

**ANÁLISE DO POTENCIAL OSTEOGÊNICO DO PLASMA RICO EM
PLAQUETAS NO REPARO DE CAVIDADES ÓSSEAS – ESTUDO
HISTOLÓGICO EM CÃES**

C.D. JOÃO JOSÉ LEME

**São Paulo
2002**

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO

**ANÁLISE DO POTENCIAL OSTEOGÊNICO DO PLASMA RICO EM
PLAQUETAS NO REPARO DE CAVIDADES ÓSSEAS – ESTUDO
HISTOLÓGICO EM CÃES**

C.D. JOÃO JOSÉ LEME

Dissertação Apresentada a Diretoria de Pós-graduação
da Universidade de Santo Amaro para a obtenção do
título de Mestre em Implantodontia, sob a orientação
do Prof. Dr. Nelson Villa

São Paulo
2002

**ANÁLISE DO POTENCIAL OSTEOGÊNICO DO PLASMA RICO EM
PLAQUETAS NO REPARO DE CAVIDADES ÓSSEAS – ESTUDO
HISTOLÓGICO EM CÃES**

CD JOÃO JOSÉ LEME

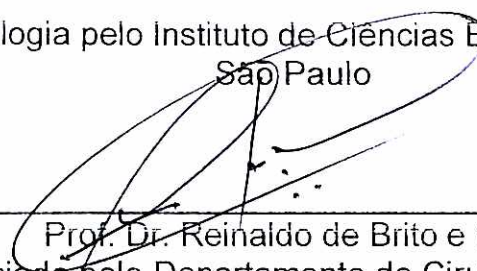
Aprovado em 18/11/02

BANCA EXAMINADORA



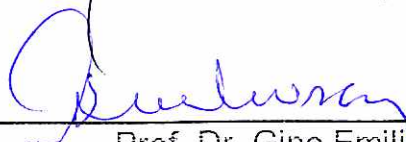
Prof. Dr. Nelson Villa (Orientador)

Livre Docente em Histologia pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo



Prof. Dr. Reinaldo de Brito e Dias

Livre Docente – Associado pelo Departamento de Cirurgia Prótese e Traumatologia
Maxilo Faciais da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo



Prof. Dr. Gino Emilio Lasco

Livre Docente em Cirurgia pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo

CONCEITO FINAL: Aprovado com distinção e honras

B. R0124009
Class. U617.69
Cutter L567a
Patri nº 3800
Tipo entrada DOA
Nota Fiscal _____
Data rec. 23.1.01
Preço _____
Origem Univ. de São Paulo
Univ. de São Paulo

L567a Leme, João José
Análise do potencial osteogênico do plasma rico em
plaquetas no reparo de cavidades ósseas: estudo histológico
em cães. Orientação do Prof. Dr. Nelson Villa. São Paulo :
2002.
62p.

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

1. Fatores de Crescimento 2. Implantes dentários
3. Plaquetas. 4. Remodelação óssea I. Título

Ao **Grande Arquiteto do Universo**, razão da existência do ontem, do hoje e do amanhã, rendemos-lhe graças por esta encarnação maravilhosa de progresso e, por nos ter permitido renascer neste Brasil maravilhoso.

Nosso vínculo eterno de gratidão e de saudade enorme dos pais queridos: João Francisco Leme e Auta Freire Leme, que não mediram esforços para que pudéssemos percorrer todo este caminho, com amor, lealdade e honestidade, mas acima de tudo, com esforço próprio.

Nosso preito de saudade ao sogro Lázaro Machado de Souza, nossa irmã Aparecida Onofre Leme, nossa neta Bruna Yumi Leme Sominami, cunhado Américo Constantino e sobrinha Dione Constantino Malpica , parte existente do meu coração que habitam o Oriente Eterno...

À Érica Machado de Souza Leme, esposa querida e grande amor de minha vida, sou grato a Deus, por ter permitido nossa vida juntos nesta existência, dando-nos os filhos maravilhosos que temos. Meu amor e meu carinho eterno, por tudo que você para mim representa. Te amo muito...

Aos filhos queridos: Patrícia e Alex, Sandra e Douglas, João Francisco e Mariane, pedaços e continuidade de nossa existência, rogo ao Pai Poderoso as bênçãos para que a caminhada de vocês, seja sempre de amor, respeito e dignidade, para conquistar sempre com esforço próprio.

A Babi, eterna paixão deste vovô coruja... e Luiz Felipe, que você seja bem vindo entre nós, pois estamos ansiosos à sua espera, nesta encarnação!

A todos meus familiares que contribuem para que este amor que nos une, seja sempre um elo desta corrente, que há de durar por toda eternidade...

MEU MUITO OBRIGADO...

Ao Prof. Dr. Nelson Villa nosso orientador, a gratidão eterna pela paciência e dedicação na condução e elaboração deste trabalho. Sua experiência nesta jornada será para mim, um exemplo a ser sempre seguido.

Ao Prof. Dr. Renato Rossi Jr, meu grande amigo- irmão, apreço sincero e eterna gratidão por ter colocado em meu caminho, este tema tão apaixonante que é o Plasma Rico e Plaquetas. Agradecer seria muito pouco, pelo muito que foi feito. Que o Grande Arquiteto do Universo o ilumine e guarde!

Ao Prof. Dr. Gino Emílio Lasco, o grande Mestre da Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial, que abriu e colocou esta Especialidade Odontológica em seu ponto mais alto, minha gratidão e eterno reconhecimento por tudo que por mim foi feito. Seu exemplo digno e leal de ensinar sempre, será um rumo seguro em minha existência.

Ao PROF. DR. JOSÉ LUIZ DE LORENZO, que com dedicação e carinho mostrou-me uma amizade impar, somando sempre com seu conhecimento, um elo inesquecível em minha existência.

Ao PROF DR. REINALDO BRITO E DIAS, nosso agradecimento pela colaboração, que com seu talento em cativar as pessoas, marcou fundo meu coração nesta jornada.

Ao PROF. Dr. WILSON R. SENDYK, COORDENADOR de nosso MESTRADO , minha gratidão pelo esforço e dedicação na condução do mesmo.

AGRADECIMENTOS

A todos os PROFESSORES da Pós Graduação do Mestrado da UNISA, que transmitiram seus conhecimentos, ampliando nossa capacidade crítica na formação e busca do saber raciocinado e seguro, o agradecimento e reconhecimento do dever cumprido.

A Prof. Dra. Ingrid Dragan Taricano responsável pelo Laboratório Universitário de Análises Toxicológicas da UNISA – UNITOX que nos permitiu a realização deste trabalho de pesquisa, bem como todo apoio necessário deste Departamento.

Aos Veterinários da UNITOX-UNISA, na pessoa do Dr. Marcelo Botelho Migliano e Dr. Luiz Henrique Cipollotti, sem os quais não teria sido possível a realização de nosso trabalho.

À Dra. Grigina Teixeira Carvalho, Chefe do Laboratório de Anatomia Patológica e Citologia Ltda. de São Caetano do Sul, que gentilmente permitiu a realização das fotomicrografias deste trabalho.

Aos colegas da Equipe de Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial do Hospital Alvorada Santo Amaro, na pessoa do Dr. Ruben Enrique Rubiniak, Dr. Antonio Sangiuliano, Dr. Gledson Cássio Bella, Dr. Ricardo Grillo, Dra. Karina A. M. Francisco, companheiros que muito contribuíram para que esta tecnologia pudesse ser implantada em nosso Serviço.

Ao Dr. Ricardo M. M. Tcholakian, Diretor Clínico do Hospital Alvorada Santo Amaro, que abriu este Hospital para esta tecnologia pudesse ser realizada, antevendo seus resultados.

A todos os colegas do Mestrado, companheiros leais durante todo nosso percurso, que acabou se transformando em uma família, gerando uma amizade para a eternidade de nossas existências.

Ao amigo Ronaldo Pispico, companheiro de jornada na parte experimental de nossos trabalhos, o abraço sincero pela ajuda, amizade e dedicação.

À amiga Marta Brochado de Aguiar Schreiber, exemplo de coragem e abnegação, que mesmo atravessando um dos períodos mais críticos de sua existência, soube vencê-los com galhardia, distribuindo amor a todos nós.

À cunhada Dra. Maria Lúcia Leal Rossi e as sobrinhas Adriana, Bianca e Camila, meu apreço de gratidão por tudo que por mim fizeram, para que tudo fosse realizado no devido tempo.

À Maria Teresa Ferreira dos Santos e Lindalva Garcia Carilli meus “anjos da guarda”, que com paciência e tolerância, tanto me ajudaram nesta jornada.

Meus agradecimentos para aqueles, que no anonimato, contribuíram mesmo que da maneira mais simples, mas que fizeram e ajudaram para que tudo saísse da melhor forma possível.

SUMÁRIO

RESUMO.I

SUMMARY...III

GLOSSÁRIO DE ABREVIATURAS.....V

INTRODUÇÃO. 1

PROPOSIÇÃO. 4

REVISÃO DA LITERATURA. 5

MATERIAIS E MÉTODOS. 15

 Materiais: 15

 Animais: 15

 Medicamentos: 15

 Materiais para coleta de sangue e cirúrgicos:16

 Métodos:16

 Anestesia Geral: 16

 Cirurgia preparatória: remoção dos elementos dentários: 18

 Obtenção do Plasma Rico em Plaquetas: 18

 Preparação das cavidades ósseas: 23

 Preenchimento das cavidades cirúrgicas:23

 Obtenção dos espécimens para estudo:23

 Processamento do material obtido:24

RESULTADOS.28

DISCUSSÃO.39

CONCLUSÕES.55

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS. 56

RESUMO

A possibilidade de recuperação de falhas ou partes deficientes do corpo humano tem sido um desafio para os profissionais e pesquisadores da área da Saúde já há algum tempo.

Para melhorar a reparação, muitos estudos em vivo e "in vitro", avaliaram os fatores de crescimento e de diferenciação encontrados em células, que incluem o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento β de transformação (TGF- β), fator de crescimento de fibroblasto básico (FGF), fator de crescimento insulino semelhante (IGF-I), fator angiogênico derivado de plaquetas

No presente trabalho, o autor avaliou o reparo de cavidades ósseas cirúrgicas em mandíbulas de cães Beagle adicionadas de plasma rico em plaquetas comparadas ao reparo normal dos animais. Os tempos experimentais foram de sete, 14, 28 e 42 dias.

No tempo de sete dias pudemos observar uma diferença entre os espécimes onde a cavidade foi preenchida somente com coágulo em relação aos espécimes onde a cavidade foi preenchida com PRP. Aos 14 dias de experimentação os espécimes mostraram ainda uma diferença significativa com respeito à maturação do tecido ósseo encontrado. No tempo experimental de 28 dias os espécimes mostraram pouca diferença na quantidade de osso neoformado, entretanto, a qualidade encontrada nos dois grupos diferiu. Finalmente aos 42 dias, tempo de reparo ósseo das fraturas nos cães,

constatamos que a diferença entre os espécimes dos dois grupos se tornou quantitativa e qualitativa.

Analisados os resultados obtidos e comparados com os dados levantados na literatura consultada, o autor pode concluir que nos tempos de sete e 14 dias da reparação óssea, a adição de plasma rico em plaquetas promove um aumento quantitativo e qualitativo no tecido ósseo formado. A velocidade de produção de trabéculas também se mostra aumentada. No período intermediário da reparação (28 dias) a adição de plasma rico em plaquetas não parece alterar a quantidade de tecido ósseo formado. A maturação, entretanto, se mostra mais avançada nos espécimes adicionados. No tempo de 42 dias da reparação óssea, a adição de plasma rico em plaquetas aumenta significativamente a qualidade e a quantidade de osso formado. A maturação mais avançada dos espécimes adicionados é também evidente.

SUMMARY

The possibility of recovery flaws or deficient parts of the human body have been a challenge for the health professionals and researchers.

To improve the repairing, many studies in vivo and in vitro, evaluated the growth factors and differentiation found in cells that include the of platelets derived growth factor (PDGF), transformer growth factor β (TGF- β), fibroblastic growth Factor(FGF), Insulin like growth factor (IGF-I), platelets derived angiogenic factor (PDAF) and bone morfogenic proteins (BMP).

In the present paper the author evaluated the repair in surgical bone cavities in jaws in Beagle dogs added of Platelet Rich Plasma compared with the animals normal repair. The experimental times were of 7,14,28 and 42 days.

In the 7 days time we could observe a difference among the specimens where the cavity was only filled out with clot in relation to the specimens where the cavity was filled out with P.R.P.. At experimentation 14 days the specimens still showed a significant difference with regard to the bone maturation. In the 28 days experimental time the specimens showed little difference in the amount of bone, however, the quality found in the two groups differed. Finally at the 42 days, time of bone repair in dogs, we verified that the difference among the specimens from the two groups turned quantitative and qualitative.

Analyzed the obtained results and compared with the data in literature, the author can demonstrate that at the times of 7 and 14 days of the bone repairing, the addition of Platelet Rich Plasma promotes a quantitative and qualitative increase in bone formation. The speed of bone production also show increased. In the intermediate period of the repairing (28 days) the addition Platelet Rich Plasma

doesn't seem to alter the amount of formed bone. The maturation, however, shown more advanced in the added specimens. At the time of 42 days the addition of Platelet Rich Plasma increases the quality and the amount of formed bone.

GLOSSÁRIO DE ABREVIações

BMP - 2 – proteína morfogenética óssea 2

BMP - 3 – proteína morfogenética óssea 3

BMP - 7 – proteína morfogenética óssea 7

BMP – proteína morfogenética óssea

DFDB – osso desidratado desmineralizado e congelado

FDB – osso congelado desmineralizado

IGF - I - fator de crescimento semelhante à insulina I

IGF - II - fator de crescimento semelhante à insulina II

MDAF – fator angiogênico derivado de macrófagos

MDGF – fator de crescimento derivado de macrófagos

OP - 1 – proteína osteogenética 1

OP - 2 – proteína osteogenética 2

PDAF - fator angiogênico derivado de plaquetas

PD-ECGF – fator de crescimento de células endoteliais derivado de plaquetas

PDGF – BB – fator de crescimento derivado de plaquetas recombinante

PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas

PRP – plasma rico em plaquetas

PTFE – politetrafluor-etileno

RhBMP- 2 – proteína morfogenética óssea recombinante humana

TGF - β - fator de crescimento de transformação β

Ng – micrograma

PDWHF - fator cicatrizador derivado de plaquetas

INTRODUÇÃO

A possibilidade de recuperação de falhas ou partes deficientes do corpo humano tem sido um desafio para os profissionais e pesquisadores da área da saúde já há algum tempo.

Ainda se buscam substitutos, principalmente para tecidos duros do organismo: ossos e dentes.

Uma das grandes preocupações na clínica odontológica tem sido as perdas ósseas, comuns nos casos de cistos, tumores, traumatismos, lesões periodontais, reabsorções fisiológicas, deformidades congênitas, etc. Em cirurgias realizadas na cavidade bucal, o problema é ainda mais crítico, pois, na maioria das intervenções terminamos por deixar como seqüela a perda óssea. Desta maneira, nas exodontias a retalho, nas exéreses de tumores e cistos, na remoção de dentes inclusos, na obtenção de acessos cirúrgicos, torna-se necessária a osteotomia e a ostectomia, resultando em formação de cavidades ósseas.

Esta condição normalmente é reconstituída por processos biológicos de reparo. Este mecanismo, entretanto, demora meses ou anos e expõe o paciente a risco e desconforto, por vezes desnecessários, sendo que, nem sempre se consegue um osso adequado que preencha e recupere totalmente a lesão produzida pelo ato cirúrgico. Estas perdas ósseas impedem a colocação de implantes dentários e conseqüentemente reabilitação funcional da área.

Nesta última década tem se estudado bastante o uso de implantes osseointegrados na substituição de dentes perdidos. Desta forma, é comum nos dias de hoje, a utilização deste recurso pelo cirurgião dentista, mesmo nas condições em que o suporte ósseo é deficiente. Nestes casos, torna-se imperiosa a utilização de

enxertos ósseos para o preenchimento das superfícies expostas dos implantes, bem como para impedir a proliferação de tecido mole ao redor do mesmo.

Na tentativa de sanar estes inconvenientes, desenvolveram-se técnicas para a reconstrução total ou parcial das estruturas perdidas, com o objetivo de recuperar o contorno anatômico normal, restaurar a sua função, aumentar a resistência mecânica, favorecer a cicatrização e reduzir as chances de infecção secundária.

Muitas técnicas foram desenvolvidas, na tentativa de solucionar tais problemas. Desta maneira, o uso de enxertos ósseos autógenos, heterógenos, aloplásticos (hidroxiapatita, sulfato de cálcio, etc.) utilizados segundo técnicas cirúrgicas diversas foram apresentados.

Os melhores resultados para a regeneração de perdas óssea foram obtidos com enxertos autógenos de células medulares de osso esponjoso, pois são altamente osteogênicas e conseguem manter sua vitalidade na ordem de 95 a 100%, quando armazenadas em soro fisiológico, por cerca de quatro horas após sua retirada (MARX, 1994). Tais procedimentos, entretanto, são caracterizados por grande morbidade das áreas doadoras dos enxertos, bem como por requererem grande espera por parte do doente, frustrada às vezes, com resultados negativos ao término do processo. Para o sucesso dos enxertos ósseos, é necessário que um número viável de células sobrevivam, para que proliferem e diferenciem em células formadoras de osso.

O processo de reparação dos enxertos ósseos, também depende da qualidade do tecido doado, vascularização da área receptora, sua imobilização e eficiência dos mecanismos de cicatrização.

Entretanto, vários pesquisadores acreditam que células de todos os enxertos morrem e que as células enxertadas mortas, liberam uma proteína ácida insolúvel denominada por Urist (1984) de proteína óssea morfogenética (BMP), que induz as células do leito receptor à neoformação óssea.

Substâncias solúveis e não solúveis tomam parte na cicatrização como proteínas morfogenéticas, substâncias que se encontram no meio extracelular, citocinas e fatores de crescimento.

Para melhorar a reparação, muitos estudos em vivo e "in vitro", avaliaram os fatores de crescimento e de diferenciação encontrados em células que incluem o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento β de transformação (TGF- β), fator de crescimento de fibroblasto básico (FGF), fator de crescimento insulino semelhante (IGF-I), fator angiogênico derivado de plaquetas (PDAF), fator de crescimento de células endoteliais derivado de plaquetas (PD-ECGF) e proteínas morfogenéticas ósseas (BMP). Estes fatores são sintetizados e secretados por plaquetas, macrófagos, células endoteliais, fibroblastos e outras de origem mesenquimal (LYNCH, et al. 1991).

Em 1991, Lynch et al. demonstraram que o plasma rico em plaquetas (PRP) melhorava a reparação de tecido ósseo e que os fatores de crescimento existentes nas plaquetas auxiliavam no reparo das lesões ósseas.

Consultada a literatura existente e movido pela motivação do uso clínico do plasma rico em plaquetas (PRP), o autor realizou o presente estudo objetivando pesquisar seu efeito no processo de reparo de cavidades ósseas em cães.

PROPOSIÇÃO

A proposta do presente trabalho é avaliar histologicamente o potencial osteogênico do plasma rico em plaquetas, no reparo de cavidades ósseas em cães, comparado ao reparo ósseo normal. Foram utilizados cães da raça Beagle, especialmente criados para experiências científicas e fornecidos pelo canil do UNITOX – Laboratório Universitário de Análises Toxicológicas da UNISA.

REVISÃO DA LITERATURA

O estudo do processo de reparo do tecido ósseo sempre intrigou e desafiou os pesquisadores.

Axhausen (1956) descreveu pela primeira vez, de uma maneira clínica e histológica, os fenômenos do processo de reparo ósseo. O autor fez uma retrospectiva histórica do processo e enfocou os principais momentos da reparação.

Em 1962 Parfitt, publicou trabalho no qual discutiu as variações na composição, arquitetura e anatomia do tecido ósseo que compõe o rebordo alveolar da mandíbula e da maxila. O autor procurou avaliar o osso alveolar quanto à quantidade de trabéculas ósseas existentes e classificou as diferentes áreas quanto ao número e tamanho destas trabéculas. O autor também comparou as variações que ocorrem no trabeculado do osso alveolar nas distintas regiões dos maxilares. Concluiu que na região anterior da mandíbula o trabeculado era mais espesso e compacto enquanto que, na região posterior do maxilar, o trabeculado se mostrava mais rarefeito.

Urist (1965), em uma resenha bastante completa, abordou o tecido ósseo quanto a sua formação e auto-indução após a lesão. Demonstrou que os monócitos são mais numerosos que as outras células no processo de reparo ósseo e que após a reabsorção conduzida por osteoclastos, o osso é neoformado por auto-indução. O autor também demonstrou que as células osteoprogenitoras assim formadas são derivadas de monócitos sangüíneos (stem-cells).

Friedenstein, Piatetzky-Shapiro e Petrakova (1966) publicaram um estudo onde enfocaram a resposta dos enxertos ósseos autógenos tomados do osso ilíaco. Os autores descreveram as vantagens e desvantagens de carregar, junto com o osso enxertado, as células medulares presentes neste tipo de osso. Baseados em achados

clínicos e histológicos concluíram que a osteogênese nestes casos é bastante significativa.

A sobrevivência de células mesenquimais provenientes da medula óssea foi demonstrada por Marx et al. (1979). Em trabalho no qual utilizaram três diferentes métodos de conservação, afirmaram que 95% das células do osso doado sobrevivem por um período de quatro horas quando conservadas em solução salina a 0,9% (soro fisiológico). Ainda neste trabalho afirmaram que o osso autógeno seja particulado ou em blocos, apresenta um potencial osteogênico muito importante.

As variações do gradiente de oxigênio na zona de reparo foram estudadas por Kington et al. (1981). Os autores demonstraram que o aumento do gradiente de oxigênio entre o enxerto e o osso adjacente ativa a quimiotaxia dos macrófagos que, por sua vez, estimulam a secreção por parte destas células dos fatores angiogênicos (MDAF). Este processo associado ao fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), inicia rapidamente o processo de angiogênese necessário à sobrevivência do enxerto.

Gray e Elves (1982) publicaram uma pesquisa experimental utilizando um modelo canino onde discutiram a osteogênese que ocorria nos enxertos de osso esponjoso. Neste trabalho, os autores demonstraram que as células competentes das áreas doadoras são responsáveis pelo início da osteogênese no reparo deste tipo de enxerto. Estas células estão presentes tanto no osso enxertado como no leito receptor, sendo que as duas populações participam do processo de osteogênese.

A biologia dos fatores de crescimento derivados das plaquetas foi revisada com bastante propriedade por Ross, Raines, Bowen-Pope (1986). A participação potencial destes fatores nos mecanismos de reparação, injúria vascular, aterosclerose e no crescimento vascular das neoplasias foi abordada com profundidade. Os autores ainda abordaram o papel de cada um dos fatores derivados de plaquetas, sua ação angiogênica, vasoconstritora e sua participação direta e indireta no processo de reparação tecidual.

Kington et al. (1986) abordaram, pela primeira vez, o uso de fatores de crescimento derivados de plaquetas na estimulação de reparo de feridas epiteliais

crônicas, topicamente em humanos. Os autores estudaram 49 pacientes dos quais 29 diabéticos que possuíam úlceras crônicas não reparadas. Os fatores derivados das 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 em média de 10,6 semanas, sendo que estas feridas estavam recebendo tratamento convencional há um tempo médio de 198 semanas (um caso atingiu 1820 semanas).

Lynch et al. (1987) também abordaram o papel dos fatores derivados das plaquetas no processo de reparação tecidual. Discutindo o efeito sinérgico com outros fatores de crescimento envolvidos no reparo, demonstraram que o sinergismo dos fatores de crescimento derivados de plaquetas com outros fatores tais como o fator de crescimento epidermal e o fator de crescimento semelhante à insulina são fundamentais para a modulação do processo de reparação.

Lynch et al. (1989) voltaram a abordar a combinação de fatores derivados de plaquetas com outros fatores gerais do reparo, especificamente o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), quando utilizados na regeneração periodontal. Aplicaram os fatores diluídos em um gel aquoso em raízes de dentes comprometidos periodontalmente após a cirurgia por retalho. O grupo controle recebia gel sem os fatores de crescimento. Após duas semanas de tratamento, foram obtidos blocos para o estudo microscópico dos animais. Os resultados demonstraram que o uso de fatores de crescimento permitia uma melhor regeneração periodontal.

Em 1991, Lynch et al. (1991a) utilizaram os mesmos fatores para estudar seu efeito no processo de reparação dos defeitos periodontais. Utilizando cães Beagle operados nos quatro quadrantes da cavidade bucal, dois dos quais recebiam o gel contendo os fatores de crescimento estudados. Os resultados mostraram um substancial aumento do crescimento dos tecidos periodontais, duros e moles nos animais tratados durante as fases iniciais do reparo.

O efeito do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) combinado com o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) foi novamente estudado por Lynch et al. (1991b) no ano de 1991. Neste trabalho, os autores avaliaram a cicatrização do

tecido ósseo ao redor de implantes dentários cilíndricos. O grupo tratado recebia gel contendo os fatores de crescimento estudados, enquanto o grupo controle recebia um gel sem princípio ativo. Encontraram um significativo aumento na qualidade e quantidade de osso formado no interior destes implantes ocos, bem como nos espaços ósseos perimplantares.

O papel dos fatores de crescimento nos processo de reparo das fraturas ósseas foi descrito por Bolander em 1992. O autor afirmou que o processo de reparo dos ossos longos é uma cascata de fenômenos na qual as células mesenquimais são reguladas por fatores de crescimento em todas as fases do processo. Concluiu que os fatores de crescimento eram os responsáveis pela regulação, proliferação e diferenciação durante o processo.

Ripamonti e Reddi (1992) publicaram uma resenha bastante completa onde enfocavam o papel dos diversos fatores de crescimento no processo de reparo ósseo. No trabalho, os autores atribuem à matriz extracelular um papel de depósito (reservatório) multifatorial de fatores de crescimento. Tais fatores, encontrados na matriz extracelular, são mediadores moleculares com potencial de diferenciação, maturação e reparação óssea.

Também Pierce et al. (1992) estudaram o papel do fator de crescimento derivado de plaquetas, do fator transformador de crescimento $\beta 1$ e do fator básico de crescimento de fibroblastos durante o processo de cicatrização de feridas da pele. Os autores demonstraram que estes fatores podem acelerar o processo de cicatrização de feridas cutâneas, porque induzem uma maior proliferação vascular e maior proliferação celular neste processo. Também concluíram que o uso de fatores de crescimento poderia ser testado clinicamente.

Ainda Becker et al. (1992) compararam o uso de membranas de poli-tetrafluoretileno (PTFE) com ou sem a combinação de PTFE e IGF-I associados a osso desidratado, desmineralizado e congelado (DFDB) colocados ao redor de implantes em alvéolos de dentes recém-extraídos. Os resultados clínicos foram semelhantes, entretanto, quando comparados histologicamente os sítios tratados com fatores de crescimento e membrana mostraram maior densidade de osso formado com relação

aos sítios tratados somente com membranas. Os autores sugeriram o estudo separado dos fatores de crescimento para a avaliação de sua potencialidade.

Marx (1993) descreveu as vantagens da utilização de osso autógeno como material de enxertos. O autor acreditava que por possuir células osteocompetentes e todos os fatores de crescimento inerente ao reparo ósseo, este tecido deveria ser o de eleição nos enxertos de aposição comuns às reconstruções maxilares e mandibulares.

Tayapongsak et al. (1994) utilizaram uma cola de fibrina autógena para manter unidas as partículas de osso nos enxertos particulados em reconstruções mandibulares. Observaram em 33 casos que, além de não permitir o escape das partículas ósseas, a cola de fibrina promovia uma melhor e mais rápida regeneração tecidual. O osso incorporado e remodelado era observado radiograficamente na quarta semana de reparo, enquanto nos pacientes não tratados este quadro ocorria na oitava semana.

Wang et al. (1994), em estudo onde utilizavam marcadores radioativos demonstraram que o uso de fatores de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) induzia uma maior proliferação de fibroblastos na reparação do periodonto. Os autores utilizaram cães onde produziam um defeito periodontal experimental, o qual era tratado com membranas de PTFE adicionados ou não de fatores de crescimento.

Em 1994, Marx publicou um outro trabalho onde apresentava dados clínicos e histológicos mostrando a capacidade de reparo inerente ao osso autógeno. O autor baseou seus achados em uma grande quantidade de casos de reconstrução da maxila e mandíbula de pacientes que sofreram ressecções causadas por neoplasias. A qualidade do reparo e o índice de sucesso dos casos justificaram as afirmações do autor.

Com relação ao papel dos fatores de crescimento existentes no tecido ósseo, Giannobile et al. (1994) demonstraram em um modelo que utilizava primatas, o potencial osteoindutor do PDGF associado do IGF-I. Estes fatores adicionados a lesões periodontais dos primatas mostraram um crescimento ósseo 21,6% maior nos animais tratados em relação aos controles. Os autores também compararam o modelo primata a um modelo canino encontrando um crescimento maior (65%) no modelo canino.

Caplan (1994) publicou um trabalho onde estudava os fatores indutores do processo de reparo ósseo. O autor associou o início do reparo ósseo aos fatores derivados das plaquetas e dos macrófagos, atribuindo as fases tardias aos fatores liberados pelos osteoblastos no processo de formação óssea.

Sigurdsson et al. (1995) mostraram pela primeira vez o efeito da proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2) recombinante humana em um modelo de lesão periodontal. Neste trabalho, os autores utilizaram um modelo de cães e mostraram uma extensa formação óssea em defeitos periodontais tratados.

Em 1995 Wozney estudou o papel potencial da proteína morfogenética óssea (BMP) na reconstrução periodontal. O autor afirmou que apenas a BMP pode ser considerada como o único fator que induz e estimula a formação de novo osso. Discutiu dados obtidos em modelos caninos e sugeriu que o BMP pode ser uma solução de futuro no reparo de problemas periodontais.

Estudando a regeneração de defeitos de classe II usando regeneração tecidual guiada com ou sem a adição de fatores de crescimento derivados de plaquetas, Park et al. (1995) mostraram um maior crescimento regenerativo no grupo tratado com os fatores de crescimento. No estudo, foram utilizados cães Beagle nos quais se promoveu um defeito periodontal calibrado ao redor dos pré-molares. Dois grupos eram tratados com a colocação de membranas de PTFE sendo que o segundo recebia também os fatores de crescimento derivados de plaquetas. A diferença foi significativa, segundo os autores, para o grupo tratado com PDGF e membranas.

Giannobile et al. (1996) publicaram um estudo onde demonstraram o efeito do IGF-I e o PDGF-BB usados isoladamente e em combinação na regeneração periodontal de primatas (*Macaca fascicularis*). Os resultados mostraram que o IGF isolado não alterou significativamente a regeneração periodontal. O PDGF isolado agiu somente sobre o tecido mole enquanto os dois fatores associados promoveram um aumento significativo na formação óssea e dos tecidos moles.

Uma completa revisão sobre as proteínas morfogenéticas do tecido ósseo (BMPs) foi publicada por Cook e Ruger (1996). Os autores discutiram sobre o grupo de BMPs o qual denominaram de "Superfamília" de proteínas osteogênicas dando

especial atenção a BMP-7 também denominada proteína osteogênica-1. No trabalho, os autores afirmaram que a BMP-7 pode promover a fusão espinal, substituir os enxertos ósseos e reparar os defeitos osteocondrais.

Também Riley et al. (1996) discutiram os efeitos da BMP-2 na formação de tecido ósseo. Os autores mostraram que pequenas quantidades de BMP-2 nativo estão presentes no osso cortical (aproximadamente 1 a 2 mg por kg de osso cortical). Os autores também demonstraram que a BMP-2 isoladamente inicia o processo de formação óssea no modelo endocondral.

Em 1997, Howell et al. publicaram um trabalho onde utilizavam o fator de crescimento derivado de plaquetas e o fator de crescimento semelhante à insulina, ambos recombinantes, aplicados em defeitos periodontais em humanos. O trabalho visava provar que o uso destes fatores não trazia riscos adicionais ao paciente. Além disto, o trabalho procurava investigar uma dose terapêutica eficaz para o uso destes fatores. Os resultados mostraram que o seu uso é seguro e não produziu reações imunológicas aos pacientes. Entretanto, os autores não lograram uma dose terapêutica ideal e sugeriram novos estudos para tanto.

Utilizando também fatores de crescimento recombinantes, Kinoshita et al. (1997) analisaram, em cães Beagle, o reparo ósseo obtido em lesões circunferenciais criadas artificialmente. A proteína osteogênica BMP-2 recombinante foi utilizada adicionada a uma esponja de ácido poliláctico-poliglicólico. Após 12 semanas os animais foram sacrificados e os blocos obtidos. Uma significativa formação de osso foi observada no grupo tratado assim como novo cimento e ligamento periodontal. Os resultados mostraram que o uso de BMP-2 pode ser útil na regeneração periodontal.

Em 1997, Lee em trabalho onde abordava a utilização de fatores de crescimento na reconstrução dos maxilares, demonstrou que a BMP-1 recombinante não consegue induzir isoladamente o crescimento ósseo. Entretanto, a proteína possui um efeito sinérgico com as demais BMPs.

Em 1998, Marx et al. publicaram o artigo que se constituiu na pedra fundamental do uso do plasma rico em plaquetas nos dias atuais. Os autores discutiram sobre a biologia, bioquímica e ação dos diversos fatores de crescimento das plaquetas. A

fisiopatologia do reparo ósseo foi demonstrada, assim como o papel dos fatores plaquetários neste processo.

Ainda em 1998, Reddi afirmou que a utilização dos fatores plaquetários existentes no plasma rico em plaquetas era segura e efetiva.

Venturelli, em 1999 publicou trabalho onde demonstrou histologicamente o maior crescimento ósseo causado pelo uso de plasma rico em plaquetas. O autor utilizou, para a obtenção do PRP, um protocolo semelhante ao utilizado por Rossi Jr, Leme e Píspico (2001). Este concentrado era geleificado com a adição de trombina e cloreto de cálcio. A utilização clínica se fez ao redor de implantes do tipo Osteotite® e as margens ósseas foram biopsiadas para estudo. O autor concluiu que a utilização de PRP em procedimentos clínicos implantares pode ser efetuada com segurança e eficiência.

Ainda em 1999, Anitua demonstrou, em trabalho onde utilizou uma centrífuga laboratorial, a possibilidade de obtenção e uso do plasma rico em plaquetas. O autor mostrou que o uso de PRP na preparação de sítios para implantes é eficaz e simples de se obter na clínica odontológica.

Um estudo utilizando fator de crescimento derivado de plaquetas, associado ao fator de crescimento semelhante à insulina foi demonstrado em cães, por Stefani et al. (2000). Os autores utilizaram um gel adicionado com fatores, nos implantes colocados em alvéolos de cães. Os resultados mostraram um maior crescimento ósseo ao redor dos implantes nas fases iniciais de reparo.

Stephan et al. (2000) publicaram um trabalho onde estudaram o uso de matriz colágena bovina adicionada de PDGF-BB (fator de crescimento derivado de plaquetas recombinante). Os resultados mostraram que o PDGF pode ser adicionado à matriz colágena bovina e que seu potencial de estimulação não desaparece. Isto demonstra que o material proposto pode ser utilizado clinicamente.

Landesberg, Roy e Glickman (2000) compararam o uso de duas técnicas para obtenção do gel de PRP. Concluíram que o uso de um agente geleificante ITA (Natrex

Technology) era seguro, prático e não necessitava da adição de trombina ou cloreto de cálcio.

Uma série de 15 pacientes tratados com o uso de PRP e osso congelado e desmineralizado (FDB), foi publicada por Kassolis, Rosen e Reynolds (2000). Os resultados mostraram que adição de PRP ao osso tratado pode ser um tratamento eficaz e promove um osso diferenciado e maduro para a colocação de implantes.

Utilizando também o PRP adicionado a osso particulado, Rosenberg e Torosian (2000) demonstraram que os resultados da técnica de elevação do seio maxilar são otimizados com o uso do gel de PRP.

Em 2001, Rossi Jr, Leme e Pispico publicaram um artigo onde propunham um protocolo de obtenção de plasma rico em plaquetas. Os autores utilizavam uma centrífuga laboratorial que possibilitava, de forma simples, a obtenção de PRP em ambiente ambulatorial.

Além do uso em Odontologia o gel de PRP foi estudado por autores de outras áreas. Assim sendo, Man, Plosker e Winland-Brown (2001) publicaram o uso do PRP nas cirurgias plásticas de ritidoplastia.

Powell, Chang e Farrior (2001) também publicaram um trabalho onde utilizavam o PRP nas ritidoplastias obtendo um resultado de menor edema e dor nas pacientes tratadas. A facilidade de posicionamento do retalho foi também observada.

Em um trabalho no qual estudavam o efeito da idade e do sexo sobre o número de plaquetas obtidas por dois diferentes métodos, Weibrich et al. (2001) demonstraram que não existe diferença significativa associada a estes dois parâmetros. A diferença observada quanto ao sexo foi significativa, mas irrelevante; enquanto que a idade não influi sobre os resultados.

Em 2001, Petrungaro publicou artigo onde demonstrou a utilização de plasma rico em plaquetas na aceleração da maturação de tecidos periodontais nas cirurgias. Mostrou que o uso do PRP poderia reduzir a incidência de complicações, reduzir a dor e diminuir o tempo total de reparação.

Em 2002, Tischler demonstrou o uso de uma máquina automática para obtenção de plasma rico em plaquetas denominada "SmartPrep". A máquina permite um uso seguro e fechado do PRP, mas tem como limitador o custo operacional da mesma.

Ainda em 2002, Lekovic et al. publicaram um trabalho onde compararam a utilização de PRP adicionado a osso bovino desmineralizado com ou sem a utilização de barreiras de PTFE. Os resultados mostraram que ambos os métodos são efetivos no tratamento dos pacientes, mas que o uso de regeneração guiada associada ao osso e ao PRP parece ser um pouco mais promissor. Os autores ressaltaram a necessidade de estudar o uso de PRP e osso bovino isolados.

Utilizando PRP associado a osso desmineralizado bovino em comparação a osso autógeno, Froum et al. (2002) demonstraram que ocorre um aumento significativo no crescimento de tecido ósseo em defeitos ósseos enxertados com a mistura de PRP e osso autógeno. Os seios maxilares onde o PRP foi adicionado ao osso bovino não apresentaram diferenças significativas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Animais:

Foram utilizados no presente trabalho 08 (oito) cães da raça Beagle provenientes do canil do UNITOX – UNISA, com controle de linhagem e origem segundo padrões de experimentação. Não houve seleção de sexo, sendo que todos os cães eram adultos jovens.

Os cães foram mantidos em canis individuais sob supervisão veterinária e receberam dieta de acordo com a fase da pesquisa e água “ad-libitum”.

Medicamentos:

Os seguintes medicamentos foram utilizados:

Sulfato de atropina (0,04mg/kg)

Acepromazina 2% (0,1mg/kg)

Tiopental (12,5 mg/kg)

Lidocaina 3%

Baytril 500 mg – Bayer Brasil

Trombina bovina tópica 1.000 US –USA

Cloreto de cálcio 10%

Solução de cloreto de sódio a 0,9% (soro fisiológico)

Materiais para coleta de sangue e cirúrgicos:

Para a coleta de sangue foi utilizado o sistema Vacuntainer® composto por suporte agulhado e tubos de 4,5ml contendo citrato de sódio (3,2%) tamponado.

Tubos limpos e estéreis, suporte-gradil, pipetas graduadas e seringas do tipo Luer com agulhas descartáveis, também foram utilizadas.

Para os procedimentos cirúrgicos foram utilizados os materiais de rotina a prática da Cirurgia Buco Maxilo Facial, conforme descritos nos métodos.

Métodos:**Anestesia geral:**

A conduta anestésica dos cães deste estudo foi realizada segundo protocolos veterinários de anestesia, para garantia de uma perfeita analgesia, sedação e tranquilidade no manuseio dos animais. Os animais foram todos pesados para o cálculo de dosagem de drogas e submetidos a jejum alimentar de doze horas, no dia anterior ao da cirurgia, sendo submetidos a exames clínicos no momento anterior à aplicação da medicação pré-anestésica. Na anestesia geral foram utilizados, por via endovenosa, o sulfato de atropina (0,04 mg/kg). Por via intramuscular a acepromazina 2% (0,1 mg/kg) e o tiopental (12,5 mg/kg), também por via endovenosa. Foi colocado um cateter nº 22 na veia cefálica para manutenção e controle de fármacos durante o ato operatório, bem como manter a hidratação e volemia do animal com a infusão de soro fisiológico (fig. 1).

Os cães foram acompanhados pela equipe de veterinários do UNITOX, responsável pelo canil, durante os atos cirúrgicos. Foram também anestesiados localmente com Lidocaina a 3% com adrenalina na proporção de 1: 50.000 (fig. 2) e preparados com assepsia, anti-sepsia intra e extrabucal e colocação de campos estéreis



Figura 1- Cão Beagle criado exclusivamente para pesquisas experimentais no UNITOX. O cão já recebeu a medicação pré-anestésica.



Figura 2 – Anestesia local com Lidocaina a 3%, com a finalidade de supressão total da dor operatória.

Cirurgia preparatória: remoção dos elementos dentários (pré-molares)

Na primeira etapa foram extraídos os dentes bilateralmente na região de pré-molares, através do seccionamento das coroas e separação das raízes com motor cirúrgico, fórceps e extratores (Fig.3,4). Os alvéolos foram suturados com fios reabsorvíveis (Vicryl 3-0) (Fig.5). Os dentes restantes da mandíbula, de forma bilateral, foram preservados.

Aguardaram-se 42 dias para que houvesse a total reparação óssea da região desdentada (Fig.6).

Obtenção do plasma rico em plaquetas:

Após o período de 42 dias os cães, foram novamente anestesiados, conforme técnica descrita, para a coleta de sangue e posterior cirurgia experimental.

Coleta de sangue:

Através da punção da veia jugular do animal, o sangue periférico foi coletado utilizando-se 4 tubos de vácuo (Vacutainer®) de 4,5 ml, estéreis, contendo 0,5ml de citrato de sódio tamponado (3,2%).

Os tubos com sangue foram homogeneizados e enviados para processamento em uma centrífuga da marca Fanem modelo 260 microprocessada, conforme descrito por Rossi Jr, Leme e Píspico (2001). (Fig.7)

Obtenção do P.R.P.: os tubos de citrato contendo o sangue colhido foram centrifugados a 800 rpm por 10 minutos, separando por camadas as células sanguíneas e o plasma (Fig.8). O P.R.P. foi então pipetado e acondicionado em um tubo de 4,5ml estéril (tubo coletor). Desta maneira pode-se obter aproximadamente 1,5ml de P.R.P. em cada tubo totalizando aproximadamente 6,0 ml. A seguir, 1,0 ml da zona de névoa (0,2 ml de cada tubo) é pipetado e adicionado ao tubo coletor. Esta porção possui plaquetas mais velhas e hemácias que permitem a obtenção de um gel de plaquetas mais consistente.

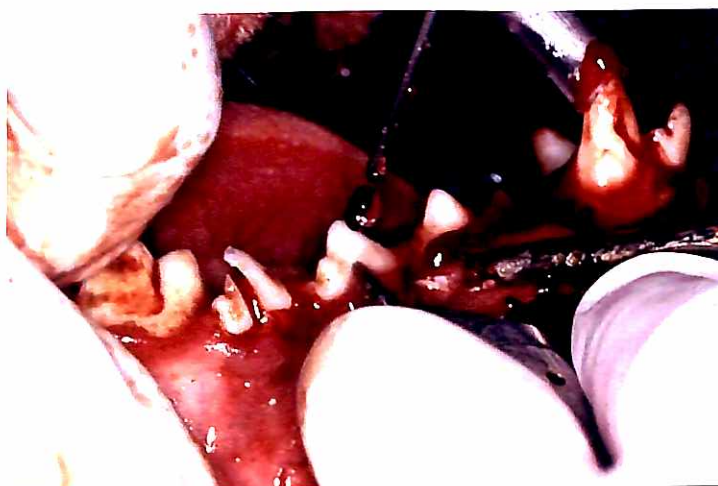


Figura 3- Odontosecção que permitiu a remoção dos elementos dentais sem trauma às taboas ósseas ou perda óssea importante.

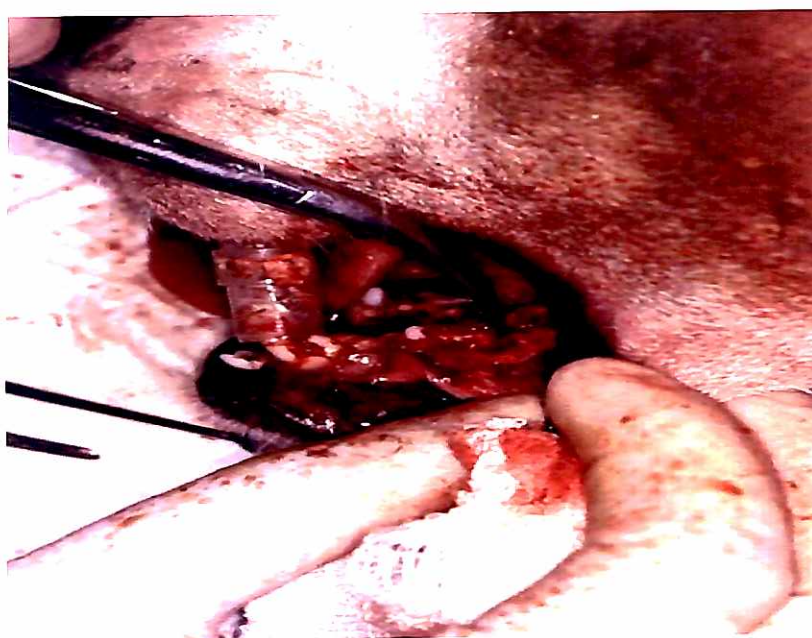


Figura 4- Exodontia com fórceps com a mesma finalidade.



Figura 5- Sutura com fios reabsorvíveis para facilitar o pós-operatório dos animais.



Figura 6- Aspecto da área após os 42 dias de reparação tecidual.



Figura 7- Centrifuga Fanem 260 microprocessada utilizada no experimento. Observar o sistema de tubos a vácuo e os coletores.



Figura 8— O material obtido após a centrifugação: o plasma rico em plaquetas encontra-se na porção superior do tubo, acima das células vermelhas. A zona de névoa o separa das demais células.



Figura 9 – A solução de trombina e cloreto de cálcio é adicionada para obtenção do gel de PRP.



Figura 10 – O gel de PRP obtido. Observar a consistência no interior do tubo.

Preparação das cavidades ósseas:

Após o período de reparo de 42 dias, uma incisão crestal entre os elementos restantes foi efetuada. Duas incisões de alívio (relaxantes), uma na mesial do primeiro molar e outra na distal do canino proporcionaram o deslocamento do retalho mucoperióstico expondo o tecido ósseo mandibular do animal (Fig11). Foram feitas quatro osteotomias circulares com trefinas de 3 mm de diâmetro e profundidade de 4 mm, distando 3 mm entre elas, sob intensa irrigação com soro fisiológico resfriado, para evitar aquecimento (Fig.12,13). O procedimento foi repedido em ambos os lados da mandíbula totalizando oito osteotomias para cada animal.

Preenchimento das cavidades cirúrgicas:

As osteotomias próximas aos molares foram preenchidas com coágulo sangüíneo normal. As osteotomias restantes foram preenchidas com o gel de plasma rico em plaquetas (PRP) (Fig.14), obtido, com a adição de 1 ml de uma solução contendo 2 ml de trombina bovina tópica e 1 ml de cloreto de cálcio 10%. (Fig. 9,10)

Na seqüência, o retalho foi reposicionado e suturado com fio reabsorvível (Vicryl 3.0), tendo os animais recebido por via endovenosa, penicilina cristalina na dose de 5 mg/kg de peso corpóreo (Baytril 500 mg) que foi mantida por cinco dias (uma dose diária). Como medicação analgésica foram aplicados 2cc de Dipirona por via intramuscular (dose única). Durante uma semana receberam ração pastosa, para evitar traumatismos na área operada e água à vontade. Após este período, os pontos foram retirados e a alimentação voltou a ser a normal do canil (seca).

Obtenção dos espécimens para estudo:

Nos tempos de sete, 14, 28 e 42 dias, dois animais foram novamente operados bilateralmente para remoção dos blocos ósseos (Fig.15).

Os blocos foram retirados por osteotomia, distando 3 mm da borda das cavidades experimentais, com o auxílio de fresas, serra e cinzéis (Fig.16,17). Durante o ato cirúrgico foram preservadas toda inervação e irrigação intramandibular do cão.

No local da osteotomia foi colocado novamente o plasma rico em plaquetas, conforme técnica acima descrita sendo a área suturada com fio reabsorvível (Vicryl 3-0). Os cães não foram sacrificados.

Processamento do material obtido:

Os blocos ósseos removidos foram fixados em formol tamponado por um mês e processados por descalcificação em edta, posterior diafanização e inclusão em parafina.

Foram feitos cinco cortes de cinco micra em cada bloco e as lâminas obtidas foram coradas como rotina para hematoxilina e eosina.

Os espécimens obtidos foram estudados em microscópio óptico comum nos aumentos de 100, 200, 400 e 600 vezes. As áreas significativas para cada tempo experimental foram fotografadas em um fotomicroscópio "Olympus" digital e impressas.



Figura 11- Reintervenção na área para confecção das cavidades ósseas.

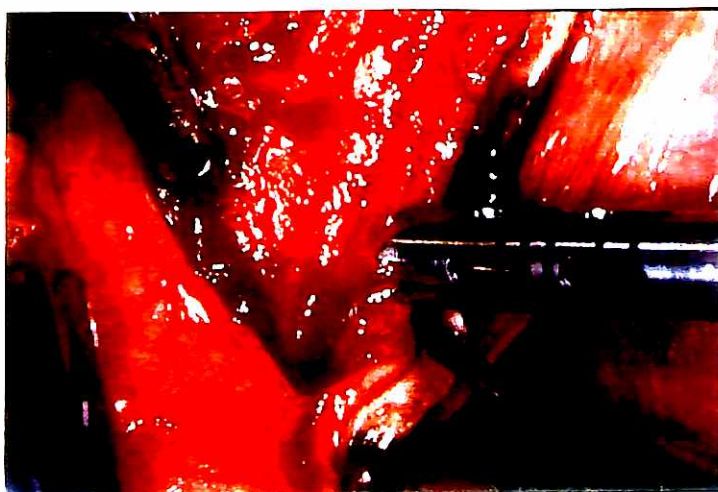


Figura 12- Utilização das trefinas pra a confecção de cavidades com as mesmas proporções.



Figura 13- Cavidades confeccionadas. Observar a distância entre as lojas ósseas.



Figura 14- As cavidades foram preenchidas da seguinte maneira: 1- com coágulo normal e 2-3-4 com P.R.P.



Figura 15- Reintervenção para coleta dos blocos ósseos.



Figura 16– A osteotomia para a remoção do bloco respeitando a inervação do animal.



Figura 17- Bloco ósseo obtido. Os blocos foram aparados e fixados em formalina tamponada durante 30 dias.

RESULTADOS

Os espécimes estudados sob a microscopia ótica convencional, exibiram os seguintes resultados:

No tempo de sete dias pudemos observar uma diferença entre os espécimes onde a cavidade foi preenchida somente com coágulo em relação aos espécimes onde a cavidade foi preenchida com PRP.

Coágulo: No aumento de 100x pudemos observar a presença de trabéculas ósseas imaturas, em formação nas regiões próximas da parede óssea da cavidade. Estas trabéculas exibiam, ao maior aumento, inúmeros osteoblastos jovens e pequeno teor de mineralização. Nas demais regiões um tecido composto por monócitos, macrófagos e fibroblastos era predominante. (figuras 18 e 19)

PRP: Ao aumento de 100x pudemos observar a presença de maior número de trabéculas nas áreas próximas aos limites da cavidade óssea. Quando observadas com um aumento maior tais trabéculas mostravam-se mais definidas e exibiam maior número de osteoblastos, além de alguns osteócitos em seu interior. (figuras 20 e 21)

Aos 14 dias de experimentação os espécimes mostraram ainda uma diferença significativa com respeito à maturação do tecido ósseo encontrado.

Coágulo: No aumento de 100x, a formação de um maior e mais organizado número de trabéculas pode ser observado. As trabéculas eram, entretanto, pouco definidas e exibiam ao maior aumento a presença de osteoblastos em seus limites além de osteócitos em seu interior. A mineralização mostrou-se semelhante à obtida em reparos ósseos normais neste tempo experimental. (figuras 22 e 23)

PRP: Os espécimes obtidos com o uso de plasma rico em plaquetas exibiram, neste tempo experimental, uma maior e mais organizada formação de trabéculas ósseas (100x). A observação destas trabéculas em aumento maior mostrou uma melhor definição das mesmas, que exibiam maior mineralização, linhas de aposição e um grande número de células ósseas. (figuras 24 e 25)

No tempo experimental de 28 dias os espécimes mostraram pouca diferença na quantidade de osso neoformado, entretanto a qualidade encontrada nos dois grupos diferiu, mostrando osso de melhor qualidade.

Coágulo: Observados ao aumento de 100x, os espécimes de coágulo mostraram uma arquitetura compatível com o tempo experimental, caracterizada por trabéculas bem definidas, porém pouco confluentes e interligadas. Poucas linhas de aposição e reabsorção foram vistas nos espécimes observados (400x). (figuras 26 e 27)

PRP: Os espécimes com P.R.P. mostraram, ao aumento de 100x, a formação de um osso jovem e desorganizado mostrando, entretanto, trabéculas mais mineralizadas e confluentes. (figura 28)

Ao aumento de 400x, pudemos observar as linhas de aposição e reabsorção mais evidentes nestes espécimes, o que caracteriza um início de remodelação e modelação ósseas. (figura 29)

Finalmente aos 42 dias, tempo de reparo ósseo das fraturas nos cães, constatamos que a diferença entre os espécimes dos dois grupos se tomou quantitativa e qualitativa.

Coágulo: Ao aumento de 100x os espécimes mostraram um total preenchimento da cavidade óssea por osso neoformado (figura 30). As trabéculas ósseas se mostravam bem definidas e exibindo linhas de aposição e reabsorção características da fisiologia óssea normal. Ao maior aumento (400x) os osteoplastos preenchidos por osteócitos e as linhas de aposição óssea puderam ser evidenciados. O quadro histológico era compatível com o tempo de reparo ósseo do animal. (figura 31)

PRP: A quantidade de trabéculas e seu maior volume puderam ser evidenciados nas cavidades ósseas preenchidas por PRP. As linhas de aposição e remodelação óssea eram evidentes, bem como o maior grau de organização do tecido ósseo. Mesmo não se tratando de um estudo quantitativo (morfométrico) foi fácil observar uma melhor e mais consistente formação óssea neste grupo. (figuras 32 e 33)

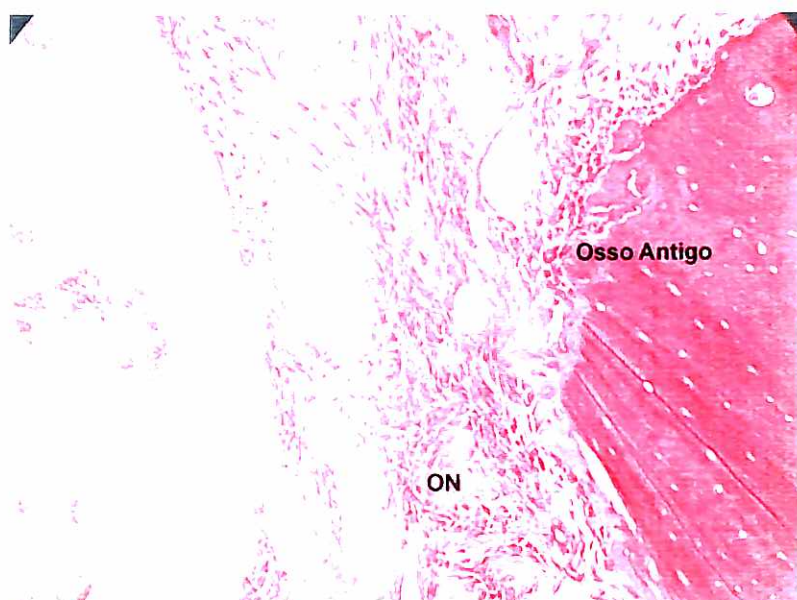


Figura 18- Corte de espécimen de coágulo com sete dias (100x). Observar a formação de osso neoformado (ON) exibindo trabéculas não definidas e inúmeros osteoblastos.

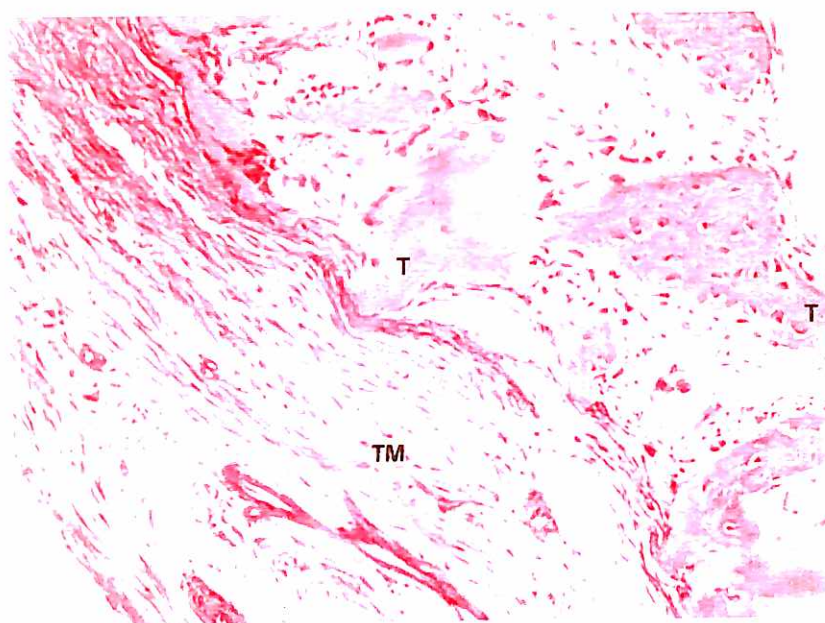


Figura 19 - Corte de espécimen de coágulo com sete dias (400x). Observar a uma trabécula óssea (T) neoformada pouco definida exibindo inúmeros osteoblastos ao redor. O tecido mesenquimal (TM) predomina.

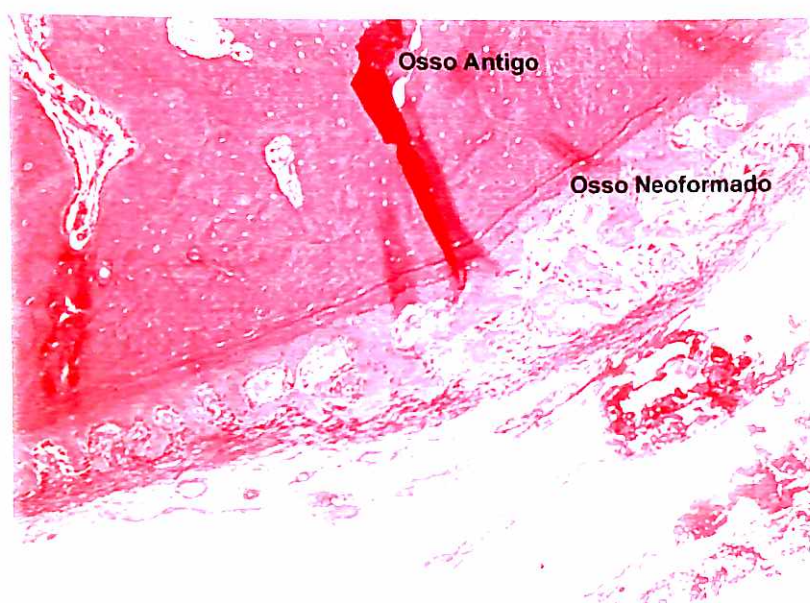


Figura 20 - Corte de espécimen de P.R.P. com sete dias (100x). Observar a formação de osso neoformado exibindo trabéculas bem delimitadas e inúmeros osteoblastos.

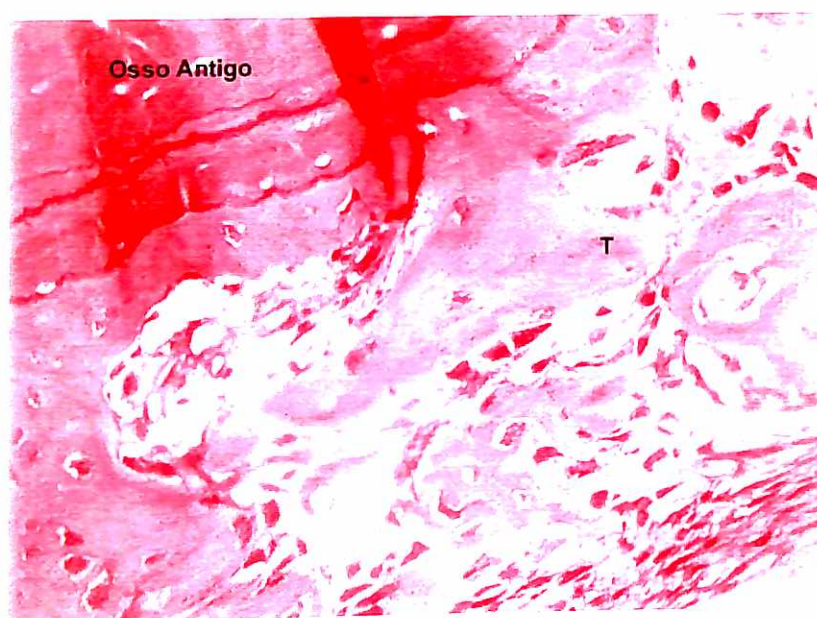


Figura 21 - Corte de espécimen de P.R.P. com sete dias (400x). Observar a uma trabécula óssea (T) neoformada exibindo inúmeros osteoblastos ao redor e alguns osteócitos no interior.

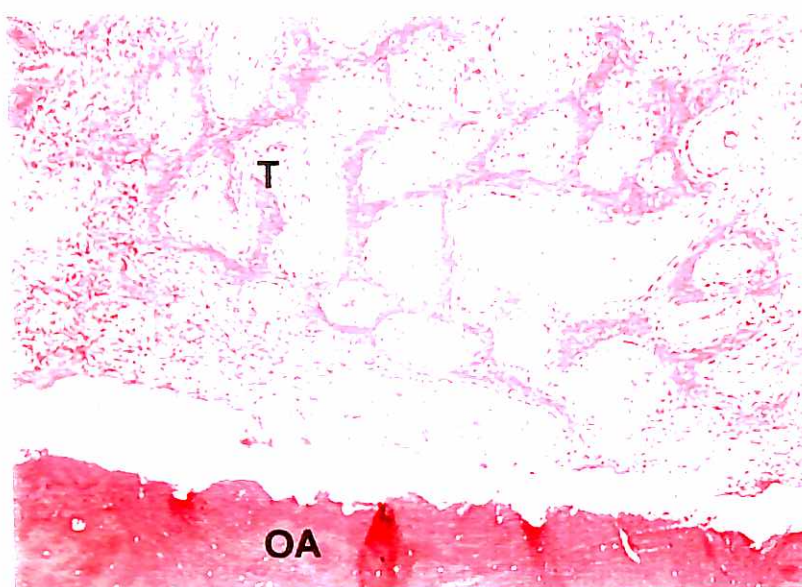


Figura 22- Corte de espécimen de coágulo com quatorze dias (100x). Observar a formação de trabéculas ósseas imaturas (T). O osso antigo é também observado (OA).

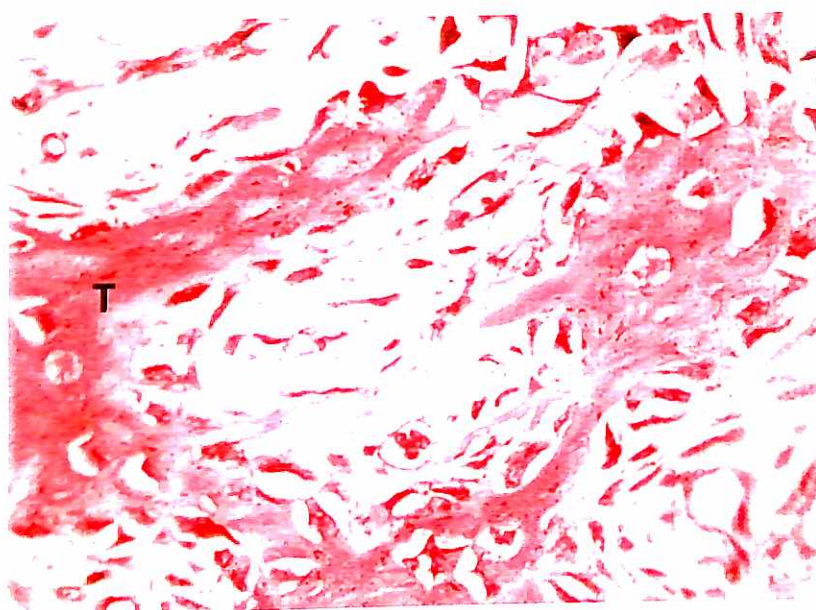


Figura 23 - Corte de espécimen de coágulo com quatorze dias (400x). Observar uma trabécula óssea (T) neoformada não definida exibindo inúmeros osteoblastos ao redor.

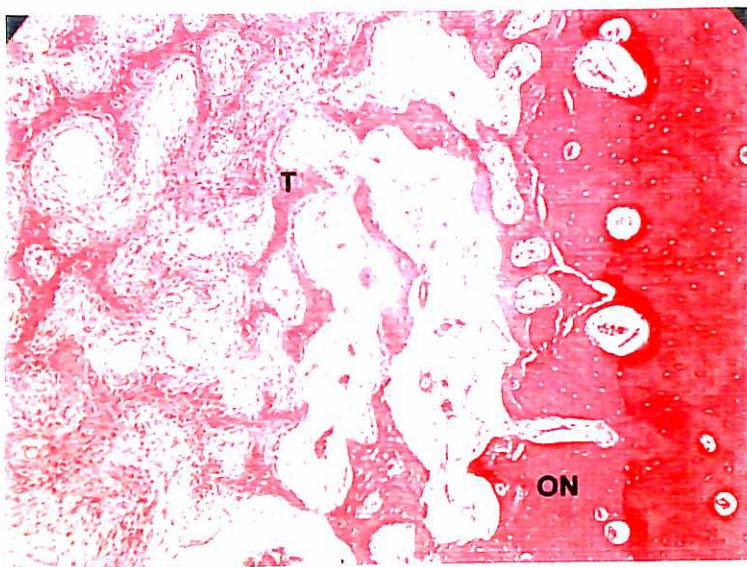


Figura 24- Corte de espécimen de PRP com quatorze dias (100x). Observar a formação de trabéculas ósseas bem definidas. O osso neoformado é também observado (ON).

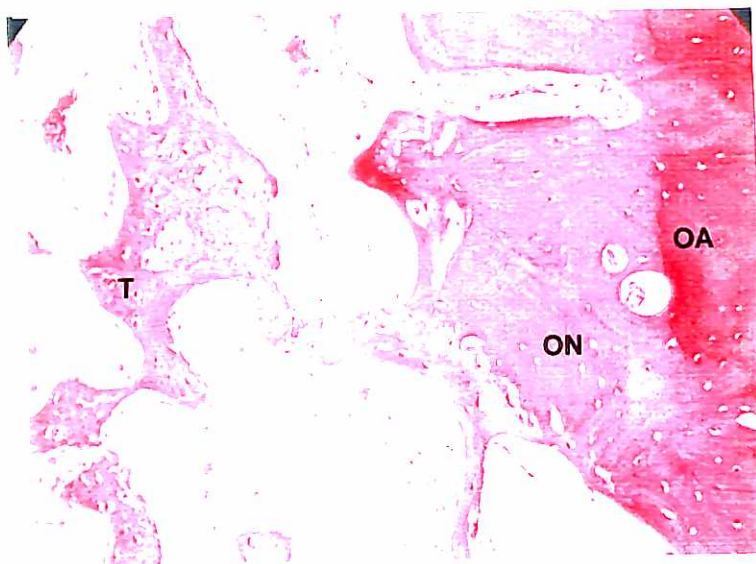


Figura 25 - Corte de espécimen de PRP com quatorze dias (400x). Observar uma trabécula óssea (T) neoformada bem definida exibindo inúmeros osteoblastos e osteócitos. O osso antigo é também observado (OA) bem como o osso neoformado (ON).

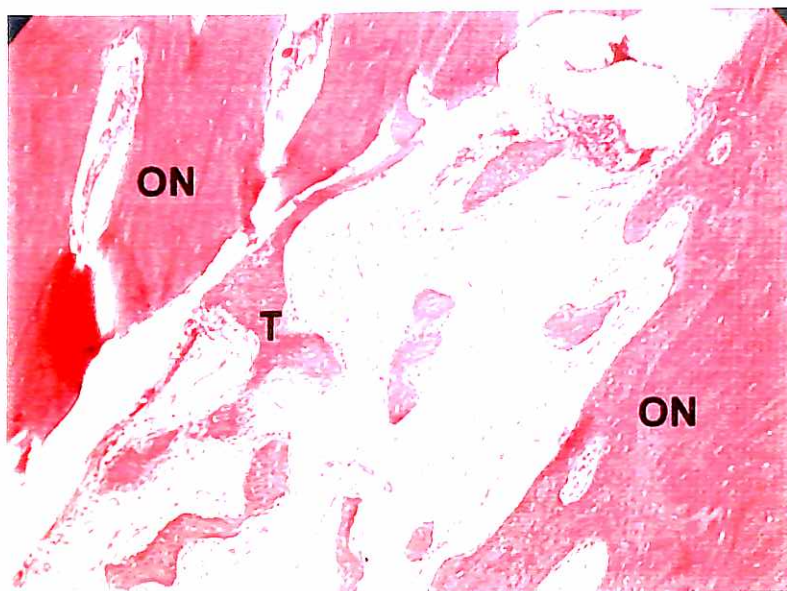


Figura 26- Corte de espécimen de coágulo com vinte e oito dias (100x). Observar a formação de trabéculas ósseas bem definidas. As trabéculas não são confluentes ou interligadas. O osso normal é também observado (ON).

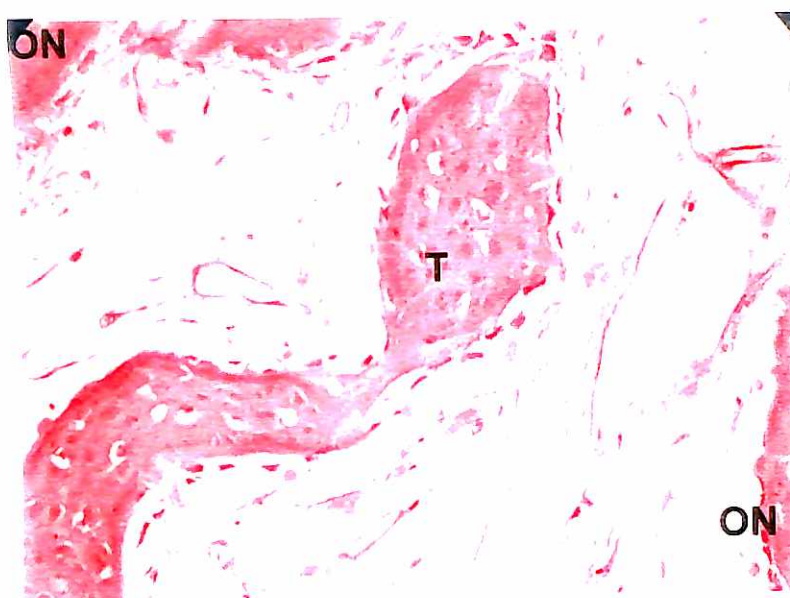


Figura 27 - Corte de espécimen de coágulo com vinte e oito dias (400x). Observar uma trabécula óssea (T) neoformada bem definida exibindo inúmeros osteoblastos ao redor e osteócitos no interior. O osso antigo é também observado (ON).

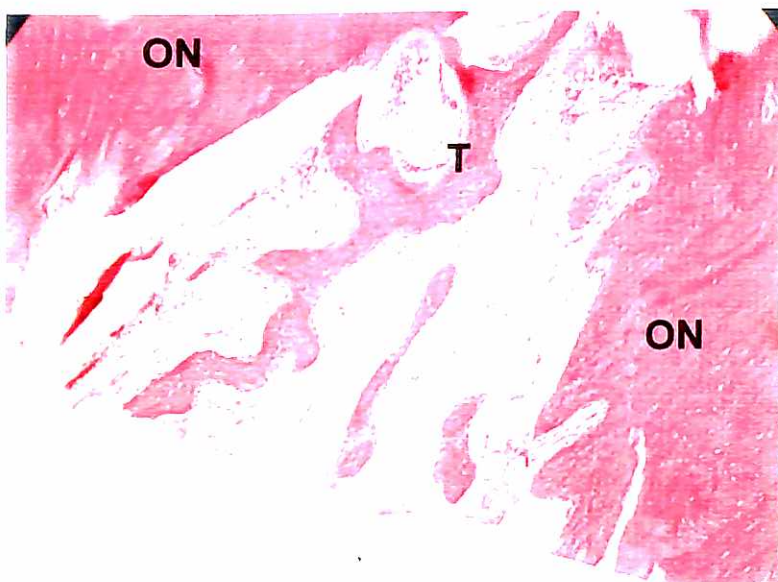


Figura 28- Corte de espécimen de PRP com vinte e oito dias (100x). Observar a formação de trabéculas ósseas bem definidas. As trabéculas são confluentes e interligadas. O osso normal é também observado (ON).

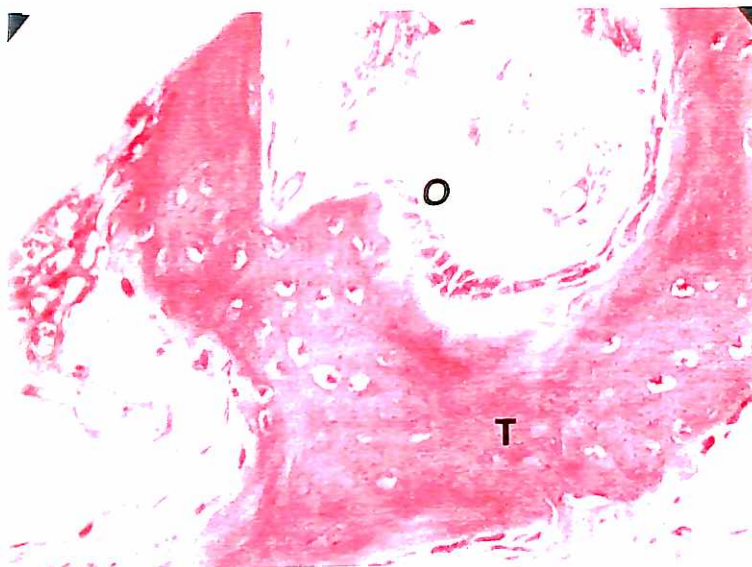


Figura 29 - Corte de espécimen de PRP com vinte e oito dias (400x). Observar uma trabécula óssea (T) neoformada bem definida exibindo inúmeros osteoblastos (O) ao redor e osteócitos no interior.

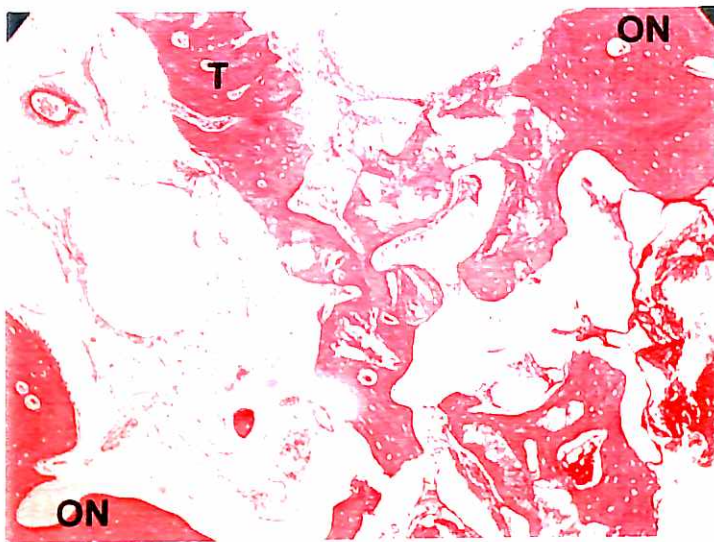


Figura 30- Corte de espécimen de coágulo com quarenta e dois dias (100x). Observar a formação de trabéculas ósseas maduras. O osso formado exibe linhas de aposição e reabsorção caracterizando remodelação.

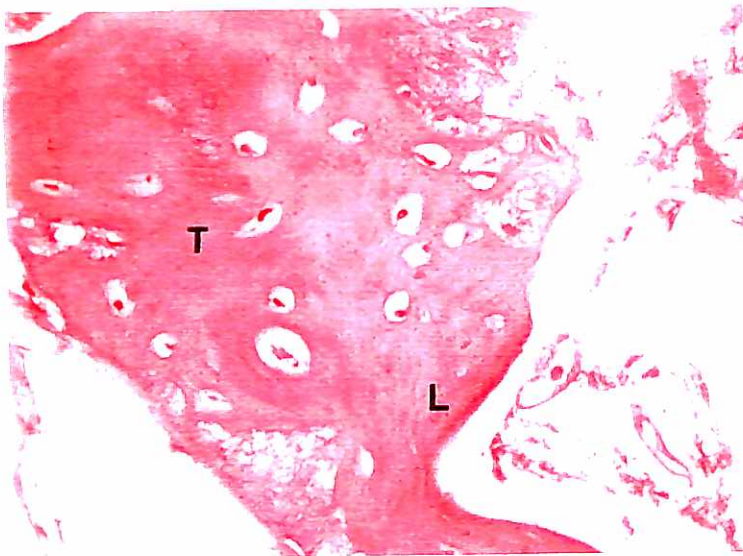


Figura 31 - Corte de espécimen de coágulo com quarenta e dois dias (400x). Observar as linhas de aposição e reabsorção que caracterizam a remodelação óssea (L).

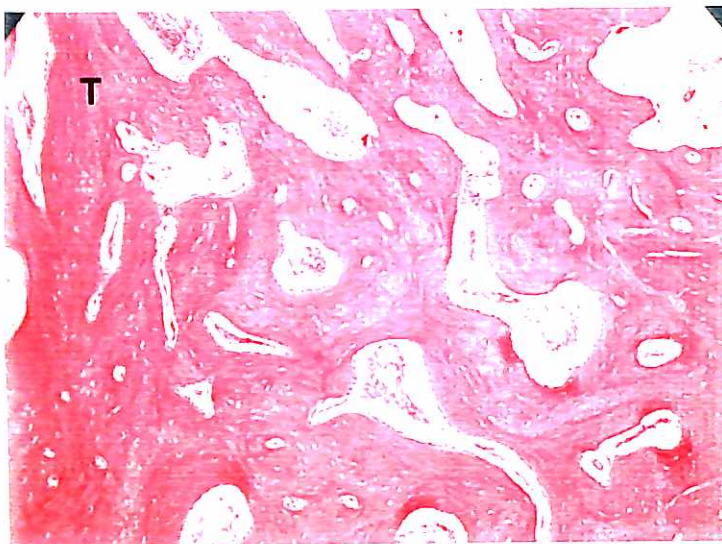


Figura 32- Corte de espécimen de PRP com quarenta e dois dias (100x). Observar a formação de trabéculas ósseas densas. O osso formado exibe linhas de aposição e reabsorção caracterizando remodelação.

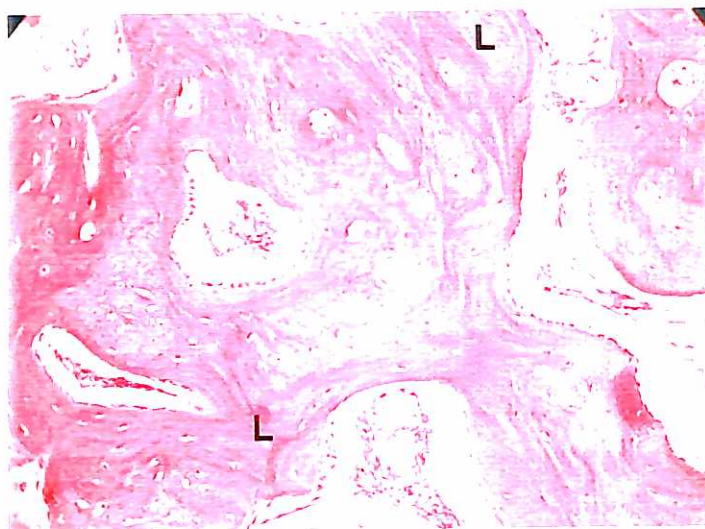


Figura 33 - Corte de espécimen de PRP com quarenta e dois dias (400x). Observar as linhas de aposição e reabsorção (L) que caracterizam a remodelação óssea.

DISCUSSÃO

A utilização de enxertos ósseos na maxila e mandíbula tem sido largamente preconizada em Implantodontia. Estes enxertos visam corrigir a anatomia dos rebordos, aumentar sua altura e espessura permitindo a colocação posterior de implantes osseointegrados. Em alguns casos, os enxertos são efetuados concomitantemente a colocação dos implantes.

Em ambas situações, fica claro que o sucesso destes enxertos é fundamental para a execução do tratamento, o que torna a seleção do material e da técnica uma tarefa cuidadosa.

Para tanto, o implantodontista deve conhecer a fundo os materiais disponíveis e suas técnicas de utilização para que possa utilizar as melhores opções no momento.

Nas últimas duas décadas, os pesquisadores têm trabalhado na procura e obtenção de diferentes materiais para enxertos, bem como técnicas de utilização dos mesmos, visando proporcionar ao clínico, soluções mais seguras e efetivas.

Nesta linha de trabalho, muitos centros de pesquisa, têm trabalhado o processo de reparação óssea, visando melhorar seus fenômenos, de maneira a permitir uma reparação óssea otimizada, que aumente o ganho de tecido ósseo onde for necessário.

Modelo de reparação óssea nos enxertos

As células osteocompetentes das áreas doadoras de osso, tanto do ilíaco como do platô da tíbia, compreende osteoblastos da população de células tronco da medula esponjosa (Axhausen, 1956; Friedenstein et al. 1966; Gray e Elves 1982; Caplan 1994). O próprio enxerto contém células osteocompetentes e ilhas de osso esponjoso

mineralizado, coágulo sanguíneo, fibrina e plaquetas dentro do coágulo. Os osteoblastos do endóstio e as células tronco medulares sobrevivem bem nos três a cinco dias iniciais, por causa da sua posição superficial e sua habilidade de absorver nutrientes dos tecidos receptores. Os osteócitos dentro do osso esponjoso mineralizado, morrem devido ao seu revestimento mineralizado, que serve como uma barreira ao aporte nutricional.

O aumento do gradiente de oxigênio entre o enxerto e o tecido adjacente ativa a quimiotaxia dos macrófagos que, por sua vez, estimula os macrófagos a secretarem o fator de angiogênese derivado do macrófago (MDAF) e o fator de crescimento derivado do macrófago (MDGF). Dentro do enxerto, as plaquetas se enredam na degranulação do coágulo dentro de algumas horas da colocação do enxerto, liberando o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF). Então, as propriedades inerentes da ferida (particularmente o gradiente de oxigênio e o PDGF) iniciam rapidamente a angiogênese dos capilares adjacentes e a mitogênese das células osteocompetentes transferidas (KNIGHTON et al., 1981). Por volta do 3º dia, podem ser vistos novos capilares brotando dos capilares existentes do lado externo do enxerto. Eles penetram o enxerto e se proliferam na rede de osso esponjoso para formar uma rede completa por volta do 10º ao 14º dia. Como estes capilares respondem pelo gradiente de oxigênio, eles efetivamente reduzem o gradiente de oxigênio quando perfundem o enxerto, assim criando um mecanismo de fechamento para prevenir uma angiogênese excessiva (KNIGHTON et al., 1981).

Embora o PDGF pareça ser o mensageiro mais adiantado para estimular a formação precoce do osteóide, isto é provavelmente substituído pelo MDGF e outros estimuladores do tecido mesenquimal da família do fator transformador beta de crescimento (TGF- β). Durante o 3º e o 7º dias iniciais, a população das células de base e os osteoblastos do endóstio produzem somente uma pequena quantidade de osteóide. Porém, desde que a rede vascular seja estabelecida, a produção de osteóide acelera, provavelmente devido ao oxigênio e nutrientes viáveis. A formação inicial do osteóide se desenvolve na superfície da trabécula esponjosa mineralizada dos osteoblastos do endóstio. Logo depois, ilhas individuais de osteóide se desenvolvem entre as trabéculas do osso esponjoso, provavelmente das células de base transferidas

para o enxerto. Uma terceira fonte de produção de osteóide se desenvolve das células tronco circulantes (monócitos) que são também atraídas para o meio bioquímico da ferida (CAPLAN, 1994). Acredita-se que estas células tronco se inoculam dentro do enxerto, onde proliferam e contribuem para a produção do osteóide.

Durante as semanas iniciais, esta fase celular e bioquímica da regeneração óssea procede para a consolidação clínica do enxerto pela coalescência das ilhas de osteóide, dos osteóides da superfície das trabéculas esponjosas, e do osso hospedeiro. Este processo, que usa a rede de fibrina do enxerto como uma armação, é usualmente referido como uma osteocondução que provê um patamar chamado de “substituição rastejante”, mas o sensato seria “formação rastejante”. Isto significa dizer que, normalmente as células não móveis (como os osteoblastos) podem ter até certo ponto mobilidade pelo processo de endocitose ao longo da fibrina como um patamar. O processo de endocitose é simplesmente a transferência da membrana celular pela borda retirada da célula, através do citoplasma de uma vesícula que avança a borda para corrigir a membrana celular. Este mecanismo lentamente avança a célula e permite a secreção de seu produto no processo. Neste caso, o produto é o osteóide sobre a rede de fibrina. Esta regeneração celular é freqüentemente referida como regeneração óssea Fase I (AXHAUSEN, 1956). Após um tempo de quatro a seis semanas, ocorre suficiente produção e mineralização do osteóide que permite a função do enxerto. Neste estágio, o osso formado sem a fase condroblástica, parece histologicamente com um osso com células sem um padrão, a qual é denominado de “osso não lamelar ou reticulado”. (MARX, 1994)

Como a quantidade de osso formado durante a Fase I depende da quantidade das células osteocompetentes, áreas doadoras com mais osso trabecular esponjoso devem ser escolhidas. Em ordem de grau, nós encontramos íliaco posterior e anterior, platô da tíbia, cabeça do fêmur, e sínfise mandibular para serem áreas doadoras em potencial, com áreas maiores de osso esponjoso do que a calvária, costela ou fibula (MARX, 1994). Além disto, o aumento da produção óssea da Fase I pode também ser conseguida pela compactação do material do enxerto. Tecnicamente, isto é conseguido com um triturador de osso, seguido por uma compactação em uma seringa, ou então

compactado também dentro do local do enxerto usando os instrumentos de preenchimento ósseo.

A regeneração que ocorre na Fase I produz um osso não lamelar desorganizado que é estruturalmente sadio, mas não a ponto de um osso maduro. Este osso sofrerá uma reabsorção obrigatoriamente e a substituição pela remodelação. Eventualmente, é substituído pelo osso da Fase II que é menos celular, mais mineralizado, e estruturalmente mais organizado (AXHAUSEN, 1956; MARX, 1994). A teoria é que estes osteoclastos reabsorvem o osso da Fase I em um ciclo normal de remodelação e substituição. Tanto no osso da Fase I, como no osso trabecular esponjoso original não viável, quando são reabsorvidos, o BMP é liberado. As células tronco no enxerto original e as novas células que chegam dos tecidos locais e da circulação, respondem pela diferenciação osteoblástica e a formação de novo osso. Este novo osso se forma assim que os maxilares e os enxertos estão em função. Ele responde às demandas recebidas e desenvolve sistemas harvesianos maduros e osso lamelar capaz de resistirem às forças normais de cisalhamento recebidas nos maxilares através das funções de abertura e fechamento. O osso é capaz de tolerar as típicas forças de compressão das dentaduras e próteses sobre implantes em função. Histologicamente, tais enxertos introduzem em longo prazo uma consistente remodelação com "turnover" esquelético normal. Um perióstio e um endóstio se desenvolvem com parte desta remodelação em longo prazo. A cortical do enxerto nunca se forma tão fina quanto a do maxilar e o enxerto por si só, mantém um padrão trabecular esponjoso denso. Este padrão é muito vantajoso para se promover a osseointegração e é muito adaptável a uma variedade de estresses funcionais. Após vários anos, o enxerto toma a morfologia radiográfica de contornos corticais de uma mandíbula ou maxila.

Fatores de crescimento e morfogênese

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.

Composto por um grupo de polipeptídios, os fatores de crescimento formam um grupo de mediadores biológicos que regulam eventos celulares importantes no reparo dos tecidos, proliferação de células incluindo diferenciação, quimiotaxia e formação de matriz.

Muitos estudos em vivo e "in vitro" avaliaram os efeitos destes polipeptídios na formação de osso. Fatores de crescimento e fatores de diferenciação achados nos ossos incluem PDGF, TGF, fator de crescimento de fibroblastos básico (FGF), IGF, e BMPs.

Matriz extracelular

A matriz extracelular do osso é um reservatório multifatorial para os fatores de crescimento que regulam a função das células do osso. Os fatores de crescimento encontrados na matriz extracelular do osso são mediadores moleculares potenciais de diferenciação, manutenção, e reparação óssea (RIPAMONTI e REDDI, 1992).

Fator de crescimento semelhante à insulina

IGF-I e IGF-II são encontrados em grandes quantidades no tecido ósseo. Na matriz de osso, IGF-II é o fator de crescimento mais abundante (MOHAN e BAYLINK, 1991).

Produzido por osteoblastos, IGF-I estimula a formação de osso por proliferação celular, induzindo diferenciação e a biosíntese do colágeno. Altas quantidades de IGF-I são sintetizadas por osteoblastos na formação do tecido ósseo. (LYNCH et al., 1991b)

Os efeitos "in vitro" (ex., promovendo quimiotaxia de osteoblastos) de IGF-I e IGF-II são semelhantes. Porém, foi achado que IGF-II não é tão potente quanto IGF-I no processo de formação de osso. Foi encontrado, entretanto, que a combinação de IGF-I e ou IGF II com outros fatores de crescimento, pode aumentar o processo de ossificação no reparo. (LYNCH et al., 1991a)

Combinação de PDGF e IGF

Foi avaliada a combinação de PDGF e IGF em estudos de regeneração óssea. Dados de um estudo efetuado por Lynch et al. (1991a) mostraram que quando tecidos

periodontais que foram expostos em curto prazo, a uma combinação de PDGF-B recombinante humano e IGF-I, resultaram em regeneração do osso. Neste estudo, aproximadamente 80 ng (menos que 4%) dos fatores de crescimento ficaram presentes por mais de 96 horas depois da aplicação. Quatro semanas depois de aplicação dos fatores de crescimento, uma regeneração óssea aumentada foi observada. Comparado com locais de controle que receberam um gel placebo, houve de cinco a dez vezes de aumento na formação de osso novo nos locais tratados com a combinação de PDGF-B e IGF-I nas duas a cinco semanas depois das aplicações (LYNCH et al., 1991a).

Outro estudo efetuado por Lynch et al. (1991b), avaliou a habilidade da combinação de PDGF-B/IGF-I em vivo de promover regeneração de osso ao redor de implantes. Resultados mostraram que aos sete dias, os implantes, tratados com a combinação de fator de crescimento, tiveram uma maior porcentagem de contato de osso-implante, que os implantes tratados com placebo ou implantes não tratados. Este achado sugere que integração mais rápida pode acontecer com o uso de PDGF-B e IGF-I. Isto é um achado importante, porque a imobilidade do implante durante as fases iniciais do reparo, é fundamental para a estabilidade secundária do implante e assegurar sucesso do tratamento. A combinação de PDGF-B e IGF-I aumenta o crescimento de osso nos espaços perimplantares; portanto, o uso desta combinação de fatores de crescimento é positiva e pode melhorar a estabilidade de um implante colocado em osso esponjoso. (LYNCH et al., 1991b)

Em um estudo de Becker et al. (1992), a formação de osso cortical adjacente aos implantes, foi aumentada significativamente com o uso de PDGF e IGF-I em adição ao uso de membranas. Os resultados deste estudo mostraram, que os locais tratados com membranas de ePTFE e a combinação de fatores de crescimento, tiveram um maior contato de osso-implante, uma maior quantidade de osso sob a barreira. De acordo com os autores, o uso de membranas pode ter causado retenção física dos fatores de crescimento, e eles foram mantidos em contato maior com os implantes. Os fatores de crescimento também podem ter ligado à capa de óxido de titânio do implante. PDGF pode ter estimulado migração de osteoblastos junto à superfície do implante, pois o PDGF é quimiotático para osteoblastos.

Esta possível diferença na migração de osteoblastos pode ter resultado em uma quantia maior de osso adjacente aos implantes (BECKER et al., 1992).

Um estudo mais recente de Giannobile et al. (1994) discutiram o uso de PDGF e IGF-I em primatas e caninos. Os resultados mostraram que havia uma quantia aumentada de osso nos primatas (21,6%) e caninos (65%) tratados com a combinação de fatores de crescimento comparada com o controle em primatas (8.5%) e caninos (14.5%).

No primeiro estudo em humanos da efetividade do PDGF/IGF em combinação, houve uma diferença estatisticamente significativa entre locais tratados com fatores de crescimento e o controle. O locais tratados com esta combinação de fatores de crescimento tiveram um crescimento de osso de 43.2%, enquanto que o grupo de controle teve apenas 18.5%. (LYNCH et al., 1991b)

A combinação de PDGF e dexametasona também foi estudada. Resultados de um estudo mostraram que esta combinação produziu aumentos significantes em formação de osso novo quatro semanas depois de administração. (LYNCH et al., 1991b)

Fator de crescimento de fibroblastos

São achados FGF ácido e básico na matriz do tecido ósseo. Ambas as formas de FGF estimulam a síntese de DNA e replicação de células em vitro, mas eles diminuem a atividade de fosfatase alcalina e não tem nenhum efeito estimulador direto em osteoblastos maduros.

Ambos os tipos de FGF são estimulantes potentes de angiogênese o que é importante para a invasão vascular do enxerto (LYNCH et al., 1991b).

Fator-b transformador

O termo TGF-b se refere à família de fatores de crescimento e diferenciação que incluem BMPs. TGF-b1 e TGF-b2 que são sintetizados e encontrados em plaquetas, macrófagos, e alguns outros tipos de células. O TGF-b1 e o TGF-b2 afetam fibroblastos, células mesenquimais indiferenciadas, principalmente pré-osteoblastos depois de sua secreção pelas plaquetas degranuladas ou ativamente secretados

através de macrófagos. Os TGF- β 1 e TGF- β 2 atuam nos mecanismos de reparo em longo prazo, e com o passar do tempo na remodelação do osso produzido. Estes fatores de crescimento têm várias funções importantes, quimiotaxia, incluindo a mitogênese dos precursores dos osteoblastos, e a estimulação de osteoblastos na matriz do colágeno de lesão, reparando o osso. O TGF- β 1 e TGF- β 2 promovem a formação de osso sobre as zonas de reabsorção inibindo formação de osteoclastos (MARX et al., 1998).

Em sistemas em desenvolvimento, o TGF- β é um regulador multifatorial do crescimento celular. O TGF- β é muito abundante na matriz extracelular do osso. O TGF- β estimula na matriz do osso a produção de fibronectina, colágeno, e a biosíntese de osteonectina. Também são expressos genes de TGF- β durante o reparo de fraturas de osso em humanos. Por causa de seu pleiotropismo efetua na formação da matriz do osso a reabsorção, como também por sua abundância relativa no osso, o TGF- β também atua na formação óssea. (LYNCH et al., 1991a)

Proteínas morfogenéticas

Até esta data, foram descobertas e publicadas 12 BMPs na literatura. Onze destas BMPs, BMP-2 a BMP-12, estão relacionadas umas com as outras e são classificadas como pertencendo a família de TGF- β por causa de suas seqüências de aminoácidos. Estas BMPs isoladamente iniciam a formação iniciada de osso endocondral. (URIST, 1965)

Quantidades pequenas de BMP nativo estão presentes em osso cortical (aproximadamente 1 a 2 mg de BMP por quilograma de osso cortical) (RILEY et al., 1996).

Muitos grupos isolaram e identificaram BMPs em outros sistemas, dando outros nomes de referência à estas moléculas. O BMP-3 é também conhecido como osteogenina, e BMP-7 e BMP-8 também são chamados de proteína-1 osteogênica (OP-1) e proteína-2 osteogênica (OP-2), respectivamente (REDDI, 1998).

Os BMPs são moléculas pleiotrópicas que são envolvidas na quimiotaxia, mitose, e diferenciação de células mesenquimais no tecido ósseo. Depois da

quimiotaxia de monócitos e células mesenquimais a diferenciação celular acontece. As células mesenquimais proliferam e diferenciam-se em condrócitos que em seguida hipertrofiam-se. Eles sofrem morte celular e são então substituído por osso. O ambiente criado com a presença do BMPs determina o tipo de tecido produzido. Em um local heterotópico, o BMP-3 ou BMP-7 produzem cartilagem. No periodonto, eles produzem cimento, ligamento periodontal, e osso alveolar. Em áreas craniofaciais o BMP-3 e BMP-7 produzem o osso intramembranoso. (REDDI, 1998)

BMP-1

Por causa de sua sequência de aminoácido, BMP-1 não faz parte da família do TGF- β . Esta proteína morfogenética não tem a habilidade para induzir formação de osso. Porém, pode ter algum efeito sinérgico com as outras moléculas de BMP e sua sequência é semelhante ao fator de crescimento epitelial. (LEE, 1997)

BMP-2 Recombinante Humano (rhBMP-2)

Foi demonstrado que o rhBMP-2 têm a habilidade para induzir o sequência completa de ossificação endocondral. A aplicação deste fator de crescimento resulta em indução local de cartilagem, e este tecido é substituído depois por osso e medula óssea. O tempo requerido para acontecer a formação de osso é reduzido quando rhBMP-2 é implantado no local. Foi mostrado também que grandes quantidades de rhBMP-2 resultam na formação simultânea de cartilagem e osso. Estes achados indicam que a rhBMP-2 pode influenciar diretamente o caminho da formação óssea ou o de sequência endocondral. (WOZNEY, 1995)

Usando um modelo com roedores, foi demonstrado que o rhBMP-2 induz uma formação óssea ectópica que é precedida através de cartilagem. Aplicações espécie-cruzadas de rhBMP-2 demonstraram a habilidade de rhBMP-2 para apoiar a reparação de defeitos de tamanhos críticos. Resultados de um estudo de rhBMP-2 em um modelo canino mostraram que uma área extensa de osso pode ser regenerado depois da implantação de rhBMP-2 em bolsas periodontais. (SIGURDSSON et al., 1995)

Outro estudo em modelos caninos avaliou o potencial regenerativo do rhBMIP-2 em defeitos de circunferenciais, horizontais. Os resultados deste estudo mostraram

uma formação de osso novo significativamente maior nos locais tratados com rhBMP-2 comparados com os locais de controle. (KINOSHITA et al., 1997)

Um estudo em ratos mostrou que a aplicação local de rhBMP-2 em áreas com alterações induzidas por irradiação podia evoluir para a cura do osso. Os autores atribuíram o crescimento a possíveis células viáveis remanescentes no campo irradiado. Também é possível que células mesenquimais, de campos próximos da área irradiada, tivessem sido atraídas por quimiotaxia e migrado para a zona de tecido danificado. Os autores concluíram que o sucesso de implante dentais, colocados em mandíbulas reconstruídas, pode ser melhorado com o uso de rhBMP-2, minimizando perda de osso e dos implantes. (KINOSHITA et al., 1997)

BMP-3

O primeiro estudo da aplicação do BMPs em humanos, usando uma única aplicação de BMP-3 (osteogenina), combinou sua aplicação com osso desmineralizado em um modelo de dente incluso. Em alvéolos extraídos de dentes inclusos que receberam BMP-3 e o enxerto, uma quantidade aumentada de osso novo, em formação, foi vista comparado com locais que receberam BMP-3 e colágeno, ou os locais de controle. Porém, locais tratados com o uso combinado de um enxerto de osso e BMP-3 não demonstraram diferenças significantes na formação de osso novo, comparados com locais que receberam apenas o enxerto ósseo. (LYNCH et al., 1991a)

BMP-7

As BMPs mostraram-se como uma promessa no reparo ao redor do implante. Um estudo piloto em primatas avaliou o uso de uma única aplicação de BMP-7 ao redor do alvéolo de extração imediata. Resultados mostraram que há três semanas, foi encontrado um aumento no crescimento do osso, medido histologicamente. (LYNCH et al., 1991b)

Em um modelo utilizando ratos, a implantação subcutânea de OP-1 humano (BMP-7), induziu uma sucessão de eventos celulares, que conduziram à formação de osso novo completamente funcional. Estes achados eram determinados pela atividade específica da fosfatase alcalina, conteúdo de cálcio e histologia local. Em coelhos, cães

e primatas foi demonstrado que a implantação de OP-1 recombinante humano, contendo preparações de matriz de colágeno, obtiveram resultados positivos em defeitos segmentários. Este osso é biológico e biomecânicamente funcional. (COOK 1996)

O achado de que OP-1 induz a formação de osso novo, promove crescimento de osteoblastos, e mantém o fenótipo de osteoblastos “in vitro” indica que este fator de crescimento pode estar envolvido centralmente na homeostase óssea. (COOK e RUEGER, 1996)

BMP bovino

Um estudo de BMP bovino em um modelo de cães mostrou que sua aplicação aumentou a taxa de osseointegração ao redor de implantes após quatro semanas. Achados em Microscopia de Varredura Eletrônica (SEM), mostraram formação abundante de osso lamelar ao redor dos implantes cobertos com BMP bovino, oito semanas após a sua administração. (LYNCH et al., 1991b)

Fator de crescimento derivado de plaquetas

PDGF é o primeiro fator de crescimento a aparecer em uma ferida. Isto inicia o processo de reparo do tecido conjuntivo, inclusive a regeneração de osso. No momento do dano, o PDGF emerge das plaquetas que degranulam ativando os receptores de membrana de células designadas (alvo). Estas células designadas desenvolvem laços de fosfato de alto-energia com proteínas internas do citoplasma as quais ativam então os laços para iniciar uma atividade específica dentro da célula designada. O PDGF tem várias atividades importantes, específicas: (1) aumento o número de células reparadoras, mitoses de endoteliócitos em vasos capilares locais, debridamento do local da ferida, e são uma fonte de fatores para crescimento e regeneração de osso continuada. (MARX et al., 1998)

O PDGF estimula a síntese de DNA, quimiotaxia, colágeno e síntese de proteína em cultura de osso. O PDGF regula atividade da fosfatase alcalina e da osteocalcina.

O plasma rico em plaquetas é uma fonte de autóloga de PDGF e TGF- β . É obtido isolando e concentrando plaquetas usando centrifugação. (ROSSI Jr, LEME e PISPICO, 2001)

O plasma rico em plaquetas somado a enxertos de osso resulta em uma taxa de maturação 1.62 a 2.16 maior que enxertos de osso que não receberam o plasma, mostrando uma maior quantidade e densidade de osso. (MARX et al., 1998)

Plasma rico em plaquetas: fator de crescimento para enxertos ósseos

A bioquímica do tecido receptor e do próprio enxerto, como anteriormente explicado, é altamente intrigante. Porém, atualmente, estudos e experiências com o plasma rico em plaquetas (PRP) adicionado ao enxerto têm mostrado uma consolidação mais rápida e uma mineralização do enxerto na metade do tempo, além de uma 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 as quais liberam, em períodos cíclicos, PDGF e TGF- β .

O PDGF parece ser o primeiro fator de crescimento presente em uma ferida e inicia a reparação do tecido conjuntivo, incluindo regeneração e reparo ósseo. As atividades específicas mais importantes do PDGF incluem mitogênese (aumento da população de células, principalmente das células de reparação), angiogênese (mitose endotelial dentro de capilares em função), e atividades de macrófagos (debridamento do local da ferida e origem da segunda fase dos fatores de crescimento para o reparo continuado e regeneração óssea). (ROSS et al., 1986)

Há aproximadamente 0.06 ng de PDGF por milhão de plaquetas e cerca de 1200 moléculas de PDGF por plaqueta, demonstrando o grande potencial destas. A teoria é que isto aumenta a quantidade inicial de PDGF o que propicia uma maior atividade da célula osteocompetente de forma mais completa do que quando ocorre no enxerto e no meio do coágulo apenas (ROSS et al. 1986). Além disto, acredita-se que o aumento da

rede de fibrina criado pelo PRP aumenta a osteocondução do início ao fim da consolidação do enxerto.

O TGF é um termo aplicado para uma “super” família de fatores de crescimento e de diferenciação, das quais os últimos 13 BMPs descritos são membros (CELESTE et al. 1990). As proteínas TGF β 1 e TGF- β 2 são os fatores de crescimento mais protéicos e genéricos envolvidos com o reparo do tecido conjuntivo em geral e regeneração óssea.

Estas proteínas TGF representam um mecanismo que mantém o módulo de regeneração óssea e a reparação em longo prazo e se transformam em um fator de remodelação óssea com o tempo. A função mais importante do TGF- β 1 e do TGF- β 2 parece ser a quimiotaxia e a mitogênese dos precursores de osteoblastos e sua habilidade para estimular sua deposição da matriz de colágeno na reparação da ferida e do osso (MARX et al., 1998). Além disto, as duas proteínas TGF inibem a formação de osteoclastos e a reabsorção de osso, assim, favorecendo mais formação do que reabsorção pelos dois mecanismos diferentes. (MOHAN e BAYLINK, 1991)

Um modelo razoável tem sido desenvolvido para regeneração óssea em enxertos celulares da medula esponjosa baseado em trabalhos anteriores e em conhecimentos recentes (MARX et al., 1998). Este modelo também aponta para dois fatores fundamentais, que influenciam a regeneração óssea normalmente. Mostram, como as quantidades aumentadas de cada um, através do PRP, produzem uma taxa mais rápida de formação óssea e uma quantidade maior de osso. A amplificação da influência do PDGF e do TGF- β através da técnica de seqüestro e concentração de plaquetas no PRP é vista como uma ferramenta disponível e prática para aumentar a taxa de formação óssea e a quantidade de osso formado.

O fato do PRP ser um preparado autólogo elimina as influências de transmissão de doenças ou reações imunogênicas que existe com preparados alogênicos ou xenogênicos. Por isso o PRP é preparado no ato da cirurgia, eliminando a possibilidade da rotulação errada de uma amostra (que pode ocorrer quando usamos um sistema laboratorial).

No presente estudo, o plasma rico em plaquetas foi obtido no momento da cirurgia conforme protocolo proposto por Rossi Jr, Leme e Pispico (2001) que se assemelha ao proposto por Venturelli (1999).

Comparados os resultados obtidos nos diferentes grupos podemos observar que no tempo sete dias obtivemos nas cavidades tratadas com PRP uma presença de um maior número de trabéculas nas áreas próximas aos limites da cavidade óssea. Quando observadas com um aumento maior tais trabéculas mostravam-se mais definidas e exibiram um maior número de osteoblastos além de alguns osteócitos em seu interior. No tempo de 14 dias, os espécimes obtidos com o uso de plasma rico em plaquetas exibiram uma maior e mais organizada formação de trabéculas ósseas, quando examinadas em uma visão mais ampla. A observação destas trabéculas em aumento maior mostrou uma melhor definição das mesmas, exibiam maior mineralização, linhas de aposição e um grande número de células ósseas. Estes resultados são concordantes com os dados levantados na literatura. Lynch et al. (1991b), Bolander (1992), Ripamonti e Reddi (1992), Tayaponsak et al. (1994) e Stefani et al. (2000) observaram em seus estudos que os fatores de crescimento promoviam um substancial aumento do crescimento tecidual durante as fases iniciais do reparo.

Aos 28 dias de experimentação, os espécimes mostraram pouca diferença na quantidade de osso neoformado, entretanto, a qualidade encontrada nos dois grupos diferiu.

Os espécimens adicionados somente por coágulo, observados ao aumento menor mostraram uma arquitetura compatível com o tempo experimental, caracterizada por trabéculas bem definidas, porém pouco confluentes e interligadas. Poucas linhas de aposição e reabsorção foram vistas nos espécimes observados quando vistas em campos mais detalhados.

Os espécimes com P.R.P. nesta fase do experimento mostraram ao aumento menor, a formação de um osso jovem e desorganizado mostrando, entretanto, trabéculas mais mineralizadas e confluentes. Em aumento maior e mais detalhado, pudemos observar as linhas de aposição e reabsorção mais evidentes nestes espécimes, o que caracteriza um início de remodelação e modelação ósseas.

Nos tempos intermediários da reparação óssea a adição de fatores de crescimento não parece influenciar demasiadamente a velocidade e a qualidade de formação óssea. A maior quantidade de trabéculas parece ser devida a maior atividade reparacional observada nos tempos de sete e 14 dias. Além disto, a presença de linhas de aposição e modelação evidenciam um discreto avanço na maturação dos espécimens tratados com PRP.

Finalmente aos 42 dias, tempo total e normal de reparo ósseo das fraturas nos cães, constatamos que a diferença entre os espécimes dos dois grupos se tornou quantitativa e qualitativa.

Os espécimes de coágulo mostraram um total preenchimento da cavidade óssea por osso neoformado. As trabéculas ósseas se mostravam bem definidas e exibindo linhas de aposição e reabsorção características da fisiologia óssea normal. Com observação mais detalhada, os osteoplastos preenchidos por osteócitos e as linhas de aposição óssea puderam ser evidenciados. O quadro histológico era compatível com o tempo de reparo ósseo do animal.

Uma quantidade de trabéculas e seu maior volume puderam ser evidenciados nas cavidades ósseas preenchidas por PRP. As linhas de aposição e remodelação óssea eram evidentes, bem como, o maior grau de organização do tecido ósseo. Mesmo não se tratando de um estudo quantitativo (morfométrico) foi fácil observar uma melhor e mais consistente formação óssea neste grupo.

Vários autores mencionam resultados semelhantes, como Lynch et al. (1991a); Becker et al. (1992); Tayapongsak et al. (1994); Giannobile, Finkelman e Lynch (1994); Caplan (1995); Giannobile et al (1996); Howell et al. (1997); Venturelli (1999), Petrungaro (2001), Froum et al. (2002).

Giannobile, Finkelman e Lynch (1994) demonstraram um crescimento ósseo 65% maior nos grupos tratados com PRP em um modelo canino.

À parte dos resultados obtidos por nós e publicados por outros autores com a adição de PRP em reparação óssea, o reparo dos tecidos moles também é potencializado. Desta forma, autores como Lynch et al. (1989), Lynch et al (1991a),

Pierce et al. (1992), Wang et al. (1994), Giannobile et al (1996), Man, Plosker e Winland-Brow (2001) e Petrunaro (2001) mostraram que a adição de PRP nas feridas cirúrgicas acelera a maturação dos tecidos moles, diminuindo o tempo total de reparo.

Observando nossos resultados e comparando-os com os dados levantados na bibliografia, torna-se evidente, para nós, a participação dos fatores de crescimento no reparo ósseo e sua potencial utilização a partir da adição de um concentrado plaquetário.

CONCLUSÕES

Analisados os resultados obtidos e comparados com os dados levantados na literatura consultada, o autor pode concluir:

1 – Nos tempos de sete e 14 dias da reparação óssea, a adição de plasma rico em plaquetas promove um aumento quantitativo e qualitativo no tecido ósseo formado. A velocidade de produção de trabéculas também se mostra aumentada.

2 – No período intermediário da reparação (28 dias), a adição de plasma rico em plaquetas não parece alterar a quantidade de tecido ósseo formado. A maturação, entretanto, se mostra mais avançada nos espécimens adicionados.

3 – No tempo de 42 dias da reparação óssea, a adição de plasma rico em plaquetas aumenta significativamente a qualidade e a quantidade de osso formado. A maturação mais avançada dos espécimens adicionados é também evidente.

Porque aos 28 dias a osteogênese parece 15mm
e a maturação -
Porque aos 42 dias inicia novamente
porque?

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

BECKER, W. et al. A comparison of ePTFE membranes alone or in combination with platelet-derived growth factors and insulin-like growth factor-I or demineralized freeze-dried bone in promoting bone formation around immediate extraction socket implants. **J. Periodontol**, v.63, n.11, p.929-940, nov, 1992.

BOLANDER, M. E. Regulation of fracture repair by growth factors. **Am Fed Clin Res Abs**, vol. 200, p.165-170, may, 1992.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **J Orthop Res**, v. 9, p.641-650, 1991.

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

CAPLAN, A. I. Bone development and repair. **Bioessays**, v. 6, n. 4, p. 171-175, 1987.

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

CELESTE, A. J. et al. Identification of transforming growth factor-beta to family members present in bone-inductive protein purified bovine bone. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.87, n.24, p. 9843-9847, 1990.

COOK, S. D.; RUEGER, D. C. Osteogenic protein-1. Biology and applications. **Clin Orthop Rel Res**, n.324, p.29-38, mar, 1996.

FRIEDENSTEIN, A. J.; PIATETZKY-SHAPIO, I. I.; PETRAKOVA, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **J Embryol Exp Morphol**, v.16, n. 3, p. 381-390, Dec. 1966.

FROUM, S. J. et al. Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts: three bilateral case reports. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v.22, n.1, p.45-53, feb, 2002.

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**, v.65, n.12, p.1158-1168, dec, 1994.

GIANNOBILE, W. V. et al. Comparative effects of platelet derived growth factor-BB, insulin-like growth factor-I alone and in combination on periodontal regeneration in *Macaca fascicularis*. **J. Periodontol Res**, v.31, n.5, p.301-312, 1996.

GRAY, J.C.; ELVES, M. W. Donor cells contribution to osteogenesis In experimental cancellous bone grafts. **Clin Orthop**, v.163, p.261-71, marc, 1982.

HOWELL, T. H. et al. A phase I/II clinical trial to evaluate a combination of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and recombinant human insulin-like growth factor-I patients with periodontal disease. **J. Periodontol**, v. 68, n.12, p. 1186-1192, dec, 1997.

KASSOLIS, J. D.; ROSEN, P. S.; REYNOLDS, M. A. Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: case series. **J Periodontol**, v.71, n.10, p. 1654-1661, oct, 2000.

KIM, S. G. et al.. Use of particulate dentin-paster of Paris combination with/without platelet-rich plasma in the treatment of bone defects around implants. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.17, n.1, p.86-94, jan-feb, 2002.

KINOSHITA, A. et al. Periodontal regeneration by application of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to horizontal circumferential defects created by experimental periodontitis in beagle dogs. **J. Periodontol**, v.68, p.103-109, 1997.

KNIGHTON, D. R.; SILVER, I.; HUNT, T.K. Regulation of wound healing angiogenesis-Effect of oxygen gradients and inspired concentration. **Surgery**, v.90, n. 2, p.262-270, 1981.

KNIGHTON, D. R. et al. Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. Successful treatment with autologous platelet- derived wound healing factor (PDWHF). **Ann. Surg**, v.204, n.3, p.322-330, sep, 1986.

LANDESBURG, R.; ROY, M.; GLICKMAN, R. S. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. **J Oral Maxillofac Surg**, v.58, n.3, p.297-301, mar, 2000.

LEE, M.B. Bone morphogenetic proteins: background and implications for oral reconstruction. A review. **J Clin Periodontol**, v.24, n. 6, p.355-65, jun, 1997.

LEKOVIC, V. et al. Comparison of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral, and guided tissue regeneration versus platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects: a reentry study. **J Periodontol**, Chicago, v.73, n.2, p.198-205, feb, 2002.

LYNCH, S. E. et al. Role of platelet-derived growth factor in wound healing: synergistic effects with other growth factors. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v.84, p.7696-7700, nov, 1987.

LYNCH, S. E. et al. A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. **J Clin Periodontol**, v.16, p.545-548, 1989.

LYNCH, S. E. et al. The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. **J.Periodontol**, v.62, n.7, p.458-467, jul,1991.

LYNCH, S. E. et al. Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. **J. Periodontol**, v.62, n.11, p.710-716, nov, 1991.

MAN, D.; PLOSKER, H.; WINLAND-BROWN, J. E. The use autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. **Plast Reconstr Surg**, v.107, n.1, p.229-239, jan, 2001.

MARX, R. E.; SNYDER, R. M.; KLINE, S. N. Cellular survival of human marrow during placement of marrow-cancellous bone grafts. **J Oral Surg**, v.37, p.712-718, oct, 1979.

MARX, R. E. Clinical application of bone biology to mandibular and maxillary reconstruction. **Clin Plast Surg**, v.21, n.3, p.377-392, jul,1994.

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

MOHAN, S.; BAYLINK, D. J. Bone growth factors. **Clin Orthop**, v. 263, p. 30-48, 1991.

PARFITT, G. J. An investigation of the normal variations in alveolar bone trabeculation. **Oral Surg Oral Med Oral Path**, v.15, n.12, p.1453-1463, dec, 1962.

PARK, J-B. Periodontal regeneration in class III furcation defects of beagle dogs using guided tissue regenerative therapy with platelet-derived growth factor. **J. Periodontol**, v. 66, n.6, p.462-467, jun, 1995.

PETRUNGARO, P. S. Using platelet-rich plasma to accelerate soft tissue maturation in esthetic periodontal surgery. **Compend Contin Educ Dent**, v.22, n.9, p.729-732,734,736 passim; quiz 746, sep, 2001.

PIERCE, G. F. et al. PDGF-BB, TGF- β^1 and basic FGF in dermal wound healing: neovessel and matrix formation and cessation of repair. **Am J Pathol**, v.140, n.6, p.1375-1388, jun, 1992.

POWELL, D. M.; CHANG, E.; FARRIOR, E. H. Recovery from deep-plane rhytidectomy following unilateral wound treatment with autologous platelet gel: a pilot study. **Arch Facial Plast Surg**, v.3, n.4, p.245-251, oct-dec, 2001.

REDDI, A. H. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. **Nature Biotechnology**, v.16, n.3, p.247-252, mar, 1998.

RILEY, E. H. et al. Bone morphogenetic protein-2: Biology and applications. **Clin Orthop**, v.324, p.39-46, Marc, 1996.

RIPAMONTI, U.; REDDI, A. H. Growth and morphogenetic factors in bone induction: role of osteogenin and related bone morphogenetic proteins in craniofacial and periodontal bone repair. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.3, n.1/2, p.1-14, 1992..

ROSS, R. ; RAINES, E. W.; BOWEN-POPE, D. F. The biology of platelet derived growth factor. **Cell**, v.46, p.155-169, jul,1986.

ROSSI Jr, R.; LEME, J. J.; PÍSPICO, R. Utilização de plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos – Proposta de um protocolo de obtenção simplificado. **Rev APCD-SBC**, n.33, p.5-7, mar-abr, 2001.

SIGURDSSON, T. J. et al. Periodontal repair in dogs: recombinant human bone morphogenetic protein-2 significantly enhances periodontal regeneration.**J Periodontol**, v.66, p.131-138,1995.

STEFANI, C. M. et al. Platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-1 combination and bone regeneration around implants placed into extraction sockets: a histometric study in dogs. **Implant Dentistry**, v.9, n.2, p.126-131, 2000.

STEPHAN, E. B. et al. Platelet-derived growth factor enhancement of a mineral-collagen bone substitute, **J Periodontol**, v.71, n.12, p. 1887- 1892, dec,2000.

TAYAPONGSAK, P. et al. Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. **J Oral Maxillofacial Surgery**, v.52, p.161-166, 1994.

TISCHLER, M. Platelet rich plasma.The use of autologous growth factors to enhance bone and soft tissue grafts. **N Y State Dent J**, v.68, n.3, p.22-24, mar, 2002.

VENTURELLI, A. Regeneración ósea: plasma rico en plaquetas. **Rev. Asoc. Odontol. Argent.**, v.87, n.6, p.459-467, nov-dic, 1999.

URIST, M. R. Bone: formation by autoinduction. **Proc Nat Acad Scin**, v.150, n.3698, p. 893-899, nov, 1965.

URIST, M. R. Purification of bovine bone morphometric protein. **Proc Nat Acad Scin**, v. 81, p. 371, 1984.

WANG, H. et al. The effect of platelet-derived growth factor on the cellular response of the periodontium: an autoradiographic study on dogs. **J. Periodontol**, v.65, n.5, p. 429-436, may, 1.994.

WEIBRICH, G. et al. Correlation of platelet concentration in platelet-rich plasma to the extraction method, age, sex, and platelet count of the donor. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.16, n.5, p.693-699, sep-oct, 2001.

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