaram a comunidade científica a desenvolver estudos em busca de novos produtos capazes de promover a recuperação do osso alveolar perdido.

Com esse propósito, muitos materiais surgiram no mercado, como o osso de origem bovina, a hidroxiapatita, as cerâmicas bioativas e outros. Dentre eles, o que mais ganhou notoriedade nos últimos tempos foi o PRP. Porém ao mesmo tempo em que se investiu muito no desenvolvimento de modelos para a sua obtenção, se deu pouca atenção ao PPP, um outro produto obtido no mesmo processo e que geralmente é desprezado. O PPP tem se mostrado de grande validade em outras áreas da Medicina como Cirurgia Plástica e Neurocirurgia, em função de suas características de promover hemostasia e alto poder de regeneração de tecidos moles.

Nosso objetivo foi estudar, por exame histológico semiquantitativo, se a adição de PRP, que contém alta concentração de plaquetas e de fatores de

crescimento (MARX et al., 1998) é vantajosa no sentido de acelerar a reparação óssea em alvéolos de dentes recém-extraídos, notadamente nos candidatos a receberem implantes. Este modelo experimental foi escolhido por apresentar uma cronologia de processos biológicos reparacionais bem descrita por Boyne (1966) e Ohta et al. (1993).

Outra meta foi investigar a influência do PPP, um produto rico em fibrina precursora da formação de colágeno e da reparação tecidual que teoricamente poderia funcionar como um arcabouço mais elaborado que o coágulo sangüíneo, acelerando assim o processo de reparação óssea. Essa suposição começou quando no paciente utilizado na padronização da metodologia foram extraídos três dentes. Como nossa metodologia inicial previa a exodontia de dois elementos, no terceiro alvéolo colocamos o PPP e 28 dias após, quando removemos a amostra para análise histológica, notamos clinicamente que esse alvéolo apresentava maior quantidade de osso neoformado que os preenchidos com o coágulo e o PRP. Esta constatação levou-nos a inserir o PPP no nosso experimento.

Na literatura encontramos discrepâncias quanto ao período ideal para avaliar o reparo de ossos humanos. Segundo Ohta et al. (1993), a regeneração completa de um alvéolo dentário humano após exodontia, com formação de osso lamelar organizado e de trabéculas espessas, ocorre entre 120 e 180 dias. Anitua (1999) colheu material de alvéolos dentais aos 70 e 102 dias. Marx et al. (1998), para avaliar os efeitos do PRP em defeitos ósseos patológicos, coletaram material no tempo preconizado por Ohta et al. (1993). Kassolis; Roden e Reynolds (2000), utilizando o PRP associado a enxertos mistos em seio maxilar, obtiveram amostras aos 120 e 168 dias. Em todos esses estudos os prazos de regeneração óssea estavam dentro de uma expectativa normal do processo regenerativo natural

dessas feridas cirúrgicas, possibilitando-nos questionar o real desempenho do PRP no processo reparativo.

No nosso entendimento, avaliar a atividade aceleradora do PRP e do PPP no processo de reparação das feridas ósseas seria mais adequado nas fases iniciais da regeneração. Esse raciocínio baseou-se principalmente na observação de Boyne (1966) de que o alvéolo dentário, após a exodontia, já está preenchido com tecido ósseo imaturo em 28 dias. Assim, tomando como referência a cronologia de regeneração alveolar após a exodontia, definimos, como momento ideal para reabertura dos alvéolos dentais e coleta do material para análise histológica, 28 dias após as exodontias seguidas por enxerto com PRP e PPP. Tendo em mente que o PRP agiria como intensificador do processo de regeneração óssea alveolar (ANITUA, 1999) e sabendo que o alvéolo dentário aos 28 dias deveria estar completamente preenchido com osso primário (BOYNE, 1966), havia a forte possibilidade de encontrar nesse tempo, eventos de reparação em fase inicial nos alvéolos-controle e em fase mais avançada nos alvéolos-teste. A opção por esse tempo de observação também se baseou em vários autores (ANITUA, 1999; FONTANA et al., 2004; FURST et al., 2003; GIANNOBILLE et al., 1994; MARX et al., 1998; ZECHNER et al., 2003) que demonstraram que os fatores de crescimento contidos nas plaquetas são liberados imediatamente após a ativação plaquetária pela adição de cloreto de cálcio e trombina bovina. Desta forma, suas atividades indutoras ocorrem nos primeiros dias da reparação. De acordo com Marx (1999), em dez minutos as plaquetas secretam 70% de seus fatores de crescimento armazenados e, na primeira hora, próximo de 100%, mas sintetizam quantidades adicionais de fatores de crescimento por aproximadamente oito dias até se esvaziarem e desintegrarem. Após esse período, os fatores de crescimento são sintetizados e liberados por macrófagos.

6.1. Concentração plaquetária

Para utilização dos fatores de crescimento no processo de regeneração alveolar, foi necessária a escolha de um protocolo para a obtenção do PRP. Marx et al. (1998) conseguiram uma concentração de plaquetas em torno de 785.000, utilizando um separador celular Electro Medics 500 Gradient Density Cell Separator (Mectronics) a partir da coleta de 400 a 450 ml de sangue (sistema de aférese com coleta em Banco de Sangue). Kassolis, Roden e Reynolds (2000), utilizando sistema de plasmaferese, conseguiram uma concentração média de plaquetas no PRP de 1.163.000 após coleta de mil a 2.500 ml de sangue. Outros pesquisadores também utilizaram a plasmaferese (MAN; PLOSKER; WINLAND-BROMN, 2001; ROSENBERG; TOROSIAN, 2000) sem, no entanto, divulgarem os resultados da concentração plaquetária no PRP. O sistema de plasmaferese exige, muitas vezes, a ida do paciente aos hemocentros e a retirada de grandes volumes de sangue. Protocolos simplificados estão sendo desenvolvidos para facilitar a coleta de sangue e a produção do PRP em ambiente ambulatorial ou no consultório. Anitua (1999) e Sonnleitner et al. (2000) propuseram protocolos simplificados, porém, não divulgaram a concentração plaquetária obtida após a centrifugação. Alterando o protocolo de Marx et al. proposto em 1998 (concentração média de 785.000 plaquetas), Marx (1999) afirmou que a concentração de plaquetas no PRP deve ser de pelo menos um milhão de plaquetas/ml em um volume de 5ml. Para conseguir essa concentração, recomendou a técnica de centrifugação dupla em que a primeira, executada em rotação severa, separa as células sanguíneas vermelhas do plasma e a segunda, em rotação suave, separa as plaquetas das células vermelhas.

Outros pesquisadores propuseram protocolos para obter maior concentração de plaquetas no preparo do PRP (ANITUA, 1999; JAHN, 2002; KASSOLIS; RODEN; REYNOLDS, 2000; MAN et al., 2001; ROSENBERG; TOROSIAN, 2000; SONNLEITNER et al., 2000), mas optamos pela técnica de Gonshor (2002), padronizada para o aparelho ACE®, onde são processadas duas centrifugações, a primeira a 160G por dez minutos e a segunda a 400G por mais dez minutos, que produzem concentração de plaquetas 850% maior que a encontrada no sangue total, 500% maior de PDGF-AB e 800% maior de TGF- β , sem comprometer a viabilidade das plaquetas.

A vantagem de não interferir na integridade desses corpúsculos foi comprovada em nosso experimento, quando após as duas centrifugações examinamos esfregaços corados por hematoxilina-eosina (Figura 19).

6.2. Processo de coagulação do PRP e PPP

A metodologia de utilização do PRP e do PPP inclui a necessidade de promover a sua coagulação. Com esse intuito, a exemplo de Marx et al. (1998), Man et al. (2001) e Gonshor (2002), acrescentamos cloreto de cálcio e trombina bovina ao PRP e PPP recém-preparados. A utilização da trombina bovina não foi aconselhada por autores (ORTEL et al., 1994; SARA et al., 1994) que afirmaram que essa substância apresenta potencial antigênico, levando ao risco de produção de anticorpos contra o fator V da coagulação e conseqüentemente de hemorragias ameaçadoras da vida. No entanto, estudos mais atuais comprovam que a trombina bovina pode ser utilizada com segurança, motivo pelo qual optamos pelo seu uso. Segundo Marx (2004), o uso desse produto como hemostático em cirurgias ortopédicas e neurológicas raramente provocou sangramento em menos de 20

casos em mais de dez milhões de cirurgias. De acordo com esse autor, o sangramento não ocorre pela formação de anticorpo para a trombina bovina, mas para o fator bovino "V a", um contaminante do processo de preparação da trombina. A trombina bovina Gentrac®, comercializada desde 1997, reduziu de 50mg/ml para 0,2mg/ml a contaminação da trombina bovina com o fator "V a". Além disso, a trombina bovina usada como hemostático é aplicada em altas doses.

6.3. Aspectos conceituais referentes à metodologia e resultados

Vários pesquisadores (MARX et al., 1998; ROSENBERG; TOROSIAN, 2000; THOR, 2002) utilizaram PRP, associado a substitutos ósseos e a osso autógeno, no tratamento de defeitos ósseos perimplantares e em reconstruções ósseas dos maxilares. Porém, um número limitado de referências é encontrado na literatura odontológica descrevendo só o uso do PRP, na forma de gel de plaquetas, para preenchimento de alvéolos dentários após exodontia, com a finalidade de promover aceleração do reparo quando se pretende a instalação de implantes dentários em período menor de tempo que o geralmente necessário quando o alvéolo é naturalmente preenchido pelo sangue.

Após a remoção de um dente, o alvéolo contém uma população de células estruturais, células-tronco, capilares rompidos e células epiteliais expostas. O início da regeneração começa com a degranulação das plaquetas e liberação de PDGF e TGF- β . O PDGF estimula a mitogênese de células-tronco e inicia a angiogênese pela indução de mitose das células endoteliais. O TGF- β ativa inicialmente os fibroblastos e pré-osteoblastos e promove sua transformação em osteoblastos funcionais maduros. A secreção continuada desse fator de crescimento influencia osteoblastos e fibroblastos a depositarem, respectivamente,

matriz óssea e matriz colágena. Esse início de atividade celular, apesar de sofrer influência de outros fatores de crescimento, é resultado direto da ação do PDGF e do TGF- β . A duração da vida de uma plaqueta em uma lesão e o período de influência direta de seus fatores de crescimento giram em torno de cinco dias. A extensão da atividade de reparação óssea é realizada por dois mecanismos. O primeiro induz aumento de células-tronco na medula e sua diferenciação em osteoblastos secretores de TGF- β . O segundo, e o mais dominante, parece ser a indução da quimiotaxia e ativação de macrófagos, que substituem as plaquetas como fonte primária de fatores de crescimento após o terceiro dia. Na medida que o PDGF decresce em influência, os fatores de crescimento derivados de macrófagos e os fatores angiogênicos assumem o controle. As células-tronco secretam TGF- β para continuar a auto-estimulação da formação óssea como uma resposta autócrina. Durante 28 dias, o leito neovascularizado elimina o gradiente de oxigênio necessário para manter a atividade dos macrófagos, que abandonam a área que assim torna-se auto-sustentável. A partir de então, ao invés de osso lamelar, o alvéolo passa a apresentar um osso imaturo com tecido osteóide entrelaçado.

Em função dos eventos fisiológicos que ocorrem na reparação óssea, fica claro que os parâmetros analisados em nossa pesquisa podem refletir a efetividade ou não do PRP e do PPP nesse processo.

O grau de neovascularização é um fator primordial no estabelecimento da reparação óssea e reflete a atividade direta e indireta dos fatores de crescimento liberados pelas plaquetas. Logo, os fatores de crescimento descritos na literatura, aceleram a atividade angiogênica de alvéolos dentários, atividade também sugerida pelo resultado dessa pesquisa. Já o PPP não interfere nesse processo.

A presença e o grau de fibrose também é um indicativo do estado de reparação tecidual, já que é um tecido conjuntivo prévio ao ósseo. Entretanto, nos

moldes de nossa pesquisa não houve diferença significativa entre o grau de fibrose constatado nos alvéolos que receberam a adição de PRP e PPP e o observado nos controles.

Da mesma forma, a atividade de osteoblastos e osteoclastos nos mostra se o tecido está ou não em franca atividade modeladora. Na análise desse parâmetro pôde-se notar melhor indício de reparação nos alvéolos que receberam o PRP, devido ao aumento da concentração de fatores de crescimento, principalmente TGF- β (responsável pela transformação de pré- osteoblastos em osteoblastos).

Já em relação à presença de osso imaturo, não foi verificada diferença entre os alvéolos preenchidos com PRP e os alvéolos-controle, mas sim destes em relação aos preenchidos com PPP. Além disso, como já era esperado, em função do curto período da análise, não foi encontrada a presença de osso lamelar em nenhuma das amostras.

Apesar de esses fatores terem um período curto de atuação direta no processo de reparo, sua ação indireta se reflete durante todo esse período. Conseqüentemente, se aumentarmos o número de plaquetas, aumentaremos a concentração e os efeitos dos fatores de crescimento, condição que propicia um processo reparativo mais acelerado e uma melhor qualidade óssea em função da maior indução de osteoblastos e fibroblastos.

Essa assertiva pôde ser confirmada por nossos resultados, compatíveis com grande parte dos trabalhos encontrados na literatura, principalmente com o de Anitua (1999), que também avaliou o favorecimento da reparação em alvéolos dentários que futuramente receberiam implantes. Apesar de a maioria dos autores utilizarem outras metodologias e não terem avaliado a reparação do alvéolo dentário (DIAS; BARROS; ANDRADE, 2002; FONTANA et al., 2004; MARX et al.,

1998; ROSENBERG; TOROSIAN, 2000; THOR, 2002), também concluíram que o PRP acelera a reparação óssea devido aos fatores de crescimento nele contidos.

É muito provável que a associação de PRP com enxerto ósseo autógeno faça com que maior quantidade de células seja induzida a produzir matriz óssea extracelular (OYAMA, et al., 2004; THOR, 2002), produzindo melhores resultados. Em humanos, muitos pesquisadores utilizaram a associação de osso xenógeno ou alógeno com PRP com resultados satisfatórios, semelhantes aos obtidos somente com o uso de PRP (ANITUA, 1999) ou de PRP associado ao osso autógeno (OYAMA et al., 2004; THOR, 2002).

No entanto, a opção de nossa pesquisa foi a análise isolada do efeito do PRP, pouco avaliado em alvéolos dentários e do PPP, aparentemente ainda não investigado, com a finalidade de evitar, na medida do possível, a realização de enxertos ósseos intra ou extrabuciais. Na discussão de nossos resultados é importante destacarmos que, em animais diferentes do homem, vários pesquisadores não puderam atestar a validade do PRP como fator acelerador do reparo ósseo (GRAGEDA et al., 2005; JAKSE et al., 2003; WILTFANG et al., 2003; WILTFANG et al., 2004), a não ser para acelerar o processo de osseointegração (ZECHNER et al., 2003). Parece lícito afirmar que apesar de os trabalhos apresentarem metodologias corretas, o modelo animal escolhido pode ter interferido no resultado final da pesquisa, já que a maioria dos trabalhos da literatura que provaram a eficácia do PRP utilizaram o ser humano como modelo experimental (ANITUA, 1999; MARX et al., 1998; OYAMA et al., 2004; ROSENBERG, TOROSIAN, 2000; THOR, 2002).

Utilizando a análise de parâmetros clássicos de reparação óssea, nossos resultados apontam semelhança de reparação nos alvéolos dentários preenchidos com o PPP e com o coágulo sangüíneo. A redução em pouco menos

da metade da concentração de plaquetas no PPP em relação ao sangue total parece não ter prejudicado a reparação óssea 28 dias após as exodontias. Talvez a elaborada rede de fibrina supostamente formada com a adição do PPP compense a diminuição da quantidade de fatores de crescimento liberados, em função da diminuição do número de plaquetas.

Em síntese, os resultados apresentados no presente estudo estão em concordância com os apresentados na literatura, que até o momento se apresenta aparentemente clara em relação à efetividade do PRP no favorecimento da reparação óssea em humanos. O grande problema é que não existe uma padronização da metodologia de obtenção do PRP, desde a centrifugação até a obtenção do gel. Por esse motivo, ainda tornam-se necessários novos estudos que conduzam a uma padronização por todos adotada, para que os resultados das pesquisas possam ser mais uniformes e, principalmente, para que os profissionais que utilizam o PRP tenham um instrumento mais confiável no processamento de sua obtenção.

Por outro lado, nossos resultados relativos ao PPP não podem ser cotejados devido à aparente ausência de trabalhos destinados a investigar sua ação em tecido ósseo.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesta pesquisa, baseados na análise de parâmetros adequados de reparação do tecido ósseo (graus de angiogênese e fibrose, atividade de osteoblastos e osteoclastos e presença de osso imaturo e laminar), permitem concluir, em humanos, que em 28 dias:

1. em comparação com alvéolos dentários preenchidos espontaneamente com coágulo sangüíneo (controle), os preenchidos com PRP apresentaram melhores indícios histológicos de reparação óssea;

2. o uso do PPP no preenchimento de alvéolos dentários não acarretou diferenças histológicas em relação ao grau de reparação óssea constatado em alvéolos-controle.

8. REFERÊNCIAS⁹

AMLER, M. H. The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 27, p. 309-318, 1969.

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, p. 529-535, 1999.

ANTONIADES, H. N.; HUNKAPILLER, M. W. Human platelet derived growth factors (PDGF): amino-terminal amino acid sequence. **Science**, v. 220, p. 963-965, 1983.

BECKER, W. et al. A comparison of e-PTFE membranes alone or in combination with platelet-derived growth factors and insulinlike growth factor-1 or demineralized freeze-dried bone in promoting bone formation around immediate extraction socket implants. **J. Periodontol.**, v. 63, p. 929-940, 1992.

BOYNE, P. J. Osseous repair of the post-extraction alveolus in man. **Fed. Dent. Serv.**, v. 21, p. 805-813, 1966.

CHAGAS, S; OLIVEIRA, S.; DE BORTOLI JUNIOR, N. Plasma rico em plaquetas
In: PONTUAL, M.A.B.; MAGINI, R.S. **Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: das pesquisas científicas à clínica odontológica**. São Paulo: Ed. Santos, 2004. cap. 6, 151-155.

⁹ De acordo com a NBR 14724 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), 2002. Abreviaturas dos Periódicos segundo "Index to Dental Literature" e SECS (Seriados em Ciências da Saúde)

DIAS, E. C. L. M.; BARROS, M. A. A.; ANDRADE, R. Plasma Rico em Plaquetas. **Rev. Bras. Implant.**, v. 8, p. 36-38, 2002.

EFEUGLU, C.; AKÇAY, Y. D.; ERTÜRK, S. A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 62, p. 1403-1407, 2004.

FONTANA, S. et al. Effect of platelet-rich plasma on the peri-implant bone response: an experimental study. **Implant Dent.**, v. 13, p. 73-78, 2004.

FURST, G. et al. Sinus grafting with autogenous platelet-rich plasma and bovine hydroxyapatite. A histomorphometric study in minipigs. **Clin. Oral Implant. Res.**, v. 14, p. 500-508, 2003.

GARG, A. K. et al. Autogenous mandibular bone grafts in the treatment of the resorbed maxillary anterior alveolar ridge: rationale and approach. **Implant. Dent.**, v. 7, p. 167-176, 1998.

GIANNOBILLE, W. V. et al. Comparison of canine and non-human primate animal models for periodontal regenerative therapy: results following a single administration of PDGF/IGF-I. **J. Periodontol.**, v. 64, p. 1158-1168, 1994.

GONSHOR, A. Technique for producing platelet rich plasma and platelet concentrate. **Int. J. Period. Rest. Dent.**, v. 22, p. 547-557, 2002.

GRAGEDA, E. et al. Bone formation in the maxillary sinus by platelet-rich plasma: an experimental study in sheep. **J. Oral Implant.**, v.31, p. 2-16, 2005.

HOWELL, T. H. et al. A phase I/II clinical trial to evaluate a combination of recombinant human platelet-derived growth factor-1 in patients with periodontal disease. **J. Periodontol.**, v. 68, p. 1186-1193, 1997.

HOWELL, T. H. et al. A feasibility study evaluating rhBMP-2/Absorbable collagen sponge device for local alveolar ridge preservation augmentation. **Int. J. Periodont. Rest. Dent.**, v. 17, p. 124-139, 1997.

JAHN, R. S. **Metodologia para obtenção de plasma rico em plaquetas.** Dissertação (Mestrado em Implantodontia). Universidade de Santo Amaro, São Paulo, 2002.

JAKSE, N. et al. Influence of PRP on autogenous sinus grafts. An experimental study on sheep. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 4, p. 578-583, 2003.

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: cases series. **J. Periodontol.**, v. 71, p. 1654 – 1661, 2000.

KIRITSY, C. P. et al. Role of growth factors in cutaneous wound healing: a review. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 4, p. 729-760, 1993.

KOKA, S.; VANCE, J. B.; MAZE, G. I. Bone growth factors: potential for use as osseointegration enhancement technique. **J. West Soc. Periodontol.**, v. 43, p. 97-104, 1995.

LANDESBURG, R.; ROY, M.; GLICKMAN, R. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 58, p. 297-300, 2000.

LANDESBURG, R.; MOSES, M.; KARPATKIN, M. Risks of using platelet rich plasma gel. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 56, p. 1116, 1998.

LIND M. et al. Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation. **Acta. Orthop. Scand. Sppl.**, v. 69, p. 2-37, 1998.

LYNCH, S. E. et al. Effects of the platelet-derived growth factor insuline-like growth factor-1 combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. **J. Periodontol.**, v. 62, p. 710-716, 1991.

LYNCH, S. E. et al. The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insuline-like growth factors on periodontal wound healing. **J. Periodontol.**, v. 62, p. 468-467, 1991.

LYNCH S. E. et al. A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. **J. Clin. Periodontol.**, v.16, p. 545-8, 1989.

MAN, D. et al. The use of autologous platelet rich plasma (platelet gel) and autologous platelet poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 107, p. 238-239, 2001.

MARX, R. E. Platelet-rich plasma: evidence to suport its use. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 62, p. 489-496, 2004.

MARX, R.E. Platelet-rich plasma: a source of multiple autologous growth factors for bone grafts. In: LYNCH, S.E. et al. *Tissue Engineering, applications in maxillofacial surgery and periodontics*. Carol Stream: Quintessence Books, 1999. cap. 4, p. 71-82.

MARX, R. E.; GARG A. K. Applications of PRP in oral and maxillofacial surgery. Disponível na Internet: http://www.plateletrich.com/frame_right.html. Maio 2002. Acesso em junho de 2002.

MARX, R. E. et al. Platelet-rich plasma. Growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 85, p. 257-267, 1998.

MARX, R. E.; GARG, A. K. Bone structure, metabolism, and physiology: its impact on dental implantology. **Implant Dent.**, v. 7, p. 267-276, 1998.

MAZOR, Z. et al. Platelet-rich plasma for bone graft enhancement in sinus floor augmentation with simultaneous placement: patient series study. **Implant Dent.**, v. 13, p. 65-72, 2004.

MERAW, S. J. et al. Treatment of peri-implant defects with combination growth factor cement. **J. Periodontol.**, v. 71, p. 8-13, 2000.

NURDEN, P. B. Inderirectional trafficking of membrane glycoproteins following platelet activation in suspension. **Tromb. Haemost.** V. 78, p. 1305-1315, 1977.

OBARRIO, J. J. et al. The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology – case reports. **Int. J. Periodont. Rest. Dent.**, v. 20, p. 487-497, 2000.

OHTA, Y. et al. Comparative changes in microvascular and bone during healing of implants in extractions sites. **J. Oral Implant.**, v.3, p. 184-198, 1993.

ORTEL, T. L. et al. Topical thrombin and acquired coagulation factor inhibitors: clinical spectrum and laboratory diagnosis. **Am. J. Hematol.**, v. 45, p. 128–135, 1994.

OYAMA, T. et al. Efficacy of platelet-rich plasma in alveolar bone grafting. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 62, p. 555-558, 2004.

PEREIRA FILHO, V. A. et al. Bases biológicas do tecido ósseo. In: PONTUAL, M. A. B.; MAGINI, R. S. **Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: das pesquisas científicas à clínica odontológica.** São Paulo: Ed. Santos, 2004. cap. 2, p. 47-69.

PIKOS, M.A. Block autografts for localized ridge augmentation: Part II. The posterior maxilla. **Implant. Dent.**, v. 9, p. 67-75, 2000.

PIKOS, M. A. Block autografts for localized ridge augmentation: Part I. The posterior maxilla. **Implant. Dent.**, v. 8, p. 279-285, 1998.

RODRIGUES, G.N.; KATAYAMA, A.Y. Elevação do assoalho do seio maxilar através da técnica do balão para sinus Lift-B.S.L. **Rev. Bras. Implant.**, v. 9, n.36, p. 340-349, 2002.

ROSENBERG, E.; TOROSIAN, J. Sinus grafting using platelet rich plasma - initial case presentation. **Pract. Periodont. Aesthet. Dent.**, v. 12, p. 843-850, 2000.

ROSSI JÚNIOR, R.; LEMOS, J. J.; PÍSPICO, R. Utilização de plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos – proposta de um protocolo de obtenção simplificado. p.1-7. Disponível na Internet <http://www.dentalnet.com.br/ArtigoPRP.htm>. Acesso em 26/12/2001.

RUTHERFORD, R. B. et al. Platelet-derived growth factor and dexamethasone combined with a collagen matrix induce regeneration of the periodontium in monkeys. **J. Clin. Periodontol.**, v. 20, p. 537-544, 1993.

SARA, J. et al. Development of antibodies to bovine and human factor V in two children after exposure to topical bovine thrombin. **Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, v. 16, p. 249-254, 1994.

SCHER, E. L. C. et al. New bone formation after sinus lift procedure using demineralized freeze-dried bone and tricalcium phosphate. **Implant. Dent.**, v. 8, p. 49-53, 1999.

SCHMITZ J.P.; HOLLINGER J.O. The biology of platelet-rich plasma. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 59, p. 1119-1121, 2001.

SEYEDEDIN, S. M. Osteoinduction: a report on the discovery and research of unique protein growth factors mediating bone development. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 68, p. 527-530, 1989.

SONNLEITNER, D. et al. A simplified technique for producing platelet-rich plasma as platelet concentrate for intra-oral bone grafting techniques: a technical note. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 15, p. 879-882. 2000.

THOR, A. Reconstruction of the anterior maxilla with platelet gel, autogenous bone, and titanium mesh: a case report. **Clin. Implant. Dent. Relat.**, v.14, p. 150-155, 2002.

VERCELOTTI, T.; RUSSO, C.; GIANOTTI, S. A new piezoelectric ridge expansion technique in the arch: a case report. *Word Dentistry*. Disponível na Internet: <http://www.worddent.com>. Acesso em junho de 2002.

WANG, H. L. The effect of platelet-derived growth factor on the cellular response of the periodontium: an autoradiographic study on dogs. **J. Periodontol.**, v. 65, p. 429-436, 1994.

WEIBRICH, G. et al. Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma-rich-in-growth-factors kit to produce platelet-rich plasma: a technical report. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 20, p. 118-123, 2005.

WHITMAN, D. H.; 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, p. 1217-1218, 1998.

WHITMAN, D. H. et al. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 55, p. 1294-1299, 1997.

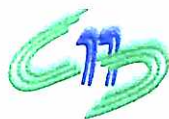
WILTFANG, J. et al. Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 15, p. 187-193, 2004.

WILTFANG, J. et al. Sinus floor augmentation with β -tricalciumphosphate (β -TCP): does platelet-rich plasma promote its osseous integration and degradation. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 14, p. 213-218, 2003.

YAMAZAKI, M. et al. Influence of antiplatelet substances on platelet-rich plasma. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 62, p. 714-718, 2004.

ZECHNER, W. et al. Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorphometric study in minipigs. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 18, p. 15-22, 2003.

ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa - UNISA



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 n.º 306
Aprovado em 16/05/2000

PARECER N.º 167/2004

Registro de Pesquisa n.º 236/04 – Apresentado em 01/06/2004

Projeto de Pesquisa: “Análise histológica, em humanos, da eficácia do Plasma Rico em Plaquetas na reparação óssea de alvéolos dentais após a extração.”

Responsável Pós- Graduando: Rogério de Lima Romeiro

Orientador: Prof. Dr. Wilson Roberto Sendyk

Área Temática Especial: 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 da UNISA, de acordo com as atribuições da Resolução 196/96, manifesta-se pela **APROVAÇÃO** do projeto de pesquisa, a ser desenvolvido nos pacientes provenientes da Clínica do Curso de Mestrado em Implantodontia da Universidade de Santo Amaro – SP.

São Paulo, 23 de Agosto de 2004

PROF. DR. CARLOS DE SOUSA LUCCI
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
da Universidade de Santo Amaro

ANEXO 2 - Carta de Informação

CARTA DE INFORMAÇÃOTítulo: Análise histológica, em humanos, da eficácia do Plasma Rico em Plaquetas na reparação de alvéolos após a extração

Estas informações estão sendo fornecidas para a sua participação voluntária neste estudo que visa verificar a efetividade do plasma rico em plaquetas na reparação óssea.

Os procedimentos a serem realizados serão os rotineiros para a realização de uma extração dentária e para a coleta de sangue através de punção venosa periférica do antebraço. Serão extraídos dois dentes com indicação para tal procedimento e ao mesmo tempo será coletado cerca de 40ml(quantidade muito pequena) de sangue, o que não causa nenhum tipo de risco ou malefício. Pequeno desconforto ou manchamento temporário podem ocorrer na região da punção. O sangue retirado será processado para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP) ao qual é atribuída a capacidade de acelerar o processo de reparação óssea. Em um alvéolo (cavidade óssea onde se aloja o dente) será colocado o PRP e no outro apenas o procedimento de rotina de uma extração dentária. Serão aguardados dois meses para cicatrização e então serão colocados os implantes dentais. Na oportunidade o osso removido para colocação dos implantes será analisado para verificação da efetividade ou não do PRP em comparação com a região onde foi realizado apenas o procedimento de rotina. As próteses sobre implantes serão instaladas seis meses após a colocação dos mesmos, como de rotina.

Os pacientes serão beneficiados pela reabilitação dentária realizada com a utilização de implantes nos locais envolvidos na pesquisa.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o cirurgião dentista Rogério de Lima Romeiro, que pode ser encontrado na Universidade de Santo Amaro no endereço: Rua Prof. Enéas Siqueira Neto, 340, Telefone (11) 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 (11) 5929-5477, fax: (11) 520-9160.

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo para a 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 os participantes em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada a 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 paciente tem direito, a tratamento médico na instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

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

Rogério de Lima Romeiro

Pesquisador responsável

ANEXO 3 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____ RG
 _____, residente a _____

acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "***Estudo histológico, em humanos, da eficácia do Plasma Rico em Plaquetas na reparação óssea de alveolos dentais após a extração***".

Discuti com o pesquisador Rogério de Lima Romeiro sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de *acesso a tratamento quando 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.

Data ___/___/___

Assinatura do paciente/representante

Data ___/___/___

Assinatura da testemunha

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 4 - Ficha de anamnese

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
IDENTIFICAÇÃO

Nome do paciente _____ Número: _____
 Nascimento ___/___/___ Idade _____ Gênero _____
 Endereço _____
 Cidade _____ Cep _____ Fone: () _____
 Profissão _____ - _____ Estado Civil _____
 R.G.: _____ C.P.F.: _____
 Data da coleta ___/___/___

ANAMNESE

Há quanto tempo foi a sua última consulta médica? _____

Qual o motivo? _____ Médico: _____

No momento está fazendo algum tratamento médico? _____

Está tomando algum medicamento? Sim () Não ()

NOME	POSOLOGIA	TEMPO DE USO

Tem sensibilidade a algum anestésico, antibiótico(Penicilina) ou alergia a algum medicamento: _____

Sistema Respiratório:

Tem ou teve?

Rinite: _____

Bronquite: _____

Sinusite: _____

Asma: _____

Enfisema Pulmonar: _____

Sistema Gastrointestinal:

Tem ou teve?

Gastrite: _____

Úlcera: _____

Sistema Urogenital:

Cálculo renal: _____

Infecção Urinária: _____

Sistema Cardiovascular:

Tem ou teve?

Angina: _____

Infarto do Miocárdio: _____

Arritmia: _____

Prolapso: _____

Sopro: _____

Endocardite: _____

Cansaço excessivo ao esforço físico: _____

Formigamento de extremidades: _____

Hiper ou Hipotensão arterial: _____

Varizes: _____

Sistema Endócrino

Tem ou teve?

Diabete: _____

Hiper ou hipotiroidismo: _____

Doenças Infecto Contagiosas:

Tem ou teve?

AIDS: _____

Sífilis: _____

Hepatite: _____

Tuberculose: _____

Exame Físico

Sinais vitais:

P.A.....Pulso.....

Loco-Regional:

Extra_oral.....

.....

.....

.....

Intra_oral.....

.....

.....

.....

.....

ANEXO 5 – Parecer do histopatologista



**INSTITUTO DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA
“PROF. F. E. GODOY MOREIRA”
SEÇÃO DE ANATOMIA PATOLÓGICA**

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que realizei a análise histológica das lâminas do trabalho “ANALISE HISTOLÓGICA DE TECIDO ÓSSEO: ALVÉOLOS HUMANOS TRATADOS COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS, PLASMA POBRE EM PLAQUETAS E COÁGULO NATURAL” do Dr. Rogério Romero.

**CLÁUDIA REGINA GOMES CARDIM MENDES DE OLIVEIRA
MÉDICA CHEFE
SEÇÃO DE ANATOMIA PATOLÓGICA**

AUTORIZAÇÃO

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

Rogério de Lima Romeiro
e-mail: rogerio.romeiro@terra.com.br