

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

SERGIO HENRIQUE FERREIRA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE HISTOLÓGICA COMPARATIVA DA EFICÁCIA DOS PLASMAS RICO E
POBRE EM PLAQUETAS NO ACELERAMENTO DA REPARAÇÃO DO TECIDO
MOLE FORMADO SOBRE ALVÉOLOS DENTÁRIOS HUMANOS.**

SÃO PAULO

2005

SERGIO HENRIQUE FERREIRA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE HISTOLÓGICA COMPARATIVA DA EFICÁCIA DOS PLASMAS RICO E
POBRE EM PLAQUETAS NO ACELERAMENTO DA REPARAÇÃO DO TECIDO
MOLE FORMADO SOBRE ALVÉOLOS DENTÁRIOS HUMANOS.**

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

Área de concentração: Implantodontia

Orientador: Prof. Dr. José Luiz De Lorenzo

SÃO PAULO

2005

B. 2012.2582
Class. U617.69
Cutter O51a
Patri nº 3840
Tipo entrada DOA/CAO
Nota Fiscal
Data rec. 23.1.10.102
Preço
Origem

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

O51a

Oliveira, Sergio Henrique Ferreira de

Análise histológica comparativa da eficácia dos plasmas rico e pobre em plaquetas no aceleração da reparação do tecido mole formado sobre alvéolos dentários humanos / Sergio Henrique Ferreira de Oliveira. Orientação do Prof. Dr. José Luiz de Lorenzo. – São Paulo : 2005. 85p.

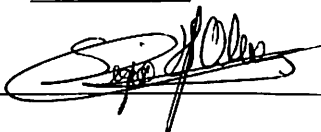
Dissertação (Mestrado). Área de Concentração em Implantodontia. Faculdade de Odontologia. Universidade de Santo Amaro.

1. Plasma 2. Plaquetas 3. Fibrinas 4. Regeneração I.
Título

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADO AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, 31 de OUTUBRO de 2005.

Assinatura:



E-mail: s.h.oliveira@ig.com.br

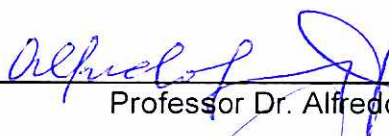
Sergio Henrique Ferreira de Oliveira

**ANÁLISE HISTOLÓGICA COMPARATIVA DA EFICÁCIA DOS PLASMAS RICO E
POBRE EM PLAQUETAS NO ACELERAMENTO DA REPARAÇÃO DO TECIDO
MOLE FORMADO SOBRE ALVÉOLOS DENTÁRIOS HUMANOS.**

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

APROVADA EM 31/10/2005

Banca Examinadora



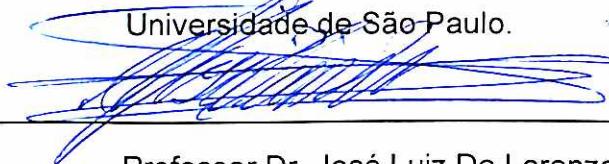
Professor Dr. Alfredo Gromastky

Doutor em Periodontia pela Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.



Professor Dr. Laurindo Borelli Neto

Doutor em Ciências, Área de Anatomia, pelo Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo.



Professor Dr. José Luiz De Lorenzo

Doutor em Ciências, Área de Microbiologia, pelo Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo.

Média Final de Aprovação: _____

Menção: Louros _____

DEDICATÓRIA

À minha Mãe **Lucia Helena Ferreira de Oliveira**, que embora sua permanência nesta vida tenha sido pequena, foi de extrema importância para eu ser o que sou hoje.

À minha avó **Fanny Passeto Ferreira**, que quando minha mãe me faltou, ela a substituiu da melhor forma possível.

Sei que ambas estão comigo a todo momento.

A toda minha **família**, sem exceções, que sempre torceu por mim.

DEDICATÓRIA ESPECIAL

Ao Doutor **Sergio de Oliveira**, meu pai. Pai é pouco para definir este homem. Ele é meu mentor, minha inspiração, amigo, colega de profissão e meu ídolo. Foi para mim pai e mãe, foi quem me ensinou minha profissão, modelou meu caráter e inspirou meus princípios. Exemplo de Homem e profissional.

Sem ele eu nada seria....

AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, por mostrar-me que nas horas mais difíceis da minha vida em que eu acreditava estar sozinho, era ELE quem me guiava e conduzia pelo caminho que hoje sei era o mais seguro.

Aos **pacientes** que tornaram essa pesquisa possível.

Ao **Professor Doutor José Luiz De Lorenzo**, que mostrou-se incansável nas infinitas correções desta Tese e sempre disposto a ajudar, mesmo sendo colocado em cima da hora como meu Orientador. Hoje sei que embora ele já fosse amigo de meu pai, eu também conquistei sua amizade.

Ao amigo **Dr. Rogério Luis Romeiro**, que foi meu braço direito nesta Tese.

Ao **Laboratório Fleury** na figura de seu diretor **Doutor Paulo G. Leser**.

À **Doutora Cláudia R. G. C. M. de Oliveira**, Doutora e médica -chefe da Anatomia Patológica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da USP e do Laboratório Fleury, que foi de uma atenção incrível ao analisar todas as lâminas histológicas desta tese.

À **Sra.Kay Áquila** (Laboratório de Histologia da UNISA), que colaborou muito executando os cortes histológicos de todas as lâminas desta Tese.

Ao **Professor Alexandre Streid**, nas questões referentes à Hematologia.

À empresa **ACE DE BORTOLI**, que forneceu os implantes e a centrífuga usados nesta Tese e à sua secretária **Amanda**, que me atendeu da melhor forma possível sempre que eu precisava.

Ao **Doutor Nilton de Bortoli Jr.**, que sempre me inspirou com seu conhecimento e sabedoria. Obrigado pela sua amizade.

Ao **Doutor Luis Fernando Lobo Leandro**, que teve papel fundamental na minha formação profissional e pessoal.

Aos amigos e companheiros do curso de Uberaba **Paulo Kawakami, Rogério Romeiro, Pedro Feitosa e Maria Aparecida Ortega**. Obrigado por me fazerem rir nas horas em que eu só tinha vontade de chorar.

Aos **colegas de mestrado** que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento como profissional e como pessoa. Passamos de colegas de turma a amigos.

Aos meus inimigos. Sua inveja e vontade de me derrotar era a força que me fazia crescer. Eu perdôo todos vocês.

RESUMO

Na literatura existem muitos trabalhos que comprovam a capacidade do plasma rico em plaquetas (PRP) acelerar e incrementar o processo de reposição óssea, mas os que investigaram essa ação em alvéolos dentários humanos e, principalmente em tecidos moles bucais, ainda são em pequeno número. Por outro lado, existe nítida carência de pesquisas destinadas a analisar se o plasma pobre em plaquetas (PPP), mais adequadamente denominado plasma rico em fibrinogênio (PRF), que é geralmente desprezado quando do preparo do PRP, também favorece a reparação de tecidos bucais.

O objetivo do presente estudo foi comparar, por análise histológica, a reparação do tecido mole coletado 28 dias após o preenchimento de alvéolos dentários com PRP ou com PPP ou de forma natural pelo coágulo sangüíneo (controle), imediatamente após exodontias processadas nas mesmas arcadas dentárias de sete pacientes selecionados, totalizando 36 alvéolos. Os resultados mostraram, pela comparação com os controles, que principalmente o PPP, mas também o PRP, aceleram o processo de reparação tecidual da gengiva.

Palavras-chave: plaquetas, fibrina, implantes dentais.

ABSTRACT

There is in literature many works that prove the capability of platelet rich plasma (PRP) in improve and speed up the bone repairing process, but the ones that had investigated this action in human dental alveolus and, mainly in oral soft tissues, still are in small number. On the other hand, exists clear lack of researches destined in analyze if the platelet poor plasma (PPP), a rich product in fibrin (PRF) usually rejected in the preparation of PRP, also improves the oral tissue repairing.

The objective of the present study was to compare, in histological analysis, the soft tissue repairing collected 28 days after the fulfilling of dental alveolus with PRP, PPP or natural blood clot (control), immediately after teeth extractions proceed in the same dental arches of seven selected patients, totalizing 36 alveolus. The results had shown, comparing to the control, that mainly the PPP, but also the PRP, had speed up the process of gingival soft tissue repairing.

Key-words: platelets, fibrin, dental implants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Primeira centrifugação.....	43
Figura 2 - Após a primeira centrifugação e separação do plasma total e PRP	43
Figura 3 - Após a segunda centrifugação.....	43
Figura 4 – Gel de PPP.....	43
Figura 5 – Gel de PRP.....	43
Figura 6 - Caso clínico na arcada superior.....	44
Figura 7 – PPP colocado no alvéolo.....	44
Figura 8 - Remoção dos espécimes gengivais.....	44
Figura 9 - Aspecto após a remoção.....	44
Figura 10 - Esfregaço do PRP, corado por hematoxilina-eosina (HE), utilizado na padronização para atestar a integridade das plaquetas após as centrifugações.....	45
Figura 11 - Pequeno número de células mesenquimais (escore 1) em corte histológico de tecido mole alveolar corado por hematoxilina-eosina; 400x1,2.....	58
Figura 12 - Acentuada presença de células mesenquimais (escore 3) em corte histológico de tecido mole alveolar corado por hematoxilina-eosina; aumento de 400x1,2.....	58
Figura 13 - Ausência de infiltrado de células inflamatórias (escore 0) em corte histológico de tecido mole alveolar corado por hematoxilina-eosina; 200x1,2.....	59
Figura 14 - Presença de acentuado grau de infiltrado de células inflamatórias (escore 3) em corte histológico de tecido mole alveolar corado por hematoxilina-eosina; 200x1,2.....	59
Figura 15 - Grau mínimo de neovascularização (escore 1) em corte histológico de tecido mole alveolar corado por hematoxilina-eosina; 200x1,2.....	60
Figura 16 - Acentuado grau de neovascularização (escore 3) em corte histológico de tecido mole alveolar corado por hematoxilina-eosina; 200x1,2.....	60

Figura 17 - Graus mínimos de hialinização e de fibrose (escore 1) em corte histológico de tecido mole alveolar corado por hematoxilina-eosina; 400x1,2.....	61
Figura 18 - Graus acentuados de hialinização e de fibrose (escore 3) em corte histológico de tecido mole alveolar corado por hematoxilina-eosina; 200x1,2.....	61
Figura 19 - Gráfico das porcentagens de tecidos moles com níveis histológicos de reparo considerados discretos, moderados ou acentuados, 28 dias após os alvéolos dentais terem sido preenchidos com PRP, PPP ou coágulo sangüíneo.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Posição, na arcada dentária, dos dentes com necessidade de exodontia em cada um dos sete pacientes selecionados.....	36
Tabela 2 - Codificação dos espécimes enviados para análise histológica.....	40
Tabela 3 - Contagem das plaquetas no sangue, PRP e PPP de quatro pacientes aleatoriamente selecionados, com a finalidade de padronização da obtenção do PRP..	45
Tabela 4 - Relação dos escores conferidos ao grau de presença dos critérios empregados na verificação da reparação dos tecidos moles do caso 1 em 28 dias.....	46
Tabela 5 - Relação dos escores conferidos ao grau de presença dos critérios empregados na verificação da reparação dos tecidos moles do caso 2 em 28 dias.....	47
Tabela 6 - Relação dos escores conferidos ao grau de presença dos critérios empregados na verificação da reparação dos tecidos moles do caso 3 em 28 dias.....	48
Tabela 7 - Relação dos escores conferidos ao grau de presença dos critérios empregados na verificação da reparação dos tecidos moles do caso 4 em 28 dias.....	49
Tabela 8 - Relação dos escores conferidos ao grau de presença dos critérios empregados na verificação da reparação dos tecidos moles do caso 5 em 28 dias.....	50
Tabela 9 - Relação dos escores conferidos ao grau de presença dos critérios empregados na verificação da reparação dos tecidos moles do caso 6 em 28 dias	51
Tabela 10 - Relação dos escores conferidos ao grau de presença dos critérios empregados na verificação da reparação dos tecidos moles do caso 7 em 28 dias.....	52
Tabela 11 - Relação dos escores conferidos ao grau de presença dos critérios empregados na verificação da reparação dos tecidos moles do caso 8 em 28 dias	53
Tabela 12 - Relação dos escores conferidos ao grau de presença dos critérios empregados na verificação da reparação dos tecidos moles do caso 9 em 28 dias.....	54
Tabela 13 - Relação dos escores conferidos ao grau de presença dos critérios empregados na verificação da reparação dos tecidos moles do caso 10 em 28 dias.....	55

Tabela 14 - Relação dos escores conferidos ao grau de presença dos critérios empregados na verificação da reparação dos tecidos moles do caso 11 em 28 dias...56

Tabela 15 - Relação dos escores conferidos ao grau de presença dos critérios empregados na verificação da reparação dos tecidos moles do caso 12 em 28 dias...57

Tabela 16 - Relação dos escores globais conferidos na análise dos parâmetros histológicos adotados para a verificação do grau de reparação das amostras de tecido mole que recobriam alvéolos dentais preenchidos 28 dias antes com PRP, PPP e coágulo sangüíneo (controle) mostrando, para cada caso analisado, o preenchimento que resultou no melhor nível de regeneração.....62/63

Tabela 17 - Percentuais de reparos teciduais considerados discretos, moderados ou acentuados, observados na análise histológica de tecidos moles 28 dias após os alvéolos dentais terem sido preenchidos com PRP, PPP ou coágulo sangüíneo.....64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PRP: plasma rico em plaquetas

PPP: plasma pobre em plaquetas

PRF: plasma rico em fibrinogênio

PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas

TGF: fator de crescimento de transformação

ADP: difosfato de adenosina

ATP: trifosfato de adenosina

VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular

FGF: fator de crescimento de fibroblastos

EGF: fator de crescimento endotelial

IGF: fator de crescimento semelhante à insulina

BMP: proteína óssea morfogenética

GH: hormônio de crescimento

DFDBA: aloenxerto ósseo desmineralizado, seco e congelado

FDBA: aloenxerto ósseo seco e congelado

e-PTF-E: politetrafluoretileno

rhBMP: proteína morfogenética do osso recombinante humano

GFC: cimento de fatores de crescimento

HA: hidroxiapatita

TCP: tricalciofosfato

FCR: força centrífuga relativa

G: gravidade

R: raio

N e rpm: rotações por minuto

CaCl₂: cloreto de cálcio

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	14
2. PROPOSIÇÃO	16
3. REVISTA DA LITERATURA	17
3.1. Plaquetas	17
3.2. Atividade das plaquetas em processos biológicos	18
3.3. Processo de reparação alveolar	19
3.4. Mecanismos de integração de enxertos	20
3.5. Fatores de crescimento liberados pelas plaquetas	21
3.5.1. Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)	22
3.5.2. Fatores de crescimento I e II similares à insulina (IGF I e II)	23
3.5.3. Fator de crescimento de fibroblastos (FGF)	24
3.5.4. Fator beta de transformação de crescimento (TGF- β)	24
3.6. Aplicação de fatores de crescimento ósseo (BGF) na reparação do epitélio bucal	26
3.7. Plasmas rico e pobre em plaquetas (PRP e PPP)	27
3.7.1. Protocolos de obtenção do PRP e do PPP	30
3.7.2. Coagulação (formação do gel)	32
4. MATERIAIS E MÉTODO	34
4.1. Atendimento aos princípios da Bioética	34
4.2. Teste de padronização da metodologia de obtenção do PRP e PPP	34
4.3. Seleção dos pacientes: critérios de inclusão e exclusão	35
4.4. Coleta do sangue e obtenção dos géis de PRP e PPP	37
4.5. Atos cirúrgicos	38

4.6. Análise histológica	39
4.7. Seqüência fotográfica do experimento	43
5. RESULTADOS	45
5.1. Contagem de plaquetas no sangue total, PRP e PPP	45
5.2. Análise histológica	46
6. DISCUSSÃO	65
7. CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS	71
ANEXOS	78

1. INTRODUÇÃO

Nos primórdios da Implantologia oral, quando os implantes ditos fibrointegrados eram a excelência das reabilitações, os profissionais da área eram chamados de “caçadores de osso”. Com o avanço das técnicas cirúrgicas e o surgimento dos implantes osseointegrados, foram desenvolvidos muitos estudos relativos à enxertia óssea e, na atualidade, antes de pensar em instalar implantes, devemos restabelecer a altura e a espessura dos rebordos atróficos para criarmos condições adequadas ao posicionamento e fixação dos implantes (LYNCH et al., 1991), condição essencial para uma reabilitação protética adequada (PIKOS, 1998, 2000). A Implantologia oral é antes de tudo uma reabilitação protética executada após uma ou mais fases cirúrgicas.

A perda precoce dos dentes pode levar a uma reabsorção acentuada dos maxilares, comprometendo a adequada reabilitação com implantes (GARG et al., 1998). O problema de extensa perda óssea torna-se relevante particularmente nos casos em que o dente foi perdido em consequência de periodontite. Além disso, reparos anatômicos também podem dificultar ou até impedir a cirurgia para a inserção do implante. Para compensar a perda de osso foram propostas técnicas como a elevação da membrana do seio maxilar ou da fossa nasal (SCHER et al., 1999) e o afastamento do nervo alveolar inferior (GARG et al., 1998; PIKOS, 2000).

Nas técnicas que utilizam enxerto, sempre que possível o osso autógeno é preferido aos homogêneos ou xenógenos (PIKOS, 2000), porque possuem a mesma origem embrionária do leito receptor e por isso sofrem menor reabsorção durante seu período de integração (GARG et al., 1998). Nessa linha de procedimento, temos a opção de usar, como área doadora, fragmentos da tíbia ou da crista anterior do osso íliaco (MARX et al., 1998). Se for necessária menor quantidade de osso, outras opções são áreas intra-orais como mento, tuber e ramo ascendente da mandíbula, com a vantagem de causar menor morbidade ao paciente (GARG et al., 1998), além de tornar

desnecessária a internação hospitalar, com os riscos e os gastos próprios desse procedimento.

Em relação a enxertos gengivais, as técnicas atuais causam importante morbidade e desconforto, de tal forma que a possibilidade de infecção e hemorragia no sítio operado, durante o período de reparação tecidual, tem estimulado a busca de métodos que possibilitem diminuir o tempo deste processo ou mesmo suprimir os inconvenientes de tal situação.

Nessa busca, o plasma rico em plaquetas (PRP) surgiu como importante coadjuvante na melhoria e incremento tanto das enxertias ósseas como das gengivais. O PRP é obtido pela centrifugação do sangue do próprio paciente e o segredo do seu sucesso parece estar nos fatores de crescimento secretados pelas plaquetas (OBARRIO et al., 2000).

É importante enfatizar que um número considerável de pesquisas odontológicas, desenvolvidas inclusive por alunos do Curso de Mestrado em Implantodontia da nossa Universidade, tem comprovado a eficácia do PRP no abreviamento do tempo de reparação do osso, mas existe a carência de estudos voltados para o aceleração da reparação de tecidos moles como o epitélio e o conjuntivo adjacente. Esses estudos também não contemplam a possibilidade de que o plasma pobre em plaquetas (PPP) ou rico em fibrina também possa favorecê-la, particularmente em relação a alvéolos de dentes recém-extraídos. Estas constatações justificam plenamente a realização deste trabalho experimental, destinado a avaliar se o PRP e o PPP promovem reparação de tecido mole alveolar em menor tempo que o coágulo sangüíneo, com a finalidade de reduzir o tempo necessário para a instalação de implante.

2. PROPOSIÇÃO

Tendo em vista as considerações feitas no capítulo Introdução, notadamente as referentes à exigüidade de trabalhos científicos a respeito da influência dos plasmas rico e pobre em plaquetas no processo de reparação de tecidos moles da boca, o objetivo deste trabalho foi comparar, por análise histológica, o grau de reparação ocorrido em 28 dias na gengiva formada sobre alvéolos dentários destinados à recepção de implantes, preenchidos com PRP, PPP e coágulo sangüíneo natural (controle) imediatamente após as exodontias.

3. REVISTA DA LITERATURA

3.1. Plaquetas

Plaquetas são corpúsculos anucleados discóides, com 1,0 a 3,0 μ m de diâmetro e 0,5 a 1,0 μ m de espessura. Derivam de prolongamentos citoplasmáticos desprendidos dos megacariócitos da medula óssea e cada prolongamento pode produzir entre duas mil e três mil plaquetas, que apresentam vida média de cerca de dez dias no sangue circulante; as envelhecidas, lesadas ou não funcionais são removidas da circulação pelo baço. Em condições normais, sua concentração no sangue é entre 150 mil e 400 mil /cc e entre as suas principais funções estão a hemostasia e a promoção da coagulação sangüínea. Apesar de não possuírem núcleo, têm uma estrutura interna adaptada à função. Sua camada externa é rica em glicoproteínas e contém receptores envolvidos nos processos de adesão e agregação de outras plaquetas e para diversos agentes capazes de ativá-las. Quando ativadas, as plaquetas intumescem substancialmente, alcançando diâmetros entre 25,0 e 50,0 μ m. Abaixo da camada glicoprotéica existe a membrana, que na porção interna apresenta filamentos especializados que penetram no interior da plaqueta, próximos a um sistema denominado "canalicular aberto", que possibilita a expulsão, para o plasma sangüíneo, de produtos secretados por suas organelas. O citoplasma é viscoso e contém numerosas organelas e grânulos. Os microfilamentos contêm actina e miosina que contribuem para manter a forma discóide, promovem a formação dos pseudópodes e possibilitam a contração das plaquetas quando estimuladas. A contração desses microfilamentos comprime e espreme as organelas e grânulos do citoplasma, constituindo um sofisticado mecanismo de liberação de substâncias produzidas pelas plaquetas. As organelas e grânulos presentes no citoplasma são de vários tipos; os principais são as mitocôndrias, os grânulos densos e os grânulos α . Estes contêm o fator plaquetário IV, que participa dos fenômenos de

coagulação do sangue e ainda β -tromboglobulina, fibrinogênio e fatores de crescimento. Os grânulos densos são reservas de adenosina-disfosfato (ADP), adenosina-trisfosfato (ATP), cálcio e serotonina. O citoplasma ainda contém outros grânulos contendo catalase, fosfatase ácida e outras enzimas. O sistema tubular denso contém cicloxigenase, que converte o ácido araquidônico da membrana em prostaglandinas e em tromboxano A_2 , a substância vasoconstritora mais potente do organismo, cujo metabólito é o tromboxano B_2 (LENHARO et al., 2004).

3.2. Atividade das plaquetas em processos biológicos

As plaquetas são os componentes básicos iniciais envolvidos nos processos de hemostasia e coagulação do sangue. Em condições normais, tanto o endotélio como as plaquetas apresentam cargas elétricas negativas responsáveis pela repulsão que impede que as plaquetas entrem em contato com a parede dos vasos sanguíneos, mantendo-as íntegras na circulação. Quando esse equilíbrio cessa, por exemplo pelo rompimento do vaso sanguíneo, ocorre a precipitação das plaquetas a fim de interromper a perda de sangue. Para tanto, as plaquetas possuem as propriedades de adesão, ativação e agregação. A propriedade de adesão plaquetária implica em sua aderência no subendotélio vascular, localizado posteriormente ao vaso lesado ou a qualquer superfície com a qual entre em contato. A propriedade de ativação promove alteração da forma discóide, tornando as plaquetas intumescidas, esféricas e com pseudópodes, o que possibilita maior contato entre elas. Como consequência, ocorrem alterações das glicoproteínas da membrana favorecendo a adesão plaquetária e a liberação de grandes quantidades de produtos como ADP, serotonina e tromboxano A_2 . A propriedade de agregação é o resultado do acúmulo das plaquetas formando grumos e dando origem ao futuro coágulo, e a presença da trombina contribui para acelerar o processo, enquanto o tromboxano A_2 atua sobre as plaquetas próximas, agregando-as

às anteriormente ativadas. Essa condição também produz a degranulação, ou seja, a liberação dos conteúdos dos grânulos α nos quais estão contidos os fatores de crescimento. A seguir, as plaquetas se reúnem e formam um emaranhado (grumo plaquetário) que aprisiona eritrócitos e leucócitos e é o primeiro elemento promotor da hemostasia. A ação de outros estímulos desencadeia alteração do estado de diversas proteínas do plasma sanguíneo, resultando na transformação do fibrinogênio em fibrina: é o processo da coagulação do sangue, que completa os mecanismos de hemostasia, interrompendo sua perda (LENHARO et al., 2004).

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

3.3. Processo de reparação alveolar

De acordo com Ohta et al. (1993), o reparo dos alvéolos dentários, embora sua cronologia possa variar de indivíduo para indivíduo de acordo com a idade e condições sistêmicas e locais, processa-se em quatro fases:

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

partir da porção apical do alvéolo. Observa-se também, em 96 horas, proliferação epitelial para a margem da ferida;

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

c) crescimento ósseo: começa na quarta semana após a exodontia, com a mineralização do tecido osteóide e a neoformação óssea a partir das paredes do alvéolo e da região apical, em direção à porção central. A cobertura epitelial sobre a ferida está praticamente completada. O tecido conjuntivo ainda apresenta-se com intenso infiltrado inflamatório, presença de muitas células de reparação (plasmócitos, leucócitos, etc) e fibras colágenas desorganizadas;

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

3.4. Mecanismos de integração de enxertos

Quando um enxerto é posicionado no leito receptor, a bioquímica do ambiente caracteriza-se por apresentar baixa tensão de oxigênio e um meio ácido devido à grande presença de lactato (MARX et al., 1998; MARX; GARG, 1998). Apesar de os osteoblastos e as células mesenquimais indiferenciadas conseguirem manter seu metabolismo pela captação de nutrientes do tecido receptor (FRIEDLAENDER, 1987), os osteócitos, separados destes por uma complexa trama mineral, acabam por necrosar (BURCHARDT, 1983; MARX; GARG, 1998). A porção do tecido enxertado que necrosa

estimula uma resposta inflamatória mediada por leucócitos mononucleares (BURWELL, 1999; FRIEDLAENDER, 1987; VIROLAINEN et al., 1997).

O processo de incorporação do enxerto acelera quando há diferença de pressão de oxigênio e, uma vez que o tecido que circunda o enxerto é normóxico, começa a induzir quimiotaxia de macrófagos (MARX et al., 1998; MARX; GARG, 1998). Essas células secretam fatores de proliferação angioblástica e fatores de crescimento. Assim, no terceiro dia após a reconstrução, o brotamento capilar inicia o processo de revascularização em volta do enxerto e entre as trabéculas ósseas. (MARX; GARG, 1998).

O sucesso das enxertias autógenas, quando comparado com o dos aloenxertos, reside na velocidade do processo de revascularização. Nos enxertos alógenos, a resposta imunológica se desencadeia por conta da diferença no complexo principal de histocompatibilidade (LIND et al., 1998) e é caracterizada basicamente pela ação de linfócitos T-citotóxicos e suas citocinas, responsáveis pela diminuição da vascularização e da capacidade de osseoindução do enxerto (KIRKEBY, 1991). Além do mais, citocinas secretadas por linfócitos T-auxiliares, importantes para a maturação dos T-citotóxicos, acabam por estimular a atividade dos osteoclastos (FRIEDLAENDER et al., 1992).

3.5. Fatores de crescimento liberados pelas plaquetas

Os fatores de crescimento são polipeptídios que funcionam como mediadores naturais, regulando eventos celulares relacionados à regeneração tecidual, quimiotaxia, diferenciação e proliferação celular e síntese de matriz intercelular (KIRITSY et al., 1993). A principal ação desses fatores é parácrina, o que significa que sua síntese ocorre num tipo de célula, especialmente plaquetas, e seus efeitos são exercidos em fibroblastos e precursores de osteoblastos (MARX et al., 1998).

Os grânulos alfa das plaquetas são as principais fontes de PDGF, TGF- β 1 e β 2 (LYNCH et al., 1991), que também são sintetizados por linfócitos, neutrófilos, macrófagos e endotélio (ANITUA, 1999; MARX et al., 1998).

3.5.1. Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)

O PDGF é constituído de duas cadeias de aminoácidos, ambas igualmente potentes em estimular em fibroblastos a síntese de DNA (WANG, 1994). A cadeia A contém 121 aminoácidos e o gene responsável pela sua codificação está localizado no cromossomo sete, enquanto a cadeia B contém 125 aminoácidos, sendo o braço longo do cromossomo 22 a sede do seu gene (ANITUA, 1999; ANTONIADES; HUNKAPILLER, 1983).

O PDGF apresenta três isoformas, que são combinações de duas cadeias: os homodímeros PDGF-AA e PDGF-BB e o heterodímero PDGF-AB. Primeiramente estão associados com plaquetas e, subseqüentemente, com a reparação de lesões. Os osteoblastos também são capazes de produzir PDGF, mas somente o que apresenta a cadeia PDGF-AA. Das três formas, o PDGF-BB é o mais ativo em termos de atividade em células ósseas, produzindo o maior aumento na replicação celular em modelos calvários. Nas culturas enriquecidas de osteoblastos derivados de calvários fetais, o PDGF-BB é aproximadamente oito vezes mais mitogênico que o PDGF-AA e três vezes mais que o PDGF-AB. Apesar de ter sido relatada a síntese de colágeno aumentada no osso e nas culturas celulares ósseas após a exposição ao PDGF, a produção de células individuais de colágeno não parece ser afetada. Ao invés disso, o aumento observado na síntese de colágeno é relacionada ao aumento no número de células secundárias e à replicação celular acentuada (KOKA; VANCE; MAZE, 1995). Quando essa proteína se liga a receptores do tipo tirosina-cinase em células mesenquimais indiferenciadas, angioblastos, macrófagos e fibroblastos, induz mitose e liberação de citocinas para

quimiotaxia de precursores de osteoblastos (BECKER et al., 1992; GIANNNOBILLE et al., 1994; HOWELL et al., 1997; WANG, 1994). Os macrófagos ativados ainda secretam citocinas que irão intensificar a angiogênese.

3.5.2. Fatores de crescimento I e II similares à insulina (IGF I e II)

Os IGF desempenham função significativa na regulação do crescimento e função celular. A maior parte dos IGF-I é produzida no fígado, em resposta aos níveis de hormônio de crescimento (GH) presente no soro sanguíneo, mas os IGF também são sintetizados em outros tecidos, esqueléticos ou não. Cultivos de osteoblastos também produzem IGF-I, o que pode ter influência localizada no metabolismo ósseo. Ao contrário do PDGF que causa apenas replicação celular aumentada, o IGF-I acentua a replicação celular, a produção de colágeno tipo I, a síntese de mRNA de colágeno tipo I e a redução da degradação do colágeno. O IGF-I, portanto, tem efeitos anabólicos positivos e catabólicos negativos. A replicação celular acentuada ocorre principalmente no perióstio, enquanto a síntese aumentada de colágeno tipo I e a aposição de matriz parecem estar concentradas no endóstio. O IGF-II, anteriormente denominado fator de crescimento esquelético, tem uma seqüência aproximadamente 60 % homóloga ao IGF-I e apresenta efeitos similares ao IGF-I, como estímulo da replicação celular e da síntese de colágeno (KOKA; VANCE; MAZE, 1995).

3.5.3. Fator de crescimento de fibroblastos (FGF)

Existem dois tipos de FGF, o ácido (aFGF) e o básico (bFGF), que partilham 55% da homologia da seqüência de DNA. Ambos têm efeitos similares, com diferenças quantitativas provavelmente devido à variação na afinidade receptora ou na união. Os FGF são isolados de vários tecidos, incluindo extrato de matriz óssea. Ambos os tipos têm efeitos mitogênicos nas culturas celulares enriquecidas com fibroblastos e com osteoblastos, mas o bFGF exibe potência maior. Em modelo calvário, foi demonstrada síntese de DNA acentuada após exposição a ambas as formas. Descobertas similares foram relatadas em culturas celulares preparadas a partir de ratos fetais e osso bovino. Adicionalmente aos fibroblastos e osteoblastos, o bFGF é mitogênico para células endoteliais, acarretando aumento na vascularização e, conseqüentemente, acentuado fornecimento de nutrientes para o local da lesão, acelerando sua reparação. A aplicação combinada de bFGF com altos níveis de TGF- β , em culturas celulares ósseas de ratos fetais resulta em aumento dose-dependente da síntese de DNA, enquanto concentrações baixas de TGF- β levam somente a uma resposta aditiva (KOKA; VANCE; MAZE, 1995).

3.5.4. Fator beta de transformação de crescimento (TGF- β)

O TGF- β , anteriormente chamado de fator I de crescimento derivado do osso, está presente em grandes quantidades tanto nas células ósseas como na matriz óssea, com a última sendo o maior reservatório deste polipeptídeo. Existem cinco isoformas conhecidos (TGF- β 1, 2, 3, 4 e 5), sendo os três primeiros encontrados em humanos. O TGF- β é produzido pelas plaquetas e células ósseas em uma forma latente, contendo dois polipeptídios sub-unitários maduros, dois fragmentos de precursores terminais amino e um terço de proteína. A forma ativa contém 112 aminoácidos; nove resíduos de

cisteína estão arrançados em um padrão compacto, em função de uma ordem de pontes de dissulfeto. Este padrão é chamado de "nó TGF- β ". A análise de ressonância magnética nuclear do TGF- β 1 em solução mostra muitas similaridades dos dois isoformes, sugerindo que o TGF- β pode existir em várias conformações. O mecanismo exato de conversão de latente para forma ativa não está estabelecido. Entretanto, dados recentes indicam que o sistema de protease-plasmina pode dividir e remover os fragmentos precursores terminais amino. A auto-regulagem pode ocorrer devido a esse mecanismo, visto que em culturas isoladas de células ósseas expostas ao TGF- β foi observado um aumento nos níveis de ativador plasminogênico e uma redução no nível de inibidores de ativadores plasminogênicos. Também se sabe que o TGF- β latente pode ser ativado sob condições de acidez. A liberação completa do fator de crescimento ativo ocorre em pH 2,0, uma situação não encontrada normalmente em tecidos humanos. Entretanto, a ativação ainda pode ocorrer em valores de pH de até 6,0 (KOKA; VANCE; MAZE, 1995).

Juntamente com os numerosos isoformes de TGF- β , existem quatro locais de união de receptores TGF- β conhecidos. Os locais receptores tipo I e tipo II unem os TGF- β 1, 2 e 3. Em algumas células podem ocorrer uniões diferentes, apesar de esta desigualdade não resultar necessariamente em diferenças na expressão fenotípica. Os locais de união tipo III também compõem os TGF- β 1, 2 e 3, apesar de em um grau menor do que com os tipos I e II. Os efeitos celulares após à união aos receptores tipo III são minimamente alterados, comparados a transdução dos sinais moleculares associados com os receptores tipo I e II, sugere-se que o receptor tipo III atue como um local pericelular, para localizar os TGF- β de moléculas relacionadas à superfície das células, para armazenamento ou ativação subsequente. Os locais tipo IV são pobremente caracterizados (KOKA; VANCE; MAZE, 1995).

O gene que codifica essa proteína está localizado no braço longo do cromossomo 19. A principal atividade desta citocina é induzir a mitose de células

mesenquimais indiferenciadas, fibroblastos e macrófagos que, se estimulados, acabam por sintetizar também este fator de crescimento que estimulará, além de outras células, sua própria mitose numa ação autócrina (ANITUA, 1999; MARX et al., 1998).

3.6. Aplicação de fatores de crescimento ósseo (BGF) na reparação do epitélio bucal

A literatura sobre o uso de fatores de crescimento na tentativa de acelerar a reparação de epitélios bucais, objetivo fundamental deste trabalho, é extremamente limitada, mas oferece informações promissoras. O mecanismo de ação dos BGF é vital para a compreensão da acentuação da osseointegração, tanto para a formação óssea rápida quanto para o aumento do prognóstico para osseointegração em áreas de pobre qualidade óssea (KOKA; VANCE; MAZE, 1995).

Lynch et al. (1991) investigaram os efeitos em curto prazo da aplicação de uma combinação de 3 μ g de PDGF- β e IGF-I em um gel de metilcelulose na regeneração dos componentes das estruturas moles e duras do periodonto de cães Beagle com doença periodontal, usando como controle o quadrante contralateral que recebeu apenas o gel. Os resultados revelaram que a vida média dos fatores no local da aplicação foi de três horas para o IGF-I e de 4,2 horas para o PDGF- β . A análise histológica das biópsias, executada com auxílio de computador e realizada duas e cinco semanas após a cirurgia, revelou aumento significativo de cinco a dez vezes no osso e cemento nos locais tratados com PDGF/IGF, mostrando que essa associação favorece a reparação óssea e acentua significativamente a formação do aparelho de inserção periodontal durante as fases precoces de reparação das lesões, em seguida à cirurgia periodontal.

Utilizando um protocolo de obtenção de PRGF (plasma rico em fatores de crescimento), Anitua (1999) avaliou, em 20 pacientes, o processo de reparação de feridas cirúrgicas produzidas por exodontias. Foram utilizados dois grupos de estudo;

dez pacientes foram designados casualmente para fazerem parte do grupo experimental, em que as falhas foram preenchidas com PRGF. Em cinco, o PRGF foi misturado com osso autógeno para prevenir colapso da ferida. Nos sítios-controle o PRGF não foi utilizado. O exame de material coletado dez e 16 semanas após a cirurgia mostrou epitelização completa em 100 % dos casos, em grau significativamente maior que nas áreas não tratadas com PRGF.

No Brasil, Píspico (2002) produziu duas feridas cirúrgicas em tecido mole do palato de cães Beagle, colocando PRP em uma e deixando formar-se o coágulo natural na outra. Análises processadas após dois, quatro, sete, 14 e 21 dias mostraram que nas feridas que receberam aplicação de PRP a reparação do tecido mole foi mais acelerada.

3.7. Plasmas rico e pobre em plaquetas (PRP e PPP)

O PRP é uma preparação autógena, com alta concentração de plaquetas obtidas a partir da centrifugação do sangue total (LANDESBURG et al., 1999; MARX et al., 1998) adicionado de citrato para impedir sua coagulação (OBARRIO et al., 2000).

Devido à diferença de densidade e peso molecular, as células sangüíneas irão se organizar durante a centrifugação em três níveis diferentes. As hemácias ocupam a porção mais inferior enquanto o plasma, contendo as plaquetas, ocupa a porção mais superior. Nesse plasma ainda podem se diferenciar dois níveis, sendo que o PRP ocupará a porção intermediária, entre as células vermelhas e o plasma pobre em plaquetas ou PPP (MARX et al., 1998).

A plaquetometria do PRP oscila em torno de 500 mil a um milhão de plaquetas por microlitro (OBARRIO et al., 2000). No PPP, mais adequadamente denominado de plasma rico em fibrinogênio, são detectadas cerca de 30 a 60 mil plaquetas por microlitro. A Ortopedia e a Cirurgia Plástica têm se valido das propriedades adesivas da fibrina e da aplicação de um derivado de fibrinogênio em hemorragias cerebrais e hepáticas.

Essa "cola de fibrina" mimetiza os últimos passos da cascata de coagulação com a conversão de fibrinogênio em fibrina, cuja função primária é a obtenção de hemostasia e a adesão dos retalhos. Sua eficácia no selamento de capilares controla facilmente o sangramento, reduzindo a formação de edemas e hematomas em cirurgias plásticas (MAN et al., 2001).

Depois de obtidos, o PRP que além das plaquetas contém leucócitos, e o PPP, podem ser convertidos em gel pela adição de trombina bovina e cloreto de cálcio (WHITMAN; BERRY; GREEN, 1997). A trombina, na presença de cálcio, promove a clivagem do fibrinogênio plasmático em fibrina. Forma-se, então, um composto insolúvel, de consistência semelhante a um gel, que no caso do PRP estimula a degranulação das plaquetas e a liberação de citocinas que funcionam como fatores de crescimento (OBARRIO et al., 2000; WHITMAN; BERRY; GREEN, 1997).

O PRP tem numerosas aplicações principalmente em Cardiologia e Neurocirurgia. Recentemente tornou-se comum seu uso em procedimentos de enxerto ósseo (LANDESBERG et al., 2000). Também tem ampla indicação na Cirurgia Bucomaxilofacial, especialmente para melhorar a incorporação de enxertos autógenos, pois seu gel permite que os enxertos particulados possam ser adaptados e mantidos no leito receptor, sem o risco de extrusão (WHITMAN; BERRY, 1998) facilitando, assim, as reconstruções mandibulares, os reparos de fissuras e fístulas buço-nasais ou buco-sinusais e reconstruções necessárias à colocação de implantes (WHITMAN; BERRY; GREEN, 1997).

O conceito é que o PRP é um coágulo de fibrina (às vezes citado como cola de fibrina), rico em plaquetas as quais liberam, em períodos cíclicos, PDGF e TGF- β .

O PDGF parece ser o primeiro fator de crescimento presente na ferida e inicia a reparação do tecido conjuntivo, incluindo o ósseo. As atividades específicas mais importantes do PDGF incluem mitogênese (aumento da população de células, principalmente as implicadas na reparação), angiogênese (mitose endotelial) e

atividades de macrófagos (debridamento da ferida e origem da segunda fase dos fatores de crescimento para o reparo continuado e regeneração óssea). Há aproximadamente 0,06mg de PDGF por milhão de plaquetas ou cerca de 1.200 moléculas de PDGF por plaqueta, demonstrando o grande potencial destas (ROSSI JÚNIOR; LEMOS; PÍSPICO, 2001).

O aumento da quantidade inicial de PDGF propicia maior atividade da célula osseocompetente de forma mais completa do que quando ocorre no enxerto e no meio do coágulo apenas. TGF- β 1 e β 2 são os fatores de crescimento mais protéicos envolvidos com o reparo do tecido conjuntivo em geral e, com o tempo, se transformam em fator de remodelação óssea. Sua função mais importante parece ser a quimiotaxia e a mitogênese dos precursores de osteoblastos e sua habilidade para estimular sua deposição de matriz de colágeno na reparação da ferida e do osso (MARX et al, 1998).

Dias; Barros e Andrade (2002), utilizando PRP com concentração de plaquetas em torno de 300 %, confirmaram que os fatores de crescimento atuam na regeneração de diversos tecidos.

Outro aspecto que desperta o interesse dos pesquisadores é a influência de substâncias antiplaquetárias no PRP. Yazawa et al. (2004) estudaram a influência dessas substâncias na concentração de fatores de crescimento presentes no PRP. Confeccionaram pílulas com plaquetas obtidas do sangue de humanos, às quais foram ou não adicionadas as substâncias antiplaquetárias prostaglandina E₁, aspirina e aspirase. Das pílulas foram feitas suspensões de plaquetas e foi medida a concentração de PDGF e o TGF- β 1 nas amostras. Houve concentração 400 % maior na amostra contendo substâncias antiplaquetárias, permitindo concluir que essas substâncias são efetivas no aumento da concentração de fatores de crescimento no PRP.

Chagas; Oliveira e Bortoli (2004) utilizaram o PRP como coadjuvante de enxertos autógenos em pacientes com atrofia óssea intrabucais. Cobrindo todo o enxerto foi utilizado o PPP como "membrana autógena". No pós-operatório, os pacientes foram

avaliados em três, cinco e sete dias. Apesar de que em alguns pacientes não foi possível a total coaptação das bordas da ferida cirúrgica devido ao grande volume do material enxertado, foi constatado que nos 12 analisados ocorreu fechamento primário das suturas. Após 60 horas foi observada ausência de deiscência, sem exposição do enxerto nos três casos de bordas não coaptadas. Após cinco dias as suturas foram removidas e observou-se diminuição do edema e de hematomas e os pacientes relataram bem-estar e quase nenhum incômodo na área.

3.7.1. Protocolos de obtenção do PRP e PPP

Um problema que ainda persiste no preparo do PRP e do PPP é a existência de muitos protocolos, nos quais variam basicamente o tempo de centrifugação e a força gravitacional desenvolvida pela centrífuga, que é diretamente proporcional ao raio da centrífuga utilizada e as rotações por minuto. A fórmula adotada é

$$FCR=0,00001118 \times R \times N^2,$$

onde FCR é a força centrífuga relativa medida em gravidades(G), R é o raio da centrífuga e N são as rotações por minuto. Aplicando essa fórmula podemos utilizar qualquer centrífuga e adaptá-la a qualquer protocolo.

Marx et al. (1998) apresentaram uma técnica de preparo de PRP que produz uma concentração de plaquetas humanas na ordem de 338 % e identificou o fator de crescimento derivado de plaquetas e o fator beta de crescimento de transformação dentro delas.

Anitua (1999) propôs um protocolo com uma única centrifugação a 160G por seis minutos.

Sonnleitner et al. (2000) descreveram um outro, que preconiza duas centrifugações, a primeira a 160G por 20 minutos e a segunda a 400G por 15 minutos.

Landesberg et al. (2000) descreveram que a melhor concentração de plaquetas foi obtida quando se centrifugou todo o sangue a 200G por dez minutos e depois o plasma, ressuspensão, foi novamente centrifugado na mesma intensidade; por outro lado, as centrifugações por um período inferior a cinco minutos não tiveram sucesso em individualizar as plaquetas. Também usaram o ácido etilenodiaminotetracético como anticoagulante, mas as plaquetas se apresentaram rompidas e na solução foram observados muitos restos celulares.

Gonshor (2002) estabeleceu um protocolo utilizando também duas centrifugações, a primeira a 160G por dez minutos e a segunda a 400G por mais dez minutos. Segundo o autor, o diferencial de sua técnica é a utilização da centrífuga ACE, onde os tubos ficam inclinados tanto em repouso quanto durante a centrifugação.

Rossi Júnior; Lemos e Píspico (2001) propuseram um protocolo simplificado de obtenção de PRP, utilizando centrífuga convencional e uma única centrifugação a 750 rpm por dez minutos.

Jahn (2002) mostrou vantagens no uso de uma centrifugação a 200G durante dez minutos seguida de outra, na mesma força gravitacional, durante 15 minutos.

Efeoglu; Akçay e Ertürk (2004) também preconizam duas centrifugações, a primeira a 300G por dez minutos e, a segunda, a 5.000G por cinco minutos.

Comparando dois protocolos anteriores, Weibrich (2005) demonstrou a vantagem do método PCCS (3i / *implants innovations*), que utiliza duas centrifugações, a primeira a 3.000 rpm por 3,75 minutos e a segunda a 3.000 rpm por 13 minutos, no sentido de promover maior concentração de leucócitos, TGF- β 1 e PDGF-AB.

3.7.2. Coagulação (formação do gel)

Como o PRP e o PPP são elaborados a partir do sangue tratado por anticoagulante, para que possam ser usados como enxertos é necessário transformá-los em gel, promovendo sua coagulação (MARX, 1999). Na literatura existem vários protocolos, como associação de cloreto de cálcio com trombina bovina (MARX et al., 1998), Botropase® (VERCELOTTI; RUSSO; GIANOTTI, 2002), a formulação ITA® (LANDESBURG et al., 2000) ou apenas o cloreto de cálcio, com ou sem controle de temperatura (ANITUA, 1999).

A utilização de cloreto de cálcio e trombina bovina é defendida por vários autores (GONSHOR, 2002; MARX et al., 1998; WHITMAN; BERRY; GREEN, 1997). O procedimento consiste na adição, ao PRP e ao PPP, de cloreto de cálcio a 10 %, na proporção de 1:8 ou 1:6 (MARX, 1999) e 10 mil unidades de trombina bovina. O cloreto de cálcio neutraliza o efeito anticoagulante do citrato e a trombina bovina inicia a cascata de coagulação.

A utilização da trombina bovina foi criticada por induzir a formação de anticorpos para os fatores de coagulação V, VIII e a própria trombina humana, propiciando, de forma não-dose-dependente, o aparecimento de hemorragias. No entanto, trabalhos mais atuais mostraram que seu uso como hemostático em mais de dez milhões de cirurgias ortopédicas e neurológicas induziu sangramento em menos de 20 pacientes, evento que não ocorre em função do anticorpo para a trombina bovina, mas do fator bovino "Va" que contamina o processo de preparação da trombina (MARX, 2004).

Em função dessa controvérsia e até mesmo em função do custo, muitos autores utilizam apenas o cloreto de cálcio para reverter o efeito anticoagulante do citrato. Anitua (1999) e Sonnleitner et al. (2000) defendem protocolos que utilizam apenas o cloreto de cálcio a 10% na concentração de 50µl de CaCl₂:1cc de PRP. A realização do procedimento à temperatura de 37°C acelera a formação do gel. Com a trombina bovina

o processo dura em torno de dois a três minutos, enquanto que com uso apenas do cloreto de cálcio, o processo leva de dez a 20 minutos. Além da temperatura, a adição de pequena quantidade de sangue total também pode acelerar o processo (MARX; GARG, 2002).

Landesberg et al. (2000) quantificaram, por imunoenensaio (ELISA), os níveis de fatores de crescimento no gel de PRP coagulado com o gel ITA (Natex Technologus Inc.) ou pela adição de trombina e cloreto de cálcio. Ambos os métodos produzem gel de PRP em menos de 30 minutos. Os níveis de PDGF e TGF- β foram similares, mostrando que o uso do ITA para preparação do gel é equivalente ao de cloreto de cálcio e trombina, sem a necessidade de equipamento especial e risco de coagulopatia.

4. MATERIAIS E MÉTODO

4.1. Atendimento aos princípios da Bioética

Esta pesquisa obedeceu às normas preconizadas pela Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS sobre diretrizes e normas reguladoras de pesquisa envolvendo seres humanos e também à Declaração de Helsinque, tendo sido aprovada pela Comissão de Ética da Universidade de Santo Amaro, UNISA, Parecer nº 26/2005 (ANEXO 1). Os pacientes selecionados receberam informações detalhadas a respeito dos procedimentos que seriam realizados (Carta de Informação - ANEXO 3) e assinaram um termo de consentimento (ANEXO 4); os dados anamnésicos foram registrados numa ficha (ANEXO 5).

A pesquisa foi prospectiva, comparativa, controlada e randomizada. A fase clínica, constituída pelas cirurgias, acompanhamento pós-operatório e avaliações clínicas, foi executada em pacientes atendidos nas clínicas do Curso de Mestrado em Implantodontia e de Cirurgia da UNISA.

4.2. Teste de padronização da metodologia de obtenção do PRP e PPP

Antes de iniciarmos a pesquisa propriamente dita, procedemos à verificação da eficácia da técnica de obtenção do PRP proposta por Gonshor (2002) utilizando a centrífuga ACE®¹. Esse teste consistiu na coleta do sangue de quatro pacientes e na contagem de plaquetas do sangue total, do PRP e do PPP.

Além disso, para padronização das outras etapas da metodologia, foi selecionado um paciente com as mesmas características dos que integrariam a pesquisa. Nos dois meses que antecederam ao início da fase cirúrgica, esse paciente foi submetido aos mesmos procedimentos realizados nos participantes efetivos, mas não foi inserido na

¹ACE Surgical Supply and Surgical Science Systems, USA.

coleta dos dados, tendo sua importância na padronização da metodologia científica do trabalho.

4.3. Seleção dos pacientes: critérios de inclusão e exclusão

Foram selecionados sete pacientes de ambos os sexos e com idades entre 20 e 65 anos, totalizando 36 alvéolos (Tabela 1), de acordo com os seguintes critérios:

A - indicação de extração bilateral de três, seis ou nove dentes superiores ou inferiores na mesma arcada, com indicação de posterior reabilitação com implantes dentários;

B - entendimento do propósito da pesquisa e aceitação de assinar o termo de consentimento;

C - ausência de infecções mucosas próximas ao local da extração e de outras doenças infecciosas como gengivite e periodontite;

D - ausência de discrasias sangüíneas, uso de anticoagulantes, antiagregantes plaquetários e antiinflamatórios, e de doenças sistêmicas que pudessem contraindicar o tratamento proposto.

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

Por outro lado, os critérios de exclusão adotados foram ausência de entendimento dos fatores de inclusão acima mencionados; desistência, abandono ou falta de colaboração; ocorrência de gravidez ou enfermidade que impedisse a continuidade do estudo até a etapa da coleta de material para análise histológica.

Conforme demonstrado na Tabela 1, a amostra total foi constituída por 36 alvéolos, sendo 24 utilizados como testes (12 preenchidos com PRP e 12 com PPP) e 12 como controles. A escolha dos alvéolos-testes e controles foi determinada por sorteio, sendo estabelecido que o do meio sempre seria o controle, o que estivesse à direita dele receberia o PPP e o que estivesse à esquerda receberia o PRP.

TABELA 1 - Posição, na arcada dentária, dos dentes com necessidade de exodontia em cada um dos sete pacientes selecionados.

Paciente	Caso	Dentes a serem extraídos
J.C.	1	34, 37, 43
	2	11, 22, 27
	3	12, 21, 26
R. M. S.	4	13, 14, 23
M. S. S.	5	24, 26, 27
A. C.	6	22, 24, 25
	7	37, 46, 42
B. R. M.	8	13, 17, 23
R. N.	9	23, 24, 25
	10	44, 45, 46
	11	21, 17, 27
F.P.C.	12	33, 43, 45

4.4. Coleta do sangue e obtenção dos géis de PRP e PPP

A coleta das amostras de sangue foi realizada após o paciente ser posicionado na cadeira cirúrgica e ter seu braço limpo com água e sabão e ser submetido a antissepsia com álcool a 70 %. Foram coletadas duas amostras de 8,5ml do sangue de cada paciente (Fig. 7), de forma a mais atraumática possível, de uma veia calibrosa da face cubital do antebraço, ora a basilíca, ora a cefálica. Cada amostra foi recolhida em um tubo de vidro siliconizado a vácuo Vacutainer², com capacidade de 10ml, contendo 1,5ml do anticoagulante citrato de sódio a 3,8 % (Fig.1), que capta e neutraliza os íons cálcio encontrados no sangue, formando quelatos que impedem sua coagulação. Além disso, o citrato de sódio não altera os receptores de membrana das plaquetas, permitindo a reversão da coagulação na fase posterior em que se adiciona cloreto de cálcio. Os tubos foram homogeneizados manualmente para que todo o sangue coletado entrasse em contato com o citrato de sódio. Em seguida, foram levados à centrífuga ACE e girados a 160G por dez minutos, para se obter a separação do sangue em três componentes básicos com diferentes densidades e pesos moleculares (do menos denso para o mais denso): o PPP, o PRP e as hemácias. Segundo Marx (1998, 1999), 1 a 3mm da parte superior do extrato de glóbulos vermelhos contém plaquetas maiores e mais recentemente produzidas e leucócitos (*buffy-coat*) e, portanto, esta parte foi incluída no PRP. O PRP, o PPP e o *buffy-coat* foram aspirados separadamente com o auxílio de seringas de 5ml ligadas a agulhas de 63mm e colocados em Vacultainer vazios, novamente colocados de forma balanceada na centrífuga e rodados a 400G por dez minutos. Para que o PRP e o PPP pudessem ser usados no preenchimento dos alvéolos dentários, foi necessário iniciar o processo de coagulação, obtido pela adição,

² Becton Dickinson, USA

ao volume de PRP produzido, de cloreto de cálcio a 10 %³ na proporção de 1:10 e 5.000 unidades de trombina bovina⁴

4.5. Atos cirúrgicos

As cirurgias foram realizadas seguindo padrões rigorosos de biossegurança. A anestesia foi obtida por injeção de mepivacaína a 2 % com levonordefrin⁵, escolhida devido ao seu rápido início de ação e grande poder de difusão nos tecidos. A antissepsia da cavidade bucal foi realizada por enxaguatório com solução de digluconato de clorexidina a 0,12 %⁶ e a extrabucal com aplicação de solução de clorexidina a 2 %⁷, após as quais foram colocados campos cirúrgicos estéreis. A técnica cirúrgica incluiu um retalho mucoperiósteo com duas incisões relaxantes no lado vestibular do rebordo alveolar, adjacentes aos locais das exodontias. Adotamos este tipo de incisão com o objetivo de conseguir melhor visibilidade do campo operatório e, principalmente, para garantir o fechamento total da ferida cirúrgica, proporcionando uma reparação por primeira intenção. As exodontias foram realizadas por via alveolar, utilizando um fórceps apropriado para cada grupo de dentes e, em seguida, os alvéolos foram rigorosamente curetados para remover as fibras remanescentes do ligamento periodontal. Todos os alvéolos-teste foram preenchidos com géis de PRP ou PPP até a margem da crista óssea e a ferida foi suturada com fio de seda 03⁸. Os alvéolos-controle foram preenchidos naturalmente por coágulo sangüíneo e também suturados de forma semelhante. A coleta do material para análise histológica foi realizada 28 dias após a realização das exodontias.

³ APP, Schaumburg, IL, USA

⁴ Gentrac Inc, Middleton, WI, USA

⁵ DFL, Rio de Janeiro - Brasil

⁶ Periogard, Colgate Palmolive, São Bernardo do Campo - Brasil

⁷ Farmavale (farmácia de manipulação), Lorena - Brasil

⁸ Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos - Brasil

Considerando a hipótese de que o PRP e o PPP seriam capazes de intensificar o processo de regeneração, foi necessário escolher um tempo para realização das biópsias que antecederesse o tempo de reparação fisiológica. A coleta de material foi realizada sempre pelo mesmo cirurgião, que utilizou um bisturi circular, para contra-ângulo, com 4,3mm de diâmetro, que removeu, do centro da área tratada (centro do alvéolo original), tecido mole com profundidade média de 4,0mm. Para alcançar essa padronização, antes das exodontias foram confeccionados guias cirúrgicas de acrílico transparente, que serviram de orientação tanto no momento da abertura para coleta do tecido como da colocação dos implantes. Após a coleta dos espécimes e, quando possível, aproveitando as perfurações realizadas pela broca trefina executadas por um colega que paralelamente pesquisava a influência do PRP e do PPP no grau de reparo ósseo, foram realizadas as inserções de implantes osseointegráveis ACE®⁹ com superfície tratada, escolhidos de acordo com a quantidade de osso disponível em cada área. A estabilidade primária dos implantes foi alcançada na região apical dos alvéolos originais.

4.6. Análise histológica

Após terem permanecido dois dias imersos em solução de Boin, os fragmentos de tecido mole correspondentes às áreas experimentais e controle foram preparados para estudos histológicos, procedendo-se a inclusão do material conforme as seguintes etapas:

⁹ ACE Surgical Supply and Surgical Science Systems, USA.

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

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

c) infiltração: foram realizados três banhos em parafina a 600°C, com duração de 20 minutos cada. Após o último o material foi incluído em parafina.

Em seguida os blocos de parafina foram levados ao micrótomo, obtendo-se cortes transversais seriados com 6µm de espessura, que foram fixados em lâminas de vidro, mantidos em estufa por três horas e corados com hematoxilina-eosina (HE).

Todas as amostras previamente codificadas (Tabela 2) foram enviadas para análise em laboratório, sem identificação das amostras com relação ao grupo a que pertenciam e analisadas por um mesmo patologista que não estava ciente de quais sítios haviam sido tratados com PRP, PPP e coágulo sangüíneo.

TABELA 2 - Codificação dos espécimes enviados para análise histológica.

Casos	Pacientes	Alvéolos tratados com PRP	Alvéolos tratados com PPP	Alvéolos preenchidos naturalmente com coágulo sangüíneo (controle)
1	J. C.	37	43	34
2		27	11	22
3		26	12	21
4	R. M. S.	23	13	14
5	M. S. S.	27	24	26
6	A. C.	25	22	24
7		37	46	42
8	B. R. M.	23	17	13
9	R.N.	44	46	45
10		27	17	21
11		25	23	24
12	F.P.C.	33	45	43

Os espécimes foram analisados por um mesmo histopatologista, como podemos conferir no laudo (ANEXO 2), utilizando varredura longitudinal em microscópio óptico¹⁰ que dispõe de três lentes oculares que permitiram-nos acompanhar o exame.

Nesse exame foram utilizados critérios que pudessem avaliar o grau de reparação de tecidos moles propiciado pelo PRP e PPP. Para tanto, valemo-nos dos parâmetros preconizados por Boyne (1966) que denunciam diferentes estágios dessa reparação: presença ou ausência de células mesenquimais indiferenciadas, quantidade de infiltrado inflamatório, quantidade de vasos neoformados e graus de fibrose e hialinização.

Com base na análise conjunta dos parâmetros detectados em cada caso, foi conferido um escore que possibilitou as conclusões deste trabalho: 0, 1, 2 e 3, respectivamente para os tecidos que apresentavam regeneração em grau ausente, discreto, moderado ou acentuado.

A seqüência dos procedimentos experimentais por nós adotados está resumida no Fluxograma e na seqüência fotográfica apresentados nas páginas seguintes.

¹⁰ Nikon Eclipse E 200 - Japão.

FLUXOGRAMA

Seleção dos pacientes por anamnese e exames clínicos, laboratoriais e radiográficos



Coleta de 17ml de sangue periférico



Primeira centrifugação a 160G por 10 min.



Separação do sobrenadante e do plasma



Segunda centrifugação a 400G por 10 min.



Separação do PRP e do PPP e ativação de ambos com cloreto de cálcio a 10% + 5.000U de trombina bovina



Exodontia de três elementos na mesma arcada, colocação do PPP no alvéolo mais à direita, formação de coágulo natural no alvéolo do centro, colocação do PRP no alvéolo mais à esquerda e fechamento do tecido mole por primeira intenção.



28 dias

Exame clínico das condições do local e retirada, com bisturi circular, de amostra do tecido mole do local da ferida cirúrgica.



Amostras dos tecidos moles fixadas em Boin.



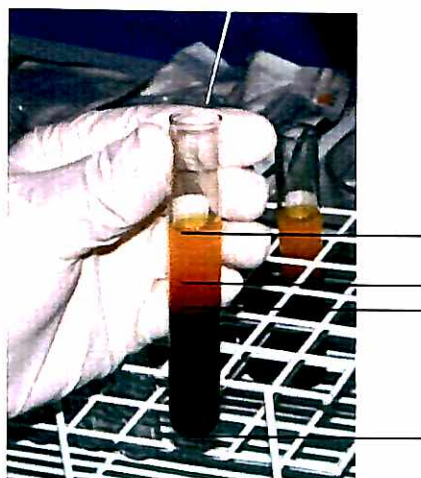
Análise histológica.

4.7. Seqüência fotográfica do experimento.

Figura 1 - Primeira centrifugação.



Figura 2 - Após a primeira centrifugação e separação do plasma total e PRP.



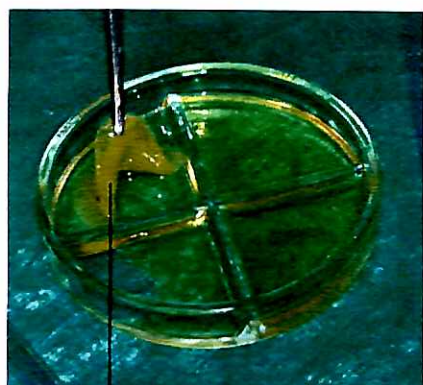
Plasma total
PRP
Hemácias

Figura 3 - Após a segunda centrifugação.



PPP
PRP

Figura 4 - Gel de PPP.



Gel de PPP

Figura 5 - Gel de PRP.



Gel de PRP

Figura 6 - Caso clínico na arcada superior.



Figura 7 - PPP colocado no alvéolo.

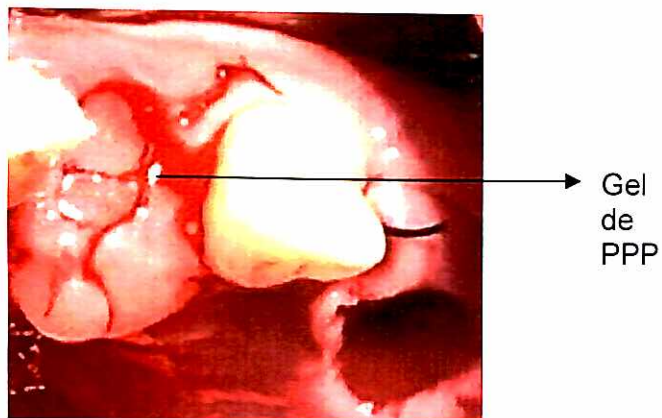


Figura 8 - Remoção dos espécimes gengivais.



Figura 9 - Aspecto após a remoção.



5. RESULTADOS

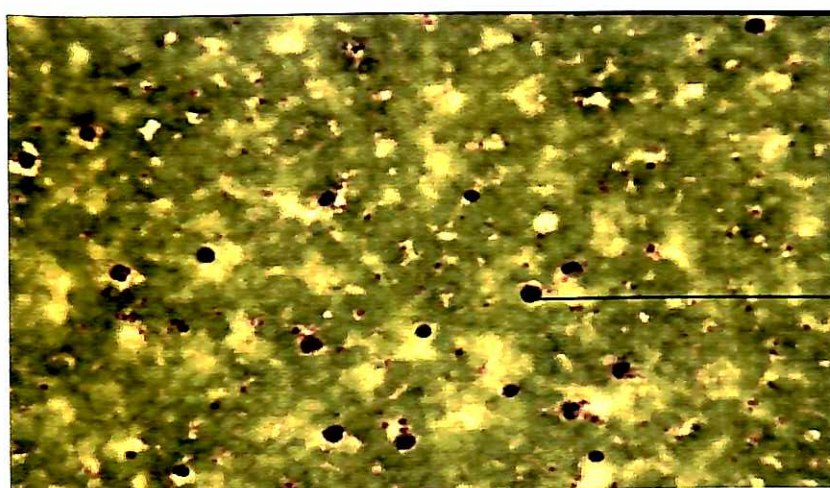
5.1. Contagem de plaquetas no sangue total, PRP e PPP

Na Tabela 3 está o resultado obtido na contagem das plaquetas no sangue, no PRP e no PPP dos quatro pacientes aleatoriamente selecionados, com a finalidade de padronização da técnica de obtenção do PRP e na Figura 10 está a comprovação da manutenção da integridade desses corpúsculos no PRP.

TABELA 3 - Contagem das plaquetas no sangue, PRP e PPP de quatro pacientes aleatoriamente selecionados, com a finalidade de padronização da obtenção do PRP.

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

Figura 10 - Esfregaço do PRP, corado por hematoxilina-eosina (HE), utilizado na padronização para atestar a integridade das plaquetas após as centrifugações.



→ Plaqueta íntegra

5.2. Análise histológica

Nas Tabelas 4 a 15 constam os escores conferidos pela histopatologista aos parâmetros de reparação visualizados nas amostras coletadas dos 12 casos.

TABELA 4 - Relação dos escores conferidos ao grau de presença dos critérios empregados na verificação da reparação dos tecidos moles do caso 1 em 28 dias.

Escore conferidos			
Parâmetros de regeneração de tecidos moles	Alvéolos tratados com PRP	Alvéolos tratados com PPP	Alvéolos-controle
Células mesenquimais indiferenciadas	0	0	0
Infiltrado inflamatório	3	1	2
Neovascularização	2	1	0
Fibrose	2	2	1
Hialinização	2	2	0
Nota	2	3	1

Legenda: 0 = ausente 1 = discreto 2 = moderado 3 = acentuado

TABELA 5 - Relação dos escores conferidos ao grau de presença dos critérios empregados na verificação da reparação dos tecidos moles do caso 2 em 28 dias.

Escore conferido				
Parâmetros de regeneração de tecidos moles	Alvéolos tratados com PRP	Alvéolos tratados com PPP	Alvéolos-controle	
Células mesenquimais indiferenciadas	2	0	1	
Infiltrado inflamatório	1	0	1	
Neovascularização	2	2	2	
Fibrose	2	3	2	
Hialinização	2	2	2	
Nota	2	3	2	

Legenda: 0 = ausente 1 = discreto 2 = moderado 3 = acentuado

TABELA 6 – Relação dos escores conferidos ao grau de presença dos critérios empregados na verificação da reparação dos tecidos moles do caso 3 em 28 dias.

Escore conferidos			
Parâmetros de regeneração de tecidos moles	Alvéolos tratados com PRP	Alvéolos tratados com PPP	Alvéolos- controle
Células mesenquimais indiferenciadas	2	1	2
Infiltrado inflamatório	1	1	1
Neovascularização	3	1	1
Fibrose	3	1	1
Hialinização	2	2	2
Nota	3	2	1

Legenda: 0 = ausente 1 = discreto 2 = moderado 3 = acentuado

TABELA 7 - Relação dos escores conferidos ao grau de presença dos critérios empregados na verificação da reparação dos tecidos moles do caso 4 em 28 dias.

Escore conferidos			
Parâmetros de regeneração de tecidos moles	Alvéolos tratados com PRP	Alvéolos tratados com PPP	Alvéolos-controle
Células mesenquimais indiferenciadas	1	0	0
Infiltrado inflamatório	2	3	3
Neovascularização	3	0	1
Fibrose	3	2	2
Hialinização	1	0	0
Nota	3	1	2

Legenda: 0 = ausente 1 = discreto 2 = moderado 3 = acentuado

TABELA 8 - Relação dos escores conferidos ao grau de presença dos critérios empregados na verificação da reparação dos tecidos moles do caso 5 em 28 dias.

Escore conferido			
Parâmetros de regeneração de tecidos moles	Alvéolos tratados com PRP	Alvéolos tratados com PPP	Alvéolos-controle
Células mesenquimais indiferenciadas	1	0	0
Infiltrado inflamatório	1	2	3
Neovascularização	3	3	1
Fibrose	3	2	2
Hialinização	3	2	2
Nota	3	2	1

Legenda: 0 = ausente 1 = discreto 2 = moderado 3 = acentuado

TABELA 9 - Relação dos escores conferidos ao grau de presença dos critérios empregados na verificação da reparação dos tecidos moles do caso 6 em 28 dias.

Parâmetros de regeneração de tecidos moles	Escore conferido		
	Alvéolos tratados com PRP	Alvéolos tratados com PPP	Alvéolos-controle
Células mesenquimais indiferenciadas	1	0	0
Infiltrado inflamatório	3	3	3
Neovascularização	2	2	2
Fibrose	1	1	0
Hialinização	0	0	0
Nota	2	3	2

Legenda: 0 = ausente 1 = discreto 2 = moderado 3 = acentuado

TABELA 10 - Relação dos escores conferidos ao grau de presença dos critérios empregados na verificação da reparação dos tecidos moles do caso 7 em 28 dias.

Escore conferido			
Parâmetros de regeneração de tecidos moles	Alvéolos tratados com PRP	Alvéolos tratados com PPP	Alvéolos- controle
Células mesenquimais indiferenciadas	1	0	1
Infiltrado inflamatório	1	1	1
Neovascularização	3	3	3
Fibrose	3	3	2
Hialinização	3	3	3
Nota	2	3	1

Legenda: 0 = ausente 1 = discreto 2 = moderado 3 = acentuado

TABELA 11 - Relação dos escores conferidos ao grau de presença dos critérios empregados na verificação da reparação dos tecidos moles do caso 8 em 28 dias.

Escore conferidos			
Parâmetros de regeneração de tecidos moles	Alvéolos tratados com PRP	Alvéolos tratados com PPP	Alvéolos- controle
Células mesenquimais indiferenciadas	1	0	0
Infiltrado inflamatório	1	1	2
Neovascularização	3	3	3
Fibrose	3	3	3
Hialinização	3	3	3
Nota	1	3	2

Legenda: 0 = ausente 1 = discreto 2 = moderado 3 = acentuado

TABELA 12 - Relação dos escores conferidos ao grau de presença dos critérios empregados na verificação da reparação dos tecidos moles do caso 9 em 28 dias.

Escore conferido			
Parâmetros de regeneração de tecidos moles	Alvéolos tratados com PRP	Alvéolos tratados com PPP	Alvéolos-controle
Células mesenquimais indiferenciadas	1	1	0
Infiltrado inflamatório	2	0	2
Neovascularização	3	2	2
Fibrose	2	2	2
Hialinização	2	3	2
Nota	2	3	2

Legenda: 0 = ausente 1 = discreto 2 = moderado 3 = acentuado

TABELA 13 - Relação dos escores conferidos ao grau de presença dos critérios empregados na verificação da reparação dos tecidos moles do caso 10 em 28 dias.

Escore conferido			
Parâmetros de regeneração de tecidos moles	Alvéolos tratados com PRP	Alvéolos tratados com PPP	Alvéolos-controle
Células mesenquimais indiferenciadas	1	0	0
Infiltrado inflamatório	1	1	3
Neovascularização	2	3	1
Fibrose	2	2	2
Hialinização	2	2	2
Nota	2	3	2

Legenda: 0 = ausente 1 = discreto 2 = moderado 3 = acentuado

TABELA 14 - Relação dos escores conferidos ao grau de presença dos critérios empregados na verificação da reparação dos tecidos moles do caso 11 em 28 dias.

Escore conferido			
Parâmetros de regeneração de tecidos moles	Alvéolos tratados com PRP	Alvéolos tratados com PPP	Alvéolos-controle
Células mesenquimais indiferenciadas	0	0	2
Infiltrado inflamatório	3	2	2
Neovascularização	1	3	2
Fibrose	2	2	1
Hialinização	2	2	1
Nota	2	3	1

Legenda: 0 = ausente 1 = discreto 2 = moderado 3 = acentuado

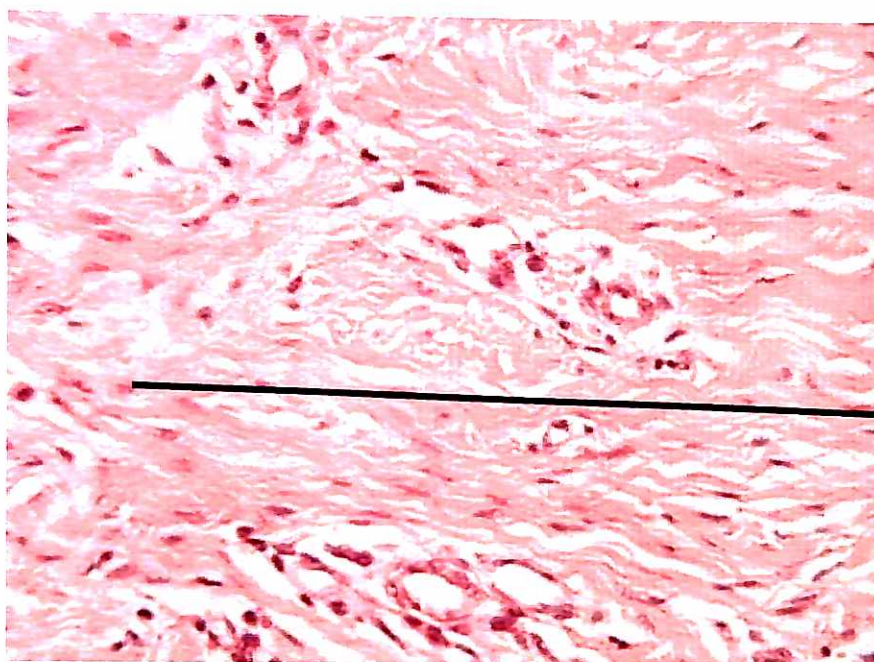
15 - Relação dos escores conferidos ao grau de presença dos critérios empregados na verificação da reparação dos tecidos moles do caso 12 em 28 dias.

Escore conferido			
Parâmetros de regeneração de tecidos moles	Alvéolos tratados com PRP	Alvéolos tratados com PPP	Alvéolos-controle
Células mesenquimais indiferenciadas	1	0	0
Infiltrado inflamatório	2	3	3
Neovascularização	2	2	2
Fibrose	2	1	1
Hialinização	1	0	0
Nota	3	2	2

Legenda: 0 = ausente 1 = discreto 2 = moderado 3 = acentuado

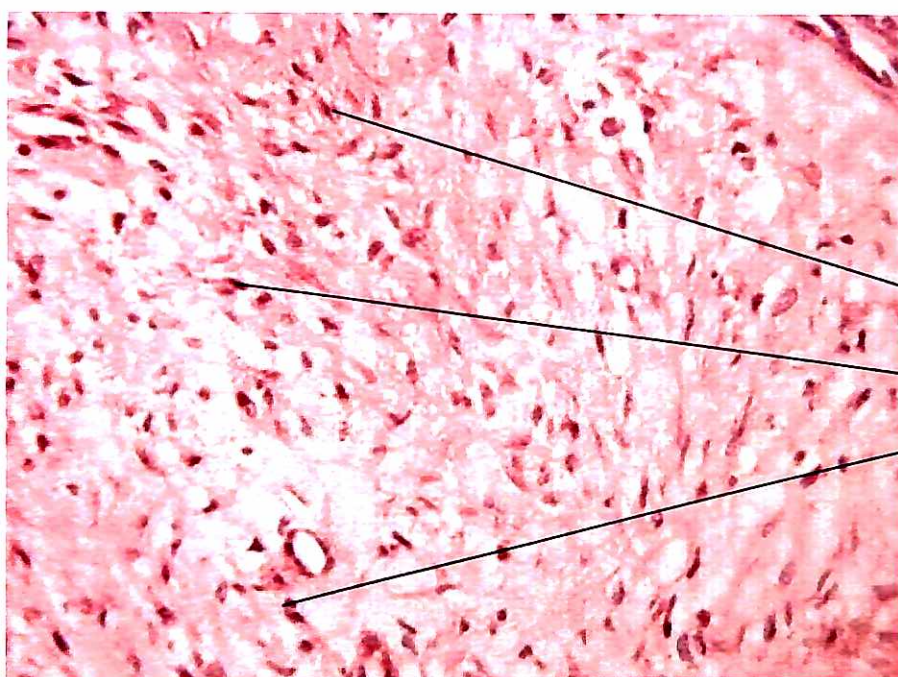
Dentre as amostras examinadas, selecionamos algumas no sentido de demonstrar as diferenças na atribuição dos escores (Figuras 11 a 18).

Figura 11 – Pequeno número de células mesenquimais (escore 1) em corte histológico de tecido mole alveolar corado por hematoxilina-eosina; 400x1,2.



Célula
mesenquimal

Figura 12 – Acentuada presença de células mesenquimais (escore 3) em corte histológico de tecido mole alveolar corado por hematoxilina-eosina; 400x1,0.



Células
mesenquimais

Figura 13 - Ausência de infiltrado de células inflamatórias (escore 0) em corte histológico de tecido mole alveolar corado por hematoxilina-eosina; 200x1,2.

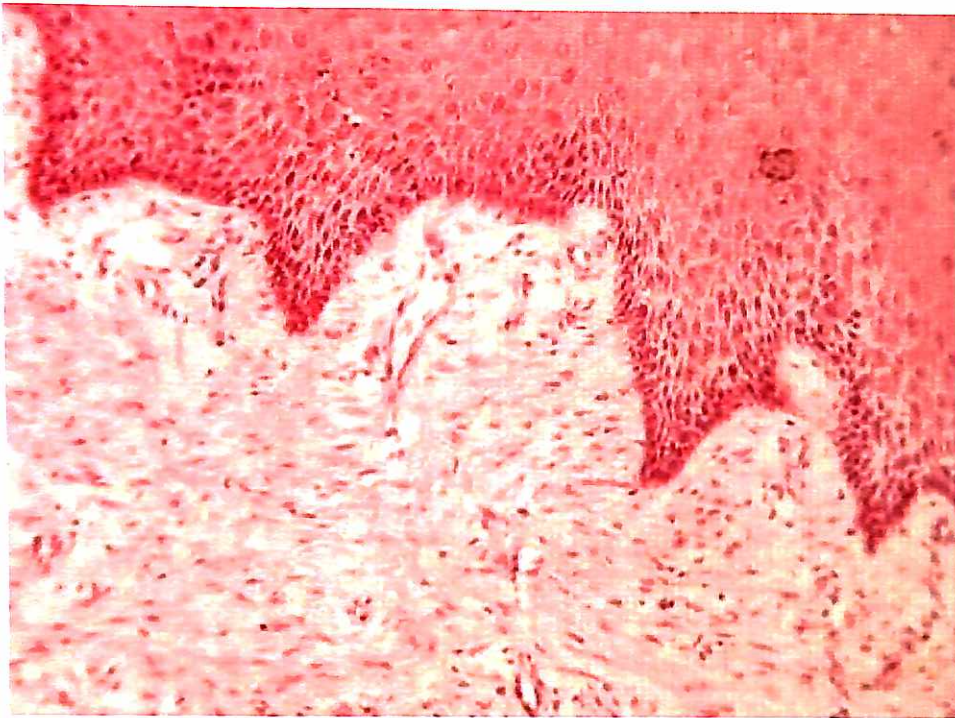


Figura 14 - Presença de acentuado grau de infiltrado de células inflamatórias (escore 3) em corte histológico de tecido mole alveolar corado por hematoxilina-eosina; 200x1,2.

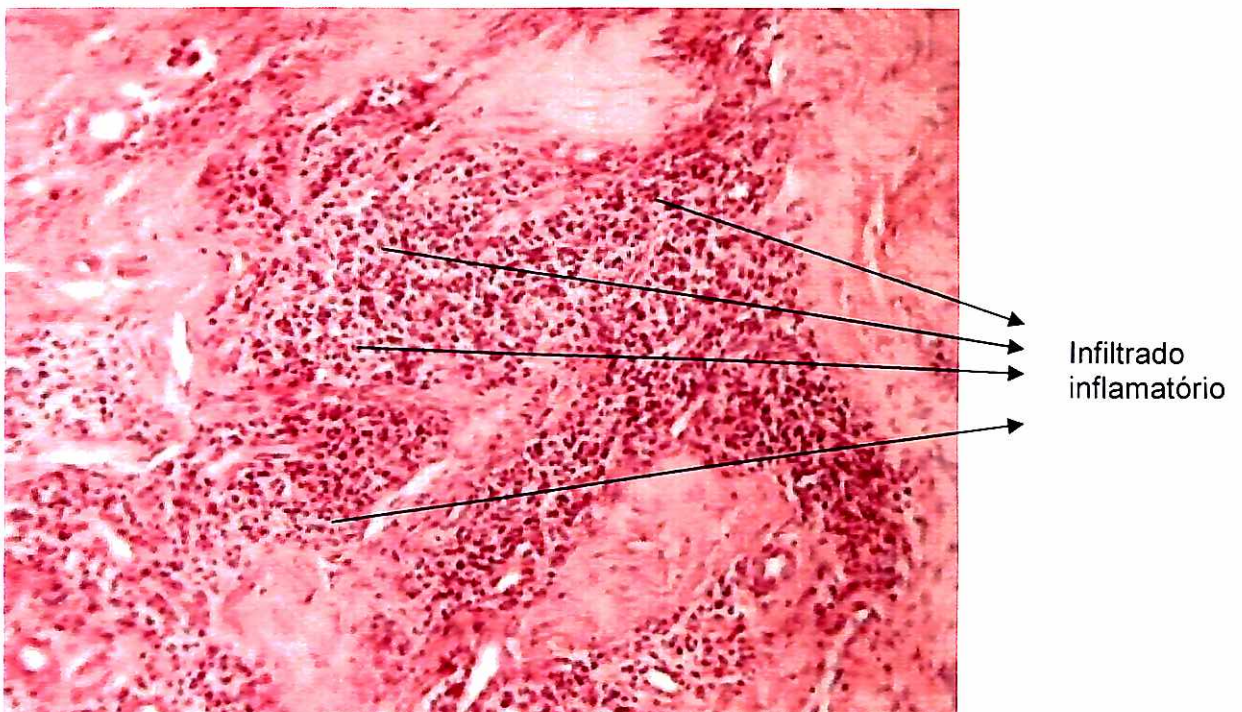


Figura 15 - Grau mínimo de neovascularização (escore 1) em corte histológico de tecido mole alveolar corado por hematoxilina-eosina; 200x1,2.

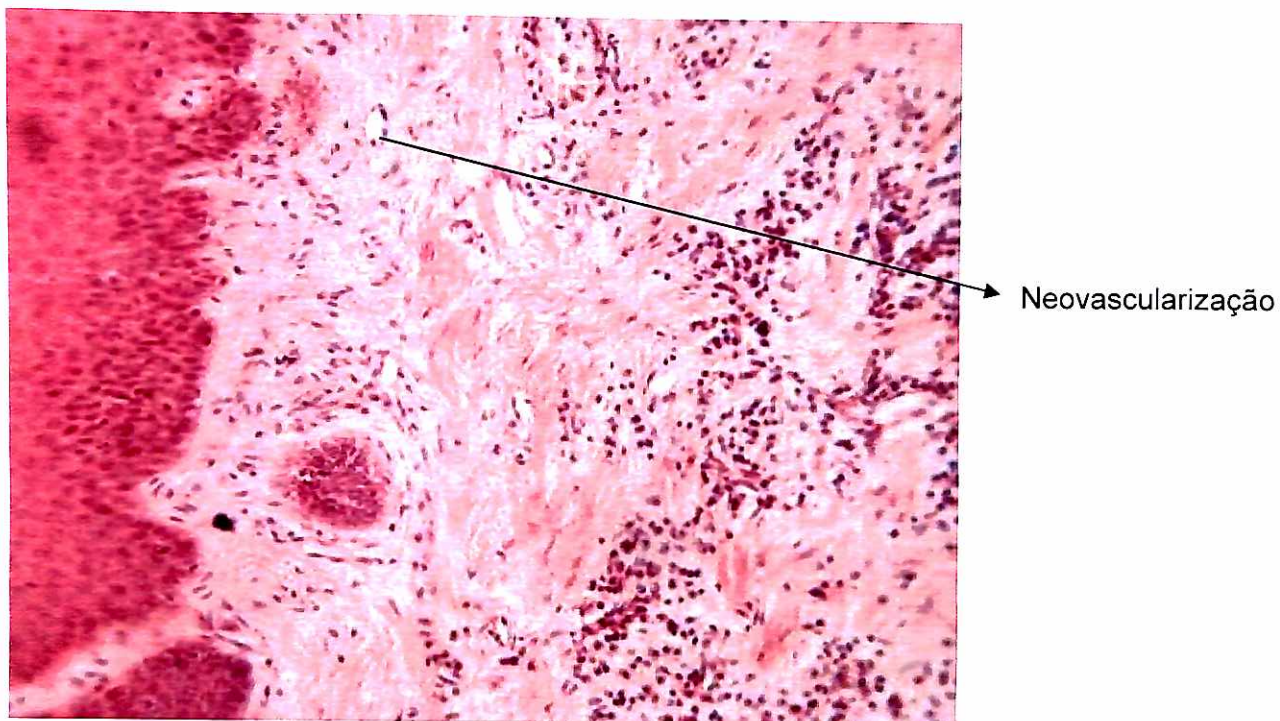


Figura 16 – Acentuado grau de neovascularização (escore 3) em corte histológico de tecido mole alveolar corado por hematoxilina-eosina; 200x1,2.

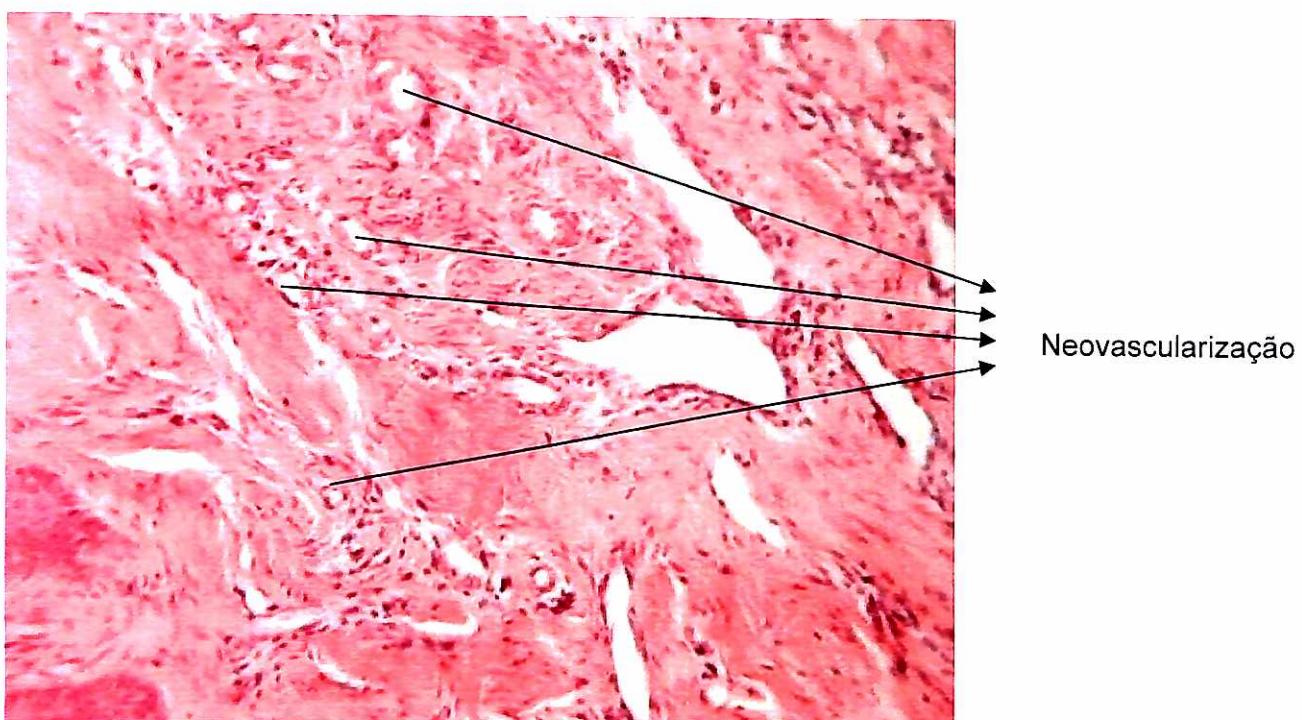


Figura 17 – Graus mínimos de hialinização e de fibrose (escore 1) em corte histológico de tecido mole alveolar corado por hematoxilina-eosina; 400x1,2. (Maior aumento para tentar uma melhor visualização dos parâmetros).

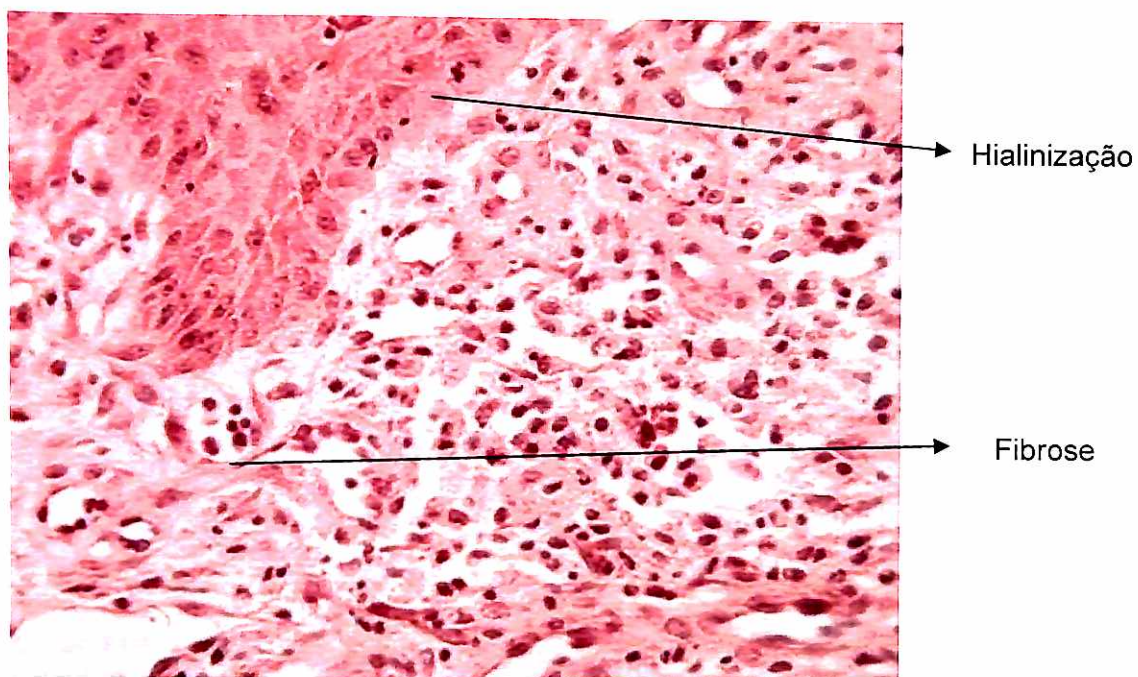
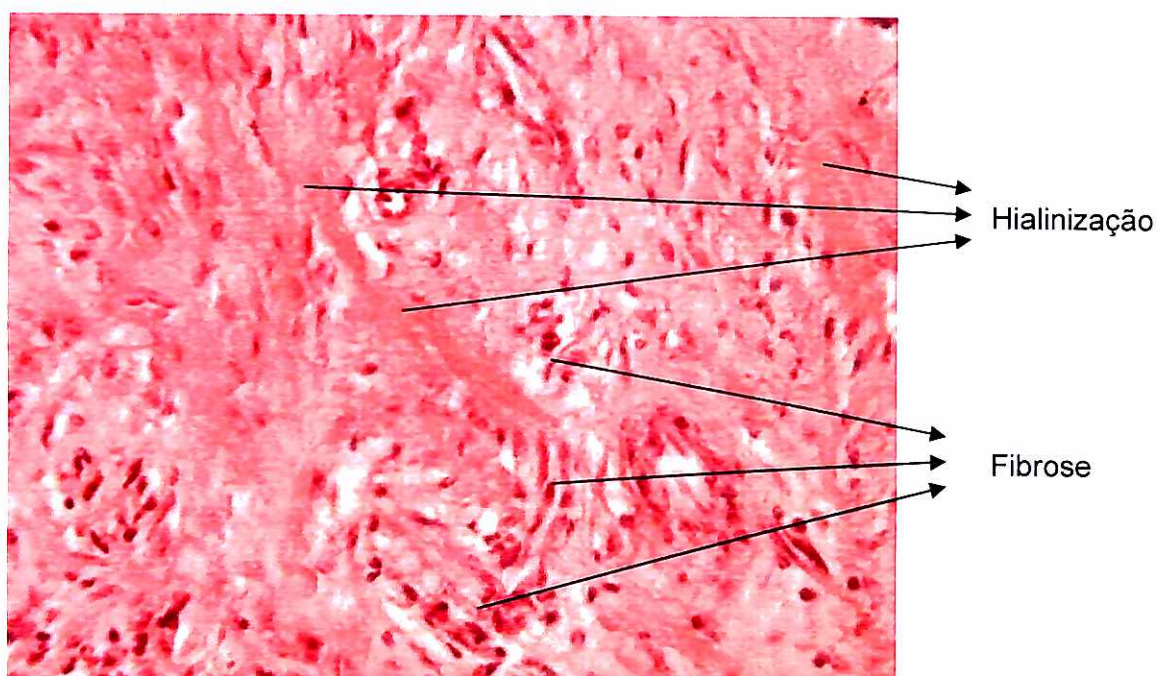


Figura 18 – Graus acentuados de hialinização e de fibrose (escore 3) em corte histológico de tecido mole alveolar corado por hematoxilina-eosina; 200x1,2.



Os escores conferidos na análise global dos parâmetros observados na análise histológica das 12 amostras de tecido mole alveolar coletadas são apresentados na Tabela 16.

TABELA 16 – Relação dos escores globais conferidos na análise dos parâmetros histológicos adotados para a verificação do grau de reparação das amostras de tecido mole que recobriam alvéolos dentais preenchidos 28 dias antes com PRP, PPP e coágulo sangüíneo (controle) mostrando, para cada caso analisado, o preenchimento que resultou no melhor nível de regeneração.

Escores conferidos

Caso	Alvéolos tratados com PRP	Alvéolos tratados com PPP	Alvéolos preenchidos com coágulo sangüíneo (controle)	Melhor regeneração obtida com
1	2	3	1	PPP
2	2	3	2	PPP
3	3	2	1	PRP
4	3	1	2	PRP
5	3	2	1	PRP
6	2	3	2	PPP
7	2	3	1	PPP
8	1	3	2	PPP
9	2	3	2	PPP
10	2	3	2	PPP
11	2	3	1	PPP
12	3	2	2	PRP

Legendas : Escore 01 = grau discreto de regeneração

Escore 02 = grau moderado de regeneração

Escore 03 = grau acentuado de regeneração

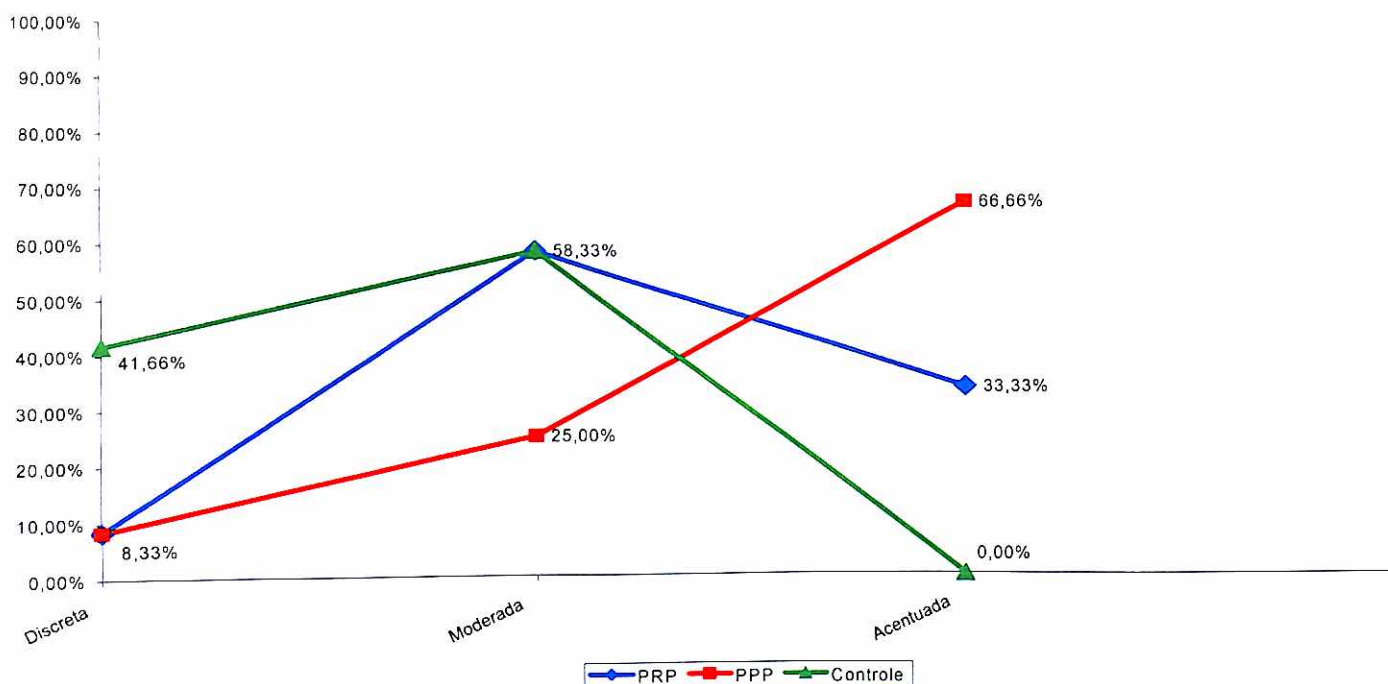
Os dados percentuais relativos aos diferentes níveis de regeneração tecidual em função do tratamento com PRP e PPP, tendo como controle as verificadas naturalmente, constam da Tabela 17 e da Fig. 19.

TABELA 17 – Percentuais de reparos teciduais considerados discretos, moderados ou acentuados, observados na análise histológica de tecidos moles 28 dias após os alvéolos dentais terem sido preenchidos com PRP, PPP ou coágulo sanguíneo.

	Reparação discreta	Reparação moderada	Reparação acentuada
PRP	8,33 %	58,33 %	33,33 %
PPP	8,33 %	25 %	66,66 %
CONTROLE	41,66 %	58,33 %	0 %

Figura 19 – Gráfico das porcentagens de tecidos moles com níveis histológicos de reparo considerados discretos, moderados ou acentuados, 28 dias após os alvéolos dentais terem sido preenchidos com PRP, PPP ou coágulo sanguíneo.

Gráfico



6. DISCUSSÃO

Na atualidade, após ter conseguido pleno êxito com a técnica de osseointegração, o implantodontista tem voltado sua atenção principalmente para resolver casos em que são necessários, antes da cirurgia de inserção, enxertos destinados a preencher grandes perdas ósseas. Para favorecer o crescimento de tecido mole para recobrimento de enxertos ósseos na boca, algumas técnicas têm sido desenvolvidas, entre elas a distração osteogênica, na qual o tecido mole “cresce” junto com o crescimento ósseo. A consagrada técnica do PRP tem sido utilizada mais com a finalidade de promover osseoindução e aparentemente nunca foi proposta como favorecedora da reparação da gengiva que recobre o alvéolo de dentes recém-extraídos. Mas o PPP, utilizado com a denominação de “cola autógena” principalmente em Neurocirurgia e Cirurgia Plástica devido às suas características de promover hemostasia e alto poder de regeneração de tecidos moles, não têm recebido a atenção devida pelos pesquisadores da Odontologia. O único relato de seu uso em cirurgia odontológica que nos foi possível encontrar no levantamento bibliográfico consta do capítulo redigido por Chagas; Oliveira e Bortolli Junior no livro “Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: da pesquisa científica à clínica odontológica” (PONTUAL; MAGINI, 2004); os autores usaram o PPP como membrana de recobrimento em cirurgias de elevação da membrana do seio maxilar nas quais o PRP foi usado como enxerto em conjunto com hidroxiapatita e osso humano liofilizado. Mas com relação à sua aplicação em alvéolos dentários formados em consequência de exodontias – um dos objetivos desta pesquisa – não nos foi possível encontrar nenhum relato científico.

A proposta deste experimento foi estudar, com base em dados histológicos, a tese de que um leito que necessita de reparação tecidual o fará quantitativa e qualitativamente melhor se a esse leito for adicionado o PRP e o PPP. De acordo com

vários pesquisadores que defendem seu uso, o gel de PRP libera grande concentração de fatores crescimento estimuladores do desenvolvimento tecidual. Por sua vez, o gel de PPP, em função do elevado teor de fibrina, promove alto grau de hemostasia e adesão tecidual.

O modelo experimental escolhido foi a reparação do alvéolo dental após exodontia, que apresenta uma cronologia dos processos biológicos reparacionais bem estudada notadamente por Lind (1998), Amler (1969) e Ohta et al. (1993).

De acordo com Lind (1998), o reparo do alvéolo dental humano após exodontia está completo ao redor de 60 dias, evidentemente incluindo o dos tecidos epitelial e conjuntivo. Este dado serviu de referência para determinarmos que o parâmetro a ser estudado seria a evolução do reparo do tecido conjuntivo.

Assim, definimos, como momento ideal para reabertura dos alvéolos dentais e coleta do material para análise histológica, 28 dias após as exodontias e a colocação de enxerto com o PRP e PPP. Embora a observação em 28 dias possa parecer um tanto quanto precoce, partimos da idéia de que nesse tempo a reparação do tecido conjuntivo estaria numa fase intermediária, possibilitando-nos avaliar o real efeito desses enxertos no aceleração da reparação da gengiva formada sobre os alvéolos dentários, tendo como base a ocorrida quando do preenchimento natural com o coágulo sangüíneo (controle). Nossa premissa foi que observações feitas em tempos maiores oferecem melhor condição para a reparação natural, dificultando a avaliação do desempenho dos enxertos.

Antes de iniciarmos a parte experimental efetiva deste estudo, em função da existência de vários protocolos, resolvemos definir uma técnica de obtenção e de ativação do PRP e do PPP.

Para a obtenção, estudamos e testamos diversas técnicas descritas na literatura e a que mais se mostrou eficiente foi a proposta por Gonshor (2002), que utiliza dupla centrifugação no aparelho ACE®. Esse autor fundamentou-se no trabalho

de Marx (1999), segundo o qual a concentração eficiente de plaquetas no PRP deve ser de pelo menos um milhão/ml em um volume de 5ml, obtida por centrifugação dupla; a primeira, a 160G por dez minutos, faz a separação entre as hemácias e o plasma (plaquetas e fibrinogênio) e a segunda, a 400G por dez minutos, separa as plaquetas do fibrinogênio.

Para a ativação do PRP e do PPP, também baseamo-nos em Marx (1999), segundo o qual dez minutos após o início da coagulação, as plaquetas secretam 70 % de seus fatores de crescimento e próximo de 100 % na primeira hora. Para controlarmos melhor esse tempo de liberação dos fatores de crescimento acrescentamos cloreto de cálcio a 10 % e trombina bovina na concentração de 5.000 U, como recomendado por Gonshor (2002). Essa mistura faz com que a coagulação do PRP e do PPP seja praticamente imediata, enquanto que se não usarmos a trombina, o tempo aumenta para dez ou 15 minutos, desperdiçando a maior parte dos fatores de crescimento (MAN et al, 2001; MARX, 1998).

Segundo alguns autores (ORTEL, 1994; SARA et al., 1994), a trombina bovina é imunogênica, podendo levar o indivíduo receptor à produção de anticorpos para o fator V da coagulação sangüínea. No entanto, recentemente foi comprovado que a trombina bovina pode ser utilizada com segurança, pois o pequeno número de hemorragias relatadas após cirurgias ortopédicas e neurológicas (menos de 20 casos em mais de dez milhões) não ocorreu pela formação de anticorpos para a trombina bovina, mas para o fator bovino "Va", um contaminante do processo de preparação da trombina (MARX, 2004). Na trombina bovina Gentrac[®], produzida desde 1997, a contaminação com o fator "Va" foi bastante reduzida, de 50mg/ml para 0,2mg/ml. Além disso, a trombina bovina usada como hemostático é aplicada em altas doses (superiores a dez mil unidades) e diretamente sobre a ferida, o que não ocorre com a utilizada no PRP (apenas 5.000 U).

Para que tivéssemos parâmetros de comparação das diferentes etapas de reparação dos tecidos moles, foi desenvolvido um sistema de pontuação na forma de escores, levando-se em consideração a análise conjunta do grau de presença de cinco parâmetros observados nas amostras analisadas histologicamente: células mesenquimais indiferenciadas, infiltrado inflamatório, neovascularização, fibrose e hialinização. Esses parâmetros fazem parte de todo um conjunto de reparação e não podem ser analisados separadamente por estarem intimamente relacionados.

Cada parâmetro analisado tem seu grau de importância e só pela análise conjunta deles podemos determinar o grau de reparação do tecido mole. A presença de células mesenquimais indiferenciadas é sempre muito desejada em qualquer processo reparador, pois demonstra grande poder de transformar células indiferenciadas em células secretoras (osteoblastos, fibroblastos, etc.) No entanto, como nosso objetivo foi observar a reparação no período de 28 dias, a presença destas células confere ao espécime a característica de estar em um estágio menos avançado de reparação. A presença de infiltrado inflamatório só é notada também nos estágios iniciais da reparação, por isso quanto maior o grau de inflamação, menor o estágio de reparação. A neovascularização é responsável pela nutrição das células que atuam na reparação e só é notada nos estágios intermediários e finais da reparação, por isso quanto maior a vascularização maior o grau de reparação. A fibrose está presente nas etapas finais da reparação e por isso quanto maior a fibrose, mais evoluído está o processo de reparação. A hialinização é a presença de um tecido maduro que aparece em processos cicatriciais ou reparativos; por isso, se este tecido estiver presente, é sinal que a reparação está em estágio mais avançado.

Diversas referências na literatura relataram a efetividade e modo de ação do PRP na reparação dos defeitos ósseos e gengivais, incluindo os periodontais e os perimplantares. Porém, não nos foi possível encontrar nenhuma pesquisa que descreveu o uso do gel de PRP no preenchimento de alvéolos dentais após exodontia,

com a finalidade de promover reparo mais rápido do tecido mole a ser reaberto para a instalação de implantes dentários. Por outro lado, aparentemente este também é o primeiro relato da efetividade do PPP na aceleração do reparo de tecido mole bucal, fazendo com que os resultados obtidos nesta pesquisa não possam ser cotejados com os de outros autores.

Assim, novamente é digna de menção a carência de estudos envolvendo uma possível influência desses produtos no aceleração da reparação de tecidos moles bucais.

7. CONCLUSÃO

Levando em consideração a comparação das observações dos parâmetros histológicos adotados para a avaliação do grau de reparo do tecido gengival ocorrido em 28 dias em alvéolos submetidos ao tratamento com PRP ou PPP e nos preenchidos simplesmente com coágulo sangüíneo (controle), podemos concluir que:

1. nesse tempo aparentemente curto essas amostras se prestaram adequadamente para a análise histológica dos diferentes parâmetros de reparação de tecidos moles;

2. em 28 dias todos os alvéolos que receberam tanto o PRP como o PPP apresentaram reparação mais rápida dos tecidos moles que os preenchidos apenas com o coágulo natural, mas o PPP mostrou-se ainda mais eficaz que o PRP.

Como aparentemente este é o primeiro relato deste benefício em alvéolos dentários, fica evidente a necessidade de novas pesquisas para a devida comprovação.

REFERÊNCIAS¹¹

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

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

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

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

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

BURCHARDT, H. The biology of bone graft repair. **Clin. Orthop.**, v. 174, p. 28-42, 1983.

BURWELL, R. G. Studies in the transplantation of bone. V. The capacity of fresh and treated homografts of bone to evoke transplantation immunity. **Clin. Orthop.**, v. 367, p. 5-11, 1999.

¹¹ De acordo com a NBR 14724 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), 2002. Abreviaturas dos Periódicos segundo "Index to Dental Literature" e SECS(Seriados em Ciências da Saúde)

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

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

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

FRIEDLAENDER, G. E. Bone grafts. **J. Bone Joint Surg.**, v. 69, p. 786-790, 1987.

FRIEDLAENDER, G. E. et al. Immune responses to osteochondral allografts: nature and significance. **Orthopedics**, v. 15, p. 171-175, 1992

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

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

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

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

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

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

KIRKEBY, O. J. Bone graft in T-cell deficient rats. **Acta Orthop. Scand.**, v. 62, p. 459-462, 1991.

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

LANDESBERG, R. et al. Qualification of growth factor levels using simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 58, p. 297-300, 2000.

LANDESBERG, R. et al. Risks of using platelet rich plasma gel. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 56, p. 1116, 1999.

LENHARO, A. et al. Plasma Rico em Plaquetas. In: PONTUAL, M. A. B.; MAGINI, R. S. **Plasma Rico em Plaquetas e Fatores de Crescimento – das Pesquisas Científicas à Clínica Odontológica.** 1. ed. São Paulo: Ed. Santos, 2004. p.165-185.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

PÍSPICO, R. **Estudo histológico comparativo de áreas doadoras de enxerto gengival livre tratadas ou não com PRP.** 2002 82 p. Dissertação (Mestrado em Implantologia). Universidade de Santo Amaro, São Paulo, 2002.

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

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

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

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

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

VIROLAINEN, P. et al. Different healing rates of bone autografts, syngenic grafts, and allografts in an experimental rat model. **Arch. Orthop. Trauma Surg.**, v. 116, p. 486-491, 1997.

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

WHITMAN, D. H.; BERRY, R. L. A technique for improving the handling of particulate cancellous bone and marrow grafts using platelet gel. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 56, p. 1217-1218, 1998.

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

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

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

ANEXO 1 - Parecer da comissão de ética



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



UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
Comitê de Ética em Pesquisas
Registro CONEP n.º 306
Aprovado em 16/05/2000

PARECER N.º 26/2005

REGISTRO CEP UNISA N.º 156/05

Projeto de Pesquisa: “Análise histológica, em humanos, da eficiência do plasma Rico em plaquetas e do Plasma Pobre em plaquetas na reparação de tecido mole de alvéolos dentais após a extração.”

Responsáveis: Pós- Graduando: Sérgio Henrique Ferreira de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Wilson Roberto Sendyk

Área Temática Especial: Odontologia

Prezado Pesquisador:

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

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

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas da UNISA, de acordo com as atribuições da Resolução 196/96, manifesta-se pela **APROVAÇÃO** do projeto de pesquisa, com o objetivo de avaliar a eficácia do uso do plasma Rico em plaquetas e do plasma Pobre em plaquetas como coadjuvante da reparação de tecidos moles e da mucosa em futuros sítios de implantes em alvéolos recém extraídos.

São Paulo, 14 de março de 2005

PROF. DR. CARLOS DE SOUSA LUCCI
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisas
UNISA - Universidade de Santo Amaro

ANEXO 2

Laudos comprovando que a análise das lâminas histológicas foram feitas pela histopatologista do Hospital das Clínicas Dra. Cláudia de Oliveira



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

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que realizei a análise histológica das lâminas do trabalho "ANALISE HISTOLÓGICA DE TECIDO MOLE: ALVÉOLOS HUMANOS TRATADOS COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS, PLASMA POBRE EM PLAQUETAS E COÁGULO NATURAL" do Dr. Sérgio Oliveira Filho.

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

ANEXO 3 - Carta de Informação

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

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

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

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

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o cirurgião dentista Sergio Henrique F. de Oliveira, que pode ser encontrado na Universidade de Santo Amaro no endereço: Rua Prof. Enéas Siqueira Neto, 340, Telefone (11) 5929-5477. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-UNISA) – Rua Prof. Enéas Siqueira Neto, 340, Telefone (11) 5929-5477, fax: (11) 520-9160.

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

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

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

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

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

Sergio Henrique F. de Oliveira

Pesquisador responsável

ANEXO 4 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____ RG _____
 _____, residente a _____

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

Discuti com o pesquisador Sergio Henrique F. de Oliveira sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

_____ Data ___/___/___

Assinatura do paciente/representante

_____ Data ___/___/___

Assinatura da testemunha

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

_____ Data ___/___/___

Assinatura do responsável pelo estudo

ANEXO 5 - Ficha de anamnese

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
IDENTIFICAÇÃO

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

ANAMNESE

Há quanto tempo foi a sua última consulta médica? _____
 Qual o motivo? _____ Médico: _____
 No momento está fazendo algum tratamento médico? _____
 Está tomando algum medicamento? Sim () Não ()

NOME	POSOLOGIA	TEMPO DE USO

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

Sistema Respiratório:

Tem ou teve?

Rinite: _____

Bronquite: _____

Sinusite: _____

Asma: _____

Enfisema Pulmonar: _____

Sistema Gastrointestinal:

Tem ou teve?

Gastrite: _____

Úlcera: _____

Sistema Urogenital:

Cálculo renal: _____

Infecção Urinária: _____

Sistema Cardiovascular:

Tem ou teve?

Angina: _____

Infarto do Miocárdio: _____

Arritmia: _____

Prolapso: _____

Sopro: _____

Endocardite: _____

Cansaço excessivo ao esforço físico: _____

Formigamento de extremidades: _____

Hiper ou Hipotensão arterial: _____

varizes: _____

Sistema Endócrino

Tem ou teve?

Diabete: _____

Hiper ou hipotiroidismo: _____

Doenças Infecto Contagiosas:

Tem ou teve?

AIDS: _____

Sífilis: _____

Hepatite: _____

Tuberculose: _____

Exame Físico

Sinais vitais:

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

Loco-Regional:

Extra_oral.....

.....

.....

.....

Intra_oral.....

.....

.....

.....

.....