

**UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
DIRETORIA DE PÓS GRADUAÇÃO**

**REGENERAÇÃO DE OSTEOTOMIAS REALIZADAS EM TÍBIAS DE
CÃES, PREENCHIDAS COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS.
ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA**

SELMAR ALVES LOBO JUNIOR.

**Dissertação apresentada à Diretoria de Pós Graduação
da Universidade de Santo Amaro para a obtenção do
Título de Mestre em Implantodontia.**

São Paulo
2003

**UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
DIRETORIA DE PÓS GRADUAÇÃO**

**REGENERAÇÃO DE OSTEOTOMIAS REALIZADAS EM TÍBIA DE CÃES
PREENCHIDAS COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS.
ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA**

SELMAR ALVES LOBO JUNIOR.

**Dissertação apresentada à Diretoria de Pós Graduação
da Universidade de Santo Amaro para a obtenção do
Título de Mestre em Implantodontia, orientação do
Prof. Dr. Nelson Villa.**

São Paulo
2003

**REGENERAÇÃO DE OSTEOTOMIAS REALIZADAS EM TÍBIA DE CÃES
PREENCHIDAS COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS.
ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA.**

SELMAR ALVES LOBO JUNIOR

APROVADO EM ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Nelson Villa. (Orientador)

Livre docente em Histologia pela Universidade de São Paulo.

Prof. Dr. Reinaldo Brito Dias.

Livre docente pelo departamento de Prótese e Cirurgia-Buco-Maxilo-Facial da
Universidade de São Paulo.

Prof. Dr. Oswaldo Alves Mora.

Professor de Histologia do departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal
de São Paulo-UNIFESP

CONCEITO FINAL: _____

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO

Eu Selmar Alves Lobo Junior, autorizo a cópia parcial e/ou integral deste trabalho.

DEDICATÓRIA

Dedico estes dois difíceis anos à você Sandra, muito mais que esposa, e sim amiga, companheira e cúmplice, que em meu silêncio e ausência, inconscientemente, me dava o apoio e tranqüilidade necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

Às minhas queridas filhas Maria Fernanda e Maria Luiza, que breve estará conosco iluminando mais ainda os nossos dias. Todo esse esforço é para vocês.

Vocês são a razão e a alegria da minha vida.

Mãe nascem-te

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Nelson Villa pela amizade, dedicação e ensinamentos a mim passados.

Ao amigo e mestre Renato Rossi Jr. pelo incentivo, apoio e ajuda nos momentos de dúvida.

A Sra. Marília e Sr. Antonio, responsáveis pelo Laboratório de Técnica Cirúrgica e pelo canil da UNISA, meu agradecimento e minha admiração pelo carinho e atenção dedicada a mim e aos animais durante todos os tempos cirúrgicos.

A Sra. Key, pela dedicação no preparo do meu material científico.

Ao Prof. Dr. Fernando Ibanhez e Dr. Thiago Stellato, Médicos Veterinários da Faculdade de Veterinária da UNISA, pela atenção e ajuda fundamentais para a execução do meu trabalho experimental.

Ao Prof. Dr. Mário Ferman e Dra. Vivian Ricci Gama agradeço pela amizade e pelas aulas de hematologia assim como pela permissão do uso do laboratório.

Ao Prof. Dr. Wilson Roberto Sendyk e toda a equipe de Implantodontia da Unisa, pela amizade e conhecimento a mim passados durante estes dois anos.

Aos meus colegas de curso, que se tornaram amigos, agradeço pela amizade e conhecimento adquirido em nossa convivência. Aproveito para expressar meu desejo de paz, saúde, sucesso pessoal e profissional.

Um agradecimento especial e carinhoso aos animais utilizados neste trabalho, pela possibilidade de crescimento científico e experiência profissional adquiridos.

Aos meus pais, mesmo longe do entendimento científico do meu trabalho, meu agradecimento pelo apoio sincero e silencioso dedicado a mim e a minha família. Sem vocês este projeto de vida não teria sido realizado.

Por último agradeço a Deus, todas as palavras, pensamentos e agradecimentos são insuficientes para expressar os meus sentimentos.

“Toda conquista parte de um sonho.

Sonhei e conquistei, com trabalho e sem esperar aplausos”

Carlos Alberto Parreira.

RESUMO

É sempre crescente o interesse e a necessidade, frente aos avanços do mundo moderno, por novas técnicas e materiais regenerativos que possam melhorar ainda mais os prognósticos de nossos procedimentos reconstrutivos, assim como diminuir ao máximo possível a morbidade cirúrgica, muitas vezes oriunda das técnicas utilizadas na reconstrução dos maxilares.

Com o estudo e a presença diária da engenharia tecidual em vários centros científicos no mundo, estamos entrando em uma nova era.

É incontestável a eficácia dos fatores de crescimento tecidual, encontrados no plasma rico em plaquetas, quando utilizados por nós, em várias oportunidades cirúrgicas.

Nosso trabalho foi desenvolvido para demonstrar a eficácia deste produto, quando utilizado na regeneração óssea. Foram feitas avaliações histológicas e histomorfométricas da regeneração de osteotomias circulares em tíbias de cães, que foram preenchidas com o plasma rico em plaquetas quando comparadas com as osteotomias preenchidas com coágulo sangüíneo (controle). As biópsias ósseas foram realizadas nos tempos de sete, 14, 21 e 28 dias conforme protocolo da American Dental Association para este tipo de experimento científico.

Como resultado pudemos constatar um número bem superior de osteoblastos nos tempos de sete e 14 dias assim como a qualidade e a quantidade do trabeculado ósseo neoformado encontrado, se comparado com as lâminas controle.

Os efeitos do plasma rico em plaquetas e seus fatores de crescimento mostram seus efeitos durante todo o início da regeneração óssea, sendo que já, aos 28 dias, melhoram substancialmente as características físicas do tecido ósseo, aumentando a quantidade e a densidade óssea, por conta disto, melhorando também a qualidade do tecido ósseo, já que este continuará em constante remodelação.

ABSTRACT

The interest and need are always growing front to the modern world's progresses for new techniques and regenerative materials that can still get better more the prognostics of our reconstruction procedures as well as reducing the possible maximum a surgical morbity and many times are originating from of the techniques used in the maxillaries reconstruction.

We are entering in a new time with the study and daily's presence of the tissue engineering in several scientific centers in the world.

The effectiveness of the factors of tissue growth is unanswerable. They can be found in the rich plasma and plaques when used in several surgical opportunities by us.

Our work was developed to demonstrate the effectiveness of this product when used in the bony regeneration. There were made histologic evaluations of the regeneration of circular osteotomies in dogs tibias that were filled out with the rich plasma in plaques when compared with the osteotomies filled out with blood coagulate (controls). The bony biopsies were accomplished in 07, 14, 21 and 28 days according Dental American Association protocol for this type of scientific experiment.

As a result we could verify very superior number of osteoblasts in the times of 7 and 14 days as well as the quality and the amount of the trabecular bony neofomation that was found if it was compared with the sheets control.

The effects of the rich plasma in plaques and your growth factors are showed during the whole beginning of the bony regeneration. We can note that in the 28 days the physics characteristics of the bony fabric increasing the amount and the bony density it is improved substantially and due this also improve the quality of the bony fabric since this will continue in constant remodelation.

SUMÁRIO

RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	II
INTRODUÇÃO.....	1
PROPOSIÇÃO.....	4
REVISÃO DA LITERATURA.....	5
MATERIAIS E MÉTODO.....	20
MATERIAIS.....	20
ESCOLHA DOS ANIMAIS.....	20
MATERIAIS PARA OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS.....	20
MATERIAIS CIRÚRGICOS.....	21
FÁRMACOS UTILIZADOS.....	21
MÉTODO.....	22
OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS.....	22
TÉCNICA DE ANESTESIA GERAL.....	23
CIRURGIA DE ENXERTO COM P.R.P.....	24
OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS PARA ESTUDO HISTOLÓGICO.....	25
TÉCNICA DE PREPARO DAS LÂMINAS.....	25
HISTOMORFOMETRIA.....	26
TÉCNICA CIRÚRGICA.....	27
CIRURGIA PARA OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE TECIDO ÓSSEO.....	37
RESULTADOS.....	40
DISCUSSÃO.....	60
CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS.....	67
APÊNDICE A – CONCEITOS BÁSICOS.....	74
APÊNDICE B – PLASMA RICO EM PLAQUETAS.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

PRP- plasma rico em plaquetas

PPP- plasma pobre em plaquetas

PDGF- fator de crescimento derivado de plaquetas

TGF α e β - fator de crescimento transformador α e β

IGF I e II – fator de crescimento semelhante a insulina

FGF – fator de crescimento de fibroblastos

EGF – fator de crescimento epitelial

BMPs – proteínas morfogenéticas do osso

rhBMP – proteína morfogenética óssea recombinante humana

cm – centímetro

Álcool ABS- álcool absoluto

μ l – micro litro

g – gravidade (força relativa centrífuga)

mm – milímetro

mm^3 – milímetro cúbicos

ml – mililitro

mg – miligrama

n° - número

DNA – ácido desoxirribonucléico

Kg – kilograma

% - por cento

PRM – rotação por minuto

Fig : - figura

INTRODUÇÃO

A busca por novos biomateriais e tecnologias que permitam o restabelecimento da anatomia e função de estruturas corporais perdidas, constitui-se no maior desafio dos pesquisadores nas últimas décadas.

Nas áreas da Cirurgia Bucomaxilofacial, Periodontia e principalmente da Implantodontia, os cirurgiões têm se voltado para a reconstrução dos maxilares reabsorvidos após a perda dos elementos dentários oriunda de diversas causas.

Para minimizarmos as seqüelas deixadas muitas vezes por atos operatórios ressectivos, como exodontias, cirurgias para remoção de lesões periapicais ou tumores benignos e malignos, as quais invariavelmente causam alterações no sistema estomatognático, lançamos mão de manobras cirúrgicas que nem sempre atingem este objetivo.

Normalmente o processo de reparação destas áreas se daria espontaneamente, porém muitas vezes a anatomia se altera drasticamente, não permitindo a reabilitação bucal com implantes dentários.

Para a correção cirúrgica dos maxilares, vários autores têm proposto materiais e técnicas cirúrgicas reconstrutivas com sucesso, conseguindo em grande parte a condição ideal para a reabilitação bucal, principalmente com a utilização dos implantes dentários.

Atualmente, graças ao desenvolvimento tecnológico dos biomateriais, ao avanço dos métodos e do melhor entendimento da histofisiologia óssea, tornou-se

possível aos profissionais da área Odontológica, em especial, melhorar a quantidade e a qualidade óssea, como também influenciar e fornecer substitutos funcionais para o tecido ósseo. Não apenas o osso autógeno pode nos ajudar, mas também inúmeros produtos sintéticos podem contribuir para esse fim em determinadas circunstâncias.

Vários materiais alógenos, xenógenos ou aloplásticos estão disponíveis, em formas variadas desde géis, pó, lâminas e blocos variando também em seus formatos, tamanhos e porosidades. A utilização de osso autógeno, porém, proporciona melhores resultados.

Tais resultados para a regeneração óssea se devem ao fato de o tecido ósseo autógeno, ser altamente osteogênico, pois suas células ainda se mantêm vivas por aproximadamente quatro horas após o enxerto (MARX, 1979).

Várias pesquisas mostram que as células oriundas dos enxertos ósseos autógenos após sua morte são fagocitadas por macrófagos e estes por sua vez liberam uma proteína insolúvel osteoprogenitora, que foi evidenciada e denominada por Urist (1965) de proteína óssea morfogenética (BMP). A presença desta proteína em áreas de reparo induz as células mesenquimais indiferenciadas a transformarem-se em células ósseas estimulando também as células hospedeiras a aumentar a neoformação óssea.

Atualmente muito se tem estudado sobre os fatores de crescimento tecidual, como IGF (fator de crescimento semelhante à insulina), TGF (fator de crescimento e transformação), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), que estão contidos nos alfa (α) grânulos das plaquetas e células de linhagem blástica. Estes

fatores têm como principais funções a mitogênese e a diferenciação celular das células mesenquimais.

Podemos facilmente concentrar estes fatores de crescimento no plasma rico em plaquetas, baseado em um protocolo simples, porém com eficácia cientificamente comprovada. Sabemos ainda que o plasma rico em plaquetas é um produto autógeno que adicionado aos enxertos ósseos promove uma aceleração na regeneração óssea e ainda nos mostra uma melhora em qualidade e quantidade do tecido ósseo regenerado (MARX, 1999).

Lynch em 1989 definiu o plasma rico em plaquetas (PRP) como um produto derivado do sangue autógeno por processo laboratorial, colhido em período pré-operatório e rico em fatores de crescimento originários dos grânulos α - plaquetários.

Outras denominações também podem ser encontradas na literatura científica, tais como plasma autógeno de plaquetas, plasma enriquecido com plaquetas, plasma rico em fatores de crescimento, concentrado de plaquetas e gel de plaquetas (ANITUA, 1999; LYNCH et al. ,1989; MARX et al.,1998).

Em 2002, Tichler chamou de PRP uma pequena porção de fatores de crescimento obtidos a partir de uma pequena fração de sangue do paciente obtidos por vários processos de centrifugação.

Como vantagens do seu uso, podemos citar o fato de o PRP ser um produto orgânico, atóxico e não imunorreativo, que tem sido usado para acelerar os caminhos da cicatrização da ferida cirúrgica, tanto nos tecidos moles como no tecido ósseo, devido à presença de fatores de crescimento (WHITMAN, BERRY e GREEN, 1997; MARX et al., 1998; ANITUA, 1999).

PROPOSIÇÃO

É proposta do autor o estudo histológico e histomorfométrico do processo de reparo de cavidades cirúrgicas confeccionadas em tíbias de cães, adicionadas de plasma rico em plaquetas, em comparação com a regeneração natural de cavidades semelhantes preenchidas com coágulo sanguíneo.

REVISÃO DA LITERATURA

É grande o número de técnicas e materiais usados em Odontologia, que tem como objetivo principal, restabelecer todas as funções bucais.

Em um estudo sobre a cicatrização alveolar em dois trabalhos comparativos após exodontias, um em humanos e o outro em cães, Caflin (1936) descreveu as etapas da cicatrização óssea.

Em 1956 Axhausen descreveu pela primeira vez, de maneira clínica e histológica, os mecanismos implicados no processo de reparo ósseo. O autor fez uma retrospectiva histórica do processo e enfocou os principais momentos da reparação.

Urist (1965) observou que o extrato de matriz de osso desmineralizado humano sofre invasão de células mesenquimais que se transformam em osteoblastos e produzem osso novo em local heterotrópico. O autor estudou a formação de osso por auto-indução e preconizou as atividades da proteína morfogenética óssea (BMP-2). Em pesquisas com coelhos, descobriu que o osso desmineralizado liofilizado induz a formação do osso.

Após estudos clínicos e histológicos em humanos, Friedenstein e Petchovo (1979) concluíram que os resultados dos enxertos ósseos provenientes do osso ilíaco mostravam-se relevantes, devido a esse tipo de enxerto ósseo conter células medulares (mesenquimais indiferenciadas).

Em um trabalho sobre enxertos, Marx (1979) mostrou que tanto nos enxertos particulados ou em blocos, as células mesenquimais indiferenciadas oriundas da

medula óssea submetidas a três diferentes métodos de conservação, permaneceram vivas no leito receptor por um período de até quatro horas, em uma concentração de 95%. Marx et al. (1998) publicaram um outro trabalho onde apresentavam dados clínicos e histológicos mostrando a capacidade de reparo inerente ao osso autógeno. Os autores basearam seus achados em uma grande quantidade de casos de reconstrução de maxilas e mandíbulas de pacientes que sofreram ressecções causadas por neoplasias.

Canalis et al. (1982) desenvolveram um estudo onde demonstraram a ação do IGF-I na formação óssea pela estimulação do DNA (ácido desoxirribonucléico), colágeno e proteínas não colágenas em 21 culturas de calvárias de ratos. O resultado apresentado foi que este fator de crescimento promove deposição de matriz óssea e estimula a mitogênese de osteoblastos.

Trabalhando com cães, Grey e Elves (1982) apresentaram um trabalho, onde demonstraram que as células medulares osteoprogenitoras estão presentes tanto nos enxertos de áreas doadoras como nas áreas receptoras e que estas células participam ativamente no processo de osteogênese.

Em 1986, Knighton et al. relataram a utilização de fatores de crescimento derivado de plaquetas, de forma tópica, na estimulação de regeneração de feridas epiteliais crônicas em humanos. Os autores estudaram 49 pacientes, dos quais 29 eram diabéticos com úlceras crônicas não reparadas. Os fatores derivados de plaquetas foram denominados "fatores cicatrizadores derivados de plaquetas" (PDWHF) aplicados topicamente nas lesões, sendo obtido o reparo em 100% das mesmas. O período de reparo foi de 10,6 semanas, sendo que estas feridas

estavam recebendo tratamento convencional há um tempo médio de 198 semanas (um caso atingiu 1820 semanas).

No mesmo ano, Ross, Raines e Bowen publicaram um trabalho onde demonstravam o papel biológico dos fatores de crescimento existentes nas plaquetas. Os autores descreveram a capacidade de estes fatores de crescimento iniciarem o reparo, tanto dos tecidos moles como do tecido ósseo de humanos.

Em um estudo utilizando cães da raça Beagle, Lynch et al. (1989) utilizaram uma associação de FDGF/IGF-I com o objetivo de avaliar a regeneração periodontal e demonstraram que estes fatores de crescimento demonstravam-se ser quimiotáticos e mitogênicos tanto para fibroblastos como para osteoblastos.

Lynch et al. (1991) estudando a cicatrização óssea ao redor de 40 implantes de pressão instalados na mandíbula de oito cães da raça Beagle, utilizaram concomitantemente à instalação dos implantes, uma associação de PDGF/IGF-I e chegaram à conclusão de que esta associação estimula a regeneração óssea em torno dos implantes.

Em 1992, Becker et al. desenvolveram um trabalho onde foram instalados 24 implantes em quatro cães logo após a extração; compararam o uso de membranas de ePTFE sozinhas, ou em combinação com DFDB ou com a combinação PDGF-bb/IGF-I. Os resultados mostraram que os locais tratados com membrana mais PDGF-bb/IGF-I obtiveram altas taxas de densidade óssea e o dobro de crescimento ósseo em torno dos implantes, quando comparados aos locais tratados com membrana ePTFE sozinha ou associada ao DFDB.

Ganio et al. (1993) comprovando o estudo de Knighton et al. (1986), descreveram um protocolo de tratamento para pacientes com úlceras crônicas a partir da aplicação de Procuren ou seja, PDGF em associação com uma matriz de colágeno bovino. Foi avaliado que 78% dos pacientes que tinham indicação para amputação mantiveram seus membros após a utilização da terapia com os fatores de crescimento.

No trabalho publicado por Panagakos em 1993, feito em calvária de ratos, o autor analisou que os fatores de crescimento semelhantes à insulina IGF-I e II são quimiotáticos e com atividade semelhante à insulina tanto *in vivo* ou *in vitro*, promovendo a proliferação de osteoblastos e células mesenquimais indiferenciadas, assim como a síntese de colágeno. Os resultados sugerem que o IGF-I e o IGF-II podem ter importante função no recrutamento de osteoblastos durante a fase inicial da regeneração óssea.

Trabalhando com macacos, Rutherford et al. (1993) aplicaram uma única vez a associação de PDGF/dexametasona e matriz colágena em áreas interdentais, constataram com isso a regeneração periodontal e crescimento ósseo alveolar vertical nestas áreas.

Giannobile et al. (1994) demonstraram em um modelo que utilizava primatas, o potencial osteoindutor do PDGF associado ao IGF-I. Estes fatores colocados em lesões periodontais dos primatas, promoveram um crescimento ósseo 21,6% maior nos animais tratados em relação aos controles.

Tayapongsak et al. (1994) iniciaram uma nova técnica de mescla entre uma cola de fibrina e osso autógeno medular. Utilizaram em 33 cirurgias de reconstrução mandibular, esta mescla, com o objetivo de facilitar a instalação e a cicatrização dos

enxertos autógenos. Esta cola de fibrina era obtida através de doação autógena de sangue em período pré-operatório. Após estudos radiográficos, notou-se a presença de osso incorporado e remodelado na quarta semana de reparo, enquanto nos pacientes não tratados com esta terapia, este efeito só era observado em oito semanas.

Wozney (1995) estudando em cães o potencial das proteínas morfogenéticas contidas na superfamília de fatores de crescimento (IGF-I e IGF-II) em especial a rhBMP-2, teve como resultado, em três áreas diferentes a confirmação da capacidade desta proteína de regenerar defeitos ósseos. Em defeitos com 2,5cm de diâmetro em mandíbulas, em áreas de regeneração de ossos longos, e em técnicas ortopédicas e regeneração de doenças periodontais em mandíbulas. Essas proteínas agem sobre as células mesenquimais indiferenciadas transformando-as em condrócitos e osteoblastos, aumentando a população celular, assim como incrementando a secreção de moléculas da matriz celular.

Caplan (1994) publicou um trabalho onde estudou os fatores indutores do processo de reparo ósseo. Associou o início do reparo ósseo aos fatores de crescimento derivados das plaquetas e dos macrófagos, atribuindo às fases tardias aos fatores liberados pelos osteoblastos no processo de remodelação óssea.

Um novo fator de crescimento denominado proteína osteogênica¹ foi apresentado por Cook e Rueger (1996). O efeito osteocondutor desta proteína foi demonstrado pelos autores que lhe atribuíram a formação de osso novo e a promoção de crescimento de osteoblastos. Os autores acreditam que este fator está centralmente envolvido no processo de reparo ósseo.

Uma retrospectiva feita por Giannobile, Finkelman e Lynch em 1996, sobre a ação dos fatores de crescimento e sua ação na cicatrização periodontal, mostrou a ação mitogênica, quimiotática, metabólica e a capacidade de diferenciação celular exercida por esses fatores de crescimento.

Entre os anos de 1995 a 1997 Smith, Summer et al., Howell et al., comprovaram em pesquisas, que a utilização de fatores de crescimento derivados das plaquetas autólogas (PDGF, TGF- β e IGF-s), isolados ou em conjunto, é biologicamente segura e eficaz para a estimulação celular para fibroblastos, células endoteliais e osteoprogenitoras.

Yaszemski et al. (1996) descreveram a evolução dos transplantes de ossos. Embora não citem a questão dos implantes dentários, o trabalho apresenta informações importantes quanto às estratégias molecular, celular e tecidual, para a reconstrução do osso humano. Os elementos necessários para solucionar a reposição óssea incluem: (1) o material usado para recompor o local danificado deve ser temporário, porque o osso neoformado precisa se fortalecer e se remodelar para suportar a carga que existia antes da perda; (2) o material deve se degradar, de modo controlado, em produtos não tóxicos, para que o organismo possa metabolizar e excretar pelas vias fisiológicas normais; (3) um suporte vascular deve se restabelecer na região reparada para supri-la de nutrientes; (4) deve-se atentar para o uso de materiais de enxerto, assim como seu metabolismo, modo de aplicação e seus resultados. Os procedimentos cirúrgicos também entram nesta análise tanto quanto à modificação da técnica cirúrgica imposta por materiais mais modernos e a reabilitação. O osso recém-formado, também é descrito conforme a origem do desenvolvimento: ossificação intramembranosa ou ossificação endocondral. O ideal

clínico em transplantes ósseos é o enxerto trabecular autógeno. Os enxertos alógenos e os autógenos também se incorporam como os enxertos trabeculados autógenos, mas têm algumas diferenças importantes. O osso trabeculado enxertado, embora necrosado, não perde sua resistência mecânica e melhora esta resistência quando o osso novo se dissemina dentro dele e, com o tempo, a resistência do local é a mesma do osso neoformado. As três diferenças importantes, na seqüência da incorporação, entre o osso trabecular e o compacto têm implicações na parte clínica dos pacientes. As diferenças estão na taxa de revascularização do transplante, na resposta osteoblasto contra osteoclasto e no comportamento do reparo. Disto dependem as estratégias para consertar e repor um plano ósseo. O enxerto ósseo trabeculado é totalmente reabsorvido durante a remodelação e a região reparada se torna um osso lamelar remodelado. O enxerto ósseo compacto permanece como uma mistura de osso necrosado e osso viável durante anos e pode não ocorrer o processo completo de renovação óssea. A parte necrosada pode variar de 50% a 90% da massa do enxerto. A estrutura necrosada mantém sua resistência mecânica e a região ocupada por ela não se transforma em osso remodelado. Por isso a orientação do osso novo não é otimizada e o conjunto não resulta em uma massa óssea que apresente resistência mecânica ao esforço adequada e desejável.

Uma nova técnica foi demonstrada por Whitman, Berry e Green (1997), que utilizaram um gel de plaquetas em substituição à cola de fibrina em cirurgias orais e maxilofaciais. Dentre as vantagens alcançadas estão um maior suporte para a cicatrização das lesões e a ausência de infecções devido à presença, neste gel, de plaquetas e os fatores de crescimento e leucócitos.

Lind (1998) em um estudo *in vitro* e *in vivo* onde utilizou vários fatores de crescimento (PDGF, IGF-I, TGF- β) em osteotomias e na fixação de implantes ortopédicos, concluiu que a associação de implantes com fatores de crescimento é promissora especialmente na melhoria da cicatrização óssea.

Marx et al. (1998) fizeram uma pesquisa *in vivo* com plasma rico em plaquetas. Oitenta e oito enxertos ósseos autógenos foram realizados para reconstruir áreas mandibulares que foram tomadas por tumores malignos com 5cm ou mais. Todos os enxertos foram removidos do osso ilíaco. Para a obtenção do PRP, os autores utilizaram um equipamento que faz a separação celular pela diferença do gradiente de densidade da (Eletro Medics 500 gradient density cell separator Medtronic). O plasma rico em plaquetas era obtido após a remoção de 450ml de sangue do paciente; para não ocorrer a coagulação, foi utilizado, para cada 5ml de sangue, 1ml de citrato-fosfato-dextrodeste. Do volume total de sangue, se obtinha, após a centrifugação, 200ml de plasma pobre em plaquetas (PPP), 70ml de plasma rico em plaquetas (PRP) e 180ml restantes com hematócrito. Foram utilizados 6ml de PRP misturados com 1ml de solução de trombina bovina/ CaCl_2 e 1ml de ar mesclado ao enxerto ósseo. Os casos foram divididos em dois grupos: um recebeu o enxerto ósseo adicionado de PRP, enquanto que o outro recebeu somente o enxerto ósseo autógeno. Após seis meses, a ação do PRP foi avaliada, sendo que o crescimento ósseo encontrado nas áreas preenchidas com PRP era superior ao das áreas-controle. Os autores observaram que o PDGF e o TGF não são os únicos fatores de crescimento presentes no PRP capazes de influenciar a regeneração óssea.

Um protocolo de obtenção do plasma rico em plaquetas foi proposto por Anitua em 1999, que utilizou uma centrífuga laboratorial. Vinte pacientes foram

submetidos a exodontias para futura instalação de implantes dentários e concluiu-se que o uso do plasma rico em plaquetas promove mais rapidamente uma regeneração óssea e de tecidos moles, sem o risco de transmissão de doenças, por ser um produto autógeno. Em 2001, Rossi, Leme e Píspico apresentaram o primeiro protocolo brasileiro para a obtenção do plasma rico em plaquetas, utilizando, como importante diferencial, um segundo ciclo de centrifugação, com o qual se consegue uma concentração maior de plaquetas se comparado com o protocolo que preconiza uma única centrifugação.

Lynch et al. (1999), acrescentaram que a tecnologia do PRP utiliza princípios da engenharia tecidual e que na técnica original, podemos introduzir modificações para o tratamento de lesões periimplantares, reduzindo-se a quantidade total de volume de sangue obtido do paciente.

Venturelli (1999) fez um trabalho clínico com a instalação de implantes 3i Osseotite, em quatro pacientes, em alvéolos com defeito periodontais de três paredes, deixando de seis a nove espiras expostas. Estas espiras foram cobertas com PRP/osso autógeno, PRP/osso bovino, membrana/osso autógeno e membrana/osso bovino. Como resultado histológico, obteve-se que a associação PRP/osso autógeno mostrou uma completa organização aos quatro meses, enquanto que a área com PRP/osso bovino ainda apresentava áreas desorganizadas de osso imaturo com algumas áreas de osso lamelar.

Descrevendo o uso do plasma rico em plaquetas e a ação de seus fatores de crescimento em humanos, Carlson em 2000 mostrou que o efeito do PDGF ocorre quando existe a união deste fator com os receptores das membranas das células. Esta união manda um sinal para as proteínas citoplasmáticas que ativam os genes

para mitoses, causando um incrível aumento do número de células de cicatrização e da angiogênese, dando início ao aparecimento de capilares e da atividade dos macrófagos, com isso, debridando a área da ferida e conseqüentemente estimulando o aparecimento dos outros fatores de crescimento.

Garg, Garganese e Peace (2000) acrescentam que um método promissor para a ativação tecidual após cirurgias orais, está na aplicação de fatores de crescimento diretamente nos locais de cicatrização em forma de membrana, pois estes mediadores biológicos (PDGF, TGF, IGF) exercem uma função crucial na estimulação e regulação do processo de cicatrização.

Landesberg, Roy e Glikman (2000) estudaram duas maneiras diferentes de obtenção do plasma rico em plaquetas, da maneira de geleificar este PRP e dos níveis alcançados de PDGF e TGF β em cada técnica de obtenção. Os dois resultados mostraram a formação do gel em menos de 30 minutos, quando centrifugados a 200g, sendo esta gravidade a mais capaz de concentrar os fatores de crescimento. Quanto à maneira de se conseguir o gel de PRP, foi usado o agente geleificante ITA (Natrex Technology), o que demonstrou que não havia a necessidade da adição de cloreto de cálcio ou trombina bovina, e que os níveis dos fatores de crescimento eram os mesmos nas duas técnicas.

Um trabalho elaborado por Kassolis, Rosen e Reynolds em 2000, na qual foram feitos quinze enxertos ossos em seios maxilares utilizando a combinação de PRP e FDB(Freeze Dried Bone) na proporção de 0,5 cc/2ml PRP. Após 120 a 168 dias 36 implantes foram instalados e a taxa de sucesso foi de 89%. Estudos de histologia demonstraram áreas de formação óssea e nenhuma área com células inflamatórias.

*devia vir
antes do autor
pg. atoz*

Marx e Garg (1998) afirmaram que a bioquímica dos tecidos receptores e dos enxertos é compatível, mas a adição de PRP estimula a consolidação e mineralização do enxerto na metade do tempo, com 15 a 30% de ganho efetivo na densidade óssea.

Estudando casos clínicos em pacientes com lesões periodontais, onde havia grande perda óssea, Obarrio et al. (2000) propuseram o uso de PDGF e TGF-I presentes no plasma rico em plaquetas em associação com DFDB para a regeneração periodontal. Os autores notaram uma considerável diminuição nas sondagens periodontais assim como radiograficamente pode ser observado um acréscimo de osso neoformado por volta de dois meses de pós-operatório.

Já Rosemberg e Torosian em 2000, descreveram um caso clínico no qual utilizaram plasma rico em plaquetas adicionado a osso particulado, e enxertado no seio maxilar. Após quatro meses foram instalados quatro implantes e carregados imediatamente com uma prótese provisória, a qual após seis meses, foi trocada por uma prótese definitiva. Com este estudo, os autores demonstraram a possibilidade da otimização do tempo em relação aos processos convencionais de espera após a enxertia óssea.

Um estudo *in vitro*, executado por Stephan em 2000, avaliou a interação da matriz de colágeno bovino com PDGF-b em uma cultura de osteoblastos oriundos de calvária de ratos recém-nascidos. Foi mostrado que esta associação promove a estimulação e proliferação de células osteoblásticas, sendo esta, uma potencial combinação para uso clínico.

Stefani et al. (2000) em um estudo em oito cães, avaliaram por análise histomorfométrica, o processo de cicatrização de ferida do osso ao redor de implantes colocados em alvéolos de pré-molares com e sem a aplicação concomitante de PDGF e IFG-I. Após a análise dos resultados, pôde-se comprovar que os fatores de crescimento tiveram parte importante e ativa na fase inicial do reparo ósseo.

Uma outra técnica de obtenção de plasma rico em plaquetas para o uso em enxertos intra-orais foi descrita por Sonnleitner, Huemes e Sullivan (2000), demonstraram também a necessidade de se colher até 6mm da porção superior do hematócrito, pois, segundo o autor, nesta região estão as plaquetas maiores e recém sintetizadas.

Cohen e Eaglstein (2001) seguindo a mesma linha de Knighton et al. (1986) estudaram a ação do PDGF em sete voluntários que se submeteram a confecção de duas lesões em cada braço. Quarenta lesões foram tratadas com PDGF contra 14 tratadas com antibioticoterapia. As lesões tratadas com gel de PDGF mostraram uma significativa rapidez na cicatrização nas primeiras seis semanas, porém o exame mais significativo foi no décimo dia no qual 82% das lesões tratadas com gel de PDGF estavam curadas, contra 28% das lesões tratadas com antibioticoterapia.

Marx (2001) concluiu que o PRP pode ser aplicado em camadas junto com o enxerto ósseo, aplicado na forma de "spray" sobre o enxerto e nos tecidos moles, e ainda como uma membrana biológica. Em aproximadamente 10 minutos, 70% dos fatores de crescimento são liberados e alcançam 100% da liberação em uma hora, e ainda existe uma liberação adicional de fatores de crescimento adicional por mais oito dias.

Também em 2001, Petrunaro afirmou que, por ser um produto que fornece vários fatores de crescimento, o plasma rico em plaquetas deve ser utilizado em Odontologia nas cirurgias de instalação de implantes, em Periodontia, nas cirurgias ósseas e estéticas e principalmente em Implantodontia, em suas várias técnicas reconstrutivas dos maxilares.

Um trabalho foi feito por Shanaman, Filstein e Danesh-Meyer (2001), para avaliar o potencial osteogênico do plasma rico plaquetas em adição de enxertos alógenos nos defeitos alveolares verticais e horizontais antes da instalação de implantes. Os resultados histológicos demonstraram a presença de material de enxerto mesclado a osso neoformado. A adição de plasma rico em plaquetas pareceu aumentar a qualidade e quantidade do osso neoformado, se comparado com o processo de regeneração óssea guiada.

Weilbrich et al. (2001) em um estudo comparativo entre dois métodos diferentes de obtenção de plasma rico em plaquetas, com o objetivo de comparar a quantidade de plaquetas obtidas em relação ao sexo e idade, notaram não haver significativa diferença no valor obtido no número de plaquetas em relação à idade e sexo.

Em três casos clínicos realizados por Froum, Wallace e Tarnow (2002), foram efetuados três casos de levantamento da membrana do seio maxilar, utilizando a associação de osso liofilizado bovino mais plasma rico em plaquetas. Em análise histomorfométrica o autor conclui que não houve diferença significativa nem na produção óssea, nem na quantidade óssea ao redor dos implantes.

Kim et al. (2002) instalaram, em cães, 30 implantes dentários com 10mm de comprimento por 4mm de diâmetro. (SooMin Synthesis Dental Materials Co, Busan,

Korea). Os implantes foram inseridos na parte central de defeitos ósseos confeccionados e preenchidos com três diferentes materiais, sendo um com coágulo, outro com DFDB e outro com DFDB/PRP. Os resultados mostraram que em todos os casos houve regeneração óssea, porém através da histomorfometria após seis e doze semanas as áreas tratadas com DFDB/PRP apresentaram maior contato osso/implante em relação ao DFBD sozinho.

Lekovic et al. (2002) avaliaram duas técnicas diferentes para tratamento de com periodontite avançada e de defeitos com perda óssea interproximal. Foi utilizado plasma rico em plaquetas com adição de osso bovino poroso mineralizado mais regeneração óssea guiada e outra associação de plasma rico em plaquetas e osso bovino poroso mineralizado somente. Após um período de seis meses foram abertos os casos e foi constatado pelos autores, crescimento ósseo com preenchimento dos defeitos com o uso de ambas as associações.

Petrungaro (2002) propôs o uso do plasma rico em plaquetas na forma líquida para banhar a superfície do implante antes de sua instalação e recobrir com plasma pobre em plaquetas em forma de gel, como se fosse uma membrana ou um cimento natural nas áreas operadas. Em outro estudo, três casos clínicos em que se tratavam recessões gengivais, sendo dois com plasma rico em plaquetas e enxerto de tecido conjuntivo, e um caso com membrana de colágeno. O autor observou diminuição do sangramento, diminuição da dor e como importante estabilizador inicial do enxerto devido às suas propriedades coesivas além de promover uma rápida revascularização da área e uma potencial diminuição da infecção pós-operatória.

Robiony et al. (2002) em trabalho onde utilizaram osso autógeno oriundo da crista ilíaca em adição ao plasma rico em plaquetas para ser interposto no espaço deixado pelos fragmentos ósseos na técnica de distração osteogênica. Essa associação era ~~era~~ Após 15 dias de espera a distração osteogênica seguia na proporção de 0.5 mm/dia por um período de 60 dias. Passado este período, o aparelho era removido e feita a instalação de implantes dentários. Segundo os autores, em todos os casos pôde ser observado um aumento considerável da regeneração óssea.

Em sua revisão, Tischler em 2002, demonstrou que a maturação dos enxertos ósseos em humanos com o uso do plasma rico em plaquetas é da ordem de 2,16 mais rápido e causa um aumento considerável na densidade óssea do enxerto, principalmente em idosos, afirmando que estes possuem um número menor de células mesenquimais indiferenciadas e, portanto, teriam melhor benefício com os vários fatores de crescimento presentes no plasma rico em plaquetas.

Yi, Yang e Know (2002) fizeram um trabalho de instalação de implantes em tíbias de coelhos utilizando no grupo-teste o gel de plasma rico em plaquetas concomitantemente com a instalação dos implantes; em relação ao grupo que não utilizou o gel de plasma rico em plaquetas. Após oito semanas, os autores concluíram que o grupo que utilizou o plasma rico em plaquetas apresentou maior contato entre o novo osso e o implante. Notaram também que houve uma reparação inicial mais rápida e melhora na estabilidade secundária em osso de pobre qualidade.

MATERIAIS E MÉTODO

Materiais

Escolha dos animais

Neste trabalho utilizamos cinco cães sem raça definida, sendo um animal para cada tempo, sem predileção por sexo, idade e de pesos variados, com a finalidade de obter resultados para as várias situações clínicas possíveis, já que em nossa clínica diária operamos pacientes de ambos os sexos e idades diferentes. Pela análise veterinária, todos os cães eram adultos jovens e pesavam em média 15kg. Todos animais após passarem por quarentena necessária foram devidamente examinados e considerados aptos no aspecto de saúde, para o desenvolvimento deste trabalho.

Materiais para obtenção do plasma rico em plaquetas

Centrifuga Fanem Excelsa II mod. 206BL

Estante

Tubos de Vacutainer® de 4,5ml (sistema Vacuum II) com 0,5 ml de citrato de sódio (3,2%) tamponado

Tubos secos siliconizados de 5,0ml

Seringas descartáveis de 10ml e agulhas de 40 x 9

Seringas descartáveis de 20ml e agulhas de 40 x 9

Placas de Petri

Pipeta de 50 μ l e ponteiros descartáveis

Ampolas com cloreto de cálcio a 10%

Materiais cirúrgicos

Motor, contra-ângulos 16:1, fresas cirúrgicas de 2,0mm de diâmetro, fresa piloto e fresa de 3,0mm de diâmetro.

Fresas tipo trefinas com 5,0mm de diâmetro interno

Caixa cirúrgica completa cedida pelo Laboratório de Técnica Cirúrgica da Universidade de Santo Amaro

Fios de sutura mononylon 3,0

Cateter nº 22

Plasti equipo

Lâminas nº 20

Fármacos utilizados

Álcool iodado

Formol a 10 %

Acepran 0,2% (0,1 a 0,2 mg/kg).

Provine (Propofol)

Fluotane (Halotano)

Benzatina 40.000u/kg

Soro fisiológico

Método

OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS

Procedeu-se à coleta de 20ml de sangue dos animais com seringas descartáveis de 20ml, por orientação veterinária, com o intuito de não provocar hemólise (Fig. 1).

Após a coleta, o sangue foi distribuído de forma lenta e homogênea nos quatro tubos de Vacutainer® de 4,5 ml contendo citrato de sódio como anticoagulante (Fig. 2).

Os tubos foram levados à centrifuga e foi utilizado o protocolo de obtenção de plasma rico em plaquetas elaborado pela Disciplina de Periodontia da Universidade de Santo Amaro, descrito a seguir:

Com os tubos em posição, procedeu-se à primeira centrifugação por 10 minutos a uma velocidade de 1100 rpm, o que equivale a 200 g, para a centrifuga usada neste experimento (Fig. 3). Segundo o trabalho de Landesberg, Roy e Glikman em 2000, essa é a gravidade em que se consegue a maior concentração plaquetária.

Em seguida, aspirou-se todo o plasma dos tubos, evitando-se ao máximo a remoção de células do hematócrito (Fig. 4 e 5). Esse plasma foi então distribuído em dois tubos secos siliconizados de maneira lenta e homogênea.

Os dois tubos foram então depositados na centrífuga e procedeu-se à segunda centrifugação, por 15 minutos a uma velocidade de 1100rpm (200g). Com este método de dupla centrifugação conseguimos uma concentração de até 370,2% em relação ao sangue total obtido (JAHN 2002) (Fig. 6).

Os tubos foram divididos em três terços, sendo o terço final do tubo, contendo aproximadamente 1,5 ml, utilizado como plasma rico em plaquetas, e os dois terços superiores foram desprezados (Fig. 7 e 8).

A geleificação do plasma rico em plaquetas deu-se com a utilização de 50µl de cloreto de cálcio a 10% por ml de PRP, e foi observada após 10 minutos em média (JAHN 2002) (Fig. 9 e 10).

Técnica de anestesia geral

Após o período de quarentena necessário para as pesquisas experimentais com animais, todos os procedimentos pré e pós-operatórios, foram realizados por Médicos Veterinários professores da Faculdade de Veterinária da Universidade de Santo Amaro, sendo todos os atos cirúrgicos realizados pelo autor deste trabalho.

Na anestesia geral foi utilizado, por via endovenosa, o Acepram a 2% como pré-anestésico na proporção de 0,1 a 0,2 mg/kg. Por via intramuscular foi aplicado o indutor Propofol na proporção de 3mg/kg. (Fig. 11 e 12).

Os animais foram deitados na posição de decúbito lateral (Fig.12) e devidamente imobilizados para um perfeito acesso cirúrgico. Durante todo o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos sob anestesia inalatória com Halotano administrado conforme a necessidade cirúrgica. Um cateter nº 22 foi

posicionado na veia cefálica do membro anterior para a administração de outros fármacos bem como para a infusão de soro fisiológico com vistas à manutenção da hidratação e volemia durante todo o procedimento operatório (Fig. 12).

CIRURGIA DE ENXERTO COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS

Após a tricotomia da região do terço médio lateral da tíbia e execução da antissepsia, feita com álcool iodado foi instalados os campos operatórios, deixando exposto apenas o local a ser operado (Fig. 13 e 14).

O tecido ósseo foi exposto após cuidadosa incisão da pele (lâmina 22) com aproximadamente 4,0 cm de extensão no sentido próximo-distal (Fig.15), seguida da divulsão do tecido subcutâneo.

Com a exposição óssea (Fig.16), procedeu-se à confecção de duas osteotomias em forma circular, uma proximal e outra distal, com uma distância entre si de 2,0 cm, na região médio-lateral de cada tíbia. Para tanto, foram utilizadas fresas cirúrgicas acopladas em contra-ângulo redutor de 16:1 a uma velocidade de 1500 rpm sob forte irrigação com soro fisiológico. Foram utilizadas em seqüência, uma fresa de 2.0mm de diâmetro até uma profundidade de 10mm e em seguida, uma fresa-piloto para que finalmente a fresa de 3,0 mm de diâmetro desse o término das osteotomias (Fig.17).

As osteotomias proximais foram preenchidas com plasma rico em plaquetas e as distais com coágulo sangüíneo, que foi utilizado como controle (Fig.18).

No espaço entre as osteotomias, foram instalados dispositivos metálicos cirúrgicos para a demarcação das áreas preenchidas facilitando, assim a remoção dos fragmentos ósseos para estudo histológico (Fig. 19).

Procedeu-se às suturas em planos com pontos interrompidos utilizando-se fio de mononylon 3,0 (Fig 20). Os animais foram medicados com Benzatina em uma dose de 40.000 u/kg por três dias.

OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS ÓSSEOS PARA EXAME HISTOLÓGICO:

Decorridos os tempos de sete, 14, 21 e 28 dias, conforme protocolo da A.D.A., os animais foram novamente submetidos à anestesia geral com a utilização do mesmo protocolo descrito anteriormente. Foi realizada, então uma nova cirurgia para a obtenção dos fragmentos ósseos.

Todos os passos cirúrgicos foram repetidos e as áreas pré-determinadas foram removidas com uma fresa trefina de 5,0mm de diâmetro e postas uma solução de formol a 10%. Novamente as incisões foram suturadas e os animais medicados (Figs. 21 a 25).

As peças, então foram preparadas pelo Laboratório de Histologia da Unisa.

TÉCNICA DE PREPARO DAS LÂMINAS

O preparo das lâminas seguiu o protocolo para coloração com hematoxilina e eosina.

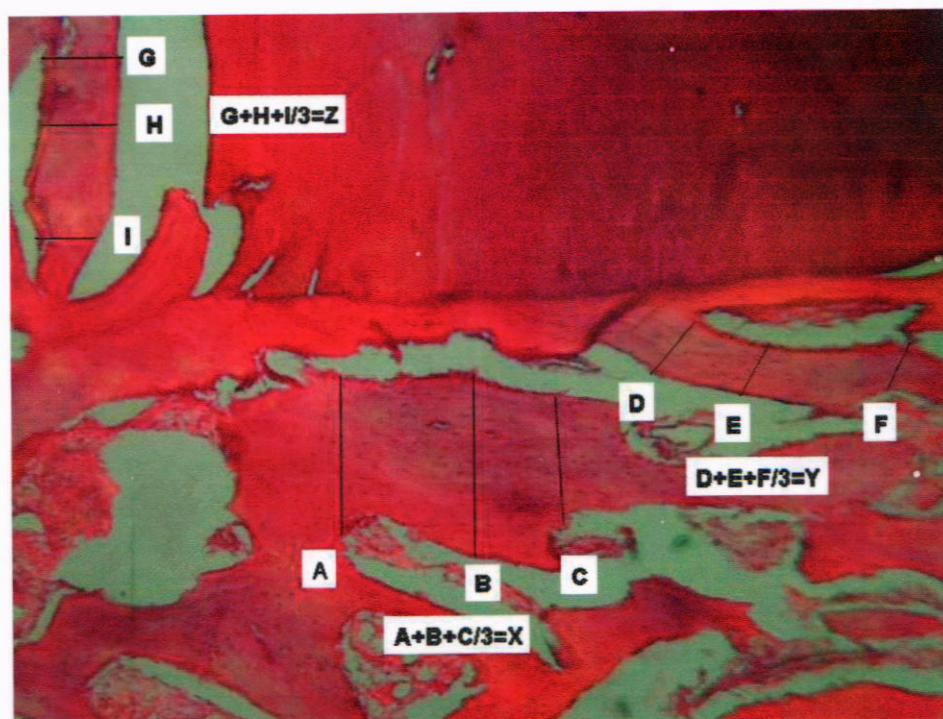
Resultado

HISTOMORFOMETRIA

Os materiais colhidos foram examinados tanto no aspecto histológico como no aspecto histomorfométrico, para a mensuração e comparação da espessura do trabeculado ósseo nas amostras controle como nas amostras com PRP.

Todas as leituras das amostras foram feitas utilizando-se um mesmo aumento da forma descrita a seguir.

Em cada tempo mensuramos três trabéculas diferentes escolhidas de forma aleatória. Em cada trabécula medimos as extremidades e a parte central, somávamos esses três valores e dividíamos novamente por três. Com isso, tínhamos três medidas para cada período estudado. Somávamos estas medidas e dividíamos novamente por três, e então, obtínhamos a média da espessura das trabéculas em cada tempo.



TÉCNICA CIRÚRGICA



Fig.1: Coletando o sangue da veia jugular, com seringa de 20ml.

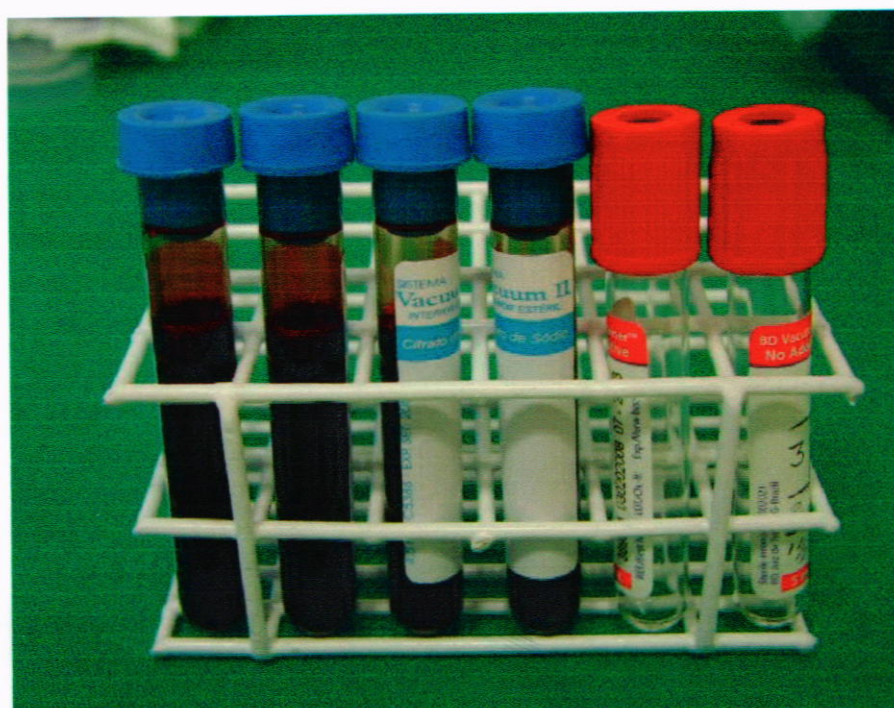


Fig. 2: Sangue coletado nos tubos de Vacutainer de 4,5ml com citrato de sódio a 3,2%.

CENTRÍFUGA



Fig. 3: 1ª centrifugação a 200g (1100rpm) durante 10 minutos.

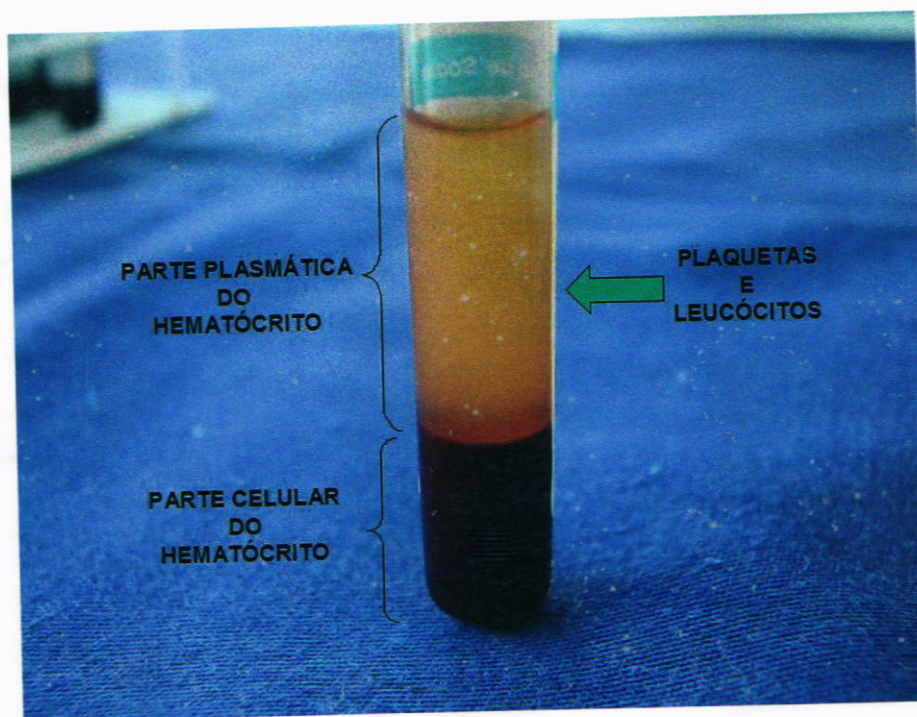


Fig. 4: Separação da porção celular (hemácias) da porção plasmática (plaquetas e leucócitos).

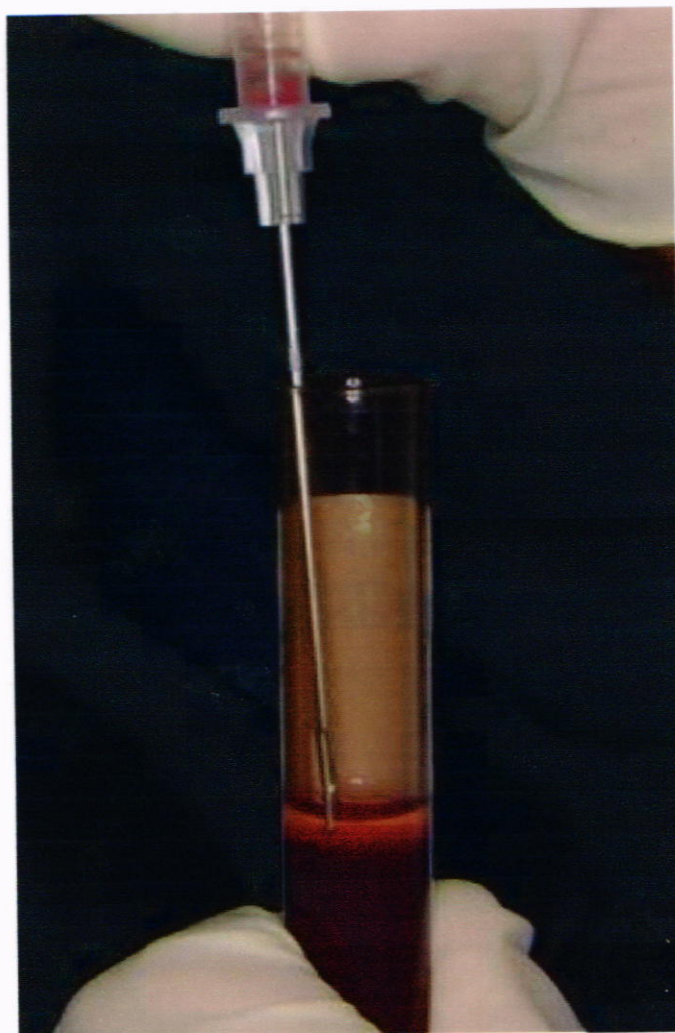


Fig. 5: Aspiração da porção plasmática.



Fig. 6: 2ª centrifugação a 200g (1100rpm) durante 15 minutos.

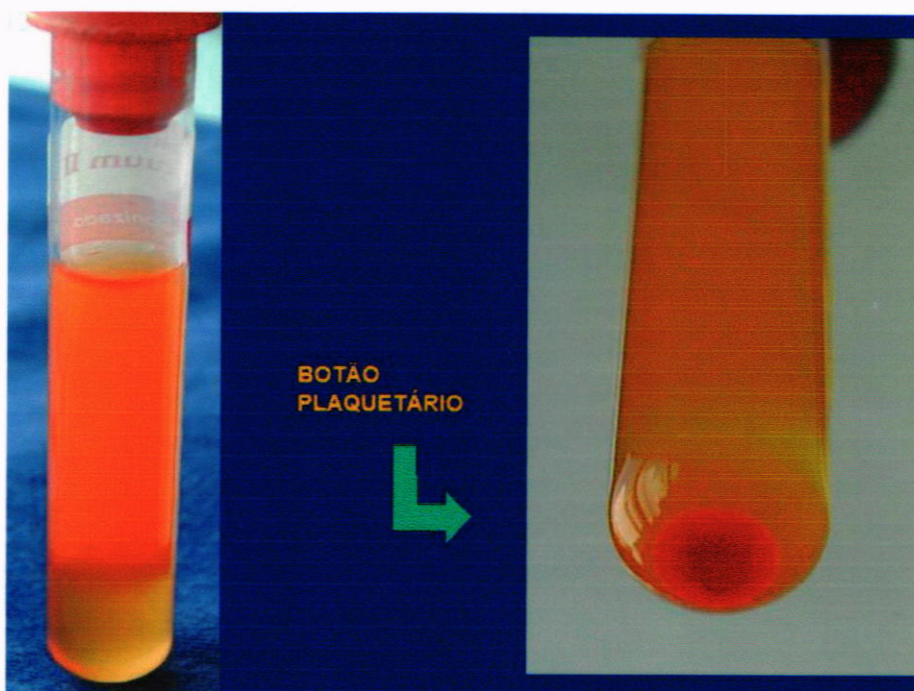


Fig. 7: Tubo após a segunda centrifugação, mostrando o botão plaquetário.

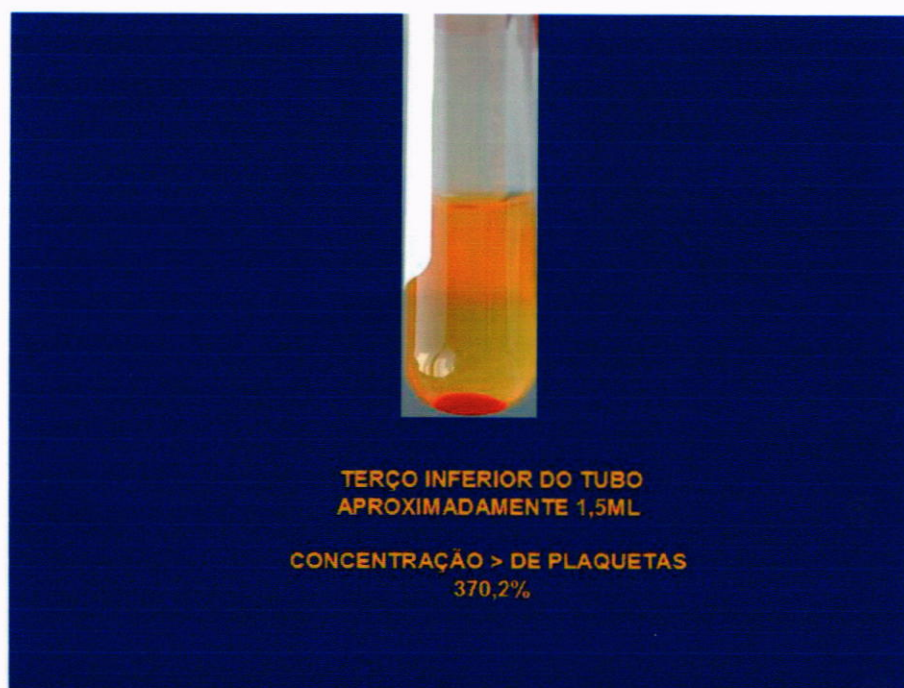


Fig. 8: Terço final do tubo contendo o plasma rico em plaquetas.

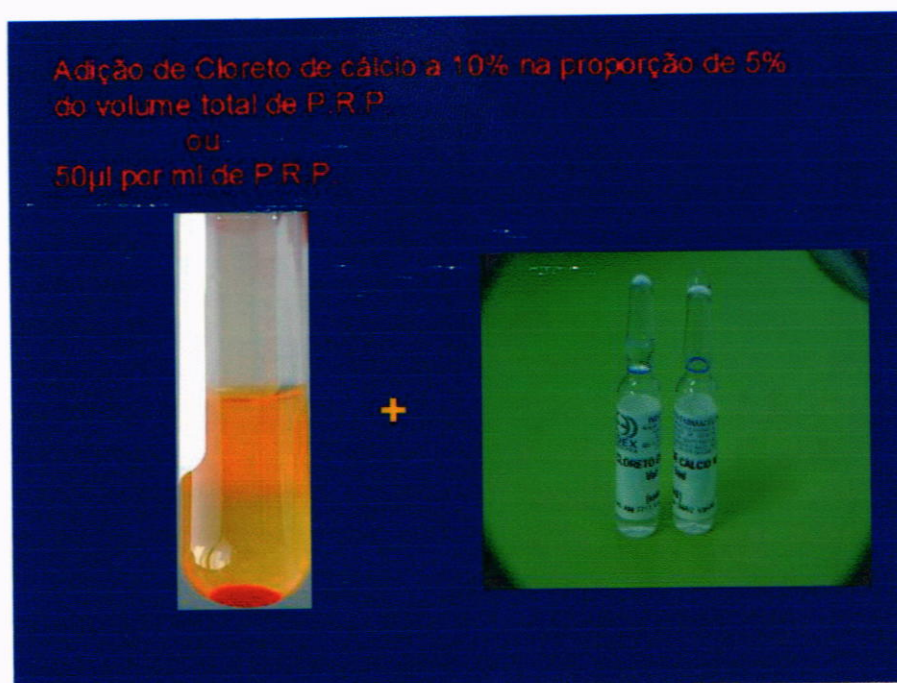


Fig.9: Adição de cloreto de cálcio a 10% na proporção de 50µl/ml de PRP.

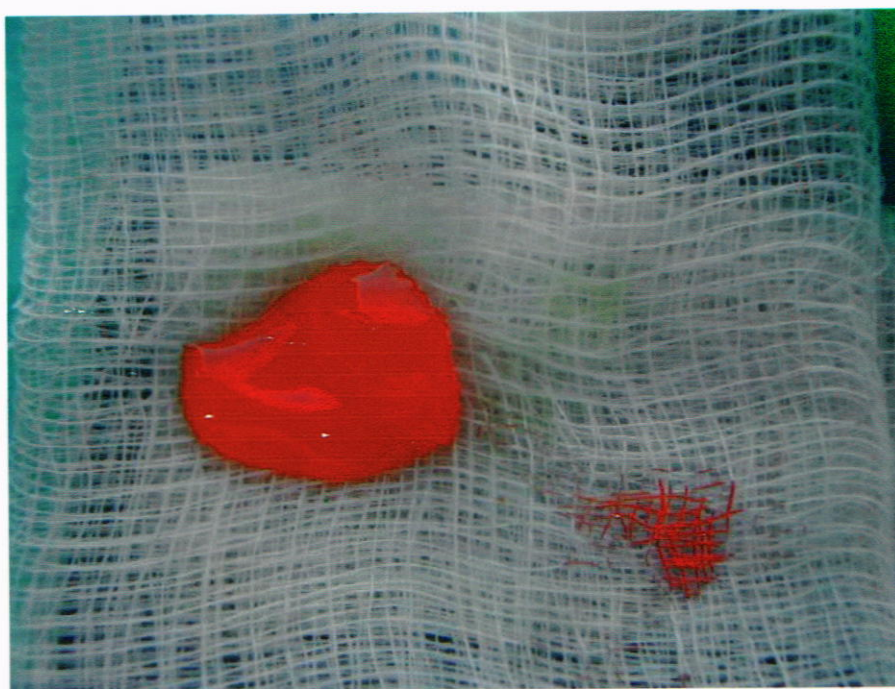


Fig. 10: Gel de PRP formado aproximadamente após 10 min.



Fig. 11: Indução anestésica.



Fig. 12: Manutenção da anestesia por ventilação do Halotano.

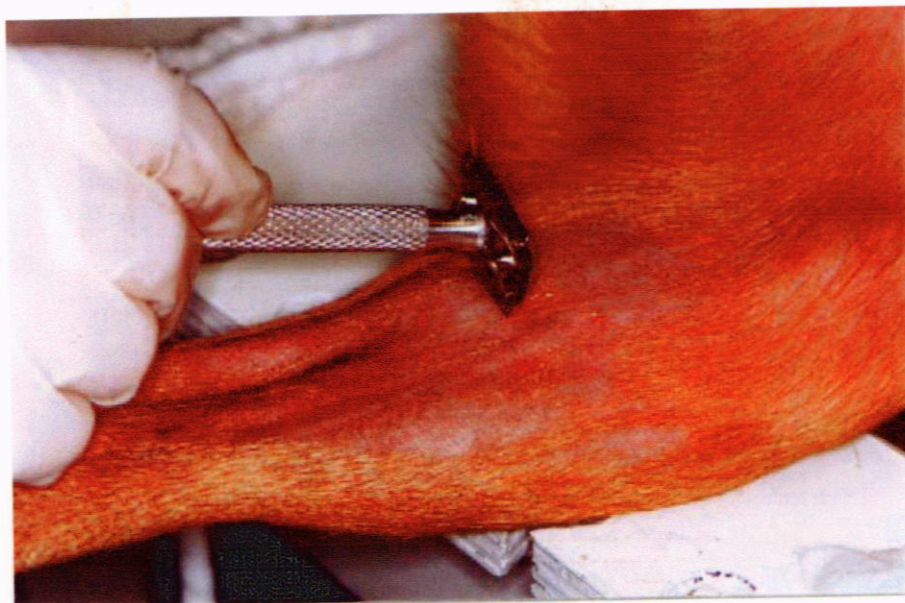


Fig. 13: Tricotomia da área a ser operada.



Fig. 14: Antissepsia com álcool iodado.

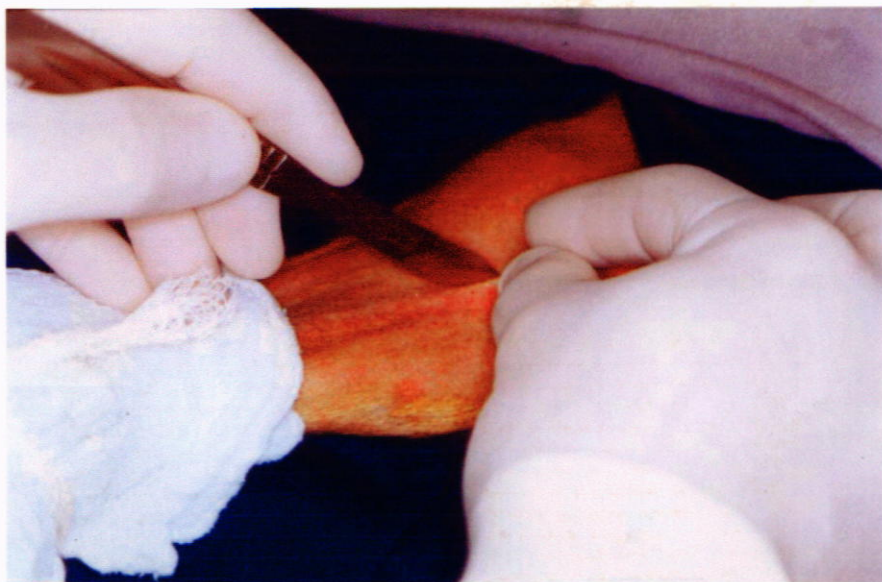


Fig. 15: Incisão da pele.

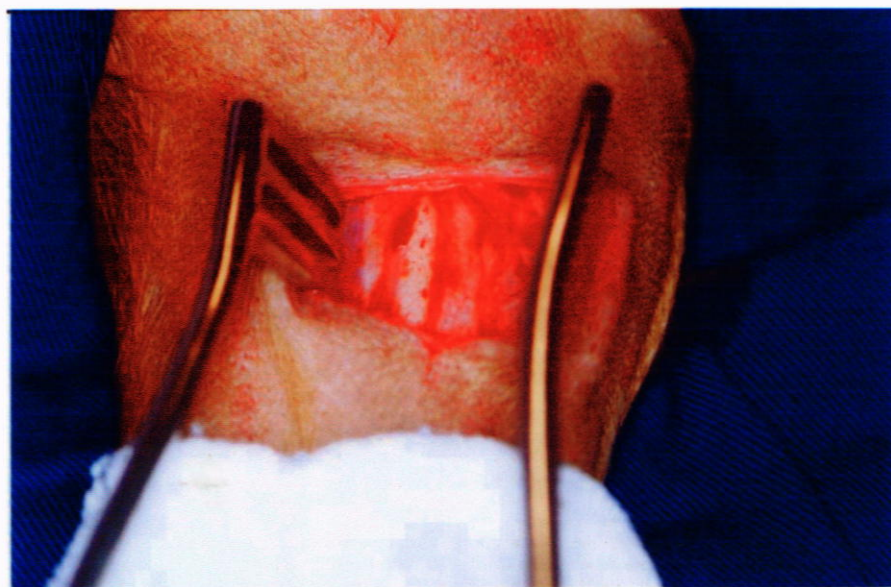


Fig. 16: Exposição do osso.

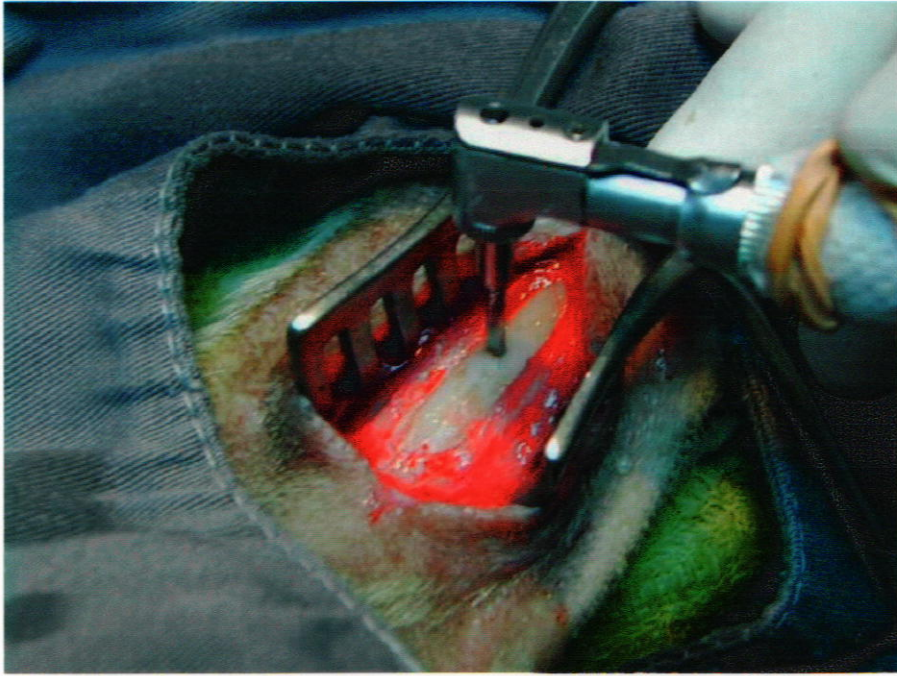


Fig. 17: Início da osteotomia sob forte irrigação com soro fisiológico.

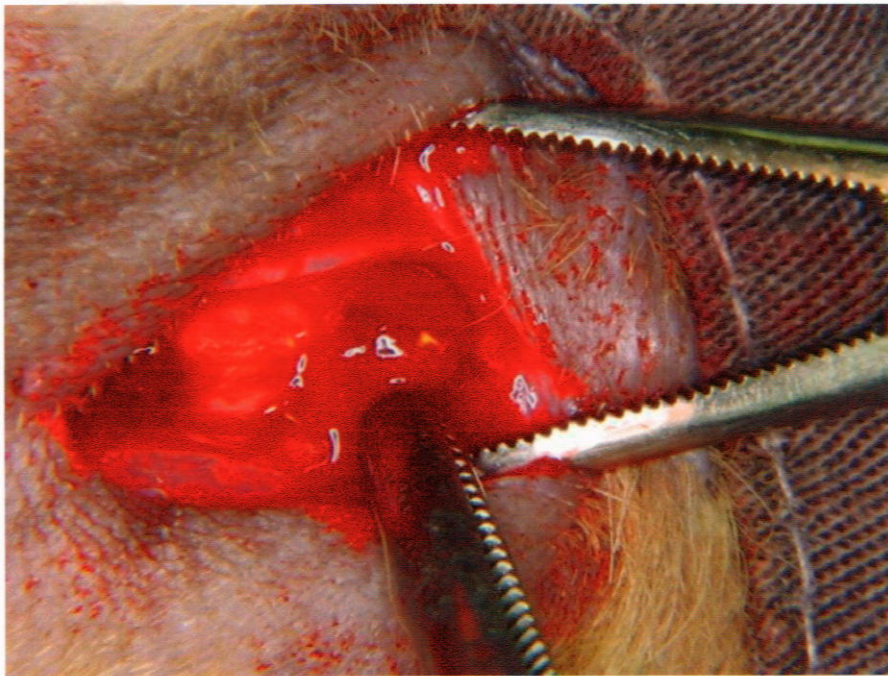


Fig.18: Enxerto com PRP na osteotomia proximal do terço médio da tibia.

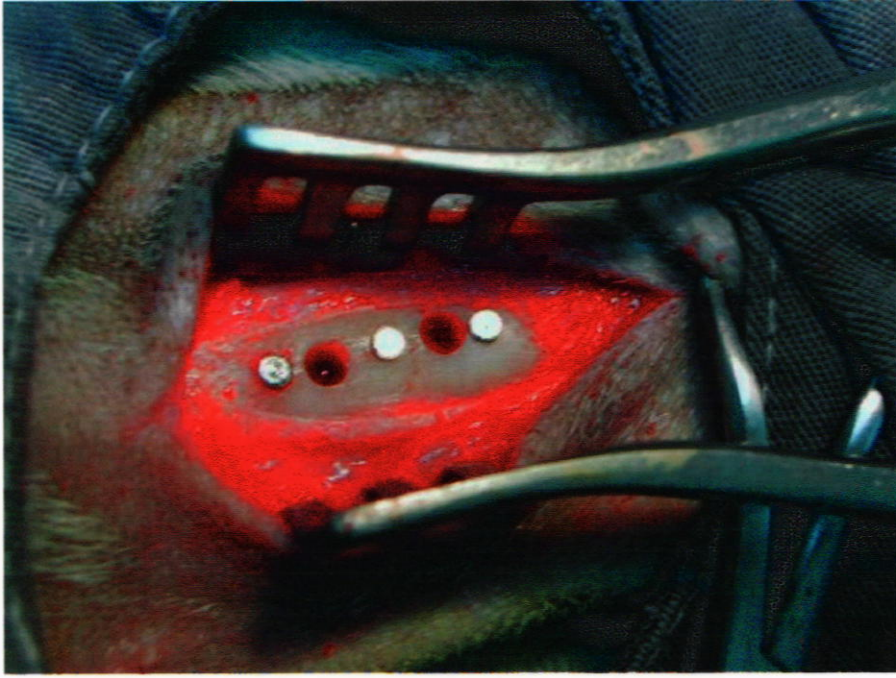


Fig.19: Dispositivos metálicos instalados.



Fig. 20: Sutura com fio mononylon 3,0.

CIRURGIA PARA OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE TECIDO ÓSSEO.

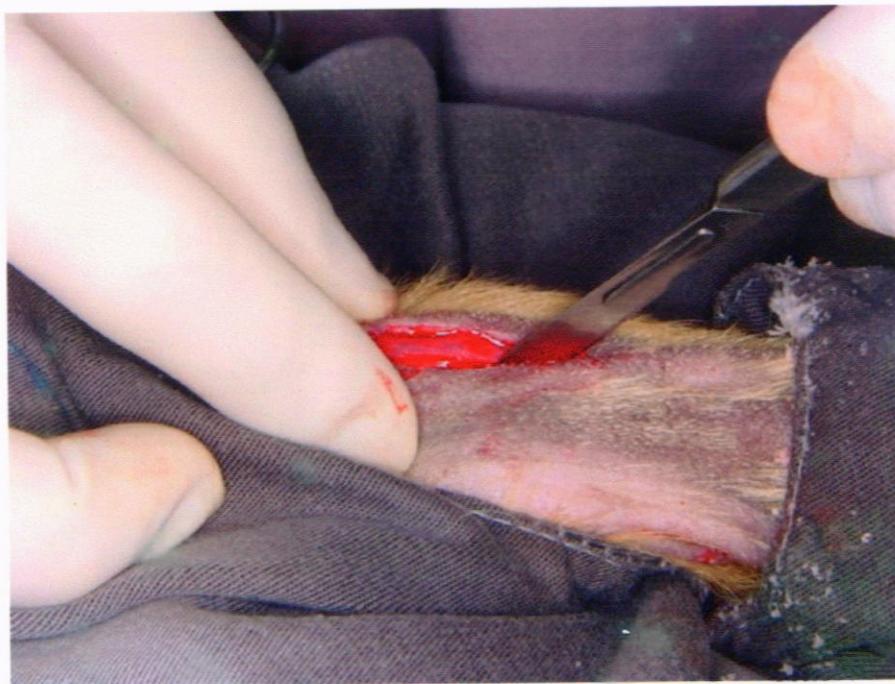


Fig. 21: Nova intervenção cirúrgica para obtenção de amostras ósseas.

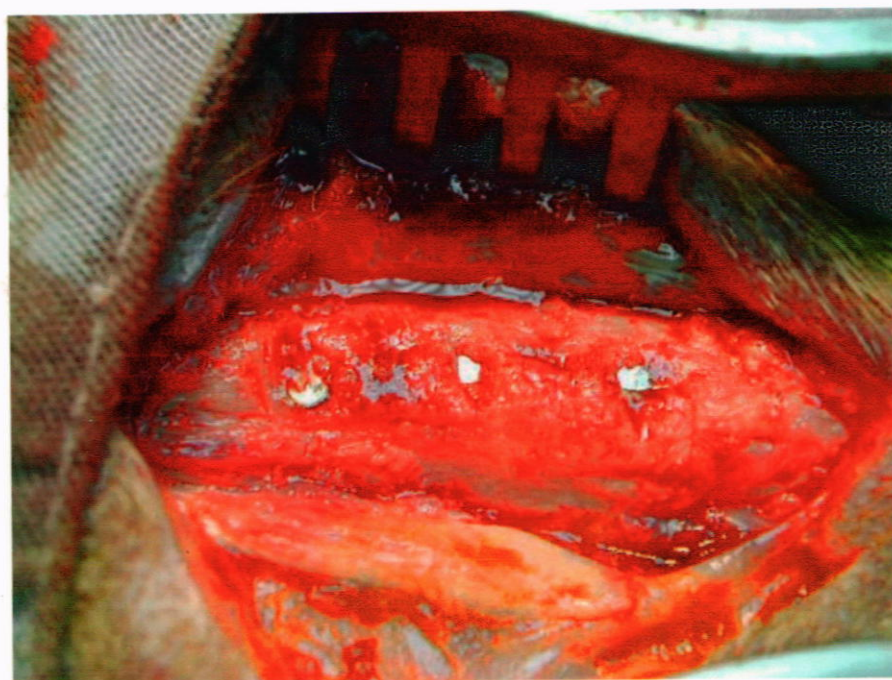


Fig. 22: Demarcação das áreas a serem removidas.

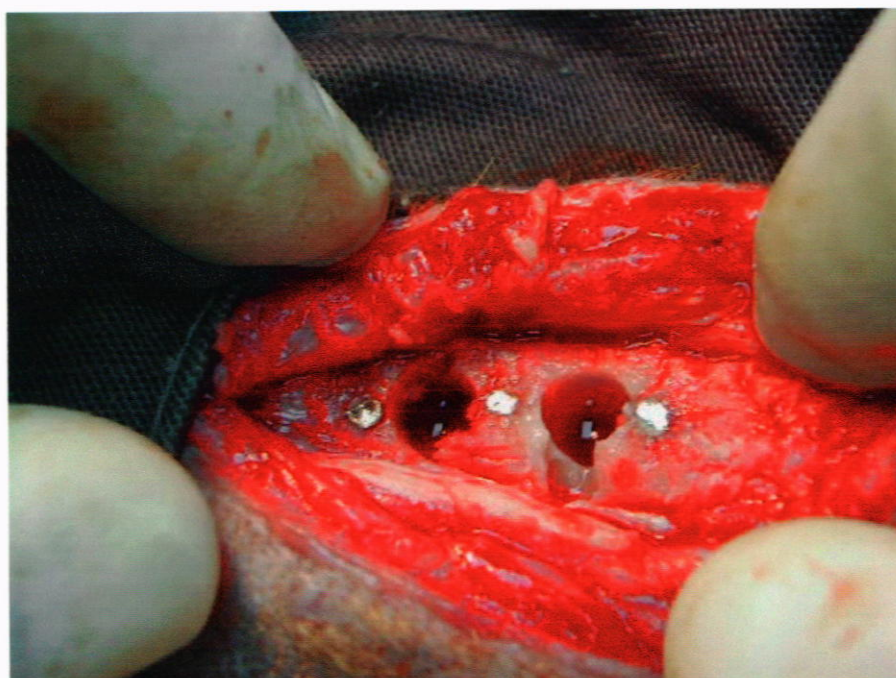


Fig. 23: Obtenção da amostra de tecido ósseo.

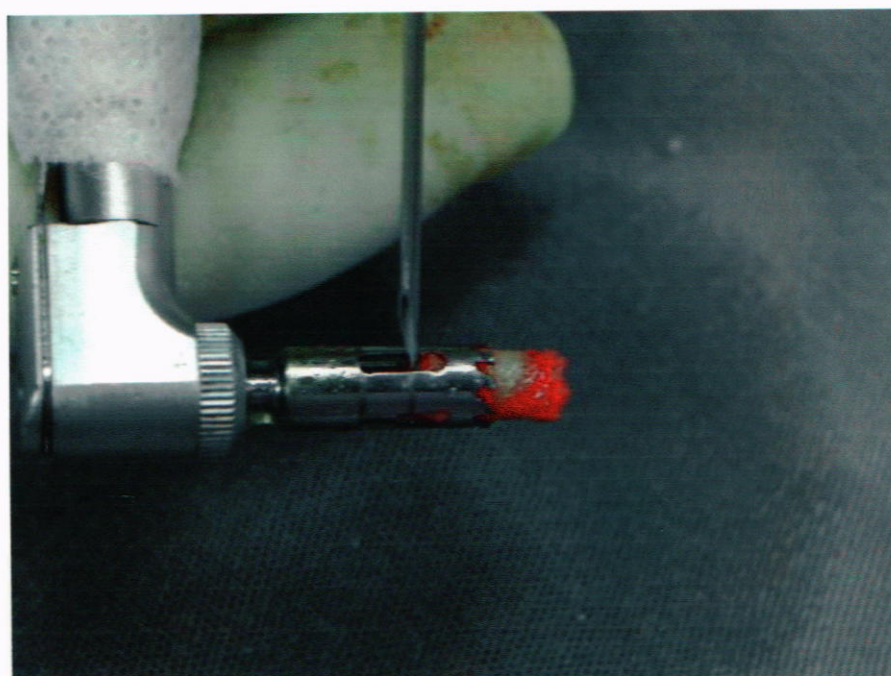


Fig. 24: Fragmento ósseo colhido com fresa trefina com 5,0mm de diâmetro externo.



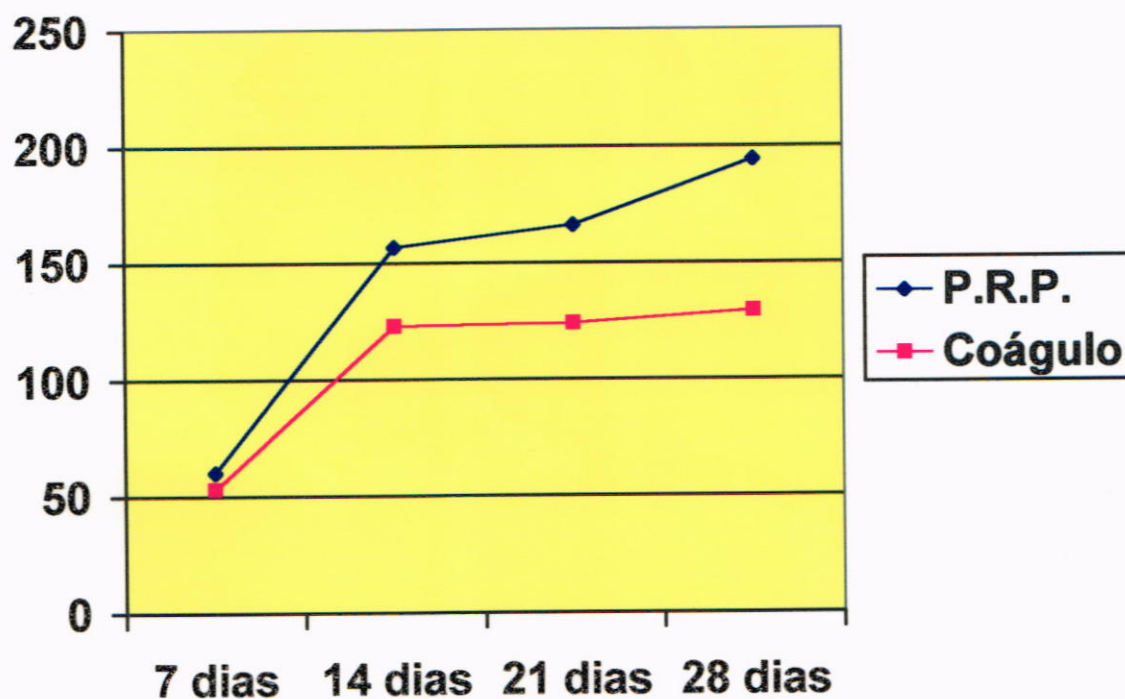
Fig. 25: Sutura final.

RESULTADOS

Os resultados foram obtidos após exame das amostras nos tempos de sete, 14, 21 e 28 dias. As amostras referentes aos casos tratados com plasma rico em plaquetas foram comparados com as amostras controle nos tempos pré-determinados.

As amostras foram avaliadas histologicamente para a descrição das características em cada tempo estudado. Para a complementação do estudo foi realizada a histomorfometria das amostras, na qual foram medidas as espessuras das trabéculas ósseas, em um mesmo plano e com o mesmo aumento, em todos os tempos estudados.

μm



Análise do gráfico

Como se evidencia no gráfico na página anterior, o crescimento ósseo na área preenchida com coágulo sangüíneo demonstra que a formação óssea se dá de maneira crescente e homogênea. No período entre sete e 14 dias, notamos maior nível de crescimento ósseo. Nos tempos de 14, 21 e 28 dias o crescimento se mostra constante, porém é nítido que a regeneração óssea apresenta aumento do trabeculado com menor intensidade.

Já na área preenchida com plasma rico em plaquetas notamos, desde o primeiro tempo estudado, presença de um trabeculado mais espesso, nos tempos seguintes o crescimento ósseo continua constante, porém a partir do 21º dia notamos uma intensificação na deposição óssea aumentando consideravelmente em relação ao tempo-controle.

Esse achado vem a concordar com Marx (1998), que declarou que os enxertos ósseos com plasma rico em plaquetas aumentam em até 30% a densidade do trabeculado ósseo neoformado e, com isso, aumenta a quantidade e a qualidade da área regenerada.

Tabela demonstrando os resultados da mensuração da espessura do trabeculado ósseo nos tempos de sete, 14, 21 e 28 dias em um mesmo plano e no aumento de 150x.

	07 dias	14 dias	21 dias	28 dias
P.R.P.	60µm	154,6µm	166µm	194,8µm
Coágulo	53,2µm	123,06µm	124µm	129,4µm

Para a obtenção destes valores, medimos a espessura do trabeculado ósseo em três trabéculas por tempo. Cada trabécula foi medida em três áreas, extremidades e meio.

07 dias PRP

$$T1=52+55+50=157/3=52,3$$

$$T2=55+55+60=170/3=56,6$$

$$T3=70+78+65=213/3=71$$

Média das trabéculas:

$$52,3+56,6+71=179,9/3=60\mu\text{m}$$

14 dias PRP

$$T1=200+190+175=565/3=188,3$$

$$T2=140+135+125=400/3=133,3$$

$$T3=153+158+116=427/3=142,3$$

Media das trabéculas:

$$188,3+133,3+142,3=463,93/3=154,6\mu\text{m}$$

21 dias PRP

$$T1=200+180+184=564/3=188$$

$$T2=195+210+160=565/3=188$$

$$T3=130+125+110=365/3=121,6$$

Média das trabéculas:

$$188+188+121,6=497/3=166\mu\text{m}$$

28 dias PRP

$$T1=155+130+103=390/3=130$$

$$T2=310+265+150=725/3=241,6$$

$$T3=235+175+240=650/3=216,6$$

Média das trabéculas:

$$130+241,6+216,6=588,2/3=194,8\mu\text{m}$$

07 dias coágulo

$$T1=36+53+55=144/3=48$$

$$T2=70+55+45=170/3=56,6$$

$$T3=50+70+45=165/3=55$$

Média das trabéculas:

$$48+56,6+55=159,6/3=53,2\mu\text{m}$$

14 dias coágulo

$$T1=138+145+118=401/3=133,6$$

$$T2=85+115+168=368/3=122,6$$

$$T3=105+122+112=339/3=113$$

Média das trabéculas:

$$133,6+122,6+113=369,2/3=123,06\mu\text{m}$$

21 dias coágulo

$$T1=150+130+135=415/3=138,3$$

$$T2=165+160+159=484/3=161,33$$

$$T3=80+75+68=227/3=74,3$$

Média das trabéculas:

$$138,3+161,3+74,3=373,9/3=124\mu\text{m}$$

28 dias coágulo

$$T1=110+150+150=410/3=136,6$$

$$T2=118+130+110=358/3=119,3$$

$$T3=135+138+124=397/3=132,3$$

Média das trabéculas:

$$136,6+119,3+132,3=388,2/3=129,4\mu\text{m}$$

EXAME DAS AMOSTRAS RELATIVAS AO PERÍODO DE 07 DIAS

Coágulo sangüíneo

Trabéculas ósseas: Observam-se pequenas formações ósseas (trabéculas neoformadas), em várias direções. Esse trabeculado ósseo neoformado possui uma afinidade tênue pelos corantes, apresentando uma coloração rosa clara. Ao redor destas trabéculas ósseas nota-se a presença de osteoblastos que, na sua maioria, apresentam uma coloração roxa, caracterizando um baixo teor de atividade. Nota-se uma cromatina condensada, porém em algumas trabéculas os osteoblastos possuem a cromatina desespiralizada, com isso caracterizando uma intensa atividade metabólica.

Tecido conjuntivo: Apresenta-se como um tecido conjuntivo denso não modelado. A população celular predominante é formada por fibroblastos, células mesenquimais indiferenciadas e osteoblastos jovens.

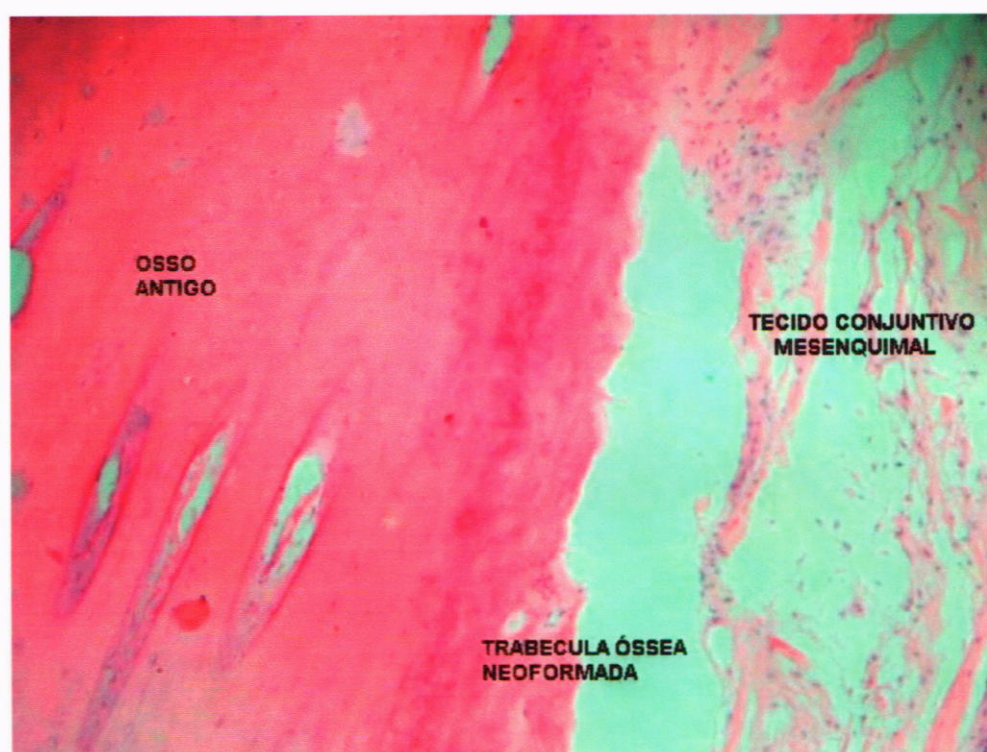


Figura A: Início da formação das trabéculas ósseas com presença de tecido mesenquimal e osteoblastos.

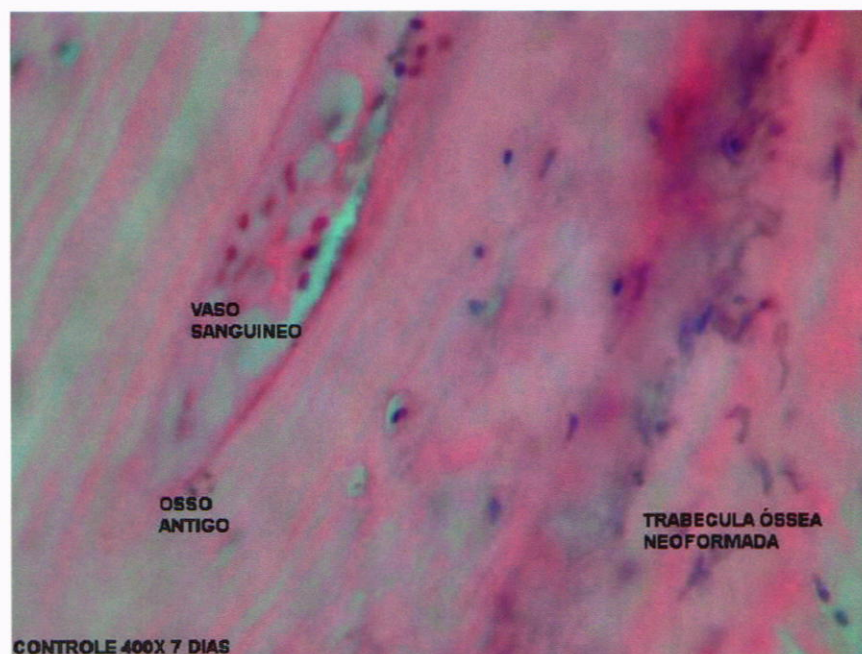


Figura B: Corte histológico da amostra com coágulo no período de sete dias, em um aumento de 400x. Presença de trabeculado ósseo neoformado e inúmeros osteoblastos.

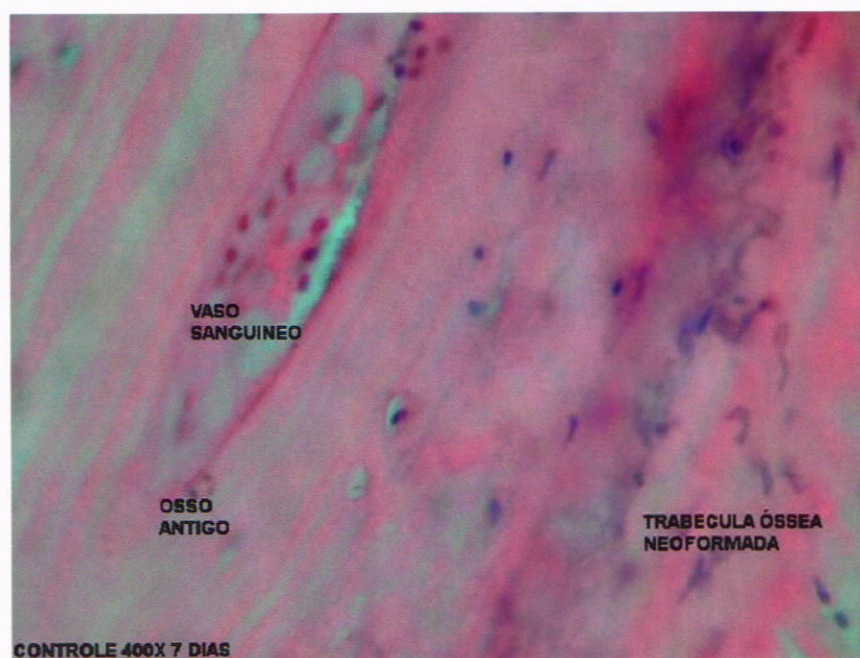


Figura B: Corte histológico da amostra com coágulo no período de sete dias, em um aumento de 400x. Presença de trabeculado ósseo neoformado e inúmeros osteoblastos.

Plasma rico em plaquetas (07 dias)

Trabeculado ósseo: Nesse tempo foi observado um trabeculado ósseo neoformado com coloração acentuado demonstrando um trabeculado ósseo com maior grau de maturidade. Podem-se ver inúmeros osteócitos inclusos no trabeculado e ao redor de todas as trabéculas uma grande população de osteoblastos que apresentam-se com a cromatina frouxa, caracterizando uma alta atividade metabólica.

Tecido conjuntivo: É digno de nota que a presença do tecido conjuntivo denso não modelado dispõe-se de maneira a um agrupamento dos feixes de colágeno, orientados para a formação de novas trabéculas ósseas. Pode ser observada uma grande quantidade de fibroblastos acompanhando este feixe colágeno, assim como muitas células mesenquimais indiferenciadas e alguns osteoblastos jovens.

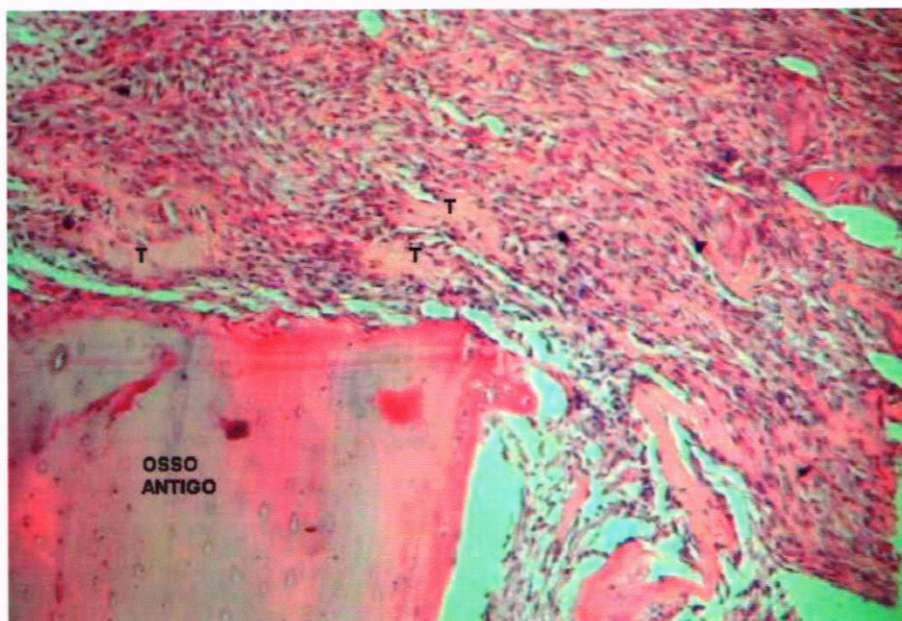


Figura C: Corte da amostra com P.R.P. (plasma rico em plaquetas) no período de sete dias em um aumento de 50x. Observar o aumento do número de osteoblastos em relação ao coágulo e presença de maior formação do trabeculado ósseo.

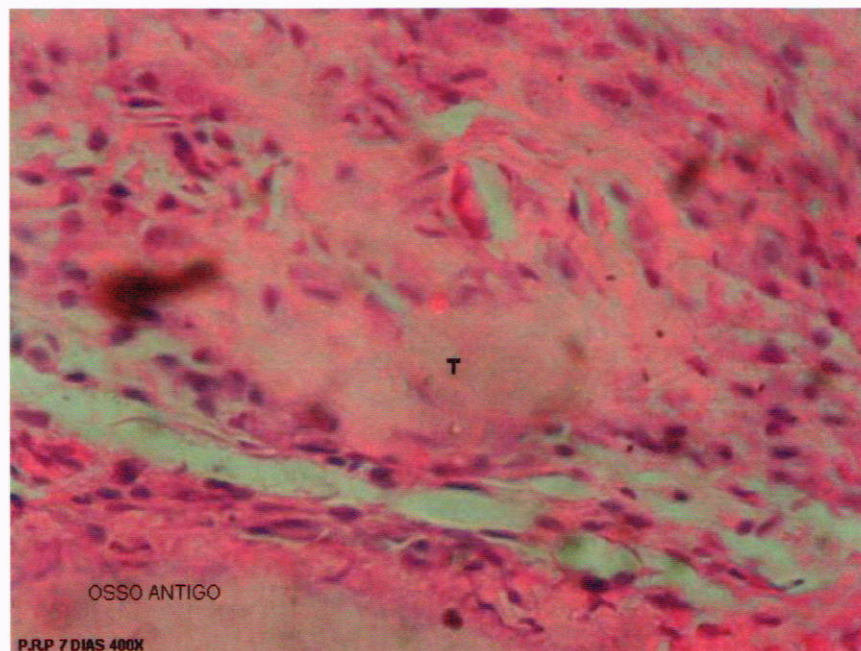
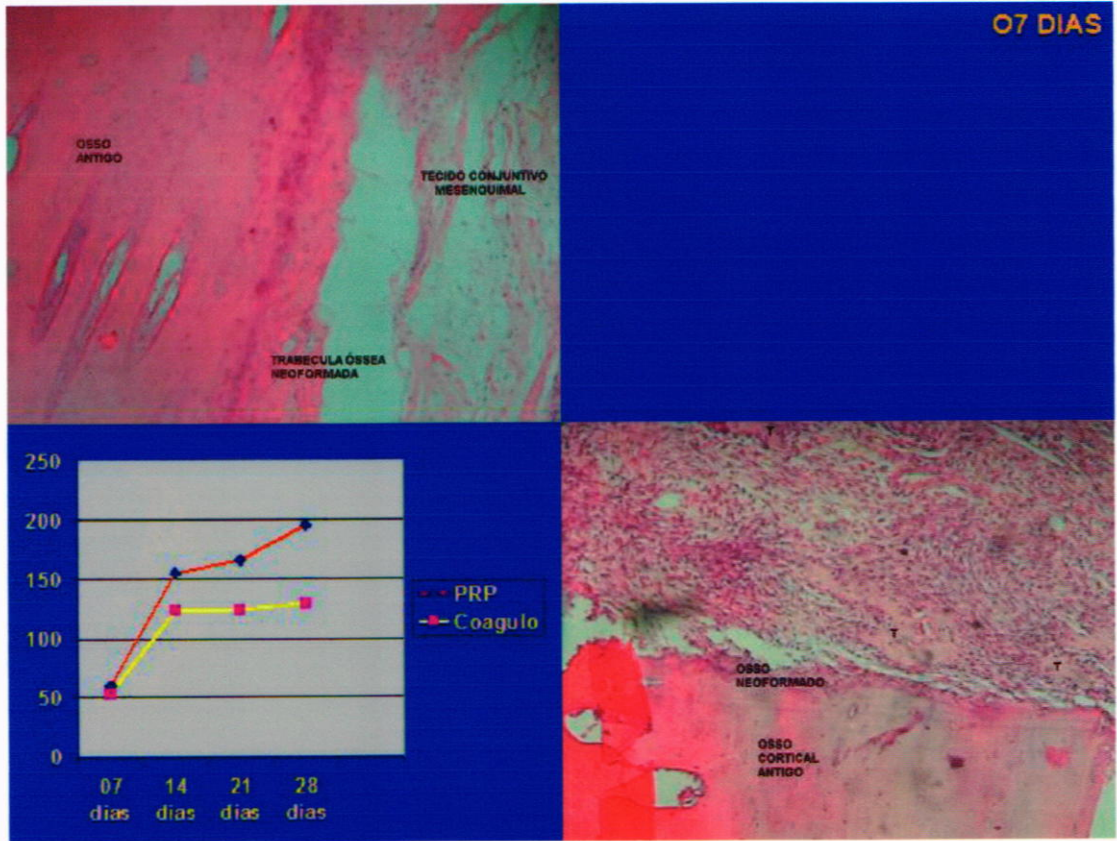


Figura D: Corte da amostra com P.R.P. (plasma rico em plaquetas) no período de sete dias em um aumento de 400x. Notar a qualidade de trabécula neoformada circundada por inúmeros osteoblastos.

Comparação entre os cortes com coágulo e com plasma rico em plaquetas no corte de sete dias e gráfico da histomorfometria.



EXAME DAS AMOSTRAS RELATIVAS NO PERÍODO DE 14 DIAS:

Coágulo sangüíneo:

Trabéculas ósseas: Apresentam-se com tamanhos variados e coloração rosa - clara, possuindo em seu interior uma população de osteócitos distribuídos aleatoriamente. Nas trabéculas ósseas formadas anteriormente é pequena a presença de osteoblastos, porém nas trabéculas recém-formadas podem-se observar osteoblastos jovens aderidos ao trabeculado ósseo e uma população de osteócitos recém-incluídos.

Tecido conjuntivo: O tecido conjuntivo caracteriza-se como um tecido conjuntivo frouxo.



Figura E: Corte histológico da amostra com coágulo no período de 14 dias em um aumento de 100x. Observar o trabeculado ósseo neoformado já em definição, com a presença de osteócitos no interior do trabeculado.



Figura F: Corte histológico da amostra com coágulo no período de 14 dias em um aumento de 400x. Notar a definição do trabeculado neoformado com recém-inclusão dos osteócitos. Notamos também vasos sanguíneos e osteoclastos, caracterizando a remodelação óssea.

Plasma rico em plaquetas (14 dias)

Trabeculado ósseo: Apresenta-se bem corado caracterizando uma trabécula madura e em seu interior, pode ser observado a grande população de osteócitos. É importante notar a grande quantidade de osteoblastos com uma cromatina frouxa mostrando grande atividade metabólica.

Tecido conjuntivo: Apresenta-se frouxo com presença de fibras colágenas em orientação para a formação de novas trabéculas ósseas. Podemos ver, também, grande quantidade de células osteoprogenitoras entremeando as fibras colágenas.



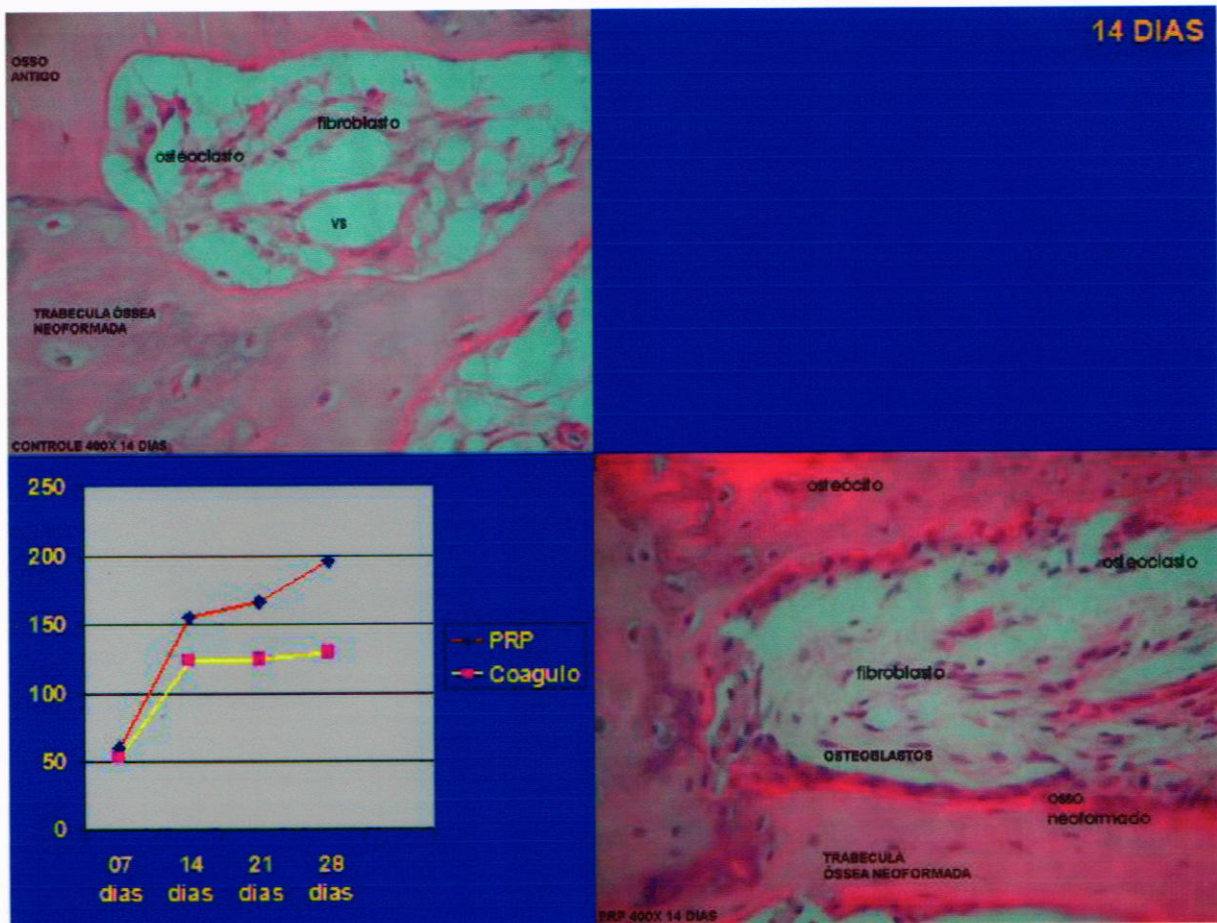
Figura G: Corte histológico da amostra com P.R.P. (plasma rico em plaquetas) no período de 14 dias em um aumento de 50x. Presença de grande trabeculado ósseo neoformado interligado entre si. Observar ainda o grande número de osteoblastos presentes no trabeculado.



Figura H: Corte histológico da amostra com P.R.P. (plasma rico em plaquetas) no período de 14 dias em um aumento de 400x. Figura determinante, pois revela uma diferença considerável em relação ao número de osteoblastos presentes circundando o

trabeculado ósseo, se comparado com o corte no mesmo período sem o P.R.P. Também notamos osteoclastos demonstrando a reabsorção óssea.

Comparação entre os cortes com coágulo e com plasma rico em plaquetas no tempo de 14 dias e gráfico da histomorfometria.



EXAME DAS AMOSTRAS RELATIVAS AO PERÍODO DE 21 DIAS:

Coágulo sangüíneo

Nota-se a presença de um trabeculado ósseo em boa quantidade, com menor quantidade de osteoblastos aderidos às trabéculas ósseas. Podemos notar a presença de osteócitos em seu interior mostrando a maturação do tecido ósseo, porém existe ainda uma grande quantidade de tecido conjuntivo frouxo entre as trabéculas ósseas, mostrando pequena densidade óssea.

Plasma rico em plaquetas

Podemos observar uma grande quantidade de trabéculas ósseas bem interligadas, com densidade óssea final formando um emaranhado com a presença de cavidades que apresentam em seu interior um tecido conjuntivo frouxo com a presença de vasos sangüíneos do tipo capilar demonstrando a boa capacidade de nutrição desta área. Podemos observar também a presença de um tecido medular e suas células mesenquimais indiferenciadas.

Em contato com as trabéculas ósseas, encontramos osteoblastos que se apresentam com a cromatina frouxa e seus citoplasmas com discreta coloração basófila, o que caracteriza uma baixa atividade funcional das células. Podemos notar também, a presença de osteoclastos que neste estágio caracteriza o processo de remodelação óssea.



Figura I: Corte histológico da amostra com coágulo no período de 21 dias, em um aumento de 50x. Notar a presença de trabeculado ósseo já bem definido com linhas de aposição e reabsorção ósseas presentes, porém com grande espaço entre as trabéculas.

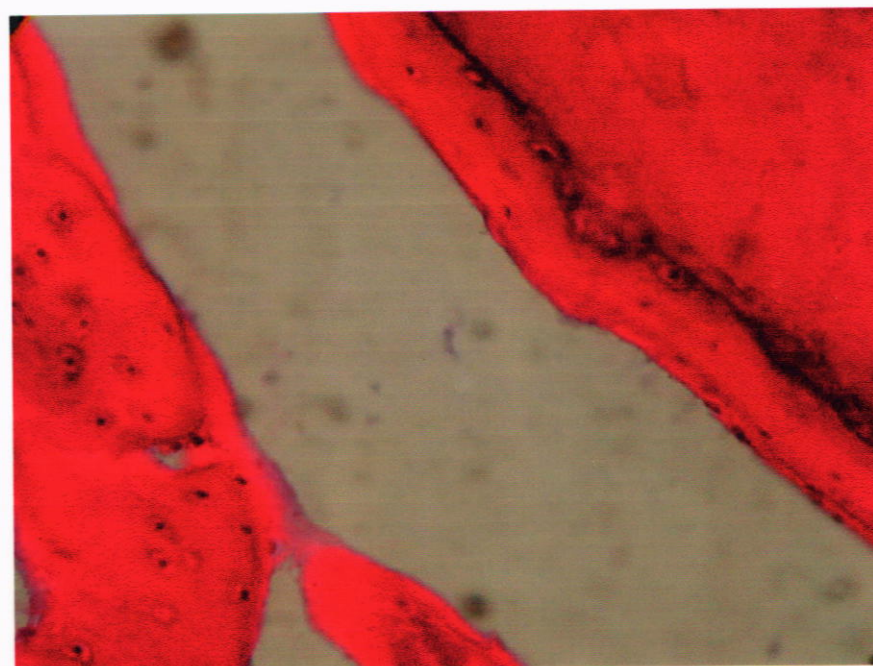


Figura J: Corte histológico da amostra com coágulo no período de 21 dias, em um aumento de 400x. Presença de osteócitos nas trabéculas ósseas, mostrando a mudança para um osso maduro.

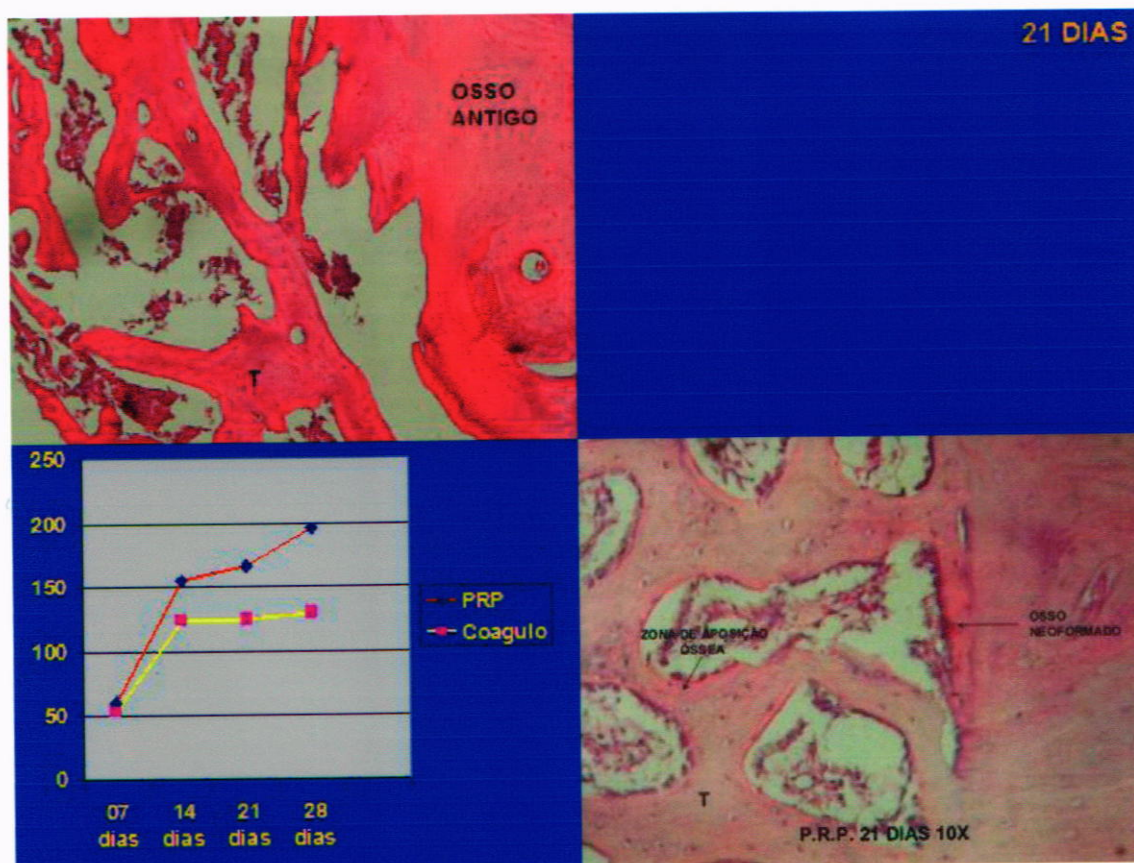


Figura K: Corte histológico da lâmina com P.R.P. (plasma rico em plaquetas) no período de 21 dias em um aumento de 50x. Notar o maior aumento da densidade do trabeculado ósseo em relação ao período similar sem o P.R.P. Presença de inúmeros osteoblastos e osteócitos, bem com vários vasos sanguíneos entre as trabéculas ósseas.



Figura L: Corte histológico da amostra com P.R.P. (plasma rico em plaquetas) no período de 21 dias, em um aumento de 100x. Observar a maturação óssea e vasos sanguíneos para nutrição da área.

Comparação entre os cortes com coágulo e com plasma rico em plaquetas no tempo de 21 dias, e gráfico da histomorfometria.



EXAME DAS AMOSTRAS RELATIVAS AO PERÍODO DE 28 DIAS

Coágulo sangüíneo

Pode-se observar uma boa qualidade do trabeculado ósseo neoformado, porém com grandes áreas entre as trabéculas, demonstrando a pouca densidade óssea. É presente também área de medula óssea com células hematopoiéticas em seu interior.

Plasma rico em plaquetas:

É nítida a diferença entre as lâminas neste tempo. Observa-se enorme quantidade de trabeculado ósseo neoformado, com poucos espaços medulares assim como a interligação das trabéculas ósseas. Podemos visualizar uma grande quantidade de osteócitos no interior do trabeculado ósseo. É digno de nota a presença de sistemas de Havers em formação que, sem sombra de dúvidas, confere uma ótima mineralização assim como a qualidade e densidade do tecido ósseo neoformado.

A medula óssea apresenta-se em maior quantidade, com vários núcleos de células hematopoiéticas em seu interior.



Figura M: Corte histológico da amostra com coágulo no período de 28 dias, em um aumento de 100x. Perceber a total maturação óssea.

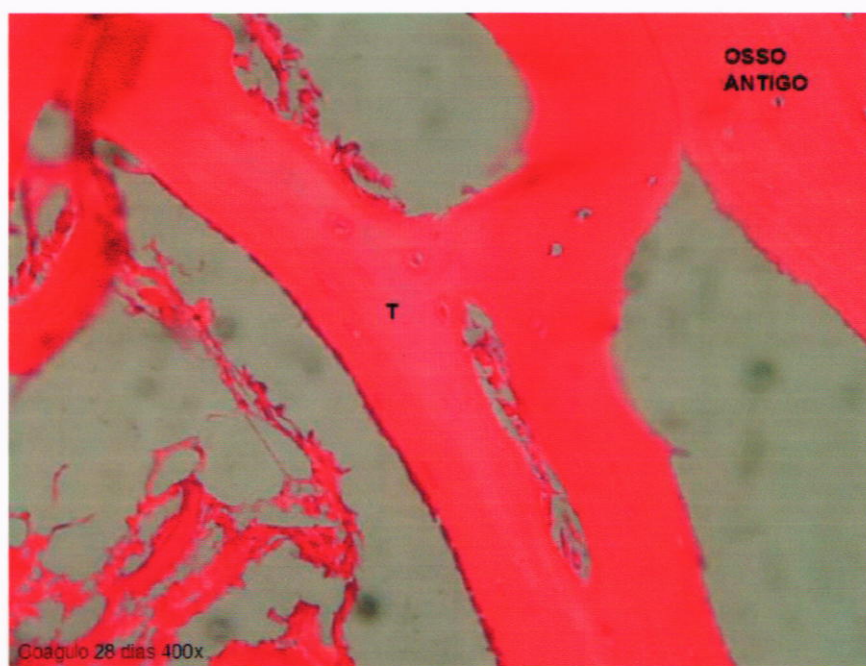


Figura N: Corte histológico da amostra com coágulo no período de 28 dias, em um aumento de 400x. Notar a presença da interligação das trabéculas ósseas, assim como novas trabéculas em formação.

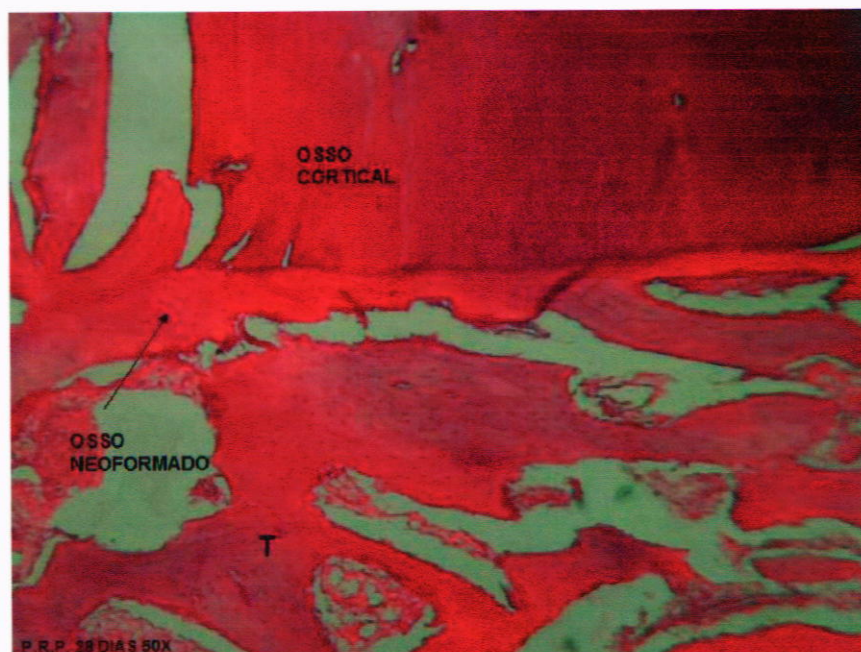


Figura O: Corte histológico da lâmina com P.R.P. (plasma rico em plaquetas) no período de 28 dias, em um aumento de 100x. Observar a grande densidade óssea devido ao volume de trabéculas neoformadas e perfeitamente interligadas entre si.

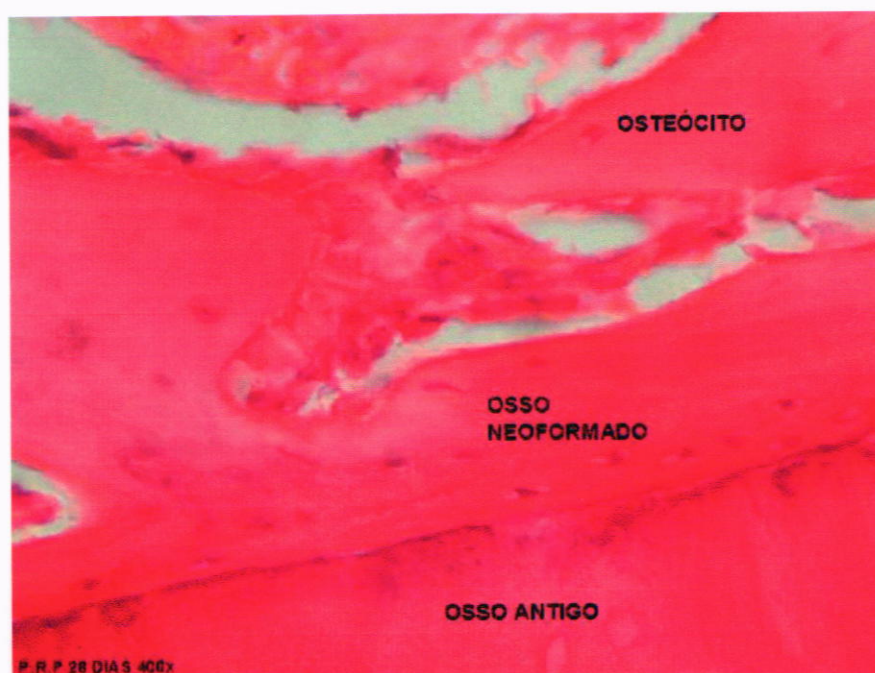
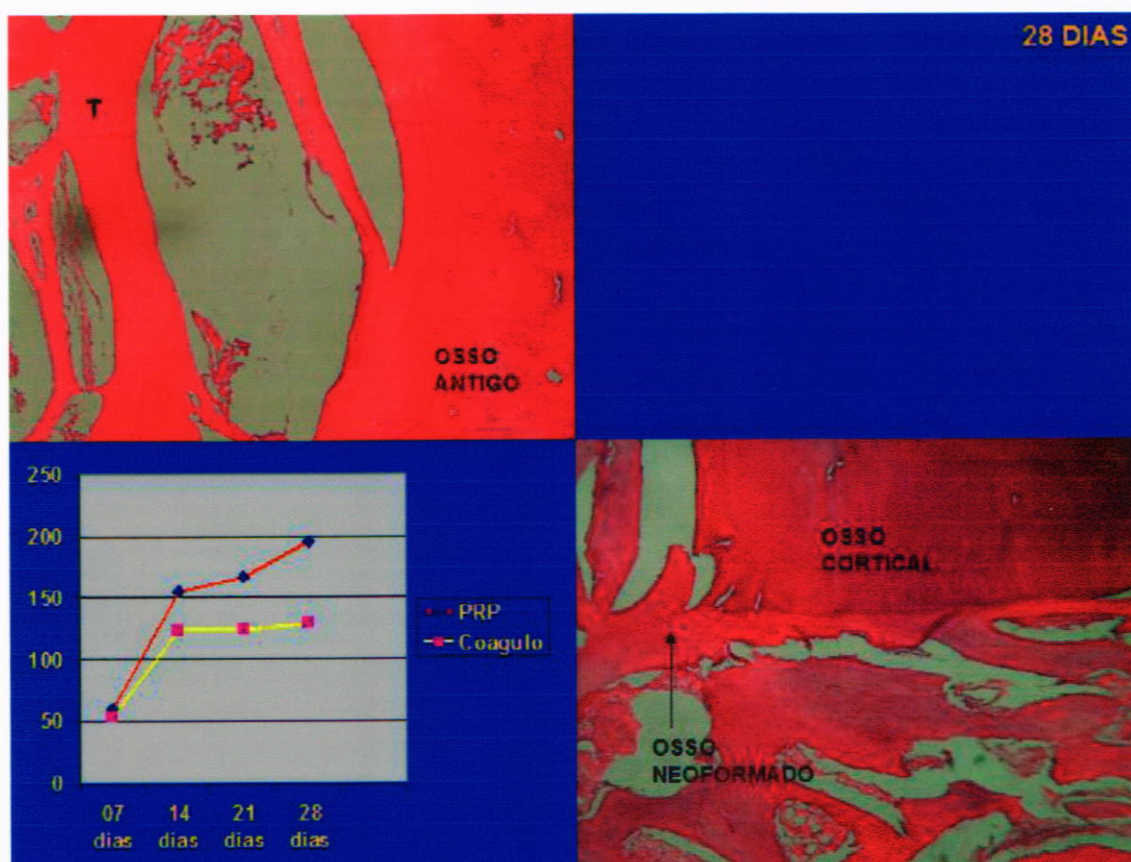


Figura P: Corte histológico da amostra com P.R.P. (plasma rico em plaquetas) no período de 28 dias, em um aumento de 400x. Notar a neoformação óssea a partir do osso preexistente, com inúmeros osteócitos e osteoblastos.

Comparação entre as cortes com coágulo e com plasma rico em plaquetas no tempo de 28 dias, e gráfico da histomorfometria.



DISCUSSÃO

Com os resultados apresentados por autores como Marx e Garg (1998), entre tantos outros, tornou-se quase imperativo o uso do plasma rico em plaquetas em procedimentos reconstrutivos. Um modelo de regeneração de enxertos ósseos proposto por (MARX e GARG, 1998) mostra com clareza a ação do PDGF e do TGF durante o processo de maturação do enxerto ósseo.

No momento da instalação do enxerto, encontramos na área receptora uma condição onde o pH local gira em torno de 7,42 e o gradiente de oxigênio é de 45-55mmHg, ou seja, uma condição de normalidade. O enxerto autógeno que será instalado nesta área possui, além de outras células ósseas contidas em seu interior, leucócitos, hemácias e plaquetas que serão fundamentais no desenvolvimento da regeneração, além de células mesenquimais indiferenciadas. O pH do enxerto encontra-se ácido por volta de 4-6, devido a um baixo gradiente de oxigênio, que varia de 5-10mmHg.

Os fatores de crescimento começam a agir a partir da degranulação das plaquetas, que ocorre devido ao contato com colágeno exposto da ferida. O primeiro fator a aparecer é o PDGF.

Este fator promove a mitogenese das células mesenquimais indiferenciadas e dos osteoblastos endósteos oriundos do enxerto, que sofrerão grande aumento em seu número. Ao mesmo tempo uma proliferação de capilares, decorrente da angiogênese estimulada também pelo PDGF, garante aos poucos a nutrição e a oxigenação da área.

Um segundo fator de crescimento a interferir positivamente é o TGF- β , que ativa fibroblastos e monócitos a entrarem em mitose para um aumento do número e conseqüentemente caminhando para uma diferenciação em osteoblastos. Com a continuação da secreção de TGF- β , este influencia a deposição de matriz óssea e de matriz colágena que suportará a invaginação dos capilares.

Após o terceiro dia já é possível observar a presença de capilares invadindo o enxerto, sendo que ao redor do décimo quarto dia o enxerto está totalmente vascularizado.

Em nossos achados, no princípio da regeneração óssea, é grande a presença de osteoblastos em relação ao tempo controle e também podemos observar trabéculas jovens em formação, ao passo que no tempo controle vemos poucas trabéculas ósseas em formação e muitos feixes de fibras colágenas com presença de fibroblastos se orientando na formação de um novo trabeculado ósseo.

Marx (1999) cita, nesta descrição, que por volta da segunda semana, o enxerto já está totalmente vascularizado o que corresponde à verdade, pois podemos encontramos em nosso trabalho, nas amostras com PRP, muitos vasos sangüíneos que nutrem permanentemente esta área, além de trabéculas bem formadas, com grande interligação entre ambas e principalmente um número muito grande de osteoblastos aderidos a essas trabéculas, sugerindo uma grande atividade celular de síntese de matriz óssea superior ao mesmo tempo na amostra controle.

Ao final do primeiro mês, o gradiente de oxigênio torna-se normal, eliminando assim a atividade dos macrófagos que substituíram as plaquetas após o quinto dia.

A partir desse tempo o enxerto torna-se auto-sustentado, sendo ainda um enxerto imaturo com osso jovem, sem a presença de osso lamelar. Neste estágio, o fator de crescimento responsável pela maturação do enxerto é o IGF I e II, que são secretados pelos osteoblastos agindo em outros osteoblastos e pelos osteoclastos responsáveis pela reabsorção óssea, com isso liberando mais BMPs que fazem a diferenciação celular das células mesenquimais indiferenciadas em novos osteoblastos.

Durante a terceira e quarta semana consecutivamente, nota-se a presença de um osteóide, que se aproveita da rede de fibrina presente para usá-la com uma armação com o objetivo de servir à maturação óssea. Este processo é conhecido como osseocondução. Podemos denominar este período de fase 1 da regeneração óssea que se completa totalmente entre 28 a 42 dias, pois há a produção e mineralização de um osteóide suficiente para permitir a função do enxerto. Após esse período inicia-se a fase dois da regeneração, que se caracteriza por ser uma fase menos celular, mais mineralizada, e mais organizada estruturalmente.

Nas análises feitas no período final do nosso experimento, encontramos um trabeculado muito bem definido, em grande quantidade e com simetria e homogeneidade entre as trabéculas. A presença de sistema de Havers confere a característica de um osso jovem, porém maduro. Nas amostras-controle, a única diferença é a quantidade do trabeculado que se apresenta diminuída e com pouca simetria entre as trabéculas.

Nosso resultado confirma o resultado descrito por Marx e Garg (1998) de que a densidade do tecido ósseo encontrado, quando do uso do PRP, era de 15 a 30%

maior em relação ao normal, já que o. Em nossa histomorfometria encontramos um resultado similar apresentado pelos referidos autores.

Nosso estudo vem a concordar com um trabalho feito por Leme (2002), na qual foram feitos enxertos de plasma rico em plaquetas, elaborado segundo o protocolo proposto por Rossi Jr., Leme e Pispico (2001), em cavidades feitas em mandíbula de cães da raça Beagle, e estudados nos mesmos tempos de nosso estudo.

Além da total concordância em relação aos achados histológicos, demonstramos histomorfometricamente uma crescente aposição óssea nas trabéculas das osteotomias preenchidas com plasma rico em plaquetas, aumentando consideravelmente a espessura do trabeculado ósseo.

Em relação ao protocolo utilizado neste estudo, este é similar a vários outros protocolos na literatura mundial. Porém, Marx em 2001 citou que as centrífugas utilizadas na maioria dos protocolos não é a ideal, pois se trata de um aparelho para diagnóstico, com o que concordamos; porém este autor afirmou que não é possível obter a quantidade de plaquetas necessária para a formação do PRP, além de não ser aprovada para a obtenção de PRP pela FDA (Food and Drug Administration). Neste aspecto somos completamente discordantes, pois o protocolo utilizado foi exaustivamente pesquisado e de completa eficiência, haja vista o resultado das lâminas apresentadas.

Outro aspecto que pode gerar discordância é o uso de trombina bovina ou tromboplastina (Soluplastin Wiener lab. Fator III, obtido de cérebro de coelho) para a obtenção do gel de PRP. Segundo Landesberg (1998), o uso dessas proteínas animais poderia estimular a produção de anticorpos contra o fator V da coagulação,

gerando conseqüentemente uma coagulopatia no paciente que recebesse um enxerto com o P.R.P. Apesar de encontrarmos na literatura vários autores (ROSSI Jr., LEME e PÍSPICO 2001; MARX e GARG, 1998) que utilizam estas proteínas para obter o gel sem qualquer evidência de coagulopatias, é possível obter um gel com ótima consistência utilizando apenas o cloreto de cálcio a 10%, em aproximadamente 10 minutos (JAHN 2002).

Encontramos, porém, autores que discordam da eficácia do plasma rico em plaquetas como indutor tecidual, como Shanamann, Flstein e Danesh-Meyer (2001) que em três casos clínicos usou PRP e osso liofilizado humano e em seus resultados histológicos obtidos após cinco meses, concluíram que a adição de PRP a materiais de enxerto e osso autógeno parece não aumentar a qualidade do osso neoformado; os autores não citam em seu trabalho qual análise histológica eles utilizaram. Nossos achados foram baseados em estudos de histomorfometria e demonstraram exatamente ao contrario.

Kassolis, Rosen e Reynolds (2000) utilizaram o PRP adicionado de osso liofilizado em 15 casos de enxerto de seio maxilar e aumento do rebordo ósseo. Os autores demonstraram em seus estudos histológicos feitos nos tempos de quatro e cinco meses que este tipo de enxerto suporta a formação de osso novo, porém também não conseguiram mensurar se a adição de PRP realmente aumenta a taxa de formação e maturação óssea. Nesse estudo, porém, os autores não utilizaram nenhum caso clínico sem o PRP para que se pudesse fazer uma real comparação entre as duas técnicas.

Froum, Wallace e Tarnow (2002) usaram o PRP adicionado de osso liofilizado bovino em três casos de enxerto bilateral de seio maxilar contendo uma mínima ou

nenhuma quantidade de osso autógeno. Em seus resultados histológicos os autores não encontram evidências de que o PRP realmente ajuda na produção de osso vital, ou ao redor de implantes. Os autores também não relataram um caso-controle para a devida comparação.

É de suma importância de se enfatize que a ação dos fatores de crescimento presentes nas plaquetas é relativamente curta, segundo Marx (2001); em 10 minutos as plaquetas secretam 70% dos fatores contidos nos grânulos α e terminam a secreção dos 100% em uma hora. Essas plaquetas sintetizam mais fatores de crescimento adicionais por mais oito dias em média antes de morrerem.

Lynch et al. (1991) mostraram que a ação do PDGF-B é de 4,2h caindo para menos de 4% após 96h; o IGF-I tem uma duração de apenas três horas, após estes primeiros três a cinco dias os macrófagos substituem as plaquetas, na liberação dos fatores de crescimento por mais 30 dias no máximo. Isso mostra que a ação principal do PRP está no estágio inicial da reparação e não durante sua remodelação tardia.

Nos estágios iniciais, o plasma rico em plaquetas faz aumentar o número de células ósseas e com isso aumenta a deposição de matriz que, conseqüentemente aumentará, a densidade e qualidade óssea neoformada. Nos tempos estudados por autores, que avaliaram a ação do PRP após cinco ou seis meses, nunca será possível a observação da ação do plasma rico em plaquetas, pois neste período o osso encontra-se em plena remodelação.

Ao nosso ver, a utilização do PRP nos procedimentos cirúrgicos torna-se fundamental e um importante fator que influenciará favoravelmente o prognóstico de nossos trabalhos regenerativos.

CONCLUSÕES

Após a análise dos resultados obtidos a partir da leitura das lâminas no aspecto histológico e histomorfométrico, o autor pôde concluir que:

1ª Em todas as amostras pode-se notar uma diferença estrutural e celular sempre mostrando que as amostras com plasma rico em plaquetas possuem uma maior quantidade celular, melhor organização do trabeculado ósseo e uma homogeneidade do crescimento. Porém, notamos um aumento constante na densidade óssea devido ao aumento da espessura das trabéculas, com isso diminuindo a espaço medular.

2º O plasma rico em plaquetas mostra-se um excelente indutor na regeneração óssea quando utilizado como enxerto ósseo.

3º O protocolo utilizado neste experimento e preconizado pela disciplina de implantodontia da Unisa mostrou-se eficaz e passível de uso clínico diário devida a sua facilidade de execução e custos relativamente acessíveis aos profissionais da área Médica.

REFERÊNCIAS:*

ANITUA, E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the reparation of future sites for implants. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Chicago, v. 14, n. 4, p. 529-535, Aug.\Sept. 1999.

AXHAUSEN, W. The osteogenic phase of regeneration of bone: a histological and experimental study. **J Bone Joint Surg**, Boston, v. 38, p. 593-601, June 1956.

BECKER, W.; LYNCH, S.E.; LEKHOLM, BECKER, E.; CAFFESSE, R.; DONATH, K.; SANCHEZ, R.A. Comparison of ePTFE membranes alone or in combination with platelet derived growth factor-i or demineralized freeze-dried bone in promoting bone formation around immediate extraction socket implants. **J Periodontol**, Birmingham, v. 63, n. 11, p. 929-940, Nov. 1992.

CAFLIN, R. S. Healing of disturbed and undisturbed extraction wound. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v. 23, p. 945-959, June 1936.

CANALIS, E.; VERRGHESE, S.; Mc CARTHY, T. I.; CENTRELLA, M. Role of platelet derived growth factor in bone cell function. **Growth Regul**. Basel, v. 2, n. 4, p. 151-155, Oct. 1992.

CAPLAN, A. I. The mesengenic process. Bone repair and regeneration. **Clin Plast Surg**, Philadelphia, v. 21, n. 3, p. 429-435, July 1994.

CARLSON, E. R. Bone grafting the jaw in the 21st century: The use of platelet rich plasma and bone morphogenetic protein. **Alpha Omegan**. Philadelphia, v. 93, n. 3, p. 26-30, Aug.\Sept. 2000.

COHEN M.A. ; EAGLSTEIN W.H; Recombinant human platelet-derived growth factor gel speeds healing of acute full-thickness punch biopsy wounds. **J Am Acad Dermatol**, St. Louis, v. 6, n. 45, p. 857-62, Dec, 2001.

COOK S.D, RUEGER D.C: Osteogenic protein-1. Biology and applications. **Clin Orthop**. Philadelphia, v. 324, p. 29 -38, Mar. 1996.

* De acordo com ABNT 6023:2002. Abreviaturas de periódicos Segundo Bases de Dados MEDLINE.

FRIEDENSTEIN, A. J.; PETCHOVO, K. U. Osteogenesis in transplants of bone marrow during placement of marrow cancellous bone grafts. **J Oral Surg**, Orlando, v. 37, p. 712-723, 1979.

FROUM S, J.; WALLACE S.S; TARNOW D.P; Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts: three bilateral case reports: **Int. Journal Periodontics Restorative Dent**, Chicago, v. 22, n.1, p. 45-53, Feb. 2002.

GANIO, C.;TENEWITZ, F,E.; WILSON, C. R.; MOYLES, B.G.The treatment of chronic nonhealing wounds using autologous platelet rich growth factors.**J foot and Ankle Surgery**, Baltimore, v. 32, n. 3, p. 263-67, May\June 1993.

GARG, A.K.; GARGENESE, D.; PEACE, J. Using platelet-rich plasma to develop an autologous membrane for growth factor delivery in dental implant therapy. **Dent Implant Update**, Atlanta,v. 11, n. 6, p. 41-44, June 2000.

GIANNOBILE W.V, FINKELMAN R.D, LYNCH S, E: Comparison of canine and non-human primate animal models for periodontal regenerative therapy: results following a single administration of pdgf/igf-I. **J Periodontol**. Birmingham, v. 65, n. 12, p.1158-1168, Dec. 1994.

GIANNOBILE. W. V.Comparative effects of platelet derived growth factor-bb, insulin-like growth factor-I alone and in combination on periodontal regeneration in macaca fascicularis. **J Periodontal Res**, Chicago, v. 31, n. 5, p. 301-312, May 1996.

GRAY, J. C.; ELVES, M. W. Donor cells contribution to osteogenesis in experimental cancellous bone grafts. **Clin Orthop**. Philadelphia, v. 163, p. 261-271, Mar. 1982.

HERNDOR, D.; NGUVEN.T; GILPIN, D. A. Growth factors – local and systemic. **Arch Surg**. Chicago, v.128, p.1227-1233, Nov.1993.

JAHN, R. S. Proposta de nova metodologia para obtenção de plasma rico em plaquetas. São Paulo, 2002, 52 p. dissertação (mestrado) Universidade de Santo Amaro Unisa.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J.;Histologia básica.Tecido ósseo. In: _____
Histologia básica. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,1999. p.111-128.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J.; Histologia básica, Células do sangue. In: _____. **Histologia básica**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 192-220.

KASSOLIS, J.D.; ROSEN, P.S.; REYNOLDS, M.A. Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: Case series. **J Periodontol**, Birmingham, v. 71, n.10, p.1654-661, Oct. 2000.

KHAN, S. N.; BOSTROM, M. P. G.; IANE, J. M. Bone growth factors. **Orthop Clin Am**. Philadelphia, v. 31, n. 3, p. 375-387, 2000.

KIM S. G.; CHUNG C. H.; KIM Y. K, PARK J. C. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Chicago, v.17, n.1, p. 86-94. Jan./Feb. 2002.

KNIGHTON, D.R.; CIRESI, K.F.; FIEGEL, V.D.; AUSTIN, I.L.; BUTLER, E.I. Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. **Ann Surg**, Philadelphia, v. 204, n. 3, p. 322-330, Sept. 1986.

KSANDER, G. A., SAWAMURA, S.J.; OGAWA, Y.; SUNDSMO, J.; MCPHERSON, J.M. The effect of platelet release on wound healing in animal models. **J Am Acad. Dermatol**, St. Louis, v. 22, n. 5, p.781-791, May 1990.

LANDESBERG, R.; MOSES, M.; KARPATKIN, M. Risks of using platelet rich plasma gel. **J Oral Maxillofac Surg**, Copenhagen, v. 56, n. 9, p.1116-1117, Sept. 1998.

LANDESBERG, R.; ROY, M.; GLIKMAN, R. S. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. **J Oral Maxillofac Surg**, Copenhagen, v. 58, n. 3, p. 297-300, Mar. 2000.

LEKOVIC, V.; CAMARGO, P. M.; WEINLAENDER, M.; VASILIC, N.; BARRIEKENNEY, E. Comparison of platelet rich plasma, bovine bone mineral, and guided tissue regeneration versus platelet rich plasma and bovine porous mineral in treatment of intrabony defects: a reentry study. **J. Periodontol**. Birmingham, v. 73, n. 2, p.198-205, Feb. 2002.

LEME, J, J; Análise do potencial osteogênico do plasma rico em plaquetas no reparo de cavidades ósseas-estudo histológico em cães. São Paulo, 2002, 62 p. dissertação (mestrado) Universidade de Santo Amaro Unisa.

LIND, M. Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation. **Acta Orthop Scand**, Kobenhavn v. 283, p. 32-37, Oct. 1998.

LIND, M. Growth factors: possible new clinical tools. a review. **Acta Orthop Scand**, Kobenhavn, v. 67, n. 4, p. 407-417, Aug. 1996.

LYNCH. S. E, Introduction. In: _____ **Tissue engennering**: applications in maxillo facial surgery and periodontics. Chicago, Quintessence books, 1999. cap.1, p.11-18.

LYNCH, S.E.; BUSER, D; HERNANDEZ, R.A.; WEBER, H.P.; STICH, H.; FOX, C.H.; WILLIAMS, R.C. Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-i combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. **J Periodontol**, Birmingham, v. 62, p. 710-716, Nov. 1991.

LYNCH, S.E.; WILLIAMS, R.C.; POLSON, A.M.; HOWELL, T. H.; REDDY, M.S.; ZAPPA, U.E.; ANTONIADES, H.N. A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v.16, n. 8, p. 545-548, Apr. 1989.

MARX. R. E, Platelet rich plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP? **J Implant Dent**, Baltimore, v.10, n.4, p. 225-228, 2001.

MARX, R. E., Platelet-rich plasma: a source of multiple autologous growth factors for bone grafts. **Tissue engennering**. In: _____ applications in maxillofacial surgery and periodontics. Chicago, Quintessence books, 1999. p. 71-82.

MARX, R. E.; CARLSON, E.R.; EICHSTAEDT, R. M.; SCHIMMELE, S. R.; STRAUSS, J. E.; GEORGEFF, K. R. Platelet rich plasma - growth factor enhancing bone grafting. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. St. Louis, v. 85, p. 638-646, June 1998.

MARX, R. E.; GARG, A. K. Bone structures, metabolism and physiology: Its impact on dental implantology. **Implant Dent**, Baltimore, v. 7, n. 4, p. 267-276, 1998.

MARX, R. E.; SNYNDER, R, M.; KLINE, N, S. Cellular survival of human marrow during placement of marrow cancellous bone grafts. **J Oral Surg**, Philadelphia, v. 37, p. 712-717, Oct. 1979.

OBARRIO J.J; ARAUZ J.J; CHAMBERLAIN T.M; CROSTON A. **Int J Periodontics Restorative Dent**, Rochester, v. 20, n. 5, p. 486-497, Oct. 2000.

OLIVEIRA, H. P. Fisiologia e função Plaquetária, **Hematologia clínica**. 3ªed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1985. p. 467-485,

PANAGAKOS, F.S. Insulin Growth factors-I and II stimulate chemotaxis of osteoblasts isolated from fetal rat calvária. **Biochimie**, Paris, v. 75, p. 991-994, Aug. 1993.

PETRUNGARO, P. Platelet-rich plasma for dental implants and soft tissue grafting. **Dent Implant Update**, Baltimore, v. 12. n. 6, p. 41-46, Sept. 2001.

PETRUNGARO, P. Immediate restoration of multiple tooth implants for aesthetic implant restorations. **Implant Dent**. Baltimore, v. 11, n. 2, p.118-127, Sept. 2002a.

PETRUNGARO, P. Using platelet-rich plasma to accelerate soft tissue maturation in esthetic periodontal surgery. **Compend Contin educ Dent**, Lawrenceville, v. 22, n. 9, p. 729-746, 2002b.

ROBIONY, M.; POLINI, F.; COSTA, F.; POLITI, M. Osteogenesis distraction and platelet-rich plasma for bone restoration of the severe atrophic mandible: preliminary results. **J Oral Maxillofac Surg**, Stuttgart, v. 60, n. 6, p. 630-635, June 2002.

REDDI, A. H. Extracellular matrix and development. in: Piez, K.A. & Reddi, A.H. Extracellular matrix biochemistry. New york, elsvier, p.375, 1984. Apud: Sailer, H.; kolb, e. application of purified bone morphogenetic protein (bmp) in cranio-maxillo-facial surgery – bmp in compromised surgical reconstructions using titanium implants. **J Craniomaxillofacial Surg**. Stuttgart, v. 22, p. 159-161, Apr. 1994.

ROSENBERG, E.S.; TOROSIAN, J. Sinus grafting using platelet-rich plasma – initial case presentation. **Pract Periodont Aesthet Dent**, Ramsey, v.12, n. 9, p. 843-850, 2000.

ROSS, R.; RAINES, E. W.; BOWEN, D. F. The biology of platlet derived growth factor. **Cell**, Tonso, v. 46:155-169, July 1986.

ROSSI JR, R - **Bases biológicas da Implantodontia..Histofisiologia dos tecidos bucais**. São Paulo: Pancast editorial. 1990, p. 25-35.

ROSSI, JR. R; LEME, J. J; PISPICO, R.;Utilização de plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos proposta de um protocolo de obtenção simplificado. disponível em : <<http://www.plaquetas.net>>. Acesso em: 21 nov. 2001.

RUTHERFORD R,B.;REYNE M.;KENNEDY,J. E.;TUCKER,M.M.;CHARETTE,F.M., Platelet-derived growth factor and dexamethasone combined with collagen matrix induce regeneration of the periodontium in monkeys. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 20, n. 7, p. 537- 544, 1993.

SAILER, H.; KOLB, E. Application of purified bone morphogenetic protein (bmp) in cranio-maxillo-facial surgery – bmp in compromised surgical reconstructions using titanium implants. **J Craniomaxillofacial Surg**, Stuttgart, v. 22, p. 2-11. Aug. 1994.

SHANAMAN, R; FILSTEIN, M. R.; DANESH-MEYER, M. J. Localized ridge augmentation using GBR and platelet-rich plasma: case reports. **Int J Periodontics Restorative Dent**, Chicago, v. 21, p. 345-355, Aug. 2001.

SMITH, R. A.The effect on TGF- β 1 on osseointegration. **Can Dent Assoc J**, Ottawa, v. 23, n. 12, p. 49 - 53, Dec.1995.

SONNLEITNER, D.; HUEMER, P.; SULLIVAN, D. A simplified technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate for intraoral bone grafting techniques: a technical note. **Int. J Oral Maxillofac Implants**, Stuttgart, v.15, n. 6, p. 879-889, Nov.\ Dec. 2000.

STEPHAN. E.B. Platelet derived growth factor enhancementof a mineral-collagen bone substitute, **J Periodontol**, Birmingham, v. 71, n.12, p.1887-1892, Dec. 2000.

STEFANI, C. M.; MCHADO, M. A. N; SALLUM, E. A.; SALLUM, A. W.; TOLEDO, S.; NOCITI, F. H. Platelet-derived growth factor/insuline-like growth factor-1 combination and bone regeneration around implants placed into extraction sockets: a histometric study in dogs. **Implant Dent**, Baltimore, v. 9, p.126-132, 2000.

TAYAPONGSAK, P.;O'BRIAN, D, A.; MONTEIRO, C, B.; ARCERO-DIAZ, L, Y. Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. **J Oral Maxillofac Surgery**, Stuttgart, v. 52, p.161-166, Feb.1994.

TISCHLER, M. Platelet-rich plasma. The use of autologous growth factor to enhance bone and soft tissue grafts. **NY State Dent J**, New York, v. 68, n. 3, p. 22-24, Jan. 2002.

WANG, HOM-LAY; PAPPERT, T.; D.; CASTELLI, W. A.; CHIEGO Jr. D. J.; SHYR, Y.; SMITH, B. A. The effect of platelet-derived growth factor on the cellular response of the periodontium: an autoradiographic study in dogs. **J Periodontol**, Birmingham, v. 65, n. 5, p. 429-436, May 1994.

URIST, M. R. Bone formation by autoinduction. **Science**, Washington, v. 150, p. 893-899, Nov. 1965.

URIST, M. R. The bone induction principle. *Clin Orthop related Res* v.53, p.243-283, 1967. Apud: Hannouche, D.; Petite, H.; Sedel, I. Current trends in the enhancement of fracture healing. **J Bone Joint Surg**, Boston, v. 83, n. 2. Mar. 2001.

VENTURELLI, A. Regeneración ósea: Plasma rico en plaquetas. **Rev Assoc Odonto. Argent.** Buenos Aires, v. 87, n. 6, p. 459-467, Nov. | Dec. 1999.

WEIBRICH, G. ; KLEIS, W. K. G. ; KUNZ-KOSTOMANOLAKIS, M.; LOOS, A. H.; WAGNER, W. Correlation of platelet concentration in platelet-rich plasma to the extraction method, age, sex, and platelet count of the donor. *Int. J Oral Maxillofac Implants*, Stuttgart, v.16, n. 5, p. 693-699, Sept. \ Oct. 2001.

WHITMAN, D.H.; BERRY, R.I.; GREEN, D.M. Platelet gel: An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. **J Oral Maxillofac Surg**, Stuttgart, v. 55, n. 11, p. 1294-299, 1997.

WOZNEY, J. M. The potential role of bone morphogenetic proteins in periodontal reconstruction. **J Periodontol**, Birmingham, v. 66, n. 6, p. 506-510, June 1995.

YASZEMSKI, M.J.; PAYNE, R.G.; HAYES, W.C.; LANGER, R.; MIKOS, A.G. Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. **Biomaterials**, Guildford, v.17, n.2, 1996.

YI, Y.J.; YANG, J.H.; KWON, S.H. Bone response to implants treated with autologous platelet rich plasma (prp) in the rabbits, **J Dent Res**, Chicago, v. 81, p. A354, Mar. 2002. (Resumo IADR n.2833)

APÊNDICE - A

CONCEITOS BÁSICOS

Para que possamos discutir com maior propriedade o uso do plasma rico em plaquetas no reparo do tecido ósseo se faz necessária uma explanação inicial sobre estes dois temas.

Tecido ósseo – composição e reparação

Como sabemos, o tecido ósseo apresenta como função básica a sustentação do corpo, armazenamento de cálcio e outros minerais, assim como a homeostase mineral.

É constituído por uma porção inorgânica formada por cristais de hidroxiapatita, flúor e magnésio e uma porção orgânica composta de fibras colágenas e células.

As células são identificadas em relação ao metabolismo e à histofisiologia óssea. Os osteoblastos, osteocitos e osteoclastos e são intimamente relacionados entre si. Os osteoblastos são originários das células osteoprogenitoras, não sendo encontrados em divisão celular, a não ser os osteoblastos jovens na presença de fatores de crescimento. Estas células localizam-se nas regiões periféricas e trabeculares.

Quando encontrados em sua fase blástica, sintetizam a matriz orgânica do osso e quando englobados pela própria matriz sintetizada recebem a denominação de osteócitos e localizam-se dentro dos osteoplastos. Vale ressaltar que os osteócitos mantêm sua atividade metabólica.

Os osteoclastos são células oriundas da junção dos macrófagos com os monócitos vindos do sangue ou mesmo da união de vários osteoblastos. Estão associados ao processo de reabsorção óssea. São de extrema importância nos processos regenerativos, pois sua atuação é responsável pela liberação das proteínas morfogenéticas do osso, fundamentais no estímulo das células mesenquimais indiferenciadas a transformarem-se em osteoblastos.

Classificamos o tecido ósseo em cortical, trabecular e medular. O osso cortical é denso, revestindo a epífise dos ossos longos e a superfície dos ossos planos. É formado por canais de Havers onde encontramos um vaso central envolto por lamelas concêntricas de colágeno tipo I mineralizado. Esses sistemas são cimentados entre si, dando origem ao que chamamos de osteons. Perpendicularmente aos canais de Havers, encontramos os canais de Volkmann.

O osso trabecular, por sua disposição tridimensional, abriga em seu interior o osso medular responsável pela função metabólica e formação de células sanguíneas e osteoprogenitoras.

Devemos atentar para o fato de que o osso apesar, de uma estrutura rígida, está em constante atividade metabólica representada pela reabsorção e neoformação óssea denominada de remodelação óssea.

Terminologia utilizada no estudo dos processos reparacionais.

A reparação pode ser definida como a substituição das células lesadas na agressão, por outras células saudáveis.

Esta reparação pode se dar de duas formas distintas:

Regeneração: é a substituição de células lesadas por outras de mesmas morfologia e função.

Cicatrização: é a substituição de células lesadas por tecido colágeno, cicatricial.

Em ambas as formas, ocorre a cura da lesão, sendo que a diferença entre elas é que, na cicatrização, ocorre a perda da função (Rossi Jr., 1990).

APÊNDICE - B

PLASMA RICO EM PLAQUETAS

É grande o interesse de pesquisadores em vários centros científicos, na procura por novas técnicas e materiais que possam facilitar os processos regenerativos, assim como, minimizar a morbidade cirúrgica ligada às técnicas reconstrutivas atuais.

Dentre os mais recentes achados, podemos considerar o plasma rico em plaquetas como um dos mais importantes avanços na área da Bioengenharia tecidual.

Lynch et al. (1989) definiram o PRP como um produto derivado do sangue autógeno por processo laboratorial, colhido em período pré-operatório e rico em fatores de crescimento originários dos grânulos α - plaquetários.

Outras denominações também podem ser encontradas na literatura científica, plasma autógeno de plaquetas, plasma enriquecido com plaquetas, plasma rico em fatores de crescimento, concentrado de plaquetas e gel de plaquetas (ANITUA, 1999; LYNCH et al., 1989, MARX et al., 1998).

Em 2002, Tichler denominou de PRP uma pequena porção de fatores de crescimento obtida a partir de uma pequena fração de sangue do paciente, por vários processos de centrifugação.

Atualmente, considera-se a obtenção de plasma rico em plaquetas quando se consegue uma concentração de 1.000.000 de plaquetas por μl em um volume de 5ml de plasma rico em plaquetas (MARX 2001).

Como vantagens do seu uso, podemos citar o fato de o PRP ser um produto orgânico, atóxico e não-imunorreativo, que tem sido usado para acelerar os caminhos da cicatrização da ferida cirúrgica, devido à presença de fatores de crescimento (ANITUA, 1999; MARX, 1998; WHITMAN, 1997).

Com o intuito de aumentar a concentração desses fatores de crescimento nos sítios traumatizados, ou onde será colocado um implante endósteo, vários pesquisadores têm estudado a possibilidade de aplicar plasma rico em plaquetas (PRP), como fonte rica de elementos celulares requeridos pelo organismo naquele sítio, de modo que os fatores de proliferação e diferenciação celular possam garantir a geração de quantidade suficiente de células novas e promover a regeneração óssea. O uso dos fatores de crescimento abre uma “nova fronteira” na terapia clínica e cria um paradigma que afeta todos os segmentos das profissões ligadas à área da saúde (LYNCH, 1991; BECKER et al., 1992; LIND, 1996, MARX et al., 1998; ANITUA, 1999; MARX e GARG, 1999).

Já é conhecido que em todo o ferimento se forma um coágulo que inicia o processo de cicatrização. Um coágulo sangüíneo contém 95% de glóbulos vermelhos, 5% de plaquetas e menos de 1% de glóbulos brancos junto com fibrinas. O PRP contém 4% de glóbulos vermelhos, 95% de plaquetas e 1% de glóbulos brancos. Portanto, o PRP enriquece o coágulo sangüíneo natural no local da lesão, pois as plaquetas são um reservatório importante de fatores de crescimento que aceleram o processo de cicatrização.

Por exemplo, o PRP misturado a um enxerto ósseo resulta em uma taxa de maturação de 1,6 a 2,2 vezes maiores que os enxertos de osso que não receberam o plasma, resultando em quantidade e densidade maior de osso, como relata Marx et al. (1998).

Atualmente, estudos e experiências com o PRP adicionado ao enxerto, têm mostrado que ocorre uma consolidação mais rápida e a mineralização do enxerto na metade do tempo, além da melhora de 15% a 30% na densidade do osso trabecular (MARX et al., 1998) O conceito é que o PRP, que é um coágulo de fibrina (às vezes referido como uma cola de fibrina) é rico em plaquetas que liberam, em períodos cíclicos, os fatores de crescimento PDGF e TGF- β .

Como componentes principais do PRP encontramos plasma, leucócitos as plaquetas e seus fatores de crescimento.

O plasma sanguíneo é uma solução aquosa contendo componentes com pequeno e grande peso molecular, que correspondem a 10% do seu volume. As proteínas plasmáticas correspondem a 7%, os sais inorgânicos a 0,9% sendo o restante formado por compostos orgânicos diversos, tais como aminoácidos, vitaminas, hormônios, lipoproteínas e glicose.

Os componentes do plasma com baixo peso molecular estão em equilíbrio, nas paredes dos capilares e das vênulas, com o líquido intersticial dos tecidos. Por isso a composição do plasma é um indicador da composição do líquido extracelular.

As principais proteínas do plasma são as albuminas alfa e beta e as gamaglobulinas e o fibrinogênio. As albuminas desempenham um papel importante na manutenção da pressão osmótica do sangue e as gamaglobulinas ou

imunoglobulinas são os anticorpos. Já o fibrinogênio é necessário para a formação da fibrina, na etapa final da coagulação sanguínea. Em relação ao PRP o fibrinogênio é fundamental na formação do gel de plaquetas (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

Os leucócitos, em uma rápida exposição são células incolores, de forma esférica quando em suspensão no sangue, implicados na defesa celular e imunocelular do organismo. A presença de leucócitos no plasma rico em plaquetas confere a este produto uma resistência natural aos processos infecciosos e alérgicos, melhorando o prognóstico do tratamento (MARX et al.1998).

As plaquetas formam-se por fragmentação do citoplasma dos megacariócitos, que por sua vez originam-se na medula óssea (OLIVEIRA, 1985). Essas estruturas têm forma de discos e apresentam-se na corrente sanguínea em torno de 150.000 a 350.000 por mm^3 de sangue. Podemos observar que dois terços das plaquetas estão em circulação, enquanto que o restante encontra-se no baço. Sua renovação diária é de cerca de 35.000 unidades possuindo um tempo médio de vida de sete a nove dias.

Apesar de seu tamanho reduzido, as plaquetas desempenham um papel importantíssimo no processo de coagulação e cicatrização da ferida cirúrgica.

Podemos dividir as plaquetas em três zonas diferentes:

Zona sol-gel: é a estrutura citoesquelética das plaquetas.

Zona das organelas: composta pelos elementos de depósito (grânulos).

Sistema canalicular: responsável pela comunicação com o plasma e pela rota de liberação das organelas e seus produtos (OLIVEIRA, 1985).

Devemos dar especial atenção aos grânulos α -plaquetários, responsáveis pela liberação dos fatores de crescimento quando ocorre a granulação plaquetária (MARX, 1999).

FATORES DE CRESCIMENTO TECIDUAL

Os fatores de crescimento presentes nas plaquetas, macrófagos, osteoblastos e células endoteliais, são polipeptídios e agem como mediadores biológicos que modulam as atividades celulares fundamentais nos processos regenerativos dos tecidos, assim como mitogênese celular, quimiotaxia e formação de matriz colágena. Suas ações iniciam-se ao ligarem-se a receptores específicos na membrana celular (GIANNOBILE, FINKELMAN, LYNCH, 1996; LIND, 1998).

Ao ligar-se com os receptores da membrana celular, eles ativam proteínas sinalizadoras citoplasmáticas que ativam os genes para mitoses, causando um aumento na população de células de cicatrização. Ativam também a angiogênese, iniciando a ativação capilar e dos macrófagos, resultando no debridamento da ferida e promovendo a origem de novos fatores de crescimento (CARLSON, 2000).

Os fatores de crescimento agem nas células osteoprogenitoras diferenciando-as e auxiliando o trabalho das células presentes no osso pré-existente. Desta forma, nos defeitos ósseos maiores, onde as células ósseas remanescentes não são suficientes para induzir o reparo, os fatores de crescimento desempenham um papel fundamental (ROSSI Jr., LEME e PÍSPICO, 2001).

Em Implantodontia, o plasma rico em plaquetas pode ser aplicado para acelerar os enxertos ósseos, enxerto de seio maxilar, osseointegração e regeneração dos tecidos moles.

Estudos específicos sobre plasma rico em plaquetas identificaram pelo menos três importantes fatores de crescimento presente nos grânulos α das plaquetas seqüestradas: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fatores de crescimento transformador $\beta 1$ e $\beta 2$ (TGF- $\beta 1$ e TGF- $\beta 2$). Outros estudos documentaram a presença dos fatores de crescimento semelhantes à insulina I e II (IGF-I e IGF-II) em testes com sangue periférico (MARX, 1999).

Segundo Lind (1998) os fatores de crescimento mais importantes, entre os mais de 30 conhecidos são:

1 - Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF): existem três isótipos e são estimuladores potentes tanto da proliferação quanto da síntese de matriz protéica.

2 - Fator de crescimento de transformação-beta (TGF- β): existem cinco subtipos diferentes (TGF- $\beta 1$ a TGF- $\beta 5$). O osso e as plaquetas contêm altas quantidades deste fator de crescimento. O TGF- β é provavelmente o regulador multifuncional mais potente do metabolismo de célula óssea.

3 - Fator de crescimento similar à insulina (IGF): pode ser do tipo I e II e é produzido por osteoblastos e plaquetas. O IGF-II é encontrado na matriz óssea em alta concentração. A síntese de IGF-I é mediada pelo hormônio de crescimento. Os IGF estimulam a proliferação dos osteoblastos indiferenciados (LIND, 1998).

4 - Proteína morfogenética do osso (BMP): existem 13 sub-tipos diferentes, do BMP-1 ao BMP-13 e são os únicos fatores de crescimento conhecidos que estimulam as células básicas mesenquimais a se diferenciar em osteoblastos e condroblastos.

5 - Fator de crescimento de fibroblastos (FGF): está presente na matriz óssea nas formas ácida e básica e é secretado por osteoblastos isolados. O FGF básico é encontrado na matriz óssea numa concentração dez vezes maior que o FGF ácido. O FGF ácido e básico são primariamente mitogênicos em células normais de osso, estimulam a síntese de DNA e replicação *in vitro*, além disso, é um potente angiogênico o que é importante para a invasão vascular do enxerto (LYNCH 1991).

FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE PLAQUETAS (PDGF)

Carlson, em 2000, definiu que o PDGF está envolvido em todos os processos de cicatrização devido às plaquetas exercerem duas funções importantes, servindo com reserva de fatores de crescimento e sendo preponderante na hemostasia. O PDGF parece ter vários efeitos positivos na cicatrização das feridas incluindo mitogênese, causando um aumento no número de células (fibroblastos), efeito angiogênico, devido à formação e à multiplicação de novos capilares, e efeitos sobre outros fatores de crescimento e células resultando na função de fibroblastos e osteoblastos, assim como promovendo a diferenciação e aceleração dos efeitos dos fatores de crescimento em outras células, como por exemplo, os macrófagos.

O PDGF é uma glicoproteína também sintetizada por macrófagos e células endoteliais. Em virtude de estarem presentes nas plaquetas dentro dos coágulos sanguíneos, é o primeiro fator de crescimento presente nas feridas, conduzindo a revascularização, a síntese de colágeno e a regeneração óssea.

Esta glicoproteína com massa molecular de aproximadamente 30Kd possui uma estrutura formada por duas cadeias básicas de aminoácidos PDGFa e PDGFb (ANITUA,1999). A cadeia A é formada por 121 aminoácidos, que apresentam similaridade de até 60% (MARX, 1999).

Está presente com peso aproximado de 0,06 ng por milhão de plaquetas o que significa $6 \times 10^{-17}g$ ou cerca de 1200 moléculas de PDGF por plaqueta (MARX, 1999).

Segundo Ross et al. (1988), a grande quantidade deste fator de crescimento na ferida acarretaria um aumento na atividade das células se comparado com o coágulo somente.

FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR (TGF- β)

É assim chamado por ter sido o primeiro fator de crescimento isolado dos sarcomas (ANITUA, 1999).

Fator de crescimento transformador- α e β é um termo utilizado para demonstrar uma superfamília de fatores de crescimento e diferenciação celular envolvidos com a cicatrização de feridas em tecidos moles e também na regeneração óssea (CARLSON, 2000).

Os TGFs mais comuns presentes no plasma rico em plaquetas são os TGF- β 1 e TGF- β 2. Os TGF- β s são formados por uma estrutura dimétrica formada por duas subunidades de 112 aminoácidos. Possuem massa molecular de aproximadamente 25Kd e são formados por duas subunidades de 12.500 daltons (ANITUA, 1999; MARX, 1999).

Esse fator de crescimento tem similaridade de até 72% entre as estruturas β 1 e β 2. A estrutura β 1 é encontrada com abundância nas plaquetas, nos linfócitos e nos neutrófilos. O tipo β 2 é encontrado em enxertos ósseos, plaquetas e neutrófilos (ANITUA, 1999).

O tecido ósseo e as plaquetas, parecem ter 100 vezes mais TGFs do que qualquer outro tecido, e os osteoblastos tem a maior quantidade de receptores para os TGFs. Esses achados sugerem, que os TGFs tem sua maior importância em relação ao metabolismo ósseo (LIND, 1998).

Esse fator de crescimento parece conter um mecanismo que além de iniciar a regeneração óssea parece também sustentar o processo de remodelação óssea e participando da maturação de enxertos ósseos. Adicionalmente a esses benefícios os TGFs promovem a inibição da formação de osteoclastos e reabsorção óssea favorecendo desta maneira a formação sobre a reabsorção óssea.

Quando estes fatores são extravasados pela degranulação das plaquetas ou secretado pelos macrófagos, seu efeito se reflete nas células como fibroblastos, células mesenquimais indiferenciadas e pré-osteoblastos.

A mais importante função do TGF- β parece ser a quimiotaxia e mitogênese de precursores de osteoblastos e na habilidade de estimular a deposição de matriz de

colágeno para a cicatrização dos tecidos moles e regeneração óssea (CARLSON, 2000).

Pertencentes a esta superfamília temos também as proteínas ósseas morfogenéticas ou BMPs.

Essas proteínas foram descobertas e assim denominadas devido ao achado de Urist em 1965 onde ele demonstrou o crescimento ósseo em tecido subcutâneo através de matriz óssea desmineralizada. Em 1989 e 1989 Wang, How-Lay et al., purificaram três tipos de BMPs e caracterizaram as suas respectivas seqüências de aminoácidos. Mais tarde mais 12 BMPs foram identificadas formando atualmente um número de treze tipos de BMPs. As BMPs são os únicos fatores de crescimento com conhecida habilidade de estimular a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em condroblastos e osteoblastos (LIND, 1998).

FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA (IGF I E IGF II)

Sua designação inicial era Somatomedin-C e fator de crescimento esquelético, são fatores de crescimento secretados pelos osteoblastos durante a formação óssea para aumentar a osteogênese e acelerar a deposição óssea (CANALIS, 1992).

Existem em dois tipos IGF-I e IGF-II são relativamente pequenos, com massa molecular de aproximadamente 7.7 Kd e 7.5 Kd respectivamente, sendo o IGF-II em maior quantidade presente na matriz óssea. Entretanto estudos demonstram que o IGF-II não é tão potente quanto o IGF-I, já que esse é de quatro a sete vezes mais potente do que o IGF-II na regeneração óssea, sendo a combinação deles com

outros fatores de crescimento um potente fator no processo de regeneração óssea (GIANNOBILE, 1996).

Os IGFs das plaquetas tem ação sobre os precursores dos osteoblastos e nos osteoblastos endosteos, sendo estas células, que produzem a fase inicial da formação óssea nos enxertos ósseos (CARLSON, 2000; MARX, 1999).

Uma vez secretado pelos osteoblastos, são incorporados à matriz óssea e estimulam o processo de regeneração óssea, para isso recrutam os osteoblastos para a área de reparo (PANAGAKOS, 1993).

A combinação desse fator de crescimento com o PDGF resulta na interação sinérgica para acelerar a cicatrização de feridas em tecidos moles (LYNCH, 1991).

Temos então como principais funções dos IGFs a influencia sobre o metabolismo ósseo: promovem a deposição de matriz óssea, estimulam a mitogênese das células osteoblásticas e ainda possuem atividade quimiotática para fibroblastos, osteoblastos e células progenitoras dos osteoclastos (CANNALIS, 1992; GIANNOBILE, 1996; PANAGAKOS, 1993).

PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS DO OSSO (BMP)

No princípio da década de 60, foram realizadas muitas pesquisas referentes ao processo de calcificação dos ossos. Urist e seu grupo descobriram que em amostras controle de ossos descalcificados e não tratados, implantados em músculos de coelhos e ratos, resultaram na formação de cartilagem e osso. Esta descoberta permitiu formular a hipótese da formação óssea por auto-indução na qual as células mesenquimais induzem outras células a se diferenciarem em células osteoprogenitoras, ou ainda em células condrogenitoras. Porém Urist em 1965, não foi o primeiro a esclarecer esta teoria de formação óssea por auto-indução, ou ainda por substâncias hipotéticas formadoras de osso que mais tarde se refeririam como as proteínas morfogenéticas. Reddi e seu grupo também o fizeram (SAILER e KOLB, 1994).

As BMPs formam uma família de proteínas que regulam os processos celulares como a diferenciação, proliferação e morfogênese celulares. Têm sido identificadas em diferentes espécies, regulando e determinando o desenvolvimento de muitos tecidos e órgãos durante a embriogênese. Hoje, podem ser sintetizadas pelo processo de engenharia genética desde a BMP-1 até a BMP-15 (LIND, 1998).

As BMP são consideradas morfogênicas, sendo também detectadas no desenvolvimento embrionário e na vida pós-natal. Onze delas, da BMP-2 a BMP-12, estão relacionadas umas com as outras e são classificadas como pertencendo a uma superfamília de TGF- β por causa de suas seqüências de aminoácidos.

Quantidades pequenas da BMP nativa estão presentes no osso cortical (aproximadamente 1mg a 2mg de BMP por quilograma de osso cortical).

Muitos grupos isolaram e identificaram as BMP em outros sistemas, dando outros nomes de referência para estas moléculas. A BMP-3 é também conhecida como osteogenina, e a BMP-7 e a BMP-8 também são chamadas de proteína-1 (OP-1) e proteína-2 osteogênica (OP-2) respectivamente.

As BMPs são moléculas pleiotrópicas envolvidas na mitose e diferenciação de células mesenquimais. Depois da quimiotaxia dos monócitos e das células mesenquimais, acontece diferenciação celular no tecido ósseo. As células mesenquimais proliferam e se diferenciam em condrócitos, que em seguida se hipertrofiam. Elas morrem como células e são então substituídos por osso. O ambiente criado com a presença de BMP determina o tipo de tecido produzido. Em um local heterotrópico, as BMP-3 ou BMP-7 produzem cartilagem. No periodonto, elas produzem cimento, ligamento periodontal e osso alveolar. Em áreas craniofaciais as BMP-3 e BMP-7 produzem o osso intramembranoso.

No processo de reabsorção, remodelação e reparo, a liberação das BMPs pode ser responsável pela iniciação da cascata osteogênica (URIST et al., 1967), além de outros fatores de crescimento ósseo continuado e completando o processo, como o TGF- β .

A rhBMP, que é a proteína morfogenética recombinada extraída de osso humano, mostrou ter a capacidade de reparar defeitos grandes em mandíbulas de primatas em falhas de 2,2cm a 3cm contendo de 0,2 mg/mm a 0,8mg/mm de rhBMP-

2. Foi observada uma boa qualidade óssea mas a conclusão é que era necessário um carregador para a formação óssea em grandes quantidades.

O carregador ideal para a BMP não deve ser o colágeno imunogeneticamente inerte, osteocondutivo e bio-absorvível, mas um suporte para que possa ser induzida a angiogênese e subsequente vascularização. É necessário que o carregador dê às proteínas a oportunidade de interagir com as células osteoprogenitoras disponíveis e, segundo alguns estudos realizados, parece que os materiais osteocondutores com remodelação lenta são bons carregadores das BMP-2 em falhas críticas. Sem o carregador, as BMP não produzem formação óssea em grandes quantidades.

O aumento na quantidade de BMP-2, implantada com uma matriz óssea, diminui o tempo para formar osso. A matriz óssea, em vez de se formar em 10 dias a 12 dias, é formada já no 50 dia. Nestes casos observa-se que a cartilagem e o osso se formarão ao mesmo tempo, o que sugere que a BMP-2 pode formar o osso independentemente seja pela via endocondral ou pela intramembranosa.

Atualmente devido ao grande avanço da Engenharia Genética, já é possível obter-se as rhBMPs ou seja, proteínas morfogenéticas recombinantes humanas. Esse processo se dá através do conhecimento da seqüência genética responsável pela produção desta proteína. Bactérias (*Escherichia coli*) são manipuladas de tal forma que o código genético bacteriano passa a incorporar esta seqüência humana, e as bactérias então produzem a proteína, que é aplicada a vários veículos que viabilizam seu uso clínico. Devido ao alto custo de produção e carência de comprovação clínica de sua eficácia, torna-se importante o aprofundamento dos estudos em trabalhos científicos, para verificar a eficiência deste novo método regenerativo (KUNZEL, 2002).

FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS (FGF)

Na matriz do tecido ósseo são encontrados sete isotipos do FGF. O FGF-1 é ácido (ou aFGF) e o FGF-2 é básico (ou bFGF). O bFGF é geralmente mais potente que o aFGF. Ambas as formas de FGF estimulam a síntese de DNA e a replicação de células *in vitro*, mas eles diminuem a atividade da fosfatase alcalina e não têm nenhum efeito estimulador direto em osteoblastos maduros. Os dois tipos de FGF são estimulantes potentes da angiogênese o que é importante para a invasão vascular em enxertos (LIND, 1998).

A síntese do TGF- β pelos osteoblastos pode também ser estimulada pelo bFGF. O FGF pode exercer algum efeito estimulador por meio de outros fatores de crescimento. O FGF é um fator angiogênico importante para a neovascularização durante a resposta cicatricial e na conjunção com seus efeitos na replicação das células ósseas, portanto, podem ser importantes no processo de cicatrização óssea (LIND, 1998).

LIND (1998) cita que pesquisadores como (ASPENBERG E JOHMANDER, 1989, KAWAGUSHI et al.1993), por exemplo, têm usado o bFGF em modelos animais para estímulo *in vivo* da formação e cicatrização ósseas.

Um outro fator de crescimento, denominado fator de crescimento epitelial (EGF), é um polipeptídeo composto por 53 aminoácidos e é encontrado predominantemente na glândula submaxilar (HERNDOR et al.,1993).