PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO

AIRTON CHARLES CHAVES JÚNIOR

OS EFEITOS DA CONTAGEM PLAQUETÁRIA DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) SOBRE O REPARO DO TECIDO ÓSSEO

Porto Alegre
2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

AIRTON CHARLES CHAVES JÚNIOR

OS EFEITOS DA CONTAGEM PLAQUETÁRIA DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) SOBRE O REPARO DO TECIDO ÓSSEO

Tese apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Odontologia, pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, na área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial.

Orientador:
Prof. Dr. Rogério Belle de Oliveira

Porto Alegre
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

C512e Chaves Júnior, Airton Charles
Os efeitos da contagem plaquetária do plasma rico em plaquetas (PRP) sobre o reparo do tecido ósseo / Airton Charles Chaves Júnior. – Porto Alegre, 2009.
149 f.

Tese (Doutorado) – PUCRS. Faculdade de Odontologia. Curso de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial.
Orientador: Prof. Dr. Rogério Belle de Oliveira.

1. Odontologia. 2. Reparação Óssea (Odontologia). 3. Plasma Rico em Plaquetas. 4. Animais – Experiências. 5. Tecido Ósseo. 6. Protocolos. I. Oliveira, Rogério Belle de. II. Título.

CDD 617.52

Bibliotecária Responsável: Dênira Remedi – CRB 10/1779

DEDICATÓRIA

À minha família: Sr. Airton e Sra. Irinéia, meus pais e minha irmã, Charlene.

Apenas, permitam-me lhes dizer que quaisquer que sejam as circunstâncias, estejamos juntos ou separados, nos vejamos com muita freqüência ou nos encontraremos raramente, falemos muito ou falemos pouco, lembrem-se eu os amo com o fundo da minha alma e do coração e vou amá-los sempre.

O Meu Muito Obrigado!!!

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Quaisquer que sejam as falhas desta tese, somente a mim pertencem, porém se há valor nesta criação, devo as contribuições generosas de todos que dedicaram um pouco de seu tempo a este projeto.

A **Deus**, pela graça da vida e a chance de mais uma caminhada em busca da elevação espiritual...
Obrigado, Senhor !!!

Ao **Prof. Dr. Rogério Belle de Oliveira**, meu orientador, pela confiança depositada e pela amizade construída.

Aos queridos **Mestres** das Faculdades de Odontologia e de Medicina da PUCRS que participaram da minha formação técnico-científica como Cirurgião Bucomaxilofacial.

Ao **Prof. Dr. Túlio Del Conte Valcanaia**, por mostrar-me o amor à Pesquisa e por sua amizade e apoio incondicionais.

Ao **Prof. Anisio de Souza Filho e Familia**, por acolher-me dentro de vosso dia-a-dia profissional, pela confiança irrestrita depositada, por acreditares na seriedade do meu trabalho e partilhares de mesma filosofia, por sua amizade e apoio incondicionais.

Aos **Professores Vera Lucia Langaro Amaral, Marcel Frajblat e a Técnica de Laboratório Dirce Souza,** pela grande contribuição na construção da fase experimental desta tese.

A **Professora Dilma Moratto de Souza**, médica veterinária, responsável pela cunicultura do Colégio Agrícola de Camboriú no período em que o experimento ocorreu; tenha certeza que sua contribuição para construção desta tese foi fundamental para o sucesso desta pesquisa, obrigado pela atenção, pela disposição e pela confiança em mim e em meu trabalho.

A **Professora Juliana Bernardon Pretto Gonçalves e aos Técnicos do Laboratório de Análises Clínicas do Curso de Farmácia e Bioquímica** da UNIVALI pela disponibilidade.

Ao **Prof. Dr. David Riveiro Tames e a Técnica de Laboratório Beatriz Pacheco Correa**, pela disponibilidade de sempre. Nesta caminhada pelo saber, seus conselhos foram determinantes.

Ao **Prof. Dr.Leonardo Rubi Rorïg e aos Técnicos de Laboratório os Biólogos Thiago Meinicke de Melo e Muriel Deon do Amaral**, do laboratório de microbiologia marinha do curso de Oceanografia da UNIVALI pela disponibilidade de sempre. Nesta caminhada pelo saber, seus conselhos foram determinantes.

Ao **Prof. Elimar Ivan Rudeck (University of Michigan)** pela participação na obtenção dos resultados finais, sua colaboração foi fundamental para concretização e conclusão deste projeto, obrigado pela confiança e amizade.

Ao **Departamento de Cirurgia do Curso de Odontologia da Universidade do Vale do Itajaí (Professores: Fabiano Rodrigues Palma, José Carlos Câmara Bastos, Tulio Del Conte Valcanaia)**, por acreditarem em meu trabalho e contribuírem determinantemente na construção de todo esse trabalho.

Ao **Dr. Renato Zanella e Dra. Andréia Zanon** por contribuírem de forma relevante para o sucesso da fase experimental desta tese.

Aos meus amigos e colegas de Doutorado em CTBMF: **Otacílio Chagas Jr.**, **Ana Cláudia Lustosa, Bruna Fronza, Henrique Ramos de Oliveira e Taís Novaes Silva**, com quem compartilho esta vitória; e aos demais amigos e colegas de pós-graduação em Odontologia que aqui estiveram de 2002 a 2009, especialmente a: **Alan Fernando Panarello e Rodrigo Gomes Beltrão.**

À **CAPES**, pelo financiamento da minha Pós-Graduação.

À **Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**, na pessoa de seu Magnífico Reitor, **Prof. Dr. Joaquim Clotet.**

À **Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**.

À **Professora e Ex-Coordenadora** do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da PUCRS, **Dra. Nilza Pereira da Costa.**

Aos **funcionários da secretaria de Pós-Graduação da FO-PUCRS**, Ana, Davenir, Marcos e Carlos, pela atenção e disponibilidade.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

Os objetivos desta tese foram: verificar se a quantidade de plaquetas presente no PRP influencia no processo de reparo do tecido ósseo quando utilizado em adição a osso autógeno como material de enxerto; avaliar se os protocolos simplificados, para obtenção de PRP, concentram plaquetas em número suficiente para acelerar o reparo do tecido ósseo, quando o PRP é utilizado em adição a osso autógeno como material de enxerto. Para a realização do experimento foram utilizados 24 coelhos machos da raça Oryctolagus cuniculus (Brancos da Nova Zelândia). As cobaias foram adquiridas com 16 semanas de vida (aproximadamente 3 kg). As feridas cirúrgicas foram confeccionadas na calvária e correspondem a 04 lojas cirúrgicas (1- coágulo sanguíneo (controle negativo), 2- osso autógeno particulado (controle positivo), 3 - PRP obtido a 160G + osso autógeno particulado, 4 - PRP obtido a 560G + osso autógeno particulado), foi utilizado uma broca trefina de diâmetro 05mm e marcação de 02mm de profundidade, criando defeitos em medidas padronizadas; o sacrifício dos animais ocorreu após 15, 30 e 45 dias da cirurgia, formando-se assim 3 grupos com 08 cobaias cada e 4 subgrupos em cada grupo. O material coletado de cada coelho seguiu para processamento laboratorial de rotina; A avaliação microscópica consistiu em análise histomorfométrica (Software Image Pro-Plus 4.5.1) das lâminas (obtidas da área mais central do defeito em cortes transversais e coradas com HE) através da mensuração da proporção de osso neo formado no interior das 04 cavidades nos 03 tempos de observação bem como a descrição histológica de uma lâmina de cada subgrupo. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância a um fator (ANOVA) e posteriormente os grupos foram comparados pelo teste de comparações múltiplas Bonferrroni e permitem concluir que: 1) o uso de PRP associado a osso autógeno particulado atuou positivamente na cicatrização óssea quando comparado aos grupos controle osso autógeno particulado e coágulo sangüíneo, somente no grupo 01; 2) Dentro das faixas de concentração plaquetária obtidas no protocolo de 160G e 560G, a contagem plaquetária não influenciou no reparo do tecido ósseo das lojas cirúrgicas tratadas com PRP.

Palavras-Chaves: Plasma Rico em Plaquetas, Protocolo, Tecido Ósseo.

Descritores: Plasma Rico em Plaquetas, Protocolo, Tecido Ósseo[1].

[1] Bireme - Descritores em Ciências da Saúde. Disponível em http://decs.bvs.br .

ABSTRACT

The purposes of this thesis were: verifying if the quantity of platelets found in PRP influences the healing proccess of bone tissue when added to autogenous bone as graft material; evaluating if the simplified protocols to obtain PRP concentrate a number of platelets enough to accelerate the healing of bone tissue, when PRP is added to autogenous bone tissue as graft material. Throughout the experiment twenty four male white new zealand rabbits (Oryctolagus cuniculus) were used as test subjects, being aquired when sixteen weeks old and weighing approximately six pounds. The surgical wounds were placed in the skull where four bone perforations were made (1- blood cloth (negative control), 2- particuled autogenous bone tissue (positive control), 3- PRP obtained at 160G + particuled autogenous bone tissue, 4- PRP obtained at 560G + particuled autogenous bone tissue); A trephine drill 0.5 mm wide and 0.2 mm deep was used to come up with standard bone tissue deffects; the animals were sacrifice after 15, 30 and 45 days after undergoing surgery, establishing three groups with 08 test subjects each and four subgroups in each group. The material collected from each rabbit was submitted to routine lab processing; The microscopical evaluation consisted in histomorfometric analysis (Software Image Pro-Plus 4.5.1) from slices (obtained from the most central area of the bone tissue deffect in transversal cuts coloured by hematoxylin), by measuring the proportion of the neoformed bone tissue inside the four surgical cavities and at the three different observation times as well as the histological decription of the slice for each subgroup. The results obtained were submitted to variance analysis by one factor (ANOVA) and afterwards the groups were compared to each other through the multiple comparation test Bonferroni and allow us to conclude that: 1) the use of PRP in association with particuled autogenous bone tissue participated positively in bone healing when compared to control groups particuled autogenous bone tissue and blood cloth only in groups 01; 2) Among the concentration patterns obtained both in the 160G and the 560G protocols, the platelet count had no influence on bone tissue healing in the surgical cavities.

Key words: platelet rich plasma, protocol, bone tissue

Descriptores: platelet rich plasma, protocol, bone tissue[2].

[2] Bireme - Descritores em Ciências da Saúde. Disponível em http://decs.bvs.br .

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Páginas

Figura 1: Punção da Artéria Auricular, com o uso de um jelco 24..... **79**

Figura 2: Retirada de 10 ml de sangue através da Artéria Auricular..... **79**

Figura 3: Tubos de vácuo para onde era transferido o sangue da coleta para preparação do PRP a 160G e 560G, sendo o outro tubo utilizado para obtenção do hemograma inicial e contagem plaquetária..... **80**

Figura 4: Tubos posicionados para aspiração do PRP, após as centrifugações de 160G e 560G **80**

Figura 5: A e B minicentrífuga utilizada para centrifugação sanguínea..... **81**

Figura 6: Tubo centrifugado isolado mostrando as frações de eritrócitos (fundo do tubo), PRP (meio do tubo) e PPP (topo do tubo)..... **81**

Figura 7: Em A seringa de insulina e agulha para punção lombar, em B vista aproximada da extremidade da agulha evidenciando a ausência de bisel e a marcação de 1mm..... **82**

Figura 8: Visão mais próxima do tubo já centrifugado, a seta evidencia a localização aproximada do PRP..... **82**

Figura 9: Em A dispositivo mais tampa em vista superior, B tampa em visão inferior, C dispositivo com os tubos centrifugados, D dispositivo completo com tampa encaixando na porção superior dos tubos, E agulha penetrando pelo furo da tampa..... **83**

Figura 10: Contador de células automatizado (Coulter STKS)..... **84**

Figura 11: Instalações do Laboratório de Cirurgia Experimental do Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Vale do Itajaí..... **84**

Figura 12: Animal preparado no pré-operatório já sob anestesia geral..... **85**

Figura 13: Tricotomia da cabeça do animal para facilitar o acesso cirúrgico **86**

Figura 14: Tricotomia auricular expondo a artéria auricular..... **86**

Figura 15: Preparo da mesa cirúrgica..... **87**

Figura 16: Anti-sepsia da cabeça do animal antes do acesso cirúrgico..... **87**

Figura 17: Infiltração com anestésico local na área a ser incisada..... **88**

Figura 18: Incisão em espessura total..... **88**

Figura 19: Afastamento cirúrgico expondo os ossos cranianos frontal, parietal e occipital..... **89**

Figura 20: Motor Elétrico e Contra-Ângulo, utilizados para confecção das lojas cirúrgicas..... **90**

Figura 21: Evidenciação da utilização de broca trefina montada em contra-ângulo de implante 16:1..... **90**

Figura 22: Preparação para confecção das lojas cirúrgicas..... **91**

Figura 23: Aspecto trans-operatório do acesso cirúrgico e osteotomia..... **91**

Figura 24: Osso coletado após ter sido particulado com Osteótomo de Byer..... **92**

Figura 25: Osteótomo de Byer utilizado para particular o osso autógeno coletado na criação das lojas cirúrgicas..... **92**

Figura 26: Lojas cirúrgicas depois de adequada preparação; observar que a cortical interna do crânio foi respeitada..... **93**

Figura 27: Aspecto trans-operatório do PRP antes da ativação..... **94**

Figura 28: PRP mais osso autógeno já em ativação; perceber a consistência gelatinosa..... **94**

Figura 29: Uso de Descolador de molt para acomodação dos materiais de enxerto; observar a consistência gelatinosa do osso autógeno particulado associado ao PRP..... **95**

Figura 30: Enxertos posicionados. A – PRP 160G + Osso Autógeno Particulado, B – Osso Autógeno Particulado, C - PRP 560G + Osso Autógeno Particulado, D – Coágulo Sangüíneo..... **95**

Figura 31: Aspecto trans-operatório da sutura do tipo contínua ancorada... **96**

Figura 32: Resumo Esquemático do Processo de Obtenção das Lâminas para Análise Microscópicas..... **99**

Figura 33: Amostra histológica da perfuração preenchida por coágulo aos 15 dias. Coloração HE (40X)..... **107**

Figura 34: Amostra histológica da perfuração preenchida por Osso Autógeno Particulado aos 15 dias.Coloração HE (40X) **108**

Figura 35: Amostra histológica da perfuração preenchida por PRP 160G + Osso Autógeno Particulado aos 15 dias. Coloração HE (40X)..... **109**

Figura 36: Amostra histológica da perfuração preenchida por PRP 560G + Osso Autógeno Particulado aos 15 dias. Coloração HE (40X)..... **110**

Figura 37: Amostra histológica da perfuração preenchida por coágulo aos 30 dias. Coloração HE (40X)..... **111**

Figura 38: Amostra histológica da perfuração preenchida por Osso Autógeno Particulado aos 30 dias. Coloração HE (40X)..... **112**

Figura 39: Amostra histológica da perfuração preenchida por PRP 160G + Osso Autógeno Particulado aos 30 dias. Coloração HE (40X)..... **113**

Figura 40: Amostra histológica da perfuração preenchida por PRP 560G + Osso Autógeno Particulado aos 30 dias. Coloração HE (40X)..... **114**

Figura 41: Amostra histológica da perfuração preenchida por coágulo aos 45 dias. Coloração HE (40X)..... **115**

Figura 42: Amostra histológica da perfuração preenchida por Osso Autógeno Particulado aos 45 dias. Coloração HE (40X)..... **116**

Figura 43: Amostra histológica da perfuração preenchida por PRP 160G + Osso Autógeno Particulado aos 45 dias. Coloração HE (40X)..... **117**

Figura 44: Amostra histológica da perfuração preenchida por PRP 560G + Osso Autógeno Particulado aos 45 dias. Coloração HE (40X)..... **118**

LISTA DE QUADROS

Páginas

Quadro 1: Divisão dos grupos de acordo com tempo e número de animais em observação **78**

Quadro 2: Distribuição das cavidades de acordo com a colocação dos materiais de enxerto **93**

Quadro 3: Modificações ósseas observadas na interface osso/implante. Comparação entre coelhos e humanos **97**

LISTA DE TABELAS

Páginas

Tabela 1: Média das proporções de tecido ósseo neoformado, com diferentes materiais nos diferentes intervalos de tempo..... **105**

LISTA DE GRÁFICO

LISTA DE GRÁFICOS

Páginas

Gráfico 1: Contagem plaquetária média no Hemograma Inicial, PRP a 160G e PRP a 560G **103**

Gráfico 2: Comparação das médias das proporções de tecido ósseo neoformado, com diferentes materiais de preenchimento nos 3 grupos,15, 30 e 45 dias respectivamente..... **106**

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BMPs	Proteína Morfogenética do Osso
CE	Cortical Externa
CI	Cortical Interna
cm	Centímetro
FDBA	Mineralized Freeze-Dried Bone Allograft
	Enxerto Ósseo Liofilizado Mineralizado Alógeno
fig.	Figura
HE	Hematoxilina e Eosina
mm	Milimetros
Nm	Nanômetros
TON	Tecido Ósseo Neoformado
µm	Micrômetros
®	Marca Registrada
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
BFGF	Fator de crescimento básico de fibroblasto
BPBM	Osso mineral poroso bovino
CT	Tomografia Computadorizada
CO_2	Dióxido de Carbono
CTBMF	Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial
cPRP	Concentrado plaquetário
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DVPM	Diferença de Volume plaquetário médio
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
et al.	e colaboradores
FCDM	Fator de crescimento derivado dos macrófagos
FDBA	Enxerto ósseo alógeno seco e congelado
FO	Faculdade de Odontologia
G	Força Centrífuga

GDF	Fatores de crescimento e diferenciação polipeptídicos
HSL	Hospital São Lucas
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina I
IGF-II	Fator de crescimento semelhante à insulina II
IGF-S	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL-1	Interlecucina 1
IL-6	Interlecucina 6
L	Litro
min	Minuto
ml	Mililitro
n	Número de repetições
$n^{o.}$	Número
ng	Nanograma
mg	Miligramas
p	Probabilidade de erro
PAF-4	Fator 4 de ativação plaquetária
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
PDEGF	Fator de crescimento de células endoteliais derivado de plaquetas
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRGF	Plasma rico em fatores de crescimento
PRP	Plasma rico em plaquetas
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
rpm	Rotações por minuto
RS	Rio Grande do Sul
TGFβ	Fator de crescimento transformador beta
TGFβ1	Fator de crescimento transformador beta 1
TGFβ2	Fator de crescimento transformador beta 2
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VPM	Volume plaquetário médio
%	Por cento

±	Mais ou menos
µl	Microlitro
®	Marca registrada
UNIVALI	Unviversidade do Vale do Itajaí
Kg	Kilograma
HA	Hidroxiapatita
UI	Unidades Internacionais
MO	Microscópio Ótico

SUMÁRIO

SUMÁRIO

		Páginas
1	**INTRODUÇÃO**	**30**
2	**REVISÃO DE LITERATURA**	**33**
2.1	CÉLULAS SANGÜÍNEAS	**34**
2.2	OS FATORES DE CRESCIMENTO ÓSSEO	**36**
2.2.1	**Fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF)**	**37**
2.2.2	**Fator de crescimento transformador beta (TGF-β)**	**39**
2.2.3	**Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-S)**	**40**
2.3	MECANISMO DE AÇÃO DOS FATORES DE CRESCIMENTO SOBRE OS ENXERTOS ÓSSEOS	**41**
2.4	PLASMA RICO EM PLAQUETAS	**42**
2.5	ESTUDOS SOBRE CENTRIFUGAÇÃO E REPAROS ÓSSEOS FRENTE AO PRP	**45**
2.6	TECIDO ÓSSEO.....	**59**
2.6.1	**Histofisiologia do Tecido Ósseo**	**59**
2.6.2	**Reparo Ósseo**	**63**
2.7	ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO	**68**
2.8	MODELOS DE ESTUDO	**71**
3	**PROPOSIÇÃO**	**72**
4	**METODOLOGIA**	**74**
4.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	**75**
4.2	PROBLEMA	**76**
4.3	HIPÓTESE	**76**
4.4	DELINEAMENTO DA PESQUISA	**76**
4.4.1	**Paradigma e Delineamento**	**76**
4.5	AMOSTRA	**77**
4.5.1	**Modelo Animal e Organização da População**	**77**
4.6	PREPARO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS	**78**
4.7	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	**84**
4.8	SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS PEÇAS.....	**96**
4.9	CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO E ESTUDO MICROSCÓPICO	**100**
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	**101**

5 RESULTADOS **102**
5.1 ANÁLISE MICROSCÓPICA E DESCRIÇÃO HISTOLÓGICA..... **106**
5.1.1 GRUPO 01 (15 DIAS)..... **107**
5.1.1.1 Coágulo..... **107**
5.1.1.2 Osso Autógeno Particulado..... **108**
5.1.1.3 PRP 160G + Osso Autógeno Particulado..... **109**
5.1.1.4 PRP 560G + Osso Autógeno Particulado..... **110**
5.1.2 GRUPO 02 (30 DIAS)..... **111**
5.1.2.1 Coágulo..... **111**
5.1.2.2 Osso Autógeno Particulado..... **112**
5.1.2.3 PRP 160G + Osso Autógeno Particulado..... **113**
5.1.2.4 PRP 560G + Osso Autógeno Particulado..... **114**
5.1.3 GRUPO 03 (45 DIAS)..... **115**
5.1.3.1 Coágulo..... **115**
5.1.3.2 Osso Autógeno Particulado..... **116**
5.1.3.3 PRP 160G + Osso Autógeno Particulado..... **117**
5.1.3.4 PRP 560G + Osso Autógeno Particulado..... **118**
6 DISCUSSÃO **119**
7 CONCLUSÃO **128**
REFERÊNCIAS **130**
APÊNDICES..... **141**
APÊNDICE A - Quantificação da Área de Osso Cortical Presente Dentro do Defeito Ósseo, em μm^2 no Software Image Pro Plus..... **142**
APÊNDICE B - Quantificação da Área Inicial do Defeito em µm2 no Software Image Pro Plus..... **143**
ANEXOS..... **144**
ANEXO A – Aprovação do Projeto de Tese pela Comissão de Ética em Pesquisa da UNIVALI **145**
ANEXO B – Aprovação do Projeto de Tese pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS..... **147**
ANEXO C – Normas para a Prática Didático-Científica de Vivissecção de Animais..... **148**

1 INTRODUÇÃO

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um produto derivado do processamento laboratorial de sangue autógeno, é rico em fatores de crescimento e vem sendo empregado nas mais variadas áreas das ciências da saúde. Sua estratégia terapêutica fundamenta-se na aceleração da cicatrização por meio da concentração de fatores de crescimento presentes no citoplasma plaquetário que são os iniciadores universais de quase todos os eventos cicatriciais (LENHARO, 2001).

Sendo uma fonte autógena de múltiplos fatores de crescimento isenta de características tóxicas ou imunorreativas o PRP tem sido utilizado associado aos enxertos ósseos, para acelerar os caminhos da cicatrização da ferida cirúrgica (ANITUA, 1999). As células da medula óssea do enxerto, presentes no material de enxerto, possuem receptores para os fatores de crescimento. A adição do PRP a ele reduz significativamente o tempo para a maturação e consolidação do enxerto, aumentando a densidade do trabeculado ósseo (MARX et al., 1998).

Apesar de se conhecer o potencial e a utilidade dos fatores de crescimento derivados das plaquetas ou obtidos através de técnicas de engenharia genética, eles ainda não são disponíveis para o uso prático rotineiro, porque a segurança e o efeito dos mesmos ainda não foram completamente confirmados (LEKOVIC et al., 2002); também por não haver procedimento que possibilite obter uma estimativa preliminar do nível de fatores de crescimento nas amostras de PRP. No entanto, a associação empírica entre contagem plaquetária/fatores de crescimento é possível de existir (WEIBRICH et al., 2001).

Não existe evidência científica quanto à influência da quantidade de plaquetas presente no PRP sobre o reparo do tecido ósseo. Teoricamente quanto maior a quantidade de plaquetas, maior a concentração de fatores de crescimento presentes no PRP e melhor o reparo do tecido ósseo. Entretanto, segundo Chaves e Beltrão (2003) os fatores de crescimento presentes no PRP são receptores dependentes, desta forma, não adiantaria termos 2X fatores de crescimento e X receptores celulares; se isto realmente acontece, a “sobra” de fatores de crescimento caracterizaria uma perda de tempo para obtenção dos mesmos, com a elevação do custo final dos procedimentos.

Não existem estudos publicados que relacionem diferentes protocolos para obtenção de PRP, sua repercussão sobre a contagem plaquetária, bem como, sua influência sobre o reparo do tecido ósseo.

Os objetivos desta pesquisa são:

- verificar se a quantidade de plaquetas presente no PRP influencia no processo de reparo do tecido ósseo quando utilizado em adição a osso autógeno particulado como material de enxerto.
- avaliar se os protocolos simplificados (aqueles obtidos através do uso de minicentrífugas de uso ambulatorial), para obtenção de PRP, concentram plaquetas em número suficiente para acelerar o processo de reparo do tecido ósseo, quando o PRP é utilizado em adição a osso autógeno particulado como material de enxerto.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÉLULAS SANGÜÍNEAS

O sangue é composto por plasma e elementos figurados. Dentre as células (elementos figurados) podemos citar os glóbulos vermelhos, também conhecidos como eritrócitos, cuja função é transportar hemoglobina e os glóbulos brancos (monócitos, linfócitos, eosinófilos, neutrófilos, basófilos e plasmócitos) relacionados de um modo geral à defesa do organismo. Além dessas células, são encontradas um grande número de plaquetas (GREGORI, 1996).

O plasma é formado pelo soro sangüíneo (água) as proteínas (albumina, globulina e fibrinogênio) e diversos eletrólitos, sendo o sódio, o cloreto e o bicarbonato os mais abundantemente encontrados (ROSS; ROWRELL, 1993; GOLDENBERG, 1997).

As plaquetas representam o componente mais importante quando o enfoque é modulação cicatricial para enxertos ósseos, devido à capacidade de liberação de fatores de crescimento (WHITMAN et al., 1997; MARX, 1999) e citocinas, incluindo o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de transformação β1 e β2 (TGF β1 e β2), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-S), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de células endoteliais derivado de plaquetas (PDEGF), interleucina 1 (IL-1), fator de crescimento básico de fibroblasto (BFGF) e fator 4 de ativação plaquetária (PAF- 4) (HARRISON; CRAMER,1993).

Originadas da fragmentação do citoplasma megacariócito (célula extremamente grande da série hematopoiética) (GOLDENBERG, 1997) as plaquetas são diminutos discos ovais ou redondos com 2 a 4 µm de diâmetro (GUYTON et al., 1996).

A concentração normal de plaquetas no sangue está entre 150.000 e 300.000 por microlitro (RAVEL, 1997) e sua contagem pode ser feita de forma manual ou automatizada; para Oliveira et al. (2002), que realizaram estudo comparando dois métodos diretos para contagem de plaquetas, tendo como parâmetro a automação, concluíram que esta modalidade de aferição plaquetária obtém resultados acurados

e reprodutíveis em amostras sem alterações morfológicas e quando os níveis celulares não estão extremamente diminuídos.

Nos casos em que a individualização das plaquetas dá-se através de método de centrifugação sangüínea, a diminuição do número de plaquetas poderia ser explicado pela formação de grumos plaquetários decorrentes deste processo, fato que impossibilitaria a contagem automatizada com acurrácia (SEGHATCHIAM; KRAILADSIRI, 1997 e 2000).

O tempo de vida médio das plaquetas no sangue é de 8 a 12 dias e de 3 a 5 dias no enxerto (MARX, 1999), ao final dos quais seus processos vitais se esgotam (GUYTON et al., 1996), apresentando um turnover plaquetário de 35.000 por μl/dia (OLIVEIRA, 1982).

Do ponto de vista ultra-estrutural, as plaquetas podem ser entendidas em três zonas: zona sol-gel, composta de vários elementos fibrosos, constituindo o sistema citoesquelético; zona das organelas, composta pelos elementos de depósito e os metabólitos, e o sistema canalicular, responsável pela comunicação com o plasma e pela rota de liberação das organelas de depósito (OLIVEIRA, 1982).

Assim como as células, as plaquetas apresentam muitas funções, embora não possuam núcleo e não se reproduzam. No seu citoplasma estão fatores ativos tais como:

1) Moléculas de miosina e actina similares àquelas encontradas nas células musculares, assim como uma outra proteína contrátil, a trombostenina, que pode ocasionar a contração das plaquetas.

2) Resíduos de retículo endoplasmático e aparelho de Golgi, que sintetizam várias enzimas e armazenam grande quantidade de íons cálcio.

3) Mitocôndrias e sistemas enzimáticos que são capazes de formar trifosfato de adenosina e difosfato de adenosina.

4) Sistemas enzimáticos que sintetizam prostaglandinas, hormônios locais que causam reações vasculares e outras nos tecidos locais.

5) Uma importante proteína chamada de fator estabilizador da fibrina, relacionada à coagulação sangüínea.

6) Fatores de crescimento que promovem o crescimento e multiplicação de células endoteliais vasculares, células musculares lisas, vasculares e fibroblastos, causando deste modo o crescimento celular o que ajuda nos processos cicatriciais (GUYTON et al., 1996).

2.2 OS FATORES DE CRESCIMENTO ÓSSEO

Os fatores de crescimento são mediadores biológicos naturais que exercem vários efeitos sobre os processos de reparo e regeneração.

Estes polipeptídeos são responsáveis por regular diversos eventos celulares tais como a síntese de DNA, a quimiotaxia, a citodiferenciação e a síntese de matriz óssea (GIANNOBILE, 1999), também contribuir para regeneração óssea e o aumento vascular, característica vital para a cicatrização do enxerto ósseo (AGHALOO et al., 2002). Assim, os fatores de crescimento parecem significar a chave para o entendimento e modulação dos processos cicatriciais (SCARSO FILHO et al., 2001).

São produzidos pelas plaquetas, fibroblastos, osteoblastos, condroblastos e outras células de natureza mesenquimal, podendo ser encontrados também em vários tecidos em fase de cicatrização (LYNCH et al.,1991b), estas moléculas naturais são iniciadoras universais de quase todos os processos cicatriciais (MARX, 1999).

Segundo Marx et al. (1998), o organismo humano utiliza os fatores de crescimento para promover o rápido aumento do número de células mesenquimais indiferenciadas no sítio cicatricial durante o tempo de reparo e cicatrização.

Os fatores de crescimento agem nas células osteoprogenitoras diferenciando-as e auxiliando o trabalho das células presentes no osso pré-existente, desta forma, nos defeitos ósseos maiores onde as células ósseas remanescentes não são suficientes para induzir o reparo, os fatores de crescimento desempenham um papel fundamental (ROSSI JÚNIOR et al., 2001), e podem melhorar a formação óssea através das técnicas de regeneração óssea guiada em combinação com materiais para enxerto (KASSOLIS et al., 2000).

A matriz extracelular presente no tecido ósseo é um reservatório de múltiplos fatores de crescimento que regulam a função das células deste tecido. Os fatores de crescimento aí encontrados são mediadores moleculares potenciais de diferenciação, manutenção e reparação óssea (RIPAMONTI; REDDI, 1994) sendo que suas atividades se extinguem por volta de 7 a 10 dias (MARX, 1999).

Desta forma a regeneração óssea mais rápida e com qualidade final elevada deve-se ao fato de que as células do enxerto ósseo e os osteoblastos, quando

testados com anticorpos monoclonados para receptores de PDGF, TGF-β1, TGF-β2 e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-S), demonstraram resultados positivos (MARX, 1999).

O uso de fatores de crescimento foi iniciado por Lynch et al. (1991b) que utilizaram o plasma rico em plaquetas e o fator de crescimento semelhante a insulina em defeitos ósseos periodontais circunferenciais e ao redor de implantes, encontrando um excelente crescimento ósseo nos casos tratados quando comparados com os controles em ambos os casos.

Tem-se teorizado que a quantidade acentuada de fatores de crescimento do PRP inicia a atividade das células ósseas indiferenciadas de forma mais completa do que ocorreria, através da área de coagulação no enxerto (MARX, 1999; GARG, 1999).

Assim, a regeneração óssea iniciada pelo PRP leva a um aumento ou melhoria do caminho natural da regeneração óssea (MARX, 1999), pela presença de matriz, sinais moleculares (fatores de crescimento) e células; uma tríade reconhecidamente destacada pela engenharia tecidual para otimização do reparo tecidual (LYNCH et al., 1999).

Apesar de se conhecer o potencial e a utilidade dos fatores de crescimento derivados das plaquetas ou obtidos através de técnicas de engenharia genética, eles ainda não são disponíveis para o uso prático rotineiro, porque a segurança e o efeito dos mesmos ainda não foram completamente confirmados (LEKOVIC et al., 2002); também por não haver procedimento que possibilite obter uma estimativa preliminar do nível de fatores de crescimento nas amostras de PRP. No entanto, a associação empírica entre contagem plaquetária/fatores de crescimento é possível de existir (WEIBRICH et al., 2001).

2.2.1 Fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF)

Este polipeptídeo é sintetizado, primariamente, pelas granulações α-plaquetárias, embora possa ser produzido e secretado pelos macrófagos, células endoteliais, monócitos, fibroblastos e matriz óssea (WANG et al., 1994; ANITUA, 1999; LYNCH et al., 1999).

É classificado dentro dos fatores de ampla especificidade devido à sua capacidade de atuar em uma grande variedade de células como os fibroblastos, as células musculares, as neuróglias, as células ósseas e outros (GANIO et al., 1993).

O PDGF é o principal fator de crescimento derivado das plaquetas, por ser o primeiro a estar presente na ferida e por guiar a revascularização, a síntese de colágeno e a regeneração óssea (MATSUDA et al., 1992; WANG et al., 1994).

Sobre os fibroblastos do ligamento periodontal, este fator promove o aumento da proliferação e da capacidade de aderência dos mesmos, podendo melhorar o prognóstico dos tratamentos das lesões periodontais (MATSUDA et al., 1992; GAMAL et al., 1998; HAASE et al., 1998). Nos osteoblastos, estimula a ação mitogênica e de quimiotaxia, otimizando o anabolismo e o crescimento do tecido ósseo (RUDKIN; MILLER, 1996; LIND, 1998; JIANG et al., 1999).

Estudos de Giannobile et al. (1994) e Park et al. (1995) demonstram a capacidade osteogênica do PDGF, isolado ou em conjunto com outros fatores, tais como prostaglandinas, dexametasona, matriz colágena e/ou membranas biológicas.

O aumento de suas concentrações em feridas que se encontram em cicatrização e reparo ósseo parece acelerar estes processos. (GREEN et al., 1997; CHAI et al., 1998).

Segundo Anitua (1999) trata-se de uma glicoproteína com uma massa molecular de aproximadamente 30 Kd e uma estrutura formada por duas cadeias básicas de aminoácidos A e B.

A cadeia A é formada por 121 aminoácidos e a cadeia B por 125 aminoácidos, que apresentam similaridade de até 60% (MARX, 1999).

Esta proteína existe como um heterodimer de duas correntes e encontra-se dispersa pela ferida a partir da fragmentação plaquetária (ANITUA, 1999).

Dispõe-se em pequenas quantidades, algo em torno de 0,06 ng de PDGF para um milhão de plaquetas, o que significa 6×10^{-17} de PDGF por plaqueta (MARX, 1999).

Segundo Chai et al. (1998), mesmo disponível em pequenas proporções, ela atua como um importante agente mitogênico para a citodiferenciação e para a cicatrização das feridas.

Estas proteínas buscam atingir as células alvo, aderindo-se aos receptores da membrana celular e estabelecendo ligações de proteína tirosina-quinase. A sua estrutura dimérica, com dois sítios de ligação, permite a união com os receptores

adjacentes para iniciar o processo de sinalização celular, sendo que os receptores α ligam-se às cadeias A e B enquanto os receptores β ligam-se somente às cadeias B (ANITUA, 1999).

2.2.2 Fator de crescimento transformador beta (TGF-β)

Segundo Giannobile et al. (1994) os fatores de transformação beta constituem uma superfamília de mediadores locais que regulam a proliferação e a função da maioria das células dos vertebrados.

Esse fator de crescimento foi assim designado por ter sido isolado inicialmente em tecidos alterados (em transformação) (ANITUA, 1999).

Possuem cinco tipos de proteínas (TGF β1 a β5) com estruturas e funções semelhantes com similaridade de até 72% entre as estruturas β1 e β2 (ROSEN; THIES, 1992).

A estrutura β1 é encontrada com abundância nas plaquetas, nos linfócitos e nos neutrófilos. O tipo β2 é encontrado nos extratos ósseos, nas plaquetas e nos neutrófilos. Observa-se ainda um tipo β3 que é um heterodimer formado por uma cadeia única de TGF-β1 e β2 (ANITUA, 1999).

Os TGFs mais comuns no PRP são as TGF-β1 e TGF-β2, que são fatores de crescimento ligados à cicatrização do tecido conjuntivo e à regeneração do tecido ósseo respectivamente (MARX, 1999). Porém, seus efeitos nas células são variados; dependendo do tipo de célula afetada podem suprimir a proliferação celular, estimular a síntese da matriz extracelular, estimular a formação óssea ou atrair células por quimiotaxia (MATSUDA et al., 1992; HOLLINGER et al., 1999).

Em sistemas em desenvolvimento, o TGF-β é um regulador multifatorial do crescimento celular, abundante na matriz extracelular óssea onde estimula a produção de fibronectina, colágeno e a biossíntese de osteonectina, eventos presentes no reparo de fraturas ósseas em humanos (LYNCH et al., 1991a).

Devido ao seu pleiotropismo, os efeitos parecem ser altamente dependentes da origem da célula óssea, da dose aplicada e do ambiente local, podendo estimular ou inibir a proliferação osteoblástica (SPORN; ROBERTS, 1992).

Para a cicatrização da região bucomaxilofacial, as funções mais importantes do TGF-β1 e β2 parecem ser a quimiotaxia e a mitogênese dos osteoblastos estimulando a formação óssea (LYNCH et al., 1991a), bem como inibição da reabsorção óssea quando atuam em osteoclastos (WHITMAN et al., 1997; MARX, 1999). O TGF-β1 atinge seu potencial quimiotático máximo a partir de 10ng/ml, enquanto outros fatores de crescimento só atingem o pico máximo no intervalo de 10 a 100 ng/ml (LYNCH et al., 1991a).

Segundo Lind (1998), quando usado para estimular a resposta óssea em torno de implantes mostra-se osseoindutivo e melhora a qualidade da osseointegração uma vez que doses de 3,0μg de TGF-β1 quando aplicadas sobre implantes cerâmicos dobrou o crescimento ósseo em torno dos mesmos.

2.2.3 Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-S)

Os IGF-s são também secretados pelos osteoblastos durante a formação óssea (GIANNOBILE et al., 1994; MARX, 1999) exercem efeitos sobre o metabolismo deste tecido, como o aumento da deposição de matriz óssea (GIANNOBILE, 1999) e a estimulação da mitogênese das células osteoblásticas, estando atribuído a ele também a atividade de quimiotaxia para fibroblastos, osteoblastos e células progenitoras dos osteoclastos (PANAGAKOS, 1993).

Existem dois tipos: IGF-I e IGF-II, com pequenas massas moleculares de aproximadamente 7.7 Kd e 7.5 Kd, respectivamente. Cada um deles se adere a um receptor de membrana celular IGF específico (LYNCH et al., 1991a; GIANNOBILE et al., 1994).

Esta capacidade mitogênica, quando avaliada sobre as células do ligamento periodontal, é 10 vezes menor que a do PDGF, pois o IGF-I só atinge o máximo de seu efeito mitogênico em concentrações maiores que 100ng/ml (MATSUDA et al., 1992). No entanto, quando testado com matriz inorgânica de osso bovino, demonstra uma capacidade de adsorção que chega a ser 10 vezes maior que a do PDGF, mostrando-se importante para o anabolismo do tecido ósseo (JIANG et al., 1999).

Diversos estudos sugerem que as IGF-S, quando combinadas com outros fatores de crescimento, podem aumentar a osteogênese em processos cicatriciais (GIANNOBILE, 1999). Apresentam-se abundantes na matriz óssea e sua atividade de regulação mitogênica e/ou do metabolismo ósseo parece ser dose dependente (PANAGAKOS, 1993).

Segundo Lynch et al. (1991b) os efeitos in vitro para promoção da quimiotaxia de osteoblastos com o uso de IGF-I e IGF-II são semelhantes, porém o IGF-II não é tão potente quanto IGF-I no processo de formação de osso.

Os mesmos autores, em 1991, em um trabalho in vivo para avaliar a habilidade da combinação de PDGF e IGF-I em promover regeneração de osso ao redor de implantes constataram que aos 7 dias, os implantes, tratados com a combinação destes fatores de crescimento tiveram uma maior porcentagem de contato de osso-implante que os implantes tratados com placebo ou não tratados. Estes achados sugerem que integração mais rápida pode acontecer com o uso de PDGF e IGF-I.

2.3 MECANISMOS DE AÇÃO DOS FATORES DE CRESCIMENTO SOBRE OS ENXERTOS ÓSSEOS

O reparo ósseo em áreas de enxerto ósseo ocorre dentro de um ambiente bioquímico complexo, no qual o tecido enxertado deve progredir de um tecido transplantado para um tecido auto-sustentado (MARX, 1999).

A compreensão dos efeitos bioquímicos e da influência dos fatores de crescimento neste modelo cicatricial é de fundamental importância para o entendimento dos mecanismos de reparo ósseo e dos eventuais benefícios do uso do PRP neste processo (GARG, 1999).

O processo de cicatrização do enxerto ósseo autógeno envolve uma complexa cascata biológica em que muitos eventos que ocorrem no sítio não têm sido bem definidos (LANDESBERG et al., 2000). O enxerto ósseo associado a elementos medulares contém diferentes tipos de células cada qual com o potencial para produzir e liberar citocinas e fatores de crescimento específicos (LIND, 1998), que provavelmente tem significante papel na integração e maturação dos mesmos.

Tanto em enxertos autógenos quanto na cicatrização de fraturas há um influxo inicial de elementos hematopoiéticos vindos do tecido ósseo saudável adjacente (MUNDY, 1996). Portanto, provavelmente, as plaquetas e seus derivados (fatores de crescimento e citocinas) estão presentes nos estágios iniciais da cicatrização do enxerto (LANDESBERG et al., 2000).

Os fatores de crescimento liberados pelos grânulos α-plaquetários atuarão com forte influência na 1ª semana pós instalação do enxerto; desta forma os eventos, segundo Marx (1999) e Garg (1999), seguem descritos abaixo.

Passados três dias da instalação do enxerto ósseo, inicia-se uma intensa atividade celular, e histologicamente é possível a visualização de capilares penetrando no enxerto pelo processo de angiogênese. A este tempo o PDGF estimula a mitogênese das células do canal medular transferidas junto com o enxerto e inicia a angiogênese do complexo capilar no interior do enxerto pela indução de mitose das células endoteliais.

O TGF-β, estimula a mitogênese de pré-osteoblastos e osteoblastos, para aumentar o número destas células, bem como promover a diferenciação das mesmas em osteoblastos maduros e funcionais.

No intuito de sustentar a invaginação capilar, o TGF-β influencia os osteoblastos e os fibroblastos a depositarem matriz óssea e colágeno.

O IGF, por sua vez, atua nos osteoblastos endósteos, que limitam as trabéculas do osso esponjoso enxertado.

Do 5º ao 7º dia, através do mecanismo de quimiotaxia, o PDGF (juntamente com o gradiente de oxigênio) atrai os macrófagos para a área enxertada e os processos regenerativos a partir de então serão estimulados pelos fatores de crescimento derivados dos macrófagos (FCDM).

2.4 PLASMA RICO EM PLAQUETAS

O PRP é um produto 100% orgânico, autógeno, atóxico e não imunorreativo (LYNCH et al., 1991a; MARX et al., 1998; ANITUA, 1999), Por esta razão o PRP tem sido usado com sucesso na área da cirurgia bucomaxilofacial em conjunto com

cirurgias reconstrutivas, enxerto ósseo em seio maxilar, após apicectomias, após remoção de cistos periapicais, extrações dentais, no aumento de rebordo alveolar, em cirurgias para reparar fendas alveolares, fístulas buco-sinusais e buco-nasais (WHITMAN et al.,1997; ANITUA, 1999).

Por ser fruto de uma preparação autógena realizada momentos antes do procedimento cirúrgico, o uso do PRP reduz o risco de transmissão de doenças infecto-contagiosas, quando comparado a outros produtos como a cola de fibrina que é derivada de crioprecipitado de doador ao acaso ou homólogo (WITHMAN et al., 1997).

São várias as nôminas encontradas na literatura, assim este composto é conhecido, também, como plasma autógeno de plaquetas, plasma enriquecido com plaquetas, plasma rico em plaquetas ou ainda gel de plaquetas (LYNCH et al., 1991b; WHITMAN et al., 1997; MARX et al., 1998; ANITUA, 1999).

Estudos específicos do PRP identificaram uma lista completa dos fatores de crescimento. O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de transformação beta (TGF-βs) e o fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-S) são os três mais importantes fatores de crescimento derivados dos grânulos α-plaquetários (LYNCH et al., 1991b; GANIO et al., 1993; ANITUA, 1999; MARX, 1999).

O PRP autógeno tem sido clinicamente aplicado para melhorar a cicatrização de feridas em diferentes órgãos do sistema e melhorar a cicatrização de enxertos ósseos em qualidade e quantidade (MARX et al., 1998). Estudos in vitro têm demonstrado a capacidade que concentrados plaquetários apresentam em aumentar a proliferação e a atividade osteoblástica (SLATER et al.,1995).

A utilização do PRP como modulador dos processos cicatriciais tem como estratégia explorar os caminhos naturais da regeneração a partir da presença de todos os fatores de crescimento nele contido atuando de maneira amplificada (MARX et al., 1998). Esta distinção básica entre a atuação dos fatores de crescimento recombinantes e o PRP é essencial, já que o primeiro, por se tratar de fator de crescimento isolado, focaliza apenas um caminho da regeneração, podendo não ser tão funcional (MARX, 1999).

Preservar a função máxima das plaquetas parece ser de grande importância bioquímica, pois a vantagem da utilização do PRP é a aceleração da regeneração

óssea pelo aumento da quantidade de todos os fatores de crescimento presentes nas plaquetas humanas (MARX et al., 1998).

As plaquetas sofrem rápida desvitalização com seu armazenamento se não forem separadas dos eritrócitos. No sangue total fresco, a eficácia das plaquetas diminui para cerca de 60% dentro de 24 horas, tornando-se totalmente ineficazes depois de 48 horas (RAVEL, 1997).

No PRP o tempo ideal ainda não foi adequadamente determinado e para Sonnleitner et al. (2000) e Obarrio et al. (2000) o ideal é que a centrifugação sangüínea ocorra no trans-operatório, para que o concentrado seja utilizado imediatamente, devido à possibilidade de os grânulos plaquetários liberarem os fatores de crescimento e eles serem perdidos antes de entrarem em contato com o leito cirúrgico, porém Drugrillon et al. (2002) fazem referência a um prazo de 6 horas para sua utilização.

Segundo Marx et al. (1998) as plaquetas recentemente sintetizadas, portanto com maior atividade, são maiores e estão misturadas às células vermelhas do sangue no primeiro milímetro inicial desta camada. Desta forma, após centrifugação sangüínea, esta camada deveria ser incluída no PRP.

A aplicação do PRP em conjunto com os enxertos ósseos, sejam autógenos aloplásticos ou xenógenos, tem sido ampliada e discutida, com aparente sucesso, já que os mesmos apresentam comportamentos biológicos distintos, podendo levar à formação de tecido ósseo ou não no local enxertado, devido ao mecanismo de reparação e aceitação orgânico-celular destes compostos (BUSER et al., 1995).

Segundo Kim et al. (2002b) o uso de PRP com osso alógeno ou xenógeno facilita a nova formação óssea quando o enxerto ósseo autógeno está dificultado por alguma razão.

Nos enxertos de seio maxilar, com ou sem instalação imediata de implantes, o PRP mostra um papel importante, devido ao complexo ambiente bioquímico que se estabelece após a enxertia (MARX et al., 1998); o fato de o PRP possuir altas concentrações de leucócitos leva a crer que ele possa atuar como um antibiótico autógeno reduzindo o risco de infecções (OBARRIO et al., 2000).

Certamente o valor clínico real do PRP é o seu poder de formação óssea mais rápida (MARX, 1999), sendo razoável a hipótese de que o incremento na concentração de plaquetas no defeito ósseo possa acelerar a cicatrização

(AGHALOO et al., 2002) permitindo uma função antecipada e a colocação de implantes em um tempo mais curto, quando necessário.

A quantidade de osso regenerado em enxerto beneficiado com PRP é bem maior em medida, especialmente, naqueles indivíduos com regeneração óssea mais pobre: idosos, osteoporóticos, diabéticos e irradiados. Este conceito de aceleração da cicatrização óssea pela adição acentuada de bioquímicos do PRP deve-se ao entendimento de que a concentração das plaquetas, em pequenos volumes de plasma, possibilita a liberação sucessiva de fatores de crescimento no ferimento estimulando a osteocondução através do enxerto (MARX, 1999).

2.5 ESTUDOS SOBRE CENTRIFUGAÇÃO E REPAROS ÓSSEOS FRENTE O PRP

O plasma rico em plaquetas é uma preparação autógena, com alta concentração de plaquetas obtidas a partir da centrifugação do sangue total (MARX et al., 1998; LANDESBERG et al., 2000) e utiliza o princípio da separação celular por centrifugação diferencial, no qual se retira sangue do doador e separam-se as substâncias desejadas, no caso as plaquetas (RAVEL, 1997; MARX, 1999).

Devido à diferença de densidade, as células sangüíneas irão se organizar durante a centrifugação em três níveis diferentes. As hemácias ocupam a porção mais inferior, enquanto o plasma contendo as plaquetas ocupa a porção mais superior. Nesse plasma ainda podem se diferenciar dois níveis, com o plasma rico em plaquetas ocupando a porção intermediária, entre as células vermelhas, e o plasma pobre em plaquetas (MARX et al., 1998; OBARRIO et al., 2000).

A execução técnica destes procedimentos tem sofrido grande incremento nos últimos anos graças ao surgimento de equipamentos cada vez mais sofisticados e automatizados (LENHARO, 2001).

O processo convencional é realizado em equipamentos de centrifugação de grande porte, típicos dos centros de hemoterapia (RAVEL,1997); porém, o uso clínico destes concentrados é limitado pela alta produção de custos.

O processo simplificado é executado em minicentrífugas preconizadas para uso em ambiente ambulatorial ou em consultórios odontológicos (ANITUA, 1999); este, recentemente, tem ganho força por sua facilidade na obtenção do PRP com

pequenos volumes de sangue, rapidez e reduzida geração de custos (WEIBRICH et al., 2002). A maior vantagem deste método é conseguir concentrações de plaquetas em quantidade suficiente sem ter a necessidade de reinfusão das células vermelhas do sangue coletado, devido ao tamanho da coleta (KASSOLIS et al., 2000).

Para Chaves e Beltrão (2003) que realizaram um estudo comparativo entre protocolos simplificados para obtenção de PRP, alterando a força centrífuga para a preparação dos mesmos. A partir de amostras sangüíneas obtidas de 20 doadores, foram compostos 5 grupos, cada qual com 20 amostras, nos quais foram aplicados os cinco protocolos em estudo: 160 G, 260 G, 360 G, 460 G e 560 G. A contagem plaquetária das amostras, após centrifugação, foi realizada em contador automatizado de células (Coulter STKS) e a qualidade plaquetária foi aferida através de análise descritiva das lâminas histológicas de esfregaço de PRP coradas com o corante hematológico May-Grunwald-Giensa. Os valores da contagem plaquetária tiveram tratamento estatístico, utilizando o teste de Duncan e o valor de F crítico a um nível de significância de 5% ($p<0,05$). As forças de centrifugação propostas para este estudo não alteraram a qualidade das plaquetas presentes no PRP e o protocolo que associa o melhor binômio quantidade/qualidade plaquetária foi o que utilizava a força centrífuga de 160 G, que forneceu o PRP com maiores contagens plaquetárias, sendo que o protocolo que utilizava a força centrifuga de 560G, foi o que forneceu menores contagens plaquetárias para as amostrar de PRP, sem que a qualidade da plaquetas ali presentes fosse alterada.

Outro método de extração do concentrado plaquetário é através da plasmoforese. Trata-se de um processo onde somente o PRP é retirado do paciente e os componentes celulares sangüíneos remanescentes são devolvidos ao mesmo. Com esta técnica, a concentração plaquetária pode ser 300% maior do que os níveis normais circulantes (MARX et al.,1998).

Por razões econômicas este procedimento somente é possível dentro de grandes clínicas ou hospitais que já disponham do aparato necessário para realização desta técnica (SONNLEITNER et al., 2000).

Weibrich et al. (2002) determinaram a plaquetometria e os níveis de fatores de crescimento no PRP produzido por 2 diferentes métodos. O estudo foi realizado com a participação de 46 doadores saudáveis (17 homens e 29 mulheres) com idade entre 20 e 59 anos média de 29,9 +/- 7,8. Para obtenção do PRP usando o kit PCCS (3i/Implant Innovations, Palm Beach Gardens, FL) 60ml de sangue com

anticoagulante (54ml de sangue e 6ml da solução de ácido citrato-dextrose-adenina), foram transferidos para uma bolsa de coleta que então foi centrifugada a 3000 rpm por 45 segundos. Todo o plasma, juntamente com 1ml das células vermelhas sangüíneas, foi transferido para uma segunda bolsa que era então centrifugada a 3000 rpm por 13 minutos. Desta segunda centrifugação 5ml superiores correspondentes ao PPP foram removidos; o plasma remanescente era o PRP que foi massageado por 3 minutos entre o polegar e o indicador para ressuspender as plaquetas aglutinadas. Finalmente todo o conteúdo foi transferido para uma seringa de 10ml para posterior contagem plaquetária. Para a produção do PRP, usando o Curasan PRP kit, o sangue foi retirado com tubos a vácuo de 8,5ml contendo 1ml de citrato como anticoagulante, sendo centrifugado em centrífuga padrão de laboratório de hematologia inicialmente a 2400 rpm por 10 minutos. Após, o plasma amarelo era retirado através de uma cânula e recentrifugado durante 15 minutos a 3600 rpm quando novamente o plasma sobrenadante (0,4ml) contendo poucas células era removido e descartado sendo o aglomerado plaquetário remanescente (0,4ml) ressuspenso em um misturador convencional e posteriormente transferido para um tubo de ensaio para análise. O tempo necessário para produção do PRP foi de 30 minutos para o kit PCCS (3i) e 40 minutos com o kit Curasan. A contagem média de plaquetas no sangue dos pacientes foi de 269.000/μl, para o PRP a média das plaquetas foi de 2.232.500/μl e 1.140.500/μl pelos kits PCCS e Curasan, respectivamente. Para assegurar que erros de mensuração não causassem diferenças na contagem plaquetária, um contador automático de plaquetas foi usado em todas as amostras. Quanto à concentração dos fatores de crescimento o TGF-β1 foi mais concentrado no PRP do kit PCCS. Já o PDGF no PRP do kit Curasan para o IGF-I, os valores não apresentaram significância estatística entre os kits. Os autores concluíram que a contagem plaquetária, bem como os níveis dos fatores de crescimento, provavelmente dependem da técnica utilizada para obtenção do PRP e que a concentração total dos fatores de crescimento foi mais alta no PRP do kit PCCS.

Froum et al. (2002) relataram três casos em que foi testada a eficácia do PRP em enxerto de seio maxilar bilateral com osso bovino liofilizado (BioOss®). Para fins de comparação, em cada paciente um seio maxilar era enxertado somente com BioOss® e o outro com a associação BioOss®/PRP. O PRP foi obtido através da

retirada de 350 a 450ml de sangue periférico processado com a Sequestra 1000 (separador de células por gradiente de densidade). Este procedimento forneceu uma média de 30ml de PRP. Através do acompanhamento e da avaliação histomorfométrica (7 meses após para 2 casos e 11 meses após para 1 caso) ficou concluído que o PRP não faz diferença significativa na produção de osso vital e na interface de contato implante-osso quando o material de enxerto é o BioOss®. Assim, seu uso em casos em que é este o material de enxerto, o PRP serviria somente como um material aglutinante que favorece a qualidade de manipulação do material a ser enxertado, devido à consistência que toma após ativado. Para os autores, a concentração plaquetária no PRP depende do sistema utilizado, do número de plaquetas no sangue do paciente e do volume final de plasma em que as plaquetas estão suspensas.

Marx et al. (1998), em seu estudo sobre a melhora dos enxertos ósseos associados ao plasma rico em plaquetas, utilizou para seu estudo 88 pacientes que possuíam defeitos mandíbulares maiores que 5cm decorrentes da ressecção de tumores ósseos e não haviam feito radioterapia, estes foram divididos em 2 grupos. O primeiro grupo recebeu como material para reconstrução mandibular somente enxerto ósseo córticomedular de crista ilíaca. No segundo grupo o mesmo tratamento foi utilizado adicionando-se plasma rico em plaquetas. Para preparação do PRP foi coletado de 400 a 450ml de sangue total com um cateter venoso colocado durante a cirurgia; para cada 5ml de sangue foi adicionado 1ml de citrato-fosfato-dextrose como anticoagulante. O sangue foi centrifugado à velocidade de 5400 a 5600 rpm obtendo-se o plasma pobre em plaquetas (PPP). Segundo os autores esta velocidade de centrifugação permitiu a separação do PPP dos eritrócitos e da crosta de coágulo, que contém as plaquetas e os leucócitos. Após a obtenção do PPP, a velocidade de centrifugação foi reduzida para 2400 rpm, permitindo a separação da crosta de coágulo, suspensa no plasma (cerca de 30ml) do acúmulo das células vermelhas do sangue. Esta redução da velocidade de centrifugação possibilitou a coleta de aproximadamente 70ml de PRP, cuja coloração é alaranjada. Após a obtenção do PRP os autores submeteram as amostras à coloração com Giensa e posterior contagem plaquetária manual e concluíram que enquanto a média da contagem de plaquetas no sangue total foi de 232.000 por milímetro cúbico, no PRP este valor subiu para 785.000 plaquetas por milímetro cúbico, obtendo-se um incremento de 338% na concentração plaquetária

por milímetro cúbico, entretanto os autores fazem referência a um tempo de 20 a 30 minutos para realização deste procedimento. A ativação do PRP era realizada com a utilização de uma solução de 10ml de cloreto de cálcio a 10% e 10.000 unidades de trombina bovina na proporção de 6ml de PRP para 1ml da solução. A maturação do tecido ósseo utilizado para reconstrução foi avaliada nos períodos de 2, 4 e 6 meses através de análise histomorfométrica com auxílio de um sistema de imagem computadorizado semi-automático. Os autores concluíram que a utilização de PRP melhora a qualidade final do enxerto ósseo quando comparado com as amostras que não receberam PRP.

Segundo Anitua (1999), em estudo de utilização de plasma rico em fatores de crescimento na preparação de futuros sítios para implantes, teve como amostra 20 pacientes saudáveis com indicação de exodontia por fratura vertical de raiz ou doença periodontal. Os pacientes foram divididos em 2 grupos. No grupo experimental após a exodontia o alvéolo foi preenchido com a mistura de enxerto ósseo autógeno e PRP; no grupo controle o alvéolo foi preenchido somente pelo coágulo. Para o preparo do Plasma Rico em Fatores de Crescimento (PRGF), antes da anestesia 10 a 20ml de sangue total foram coletados e distribuídos em tubos de ensaio de 5ml contendo solução de citrato de trissódio a 10%. Os tubos foram centrifugados a 160 G por 6 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, fez-se a coleta do plasma incluindo de 1 a 2mm da porção superior das células vermelhas do sangue, obtendo-se um volume de cerca de 1,2ml de PRGF por tubo. O PRP foi ativado durante o procedimento cirúrgico com a utilização de cloreto de cálcio a 10% a um volume de 50 microlitros para cada 1,2ml de PRGF obtido. Após 10 e 16 semanas foram realizadas biópsias das áreas em estudo com a utilização de broca trefina com a profundidade de 3mm. Para todas as áreas estava programada a colocação de implantes endósseos metálicos. Após o devido processamento das peças e avaliação histológica das lâminas o autor concluiu que não havia efeitos negativos na utilização de PRGF; epitelização completa, maturação e regeneração óssea das áreas de exodontia ocorreram em 100% dos casos, mas significativamente em melhor qualidade nas áreas tratadas com PRGF do que nas controle.

Landesberg et al. (2000), em estudo para quantificação dos níveis de fatores de crescimento usando um método simplificado de preparação do gel de PRP, testaram velocidades diferentes de centrifugação durante períodos de tempo

diferentes. A preparação do PRP seguiu como protocolo a coleta de sangue total periférico em tubos vacutainer de 5ml contendo 0,5ml de citrato de sódio a 0,129mol/l ou 0,048ml de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) obtidos de voluntários saudáveis (2 homens e 1 mulher). Uma quantidade de sangue total foi removida para determinar a contagem de plaquetas inicial e os tubos foram centrifugados em minicentrífuga com centrifugação variando de 100 a 200 G em tempos de 2 a 20 minutos. Posteriormente todo o plasma foi transferido para um recipiente graduado de 15ml que novamente foi centrifugado a 100 G, 200 G, 250 G e 400 G, por um tempo que variou de 2 a 10 minutos. Os resultados mostraram que a melhor concentração de plaquetas foi obtida utilizando-se o protocolo de 200 G por 10 minutos, onde os autores obtiveram um enriquecimento da média da plaquetometria inicial de 229% (268.000 µl para 615.000 µl) com plasma posteriormente recentrifugado na mesma intensidade onde se obteve uma média de incremento de concentração de 205,7% +/- 22.2% chegando a obter 935.000 plaquetas/µl de um sangue que inicialmente apresentava 294.000 plaquetas/µl. As centrifugações por um período inferior a 5 minutos não obtiveram sucesso em individualizar as plaquetas. Segundo os autores, forças maiores que 250 G formam grumos plaquetários que não podem ser ressuspensos e o uso de EDTA proporciona concentrações plaquetárias aproximadamente duas vezes maior do que quando se usa citrato, porém, ao microscópio ótico, as plaquetas aparecem danificadas podendo ser vistos débris celulares.

Obarrio et al. (2000), em relato de 5 casos sobre o uso de fatores de crescimento autógeno em cirurgia periodontal, demonstraram uma nova biotecnologia em que o gel de plaquetas é usado em combinação com osso congelado desmineralizado alógeno para o tratamento de defeitos ósseos periodontais. Para preparar o gel de plaquetas, 400ml de sangue periférico foram retirados do paciente por meio da utilização de um separador de células por densidade. O sangue retirado era centrifugado a 5600 rpm dividindo-se desta forma em PPP, PRP e células vermelhas do sangue. A velocidade de centrifugação era diminuída para 2400 rpm, para permitir a separação de 30ml de PRP, sendo os outros componentes reinfundidos no paciente. Segundo os autores, a concentração plaquetária no PRP varia de 500.000 a 1.000.000/µl. O PRP foi ativado utilizando uma mistura de 10ml de cloreto de cálcio a 10% com 5000 unidades de trombina

bovina liofilizada, onde 1ml desta solução é misturada a 7ml de PRP. Em 10 segundos, o conteúdo assume a consistência de gel resultante da formação da rede de fibrina. Os autores concluíram através das observações clínicas e radiográficas com dois anos de acompanhamento, que esta nova tecnologia pode proporcionar um aumento nas taxas de formação óssea e produzir excelente qualidade de osso novo, bem como significativa redução da profundidade de sondagem, melhorando a cicatrização de cirurgias periodontais.

Kassolis et al. (2000) relataram 15 casos sobre o aumento de rebordo alveolar e seio maxilar utilizando plasma rico em plaquetas em combinação com enxerto ósseo alógeno seco e congelado (FDBA), em áreas que posteriormente receberiam implantes endósseos metálicos. O procedimento utilizado para obtenção do PRP foi através da centrifugação sangüínea a aproximadamente 2500 rpm. Foram obtidos de 50 a 150ml de PRP e a contagem automatizada das plaquetas no PRP revelou um aumento de 3 a 10 vezes no número de plaquetas iniciais do sangue periférico. As aferições revelaram 244.000 plaquetas por microlitro no sangue periférico (variação de 163.000 a 424.000) e de 1.163.000 plaquetas por microlitro no PRP (variação de 361.000 a 2.421.000). O PRP foi ativado durante o procedimento cirúrgico com a utilização de cloreto de cálcio a 10%. O procedimento de reabertura das áreas enxertadas ocorreu em 3 ou 4 meses de acordo com a disponibilidade dos pacientes. Material para avaliação histológica foi obtido com a utilização de broca trefina nos sítios de instalação dos implantes. A avaliação das lâminas histológicas confirmou a presença da formação de tecido ósseo vital ao redor das partículas de FDBA sendo possível observar-se em alguns espécimes a formação de pontes ósseas incluindo o material enxertado. Para os autores os achados histológicos sugeriram que o aumento do rebordo alveolar e seio maxilar com FDBA associado a PRP providencia uma alternativa viável para futuros sítios de instalação de implantes. Futuros estudos, porém, seriam necessários para determinar se o PRP melhora a formação óssea nova ou a maturação óssea quando utilizado com o FDBA.

Camargo et al. (2001) estudaram a associação de PRP com osso mineral poroso bovino (BPBM) e regeneração tecidual guiada (membrana absorvível de ácido poliglicólico) versus regeneração tecidual guiada (membrana absorvível de ácido poliglicólico) no tratamento de defeitos intra-ósseos. O estudo clínico foi realizado em 18 pacientes saudáveis com defeitos ósseos interproximais

semelhantes e aos pares. Para obtenção do PRP, o protocolo utilizado foi a retirada de 10ml de sangue em tubos de vácuo contendo citrato de sódio a 10% como anticoagulante. Os tubos foram centrifugados a 5600 rpm por 6 minutos, que resultava na separação do sangue em 3 frações, PPP no topo do tubo, PRP no meio e células vermelhas do sangue no fundo. Dois mililitros da camada superior correspondente ao PPP foram aspiradas e descartados. O PRP foi coletado em conjunto com 1 a 2mm da fração de células vermelhas do sangue, fração rica em plaquetas recentemente sintetizadas. A ativação do PRP ocorreu durante o procedimento cirúrgico com a utilização da solução de cloreto de cálcio a 10% e 100 U/ml de trombina bovina. O PRP e o material de enxerto eram misturados na proporção de 1:1. Todas as medidas obtidas durante a primeira cirurgia para o tratamento dos defeitos periodontais foram aferidas após 6 meses através de cirurgia exploratória. Os autores concluíram que a adição de PRP/BPBM não somente trouxe benefícios clínicos como também estatisticamente significantes para os casos tratados e que ambas modalidades de tratamento resultaram em significantes reduções na profundidade de sondagem, bem como, no ganho de reinserção clínica quando comparadas aos valores iniciais.

Shanaman et al. (2001), em relato de 3 casos, utilizaram PRP em combinação com osso alógeno e membranas absorvíveis e não absorvíveis, em defeitos verticais e horizontais da crista alveolar, em áreas para futura colocação de implantes endósseos metálicos. O PRP foi coletado em banco de sangue de 3 a 10 dias antes do procedimento cirúrgico, e submetido a todos os testes de rotina. No dia que antecipava o procedimento cirúrgico, o sangue retirado sofria o procedimento para extração de 50ml de PRP que revelava 3.000.000 de plaquetas por microlitro. A ativação do PRP foi realizada com a utilização de uma solução de cloreto de cálcio a 10% e 1.000 unidades de trombina bovina. As áreas enxertadas após aproximadamente 6 meses foram reoperadas para instalação dos implantes, a este tempo procedeu-se a biópsia do local com a utilização de broca trefina. Após adequado processamento das peças a avaliação histológica das áreas enxertadas revelou a presença de partículas do enxerto rodeadas por tecido conjuntivo bem como formação de tecido ósseo. Os autores concluíram que a adição de PRP não melhorou a qualidade e quantidade da formação óssea quando comparado a estudos sem PRP que faziam uso de regeneração óssea guiada, sugerindo a necessidade de outros estudos para determinar o seu real efeito quando associado

a diferentes materiais para enxertia, bem como a determinação da influência de outros fatores como as membranas e a concentração de fatores de crescimento contidos no PRP.

Drugrillon et al. (2002), em estudo sobre concentrado autógeno de plasma rico em plaquetas (cPRP) para aplicação local em regeneração óssea, propusseram uma modificação no sistema de bolsas para coleta em banco de sangue, com objetivo de diminuir a quantidade de sangue necessária para produção do cPRP. Para tal, foram coletados 250ml de sangue de 34 doadores (9 homens e 25 mulheres com idade variando entre 21 e 71 anos (média de 50,4 anos). O sangue coletado foi centrifugado a 240 G por 20 minutos de onde se obteve o PRP. Deste, 5ml foram destinados à contagem plaquetária em contador hematológico automatizado e posterior cálculo do TGF-β1. O PRP foi armazenado toda noite em temperatura ambiente sobre constante agitação em equipamento especializado. No dia seguinte, 3 - 4 horas antes da cirurgia, o PRP foi novamente centrifugado a 800 G por 15 minutos. O plasma pobre em plaquetas sobrenadante foi separado restando o aglomerado plaquetário e 8ml de plasma (volume suficiente para um aumento de seio maxilar bilateral), sendo as plaquetas cuidadosamente ressuspensas no plasma remanescente (cPRP). Os resultados mostraram que a média da contagem plaquetária no sangue foi de 239.000 +/- 52.500 plaquetas/μl (variação de 139.000 a 338.000/μl), no PRP a média foi de 341.000 +/- 106.000 plaquetas/μl (variação de 187.000 a 690.000/μl) e no cPRP a média foi de 3.990.000 +/- 1.220.000 plaquetas/μl (variação de 1.730.000 a 6.470.000/μl). A quantidade de TGF-β1 no sangue não foi relatada, no PRP foi de 87,7 +/- 29,4ng/ml (variação de 48,5 a 174ng/ml) e no cPRP foi de 1020 +/- 377ng/ml (variação de 466 a 2140ng/ml). Para testarem a influência da força de centrifugação na contagem plaquetária e quantidade de TGF-β1, partes de 5ml de PRP foram separadas e distribuídas em tubos de polipropileno, sendo os tubos recentrifugados a 400, 600, 800, 1000 e 1200 G respectivamente, o PPP sobrenadante foi cuidadosamente removido e o aglomerado plaquetário foi ressuspenso no plasma remanescente (0,5ml), sendo submetido à contagem plaquetária e quantificação do TGF-β1. Os resultados de 400 G para 1200 G apresentaram um aumento significativo na concentração plaquetária (3.261.000 +/- 653.000/μl para 5.120.000 +/- 772.000/μl de cPRP respectivamente) entretanto para a concentração de TGF-β1 o aumento significante ocorreu de 400 G

para 800 G (187 +/- 70,5ng/ml para 652 +/- 198ng/ml de cPRP) sem maior aumento para 1000 e 1200 G. Para os autores, o passo crítico na preparação do cPRP está nas altas centrifugações para concentrar as plaquetas. As forças podem ativar as plaquetas que liberariam seu conteúdo granular (fatores de crescimento), no plasma sobrenadante, por isto procederam a investigação da quantidade de TGF-β1 nos concentrados submetidos a diferentes forças de centrifugação, revelando que centrifugações acima de 800 G não incrementam a quantidade de TGF-β1 ao preparado, sugerindo desta forma que as plaquetas foram ativadas e liberaram seu conteúdo granular, por esta razão a centrifugação para obtenção do cPRP foi a 800 G. O presente estudo possibilitou aos autores concluírem que, com este método, obtiveram-se concentrações de TGF-β1, 12 vezes maiores que no cPRP e que a diminuição na coleta sangüínea de 500 para 250ml previne anemia e complicações no dia da cirurgia.

Aghaloo et al. (2002), em estudo piloto para investigação do uso de PRP em defeitos cranianos de coelhos utilizaram 15 animais divididos em 3 grupos, onde 4 defeitos ósseos de 8mm foram confeccionados com broca trefina em irrigação abundante e imediatamente enxertados com osso autógeno, PRP, osso autógeno e PRP, permanecendo um defeito sem tratamento (controle). O reparo foi avaliado radiograficamente através de subtração digital e histologicamente por análise histomorfológica após 1, 2 e 4 meses do procedimento cirúrgico. Para obtenção do PRP os autores retiraram 10ml de sangue de cada coelho que foi associado a 1,1ml de citrato de sódio (anticoagulante). O sangue foi centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos (215 G) para separar o plasma contendo as plaquetas das células vermelhas. Todo o plasma foi removido e a ele foi adicionado mais 0,4ml de citrato de sódio, sofrendo nova centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos (863 G) de onde se obteve 1ml de PRP. Contagem plaquetária, não automatizada, foi realizada no sangue periférico antes da centrifugação e posteriormente no PPP e no PRP. A média de plaquetas no sangue periférico foi de 144.000/µl com variação de 70.000 a 260.000/µl e no PRP foi de 1.050.000/µl com variação de 625.000 a 1.495.000/µl. O PRP foi ativado durante o procedimento cirúrgico com uma solução de trombina bovina (5000 unidades) e cloreto de cálcio a 10%. O material para enxerto era obtido durante o preparo das lojas cirúrgicas e após triturado era misturado ao PRP ou utilizado isoladamente. Os autores concluíram que não houve melhora significante

dos defeitos preenchidos com PRP tanto para avaliação radiográfica quanto para histomorfométrica; já os defeitos tratados com osso e osso associado a PRP apresentaram uma tendência radiográfica e histomorfométrica de aumento na formação óssea para 1, 2 e 4 meses quando comparado com o grupo controle e o PRP puro.

Kim et al. (2002a) avaliaram o uso de sulfato de cálcio com ou sem PRP no tratamento de defeitos ósseos ao redor de implantes, utilizando 10 cães da raça beagles, que receberam, cada um, 3 implantes na crista ilíaca. O PRP foi obtido minutos antes da anestesia, retirando-se 10ml de sangue de cada animal em tubos de 5ml contendo citrato de sódio a 10% como anticoagulante. Os tubos foram centrifugados a 1000 rpm por 10 minutos; 1ml de PPP de cada tubo foi descartado. O plasma remanescente em cada tubo foi coletado e recentrifugado a 1500 rpm por 10 minutos. Para ativação do PRP 15ml de cloreto de cálcio a 10% e 1250 unidades de trombina foram adicionados juntamente ao sulfato de cálcio particulado. A análise histológica revelou que todos os defeitos ósseos ao redor dos implantes que foram tratados com sulfato de cálcio com e sem PRP, foram preenchidos com osso novo. Os defeitos que não foram tratados (controle) demonstraram formação óssea nova somente na porção inferior das roscas dos implantes, sugerindo que os defeitos ósseos ao redor de implantes podem ser tratados com sulfato de cálcio obtendo-se resultados melhorados se PRP for utilizado em associação.

Kim et al. (2002b), em estudo para comparar a osseointegração de implantes endósseos em osso seco congelado desmineralizado isolado ou com PRP, utilizou dez cachorros machos e fêmeas adultos com aproximadamente 1 ano. Os animais foram submetidos a procedimento cirúrgico sob anestesia geral, para o preparo de 3 alvéolos circulares medindo 4mm de profundidade e 6mm de distância mesiodistal e bucolingual, na crista ilíaca de cada animal. Desta forma, foram instalados 30 implantes com 10mm de comprimento por 4mm de diâmetro. O defeito ósseo remanescente ao redor dos implantes serviu como área para avaliação dos materiais propostos, ficando um defeito sem tratamento (controle), outro tratado com enxerto de osso seco congelado desmineralizado e o último com a associação osso seco congelado desmineralizado e PRP. Para preparação do PRP, 10ml de sangue foram retirados de cada cachorro, minutos antes da anestesia, usando tubos a vácuo de 5ml que continham citrato de sódio a 10% como anticoagulante. Os tubos foram centrifugados a 1000 rpm por 10 minutos, o sangue foi separado em 3 componentes

básicos: células vermelhas do sangue no fundo do tubo, PRP aparecendo no meio do tubo e PPP que se encontrava no topo do tubo. Um mililitro de PPP foi retirado de cada tubo de 5ml e descartado e o plasma remanescente foi coletado e centrifugado novamente a 1500 rpm por 10 minutos. A seguir, 50 µl de cloreto de cálcio a 10% e 1250 unidades de trombina bovina foram adicionados ao PRP, sendo, por fim, misturados ao osso seco congelado desmineralizado. Contagem automatizada do sangue periférico revelou uma média de 443.000/µl, com uma variação de 400.000 a 505.000/µl; já a média de plaquetas no PRP foi de 1.735.000/µl, com uma variação de 1.520.000 a 2.005.000/µl com um incremento de 392% na contagem inicial. Os resultados mostraram que, quando se comparava o percentual médio da formação óssea na região e a taxa de contato ósseo com os implantes, o grupo experimental apresentava uma gradual maturação óssea estatisticamente significante, em relação ao grupo controle; e que, quando o PRP foi adicionado ao osso seco congelado desmineralizado, o período de cicatrização da interface osso/implante reduziu. Os autores, baseados em seus resultados, sugerem que defeitos ósseos ao redor de implantes de titânio podem ser tratados com sucesso utilizando osso seco congelado desmineralizado e que o PRP pode aumentar a formação óssea.

Zechner et al. (2003), em estudo histológico e histomorfométrico da influência do PRP no reparo ósseo ao redor de implantes, utilizou como modelo animal a região de pré-molares mandibulares de 12 miniporcos (95 ± 5Kg cada), obtendo 72 sítios para instalação dos implantes (3 em cada lado da mandíbula). O PRP foi utilizado em todos os sítios do lado esquerdo, tendo como controle o lado direito. Os animais foram divididos em 4 grupos e sacrificados com 3, 6 e 12 semanas após a cirurgia. Para obtenção do PRP, os autores utilizaram-se do método convencional. Desta forma, retiraram no dia que antecedeu a cirurgia, 450ml de sangue venoso periférico de cada animal em bolsa tripla para coleta sangüínea, tendo como anticoagulante citrato-fosfato-dextrose. O sangue foi centrifugado a 2890 rpm por 6 minutos e o plasma foi manualmente transferido para segunda bolsa e armazenado a 22 °C em contínua agitação até a hora do procedimento cirúrgico, quando era recentrifugado a 153 G por 12 minutos. A essa hora todo o PPP era transferido para a terceira bolsa e descartado, restando na segunda bolsa aproximadamente 30ml de PRP. Os autores afirmaram que com este protocolo de centrifugação é possível a obtenção do PRP com uma contagem plaquetária que varia de 800.000 a 1.000.000

de plaquetas por microlitro. Os resultados histológicos indicaram que a aplicação tópica de PRP nos alvéolos cirúrgicos incrementou significativamente, quando comparado ao grupo controle, a atividade de regeneração óssea até a sexta semana.

Aghaloo et al. (2004), em estudo piloto para investigação do uso de PRP associado a Osso Bovino Inorgânico em defeitos cranianos de coelhos, utilizaram 15 animais, divididos em 3 grupos, onde 4 defeitos ósseos de 8mm foram confeccionados com broca trefina em irrigação abundante e imediatamente enxertados com Osso Bovino Inorgânico sozinho, Osso Bovino Inorgânico + PRP, Osso Autógeno e Coagulo Sangüíneo. O reparo ósseo foi avaliado radiograficamente através de subtração digital e histologicamente por análise histomorfológica e histomorfométrica, após 1, 2 e 4 meses do procedimento cirúrgico. Para obtenção do PRP os autores retiraram 10ml de sangue de cada coelho que foi associado a 1,1ml de citrato de sódio (anticoagulante). O sangue foi centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos (215 G) para separar o plasma contendo as plaquetas das células vermelhas. Todo o plasma foi removido e a ele foi adicionado mais 0,4ml de citrato de sódio, sofrendo nova centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos (863 G) de onde se obteve 1ml de PRP. Contagem plaquetária, não automatizada, foi realizada no sangue periférico antes da centrifugação e posteriormente no PPP e no PRP. A média de plaquetas no sangue periférico foi de 118.000/µl com variação de 100.000 a 135.000/µl e no PRP foi de 960.000/µl com variação de 660.000 a 1.265.000/µl. O PRP foi ativado durante o procedimento cirúrgico com uma solução de trombina bovina (5000 unidades) e cloreto de cálcio a 10%. Os autores concluíram que houve melhora significante no reparo ósseo dos defeitos preenchidos com Osso Bovino Inorgânico + PRP quando comparados a Osso Bovino Inorgânico puro e que os defeitos preenchidos com Enxerto Autógeno foram melhores que os outros grupos na avaliação radiográfica, histomorfológica e histomorfométrica para 1, 2 e 4 meses.

Aghaloo et al. (2005), em estudo piloto para investigação do uso de PRP associado a Osso Congelado Seco Mineralizado e Desmineralizado em defeitos cranianos de coelhos, utilizaram 15 animais, divididos em 3 grupos, onde 4 defeitos ósseos de 8mm foram confeccionados com broca trefina em irrigação abundante e imediatamente enxertados com Osso Congelado Seco Mineralizado sozinho, Osso Congelado Seco Mineralizado + PRP, Osso Congelado Seco Desmineralizado

sozinho e Osso Congelado Seco Desmineralizado + PRP. O reparo ósseo foi avaliado radiograficamente através de subtração digital e histologicamente por análise histomorfológica e histomorfométrica, após 1, 2 e 4 meses do procedimento cirúrgico. Para obtenção do PRP os autores retiraram 10ml de sangue de cada coelho que foi associado a 1,1ml de citrato de sódio (anticoagulante). O sangue foi centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos (215 G) para separar o plasma contendo as plaquetas das células vermelhas. Todo o plasma foi removido e a ele foi adicionado mais 0,4ml de citrato de sódio, sofrendo nova centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos (863 G) de onde se obteve 1ml de PRP. Contagem plaquetária, não automatizada, foi realizada no sangue periférico antes da centrifugação e posteriormente no PPP e no PRP. A média de plaquetas no sangue periférico foi de 112.333/µl com variação de 90.000 a 135.000/µl e no PRP foi de 1.137.667000/µl com variação de 800.000 a 1.465.000/µl. O PRP foi ativado durante o procedimento cirúrgico com uma solução de trombina bovina (5000 unidades) e cloreto de cálcio a 10%. O material para enxerto era misturado ao PRP ou utilizado isoladamente. Os autores concluíram que não houve melhora significante no reparo ósseo dos defeitos preenchidos com Osso Congelado Seco Mineralizado e Desmineralizado + PRP tanto para avaliação radiográfica, histomorfológica e histomorfométrica para 1, 2 e 4 meses quando comparado aos grupos controle com Osso Congelado Seco Mineralizado e Desmineralizado puro.

Santana et al. (2006), em estudo para avaliação radiográfica do processo de reparo de cavidade óssea cirúrgica preenchida ou não com plasma rico em plaquetas, em defeitos cranianos de coelhos, utilizaram 12 animais, onde 2 defeitos ósseos de 5mm foram confeccionados com broca trefina em irrigação abundante sendo um dele deixado preencher com coágulo sangüíneo e o outro com PRP. O reparo das cavidades ósseas foi avaliado radiograficamente através da digitalização das imagens radiográficas e o auxilio de um programa de computador. O tempo de sacrifício dos animais foi de 14 e 28 dias de pós-operatório, formando assim dois grupos com 06 animais. Para obtenção do PRP os autores retiraram 10ml de sangue de cada coelho que foi associado a 1,1ml de citrato de sódio (anticoagulante). O sangue foi centrifugado a 160G por 20 minutos para separar o plasma contendo as plaquetas das células vermelhas. Todo o plasma foi removido e a ele foi adicionado mais 0,4ml de citrato de sódio, sofrendo nova centrifugação a 400G por 10 minutos de onde se obteve 1ml de PRP. O PRP foi ativado com 50 microlitros de cloreto de

cálcio a 10%. Os autores não fazem menção ao número de plaquetas obtido no sangue periférico tão pouco no preparado de PRP. Os autores concluíram que não haver diferença estatisticamente significante entre os grupos Coágulo e PRP aos 14 dias pós-operatórios e que o reparo estava adiantado no grupo PRP quando avaliado aos 28 dias ($p < 0,05$). Perceberam ainda que o PRP promoveu aumento da densidade óssea nas adjacências das cavidades cirúrgicas nas quais foi utilizado ($p < 0,05$).

Como pode ser observado durante a revista preliminar de literatura, o plasma rico em plaquetas tem indicação na Cirurgia Bucomaxilofacial, especialmente no que diz respeito à sua utilização para melhorar a incorporação de enxertos (seio maxilar e autógeno em bloco ou particulado) muitas vezes necessários à colocação de implantes endósseos metálicos, porém, os estudos em momento algum versam sobre a influência da contagem plaquetária do PRP sobre o reparo do tecido ósseo.

2.6 TECIDO ÓSSEO

2.6.1 Histofisiologia do tecido ósseo

O processo pelo qual esse tecido é formado chama-se de ossificação ou osteogênese, podendo ser originado de duas formas: a ossificação intramembranosa, atualmente também conhecida como endoconjuntiva e a ossificação endocondral onde um modelo cartilaginoso é substituído por osso. (KATCHBURIAN; ARANA-CHAVES; 1999).

O osso representa um sistema resistente, rígido, mineralizado (sendo considerado o maior reservatório de cálcio do corpo), além de realizar a proteção de estruturas vitais e servir como origem e inserção de vários músculos, atuando como elemento de suporte e sustentação através do esqueleto (FEINBERG et al., 1997; ROBERTS; GARETTO, 2000).

É considerada uma estrutura extremamente forte, possuindo uma força de resistência à quebra comparada a do aço, contudo com uma determinada elasticidade e flexibilidade, e com alta capacidade de regeneração espontânea (HERCULIANI et al., 2000).

Sua composição é aproximadamente distribuída em 8% de água e 92% de material sólido, sendo este último dividido em aproximadamente 21% de material orgânico e 71% de material inorgânico (FEINBERG et al., 1997; ROSEMBERG, 1996).

O principal sal inorgânico constituinte do osso são os cristais de hidroxiapatita ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$), este mineral confere a força e a dureza ao osso e se constitui no reservatório de 99% de todo o cálcio, 80% de todo o fósforo e 65% do sódio e magnésio do organismo (FEINBERG et al., 1997; ROSEMBERG, 1996).

O componente orgânico é representado em aproximadamente 90% pelo colágeno tipo I (similar ao encontrado na pele e nos tendões), e os outros 10% são representados por substâncias não colágenas como proteínas morfogenéticas do osso (BMPs), proteoglicanas e glicoproteínas como osteocalcina, osteonectina e osteopontina (ROSEMBERG, 1996). Dentre elas, somente a osteocalcina e a osteopontina são específicas para osso, enquanto as demais também estão presentes em outros tecidos não-mineralizaodos (DERKX et al., 1998).

Microestruturalmente o osso pode ser categorizado em três componentes: células, matriz orgânica e matriz inorgânica. Esses são integrados em duas hierarquias macroestruturais: osso cortical e osso esponjoso (BOGLIOLO, 1994).

As células encontradas no osso são de três tipos: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, sendo os dois primeiros tipos celulares derivados das células mesenquimais denominadas células osteoprogenitoras. Os osteoblastos são responsáveis pela síntese e secreção do componente orgânico da matriz extracelular e iniciam o processo de mineralização. Os osteócitos se situam em cavidades chamadas osteoplastos e desempenham um importante papel no controle dos níveis plasmáticos de cálcio e fósforo. Já os osteoclastos, são células gigantes multinucleadas que estão relacionadas com a reabsorção do tecido ósseo e participam do processo de remodelação dos ossos. São derivadas de uma célula precursora granulócito-macrófago localizada na medula hematopoiética (ROSEMBERG, 1996; YOUNG; HEATH, 2000, TEM CATE, 2001; GARTNER; HIATT; 2003).

Os osteócitos, os osteoblastos e as células osteoprogenitoras estão incluídas nas células formadoras do osso. A geração e a estimulação dessas células são reguladas por citocinas e fatores de crescimento, como o fator de crescimento de

fibroblastos (FGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator do crescimento semelhante à insulina e o fator de crescimento transformador. As células osteoprogenitoras são células-tronco mesenquimais pluripotenciais localizadas nas vizinhanças de todas as superfícies ósseas; quando apropriadamente estimuladas, elas têm a capacidade de sofrer divisão celular e produzir uma prole que se diferencia em osteoblastos. Esse processo é vital para o crescimento, remodelagem e reparo do osso (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

A maioria dos ossos possui uma camada externa densa e rígida de tecido ósseo compacto denominado cortical e uma zona medular central de delgadas trabéculas interconectadas. A superfície externa dos ossos geralmente é revestida por uma camada de tecido conjuntivo fibroso denso, chamada, periósteo. Durante o crescimento ou reparo ósseo, as células osteoprogenitoras se diferenciam em osteoblastos que são responsáveis pela deposição de lamelas concêntricas de osso cortical por crescimento aposicional (YOUNG; HEATH, 2000).

Os tecidos mineralizados, com exceção do esmalte dentário, são de origem conjuntiva e sua capacidade de neoformação e/ou remodelação está relacionada diretamente às células que os originam. A rigidez e dureza característica do esqueleto dos vertebrados devem-se à presença do fosfato de cálcio, em geral, sob forma de hidroxiapatita. Os osteoblastos e condroblastos produtores de matriz orgânica originam cristais de mineral na matriz das células, chamadas de vesículas de matriz. Quando estas vesículas estão calcificadas, a mineralização se estende às fibras colágenas e às regiões interfibrilares, gerando um processo de agregados ou unidades isoladas calcificadas, que aumentam através do crescimento ou multiplicação de cristais (KATCHBURIAN; ARANA, 1999).

Burkitt, Young e Heath (1994) propuseram o reparo de fratura como modelo de reparo ósseo. Neste modelo a neoformação óssea seria tanto intramembranosa como endocondral. Segundo os autores, no local da fratura forma-se um coágulo sangüíneo que é posteriormente substituído por um tecido colágeno altamente vascular (tecido de granulação). Esse tecido torna-se progressivamente mais fibroso. Células mesenquimais diferenciam-se em condroblastos e substituem o tecido de granulação por cartilagem hialina, formando um calo provisório que é flexível. Este calo é fortalecido pela deposição de sais de cálcio dentro da matriz cartilaginosa. Células osteoprogenitoras do endósteo e periósteo são ativadas e depositam osso imaturo ao redor e dentro do calo provisório. O calo provisório é então transformado

em calo ósseo. O osso imaturo formador do calo ósseo será lentamente remodelado para formar osso lamelar maduro.

Schenk (1996) afirma que a formação óssea depende de dois pré-requisitos indispensáveis: suprimento vascular e suporte mecânico. O tecido ósseo exibe um potencial de regeneração surpreendente e restaura sua estrutura original e suas propriedades mecânicas, porém com certos limites e passível de falhas, caso determinadas condições não sejam observadas. Esse autor salienta alguns fatores que impedem ou dificultam o reparo ósseo: falha de vascularização, instabilidade mecânica, defeitos de grandes volumes e tecidos competidores com alta atividade de proliferação, como o tecido epitelial.

A fisiologia óssea é controlada por uma interação de fatores mecânicos e metabólicos, sendo que, sob circunstâncias fisiológicas, a formação do osso é regulada principalmente pela carga funcional ou pico de esforço. Durante a mineralização, pequenos cristais de hidroxiapatita (HA) são densamente condicionados em uma série ordenada, de acordo com a orientação das fibras colágenas. Dependendo das condições ambientais, o osso se forma como um material nitidamente ordenado, tanto em nível molecular quanto macroscópico (ROBERTS; GARETTO, 2000).

Hollinger, Buck e Bruder (1999) reafirmaram o reparo de fratura óssea como o modelo de estudo na regeneração óssea. Salientaram a importância dos fatores de crescimento tais como TGF-β (fatores de crescimento de transformação β), PDGF (fator de crescimento derivado das plaquetas) e BMPs (proteínas morfogenéticas do osso) no processo de reparo ósseo.

Defeitos ósseos ou fraturas causadas por traumas, infecções, neoplasias e anomalias do desenvolvimento cicatrizam-se com produção de novo osso com organização similar ao tecido original, contudo, a capacidade regenerativa espontânea é limitada pelo tamanho da lesão (HERCULIANI et al., 2000).

Conforme Ramoshebi et al. (2002), o osso possui uma estrutura de proteínas fortalecida por fosfato de cálcio, além de possuir uma capacidade regenerativa. O processo de formação ocorre a partir de uma dinâmica biológica que envolve processos bioquímicos, celulares e hormonais continuamente facilitados por um estado de deposição, reabsorção e remodelação ósseas. Existem três parâmetros fundamentais na engenharia tecidual óssea que vão determinar a capacidade de osteoindução: sinais osteoindutores solúveis, viabilidade das células mesenquimais

indiferenciadas em responder e ter a capacidade de se diferenciarem em células formadoras de osso, além de uma adequada matriz extracelular.

2.6.2 Reparo ósseo

Toda espécie animal tem a capacidade, de reposição de lesões causadas por traumas em suas estruturas orgânicas, inclusive o cirúrgico. E essa capacidade justifica a possibilidade do uso da cirurgia como modalidade terapêutica. Por isso, busca-se entender os fenômenos de reposição estrutural, e as possibilidades de controlá-lo no que diz respeito a sua velocidade, quantidade e qualidade. O estudo das alterações em nível microscópico permite afirmar que elas repetem-se durante o processo de cura de uma ferida; são variáveis em um mesmo indivíduo, numa relação direta com a intensidade do trauma; e podem ser relacionadas com aspectos clinicamente detectáveis (GREGORI, 1996).

Uma vez que um dano é suficiente para suscitar uma resposta inflamatória, o processo de cura é iniciado, podendo o resultado do mesmo ser: a regeneração, ou seja, a completa restauração da arquitetura do tecido; ou o reparo, isto é, a restauração da continuidade do tecido através de cicatrizes e distorção da arquitetura normal (TEN CATE, 2001).

Para Gregori (1996), um tecido lesado pode ser reparado através de dois processos distintos, denominados de regeneração e de cicatrização.

Assim, reparação é a capacidade que os tecidos apresentam de poder repor as suas estruturas lesadas; regeneração é a reposição das estruturas lesadas por células com morfofuncionalidade semelhante àquela que anteriormente existiam; e cicatrização é a reposição das estruturas lesadas por um tecido conjuntivo fibroso, denominado tecido cicatricial (GREGORI, 1996).

O autor classifica o processo de reparação de uma ferida cirúrgica em cinco fases distintas e sucessivas. Estas fases são denominadas: não-proliferativa; de ativação; proliferativa; de síntese; e de remodelação. A fase não-proliferativa inicia-se juntamente com o trauma cirúrgico, perdurando até 48 horas, no máximo. Nesta

fase ocorrem os processos mais importantes da hemostasia, caracterizando a inflamação primária ou inflamação traumática local. A fase de ativação caracteriza-se pelo aumento da concentração numérica de células do tecido conjuntivo, tanto dos macrófagos quanto dos fibroblastos, nos tecidos envolvidos na ferida cirúrgica. É uma fase subclínica, inicia-se com o quadro inflamatório e dura 72 horas. A fase proliferativa é caracterizada por um significativo aumento regional na população de macrófagos e fibroblastos. Faz-se então a estabilização definitiva do "coágulo organizado". Este evolui para o chamado tecido de granulação, estrutura bem definida que tende a unir as bordas da ferida. Esta fase dura do terceiro dia pós-operatório até o sexto dia. A fase de síntese é caracterizada pela deposição extracelular de ácido hialurônico e colágeno, substâncias essas sintetizadas pelos fibroblastos. Esta fase representa a reposição de estruturas lesadas durante o ato operatório e inicia-se no sexto dia. Perdura até que a quantidade de colágeno seja suficiente para a reposição dos tecidos lesados, tendo assim uma duração bastante variável. A fase de remodelação é de intensa modificação em nível microscópico, não detectável clinicamente. Nesta ocorre diminuição do número de fibroblastos presentes; desaparecem os leucócitos e os macrófagos; restabelece-se a microcirculação regional pela redução do número de capilares neoformados. Sua duração está na dependência do tipo de tecido e extensão da ferida cirúrgica, entre outros (GREGORI, 1996).

Segundo Hupp (1996), as etapas do processo de reparo normal das feridas ósseas seguem a seqüência de inflamação, fibroplasia e remodelação.

De acordo com Catanzaro e Guimarães (1982), o processo de reparo ósseo é descrito em três fases: uma fase inflamatória, uma reparadora e uma de remodelação. A fase inflamatória é caracterizada pela formação de um coágulo sanguíneo que envolve as superfícies ósseas no local da lesão estendendo-se pelo periósteo e cavidades medulares próximas, acompanhadas de edema moderado. Instala-se um processo inflamatório agudo com grande mobilização de neutrófilos e macrófagos, provocado pela liberação de substâncias quimiotáticas (histamina e serotonina, por exemplo) no local lesionado. Esta fagocitose tem como objetivo começar a remoção do coágulo das regiões necrosadas, e dos osteócitos mortos que surgem nas superfícies ósseas da região lesionada. Após, inicia-se a fase reparadora com o aparecimento de um grande número de fibroblastos produtores de

colágeno e responsáveis pela formação de um calo fibroso, no qual as fibras colágenas envolvem a região lesionada. À medida que a ação dos macrófagos prossegue, reabsorvendo o coágulo e tecido ósseo necrosado, surge gradativamente uma nova rede capilar. Essa rede, oriunda das células endoteliais remanescentes dos vasos rompidos e das células mesenquimais indiferenciadas, invade a região do coágulo juntamente com fibroblastos e osteoblastos para formar rapidamente um novo tecido ósseo no local, por um processo de ossificação intramembranosa ou endoconjuntiva. Isso irá resultar em um osso imaturo. O calo ósseo tem uma textura própria, mais celular e menos mineralizada, indicando a rapidez do processo de ossificação e justificando a denominação de osso imaturo. Na fase remodeladora, o calo ósseo passa por uma série de processos de reabsorção e neoformação até que a região lesionada retome a textura que possuía antes da lesão. As atividades osteoblásticas e osteoclásticas removem os excessos de material do calo ósseo, restabelecendo as cavidades ósseas que existiam e reconstróem os sistemas de Havers e o trabeculado de osso esponjoso na mesma disposição anterior à lesão.

Para Peterson et al. (2000), os eventos de cicatrização no tecido ósseo ocorrem em fases idênticas aos dos tecidos moles, possuindo uma fase inflamatória, uma fibroblástica e uma remodeladora, no entanto, osteoblastos e osteoclastos irão agir na reconstrução e remodelação do tecido lesado. As células osteogênicas (osteoblastos) com grande importância na cicatrização são derivadas do periósteo, endósteo e células mesenquimais indiferenciadas circulantes. Já os osteoclastos agem reabsorvendo osso necrótico e aquele que necessita de remodelação, induzindo os osteoblastos a depositarem osteóide que, quando mantido imóvel durante o processo de cicatrização, torna-se uma estrutura calcificada por deposição de mineral. Quando um osso é fraturado e suas extremidades livres afastam-se por mais de um milímetro, esse cicatriza por segunda intenção, ou seja, durante a fase fibroblástica, deve haver uma grande deposição de colágeno destinado a preencher o espaço formado. Os fibroblastos e osteoclastos produzem uma grande quantidade de matriz fibrosa cicatricial, que se estende além das extremidades livres do osso, formando o calo ósseo. Já a cicatrização por primeira intenção ocorre quando existe uma fratura incompleta, sem separação, ou quando as extremidades do osso são reduzidas à posição original e estabilizadas de forma rígida.

Para Cowin (2001), o processo da cicatrização óssea pode ser dividido em três eventos biológicos: fase inflamatória, reparativa e fase remodeladora. A primeira etapa é caracterizada pela formação do coágulo, a segunda pela construção do calo ósseo e a terceira é a remodelação e a formação de um novo tecido ósseo de forma lamelar.

Os vasos sanguíneos são rompidos e uma hemorragia local preenche a zona da lesão resultando na formação de um coágulo sanguíneo. Ao mesmo tempo plaquetas desgranuladas e células inflamatórias liberam PDGF, TGF-B FGF e IL-1 e IL-6, os quais ativam as células osteoprogenitoras no periósteo e na cavidade medular estimulando a atividade osteoclástica e osteoblástica. As primeiras células presentes são progenitoras pluripotentes chamadas de células tronco mesenquimais que possivelmente se originam do periósteo, do endósteo, da medula óssea e do endotélio vascular. As células osteoprogenitoras, que estão mais próximas da fratura e são supridas por uma rede de capilares, se diferenciam em osteoblastos e começam a secretar a matriz óssea, essa diferenciação aparenta ser ativada pelas BMPs. A neoformação óssea é produto tanto da ossificação intramembranosa como endocondral, pois as células osteoprogenitoras que se encontram no meio da massa em proliferação possuem um suprimento sanguíneo inadequado, transformando-se em condroblastos pela baixa tensão de oxigênio. Essas células produzirão cartilagem que acabará sendo substituída por osso primário formado pela ossificação endocondral, sendo que a intramembranosa é responsável pelo primeiro osso produzido junto ao tecido lesado. Durante o processo de remodelação o tecido ósseo primário é substituído pelo secundário reforçando ainda mais a zona de reparação de fratura (GARTNER; HIATT, 2003; COWIN, 2001; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000; JUNQUEIRA; CARNEIRO; 1999).

O processo da calcificação ainda não se conhece com certeza, apesar de se saber que ele é estimulado por alguns proteoglicanos e pela osteonectina. A teoria mais aceita baseia-se na presença de vesículas da matriz no osteóide (matriz óssea recém-formada ainda não calcificada), liberadas pelos osteoblastos. Com o aumento da concentração de íons de cálcio na vesícula da matriz, ocorre a cristalização e o cristal de hidroxiapatita em crescimento rompe a membrana estourando a vesícula da matriz, liberando o conteúdo. A alta concentração de íons na vizinhança dos cristais de hidroxiapatita juntamente com a presença de fatores de calcificação e

proteínas ligantes de cálcio, promove a calcificação da matriz (GARTNER; HIATT; 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO; 1999).

Em geral, quanto mais especializado o tecido, menor a capacidade de regeneração (TROWBRIDGE; EMLING, 1996). O reparo ósseo pode ser tão perfeito a ponto de não ser distinguido posteriormente ao exame radiográfico ou histológico (ROBBINS; ANGEL; KUMAR, 1986)

A análise microscópica do conteúdo de lojas ósseas cirúrgicas em reparação, observada em fêmur de ratos após 9 dias de pós-operatório, revelou que este tecido se encontrava em fase de intensa formação de osso imaturo, com característica de ossificação do tipo intramembranosa. Neste mesmo estudo verificou-se que tecidos transplantados, após 15 dias, apresentavam completas neoformação óssea com aumento de tecido ósseo na área do enxerto (NUNES; TAMES; VALCANAIA, 1997).

Para Schenk (1996), a formação óssea depende de dois pré-requisitos indispensáveis, o suprimento vascular e o suporte mecânico. O tecido ósseo exibe um potencial de regeneração surpreendente, restaurando sua estrutura original e suas propriedades mecânicas, porém, com certos limites e, passível de falhas, caso determinadas condições não sejam observadas. Ressaltam-se alguns fatores que impedem ou previnem o reparo ósseo, como a falha de vascularização, instabilidade mecânica, defeitos de grande volume e tecido competidor (tecido epitelial) com uma alta atividade de proliferação. O osso é um tecido que usualmente passa por um processo de remodelação de aproximadamente 2 a 3% ao ano. No defeito cirúrgico, entretanto, o osso pode remodelar mais rápido a partir do trabeculado e o processo de transformação para o osso lamelar, podendo ocorrer completamente dentro de alguns meses, dependendo de fatores envolvendo o local do enxerto, como vascularização e forças funcionais. Qualquer lesão óssea ativa a regeneração local pela liberação de fatores de crescimento e de indução óssea, pois o osso é uma das fontes mais ricas em fatores crescimento

2.7 ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO

Para ELLIS III (1996), o conhecimento básico de como se dá a cicatrização dos enxertos ósseos autógenos é necessário para que se entendam as vantagens dos vários tipos de enxertos ósseos disponíveis. A cicatrização ocorreria por intermédio de dois processos básicos: O primeiro processo surge a partir de células viáveis do próprio enxerto, capazes de formar tecido osteóide, já o segundo é observado no leito receptor e é iniciado por intensa angiogênese e proliferação fibroblástica com posterior osteogênese.

Garg (1999) definiu três diferentes processos de cicatrização associados com os enxertos ósseos: osteogênese, osteoindução e osteocondução. Osteogênese é a formação e o desenvolvimento do osso. Osteoindução é o processo de estimulação da osteogênese. Osteocondução é o fornecimento de uma matriz física para a deposição de novo osso. Para o autor, esses três processos ocorreriam concomitantemente na regeneração dos enxertos ósseos autógenos.

O enxerto ósseo autógeno é o tipo ideal e o mais comumente empregado, encontrando-se acima dos outros biomateriais, por ser o único tipo de enxerto que fornece células ósseas imunocompatíveis vivas, que são essenciais à osteogênese. Entretanto, possui como desvantagem a necessidade de uma área doadora, estética e funcional (BOYNE, 1984; PERROTT; SMITH; KABAN, 1992; ELLIS; SINN, 1993; HISLOP; FINLAY; MOSS, 1993; JENSEN et al., 1996)

Segundo Ellis III (1996), os enxertos ósseos são utilizados nos casos de procedimentos cirúrgicos com a finalidade de corrigir alterações ósseas, sejam elas de natureza traumática, congênita ou ainda patológica, procurando auxiliar o processo de reparo ósseo e conseqüentemente, o retorno dos tecidos envolvidos à sua condição de normalidade, tanto fisiológica como esteticamente.

O osso autógeno é considerado o “padrão-ouro” dentre os materiais de enxerto, em função de suas propriedades osteocondutoras, osteoindutoras e osteogênicas (BECKER et al., 1995). Sua desvantagem, porém, está na necessidade da criação de outro sítio cirúrgico com suas conseqüências pós-operatórias, muitas vezes, contra-indicando sua utilização (TAGA, 1996).

Ellis III (1996) refere que quando um fragmento de tecido ósseo é transplantado de um local para o outro no mesmo indivíduo, há dois fenômenos no

processo de reparo, ocorrendo inicialmente uma proliferação das células transplantadas do enxerto e a formação de um novo osteóide. Este evento é o responsável pela maior parte de osso neoformado. Isto dependerá da quantidade de células ósseas viáveis transplantadas, isto é, aquelas que “sobreviveram” ao processo de enxerto. Isso está na dependência da difusão de nutrientes das margens do leito receptor, uma vez que o suprimento sangüíneo é interrompido quando o enxerto e retirado de sua área doadora. A quantidade de neoformação óssea será diretamente proporcional ao contingente de células viáveis e denominada fase I da osteogênese. A segunda etapa da regeneração óssea ocorre a partir da segunda semana, quando há alteração no leito receptor, com a angiogênese e a proliferação fibroblástica. Os fibroblastos e outras células mesenquimais, se diferenciam em osteoblastos e começam a aposição de novo osso, constituindo a fase II da osteogênese, responsável pela incorporação do enxerto no local receptor, assim como reabsorção, reposição e remodelação contínuas.

O enxerto autógeno serve como uma base osteocondutiva para a deposição de matriz óssea durante a cicatrização. As propriedades osteoindutivas ocorrem no sentido de uma transferência osteogenica. Assim, com a aplicação do enxerto, osteoblastos e células precursoras de osteoblastos, fatores de crescimento (fator de crescimento β) e fatores de indução óssea (proteína óssea morfogenéticas) são atraídos pela matriz do osso enxertado, transferido para o sítio receptor, resultando numa ativação e neoformação óssea (GARG, 1999 ; GARG; STEVENS, 1999).

Conforme Catanzaro Guimarães (1982), as primeiras porções de matriz ficam depositadas sobre enxerto. Essa incorporação é transitória e à medida que essa matriz vai se depositando e calcificando, as partículas do enxerto vão sendo reabsorvidas. Na fase final, todo o osso enxertado é reabsorvido e substituído por outro, neoformado. A substituição representa o terceiro estágio do processo de reparo dos enxertos ósseos. O tecido ósseo neoformado não permanece com a mesma arquitetura por muito tempo, ao contrário, sofre um processo da reconstrução, através do qual assume aspecto arquitetural semelhante ao do hospedeiro. Este mecanismo, denominado remodelação, representa o quarto e último estágio da cicatrização dos enxertos ósseos.

O osso autógeno é o único biomaterial de enxerto disponível com propriedades osteogenicas, ou seja, capacidade de formar osso diretamente a partir das células do osso transplantadas e, sua forma mais eficaz é o osso esponjoso, que fornece a maior concentração de células ósseas (MISCH, 2000; NEVES, 2001).

O osso autógeno é geralmente considerado o melhor material para preenchimento de defeitos ósseos. Situação clínicas, no entanto, como tamanho do defeito ósseo, ausência de tecido doador suficiente ou a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica, pode impedir seu uso (CANCIAN et al., 1999).

O osso autógeno satisfaz os critérios de biocompatibilidade e osseointegração, fornecendo realmente um bom potencial osteogênico (HISLOP, FINLAY; MOSS, 1993). Este tipo de enxerto tem apresentado superioridade por sua capacidade osteoindutiva (AGOSTINI; PILATTI, 2000).

Em 1990, Wozney et al. demonstraram que o processo de formação óssea é iniciado quando células mesenquimais indiferenciadas entram em contato com a proteína morfogenéticas óssea, ocorrendo proliferação e diferenciação em codroblastos por volta do 5º dia. A vascularização na área se completa em torno deste período. Os osteoblastos começam a se localizar e a depositar matriz óssea na área do enxerto, quando a cartilagem é reabsorvida. Esta matriz óssea é então mineralizada e por volta do 14º dia um osso medular é formado contendo osteoblastos, osteoclasto e elementos medulares. O osso normal apresenta um processo dinâmico e contínuo e remodelação, através dos osteoblastos e osteoclastos, depositando e reabsorvendo osso, respectivamente. Este mesmo processo pode ser acelerado pelo aumento da concentração de proteínas morfogenéticas ósseas na área do enxerto (WOZNEY et al., 1990).

2.8 MODELOS DE ESTUDO

Defeitos ósseos que não irão cicatrizar durante o tempo de vida de um animal, justificando a necessidade da utilização de algum material para

preenchimento ósseo, são denominados defeitos ósseos críticos (HOLLINGER; KLEINSCHMIDT, 1990; SCHMITZ; HOLLINGER, 1986).

Diferentes modelos animais experimentais têm sido utilizados nos estudos em Regeneração Óssea Guiada e neoformação óssea de biomateriais. Podemos citar: ratos (BUSER; DAHLIN; SCHENK, 1994; CONSOLARO et al., 1997; ZAHEDI et al., 1998; ZELLIN; GRITLI-LINDE; LINDE, 1995), cães (McGINNIS et al., 1998; SMUKLER; BARBOZA; BURLISS, 1995), coelhos (AABOE et al., 1998; ITO; NAMBA; MURAI, 1998; LUNDGREN; SENNERBY; LUNDGREN, 1998; PIATTELLI et al., 1996; SCHMID et al., 1997) e macacos (HURZELER et al., 1998). Os defeitos são criados em diferentes ossos como tíbia, calvária, fêmur e mandíbula.

A quantidade da neoformação óssea sob condições experimentais é influenciada pela espécie do animal, idade, localização anatômica, envolvimento de cortical (uni ou bicortical), presença de periósteo e/ou dura-máter e estabilidad defeito (AABOE; PINHOLT; HJORTING-HANSEN, 1995).

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos desta pesquisa são:

- verificar se a quantidade de plaquetas presente no PRP influencia no processo de reparo do tecido ósseo quando utilizado em adição a osso autógeno particulado como material de enxerto.

- avaliar se os protocolos simplificados (aqueles obtidos através do uso de minicentrífugas de uso ambulatorial), para obtenção de PRP, concentram plaquetas em número suficiente para acelerar o processo de reparo do tecido ósseo, quando o PRP é utilizado em adição a osso autógeno como material de enxerto.

4 METODOLOGIA

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Esta pesquisa seguiu os princípios éticos estabelecidos de acordo com o capítulo XIV, art. 94-99, das Normas de Pesquisa em Saúde da PUCRS e do Conselho Nacional de Saúde – Resolução n° 01, de 13 de Junho de 1998, e em observância da Lei 6688, de 08 de Maio de 1979.

O projeto foi submetido à análise pela Comissão Científica e de Ética da Universidade do Vale do Itajaí e aprovada em 18 de agosto de 2005 sob o protocolo nº 405 / 2005 (ANEXO A).

O projeto foi submetido à análise pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e aprovada em 27 de maio de 2009 sob o protocolo nº 0020 / 09 (ANEXO B).

Foram respeitados os Princípios Éticos de Experimentação Animal postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (1990 apud GOLDIM, 1997), bem como as Normas para a Prática Didático-Científica da Vivissecção de Animais (Anexo C) previstas na lei 6.638 de 8 de maio de 1979 (BRASIL, 1988).

4.2 PROBLEMA

Não existem estudos publicados que relacionem diferentes protocolos para obtenção de PRP, sua repercussão sobre a contagem plaquetária, bem como, sua influência no reparo do tecido ósseo. Portanto o presente estudo aventa o seguinte problema: a quantidade de plaquetas presentes no PRP influencia no processo de reparo do tecido ósseo quando utilizado em adição a osso autógeno particulado como material de enxerto?

4.3 HIPÓTESE

A quantidade de plaquetas presentes no PRP influencia no processo de reparo do tecido ósseo quando utilizado em adição a osso autógeno como material de enxerto.

4.4 DELINEAMENTO DA PESQUISA

4.4.1 Paradigma e Delineamento

Esta pesquisa foi realizada junto ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, Área de Concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), como parte integrante da linha de pesquisa “Biocompatibilidade de Materiais”.

Foi desenvolvida dentro do paradigma tradicional, no delineamento de estudo experimental verdadeiro, pós-teste com grupo controle (CAMPBELL, 1979).

É um estudo do tipo “quase experimental – materiais equivalentes” e controle pós-teste somente. Seu delineamento é:

- M0 O M1 O M2 O M3 O onde:
- M = Material
- O = Observação

4.5 AMOSTRA

A amostra foi do tipo probabilística, obtida de forma aleatória simples. O experimento foi realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental do Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Vale do Itajaí e os animais foram adquiridos do Colégio Agrícola de Camboriu, no ano de 2005.

A seleção da amostra obedeceu a alguns critérios de exclusão, não sendo incluídos animais:

a) fêmeas, com o intuito de não gerar uma variável em relação ao gênero;

b) com massa corpórea menor que 3kg;

c) com idade superior ou inferior a 16 semanas de vida, pois a idade poderia interferir na capacidade de resposta biológica.

4.5.1 Modelo Animal e Organização da População e dos Grupos

Para a fase experimental desta pesquisa, foram utilizados 24 coelhos machos da espécie *Oryctolagus cuniculus* (Brancos da Nova Zelândia), com quatro meses de idade.

Os animais foram divididos em três grupos de oito animais cada um e colocados em gaiolas individuais de (100 cm de comprimento X 100 cm de largura X

100 cm de altura), sendo todos os procedimentos de manipulação, alimentação e limpeza realizados por pessoal treinado em bioterismo (MERUSSE; LAPICHIK, 1996).

Os períodos de observação determinados foram de 15 dias para o 1º grupo, 30 dias para o 2º e 45 dias para o 3º (quadro 1).

Grupo	Número de animais por grupo
1º. – 15 dias	08 animais
2º. – 30 dias	08 animais
3º. – 45 dias	08 animais

Quadro 1 – Divisão dos grupos de acordo com tempo e número de animais em observação.
Fonte: Dados da pesquisa (2009).

Todos os animais ficaram alojados sob condições satisfatórias, com temperatura e umidade relativa adequadas no Laboratório de Cirurgia Experimental do Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Vale do Itajaí.

As gaiolas foram etiquetadas com o nome do pesquisador e orientador responsáveis pelo experimento e adequadamente numeradas.

A alimentação foi feita à base de ração comercial e água *ad libitum* e a limpeza das gaiolas foi realizada três vezes por semana, com água corrente, sabão e desinfetantes.

4.6 PREPARO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS

O preparo do PRP seguiu o protocolo descrito por Chaves e Beltrão (2003), e está detalhado abaixo:

Após o ato anestésico, de cada um dos vinte e quatro coelhos no seu pré-operatório imediato (antes do inicio da incisão cirúrgica) foram coletados 10ml de sangue total periférico.

A coleta ocorreu através da punção da artéria auricular marginal, com o uso de um jelco número 24 (Figura 01) sendo o sangue aspirado em seringa de 10ml (Figura 02) e depois passado diretamente para 02 tubos de vacutainer de 5ml, cada um contendo 0,5ml de citrato de trissódio a 10% (anticoagulante), e 1ml (Figura 03) era destinado para determinação do hemograma completo e plaquetometria inicial dos coelhos.

Fig. 01: Punção da Artéria Auricular, com o uso de um jelco 24.
Fonte: Dados da Pesquisa (2009).

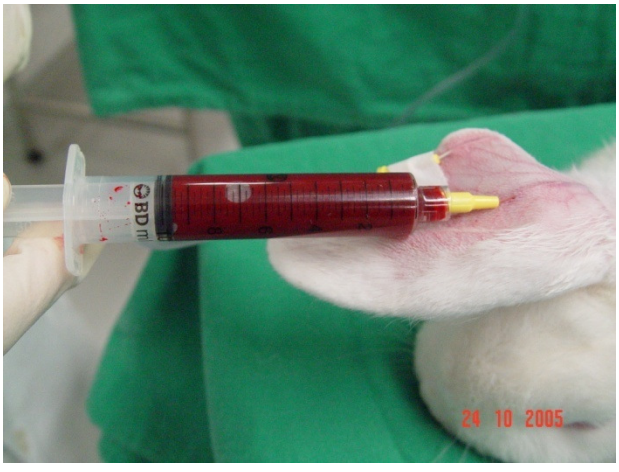


Fig. 02: Retirada de 10 ml de sangue através da Artéria Auricular.
Fonte: Dados da Pesquisa (2009).

A cada um dos novos tubos devidamente identificados foi aplicado um protocolo de centrifugação (Figura 03).

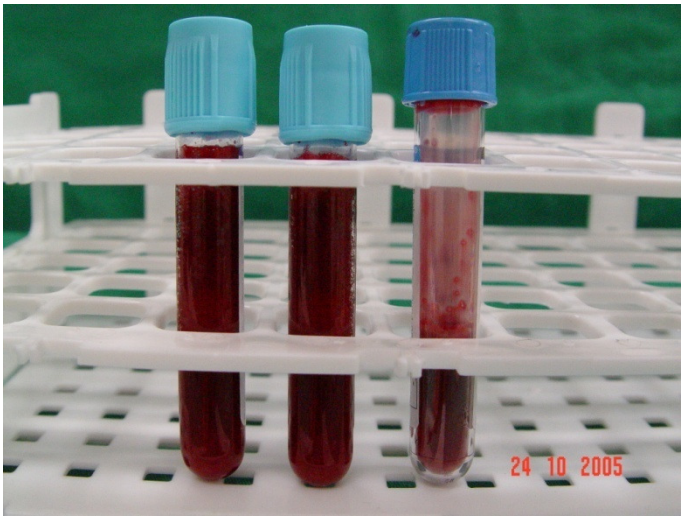


Fig. 03: Tubos de vácuo para onde era transferido o sangue da coleta para preparação do PRP a 160G e 560G, sendo o outro tubo utilizado para obtenção do hemograma inicial e contagem plaquetária.
Fonte: Dados da Pesquisa (2009).

Desta forma foram obtidos de cada coelho um PRP de amostra sangüínea centrifugada a 1000 rpm por 6 minutos (160G) (Protocolo atualmente utilizado pelo serviço de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial para obtenção de PRP através do laboratório de Patologia Clínica do HSL) e outro de amostra sangüínea centrifugada a 2000 rpm por 6 minutos (560G). Para tanto, foi utilizado na sala de cirurgia experimental uma centrífuga hematológica CELM – LS 3 PLUS (Figuras. 04 e 05).

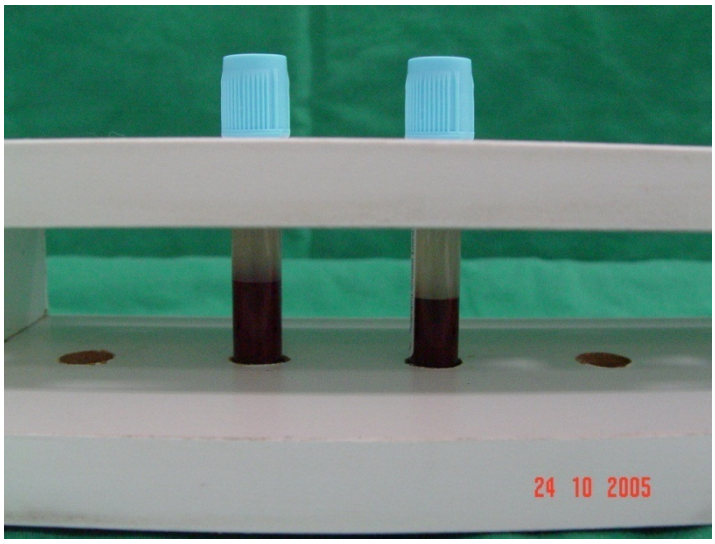


Fig. 04: Tubos posicionados para aspiração do PRP, após as centrifugações de 160G e 560G.
Fonte: Dados da Pesquisa (2009).

Fig. 05: A e B minicentrífuga utilizada para centrifugação sanguínea.
Fonte: Programa de Pós-Graduação em CTBMF da FO/PUCRS, Porto Alegre, 2003.

Após a centrifugação de cada tubo, o sangue dos tubos apresentavam-se divididos em três componentes básicos: células vermelhas do sangue (fundo do tubo), plasma rico em plaquetas (meio do tubo) e plasma pobre em plaquetas (topo do tubo) (Figura 06). Com o uso de uma seringa de 1ml (utilizada para veiculação de insulina) montada em uma agulha anestésica para punção lombar no. 15 , que teve seu bisel cortado e apresentava uma marcação de 1mm em sua extremidade (Figura 07), foi coletado o PRP, incluindo 1mm da porção superior das células vermelhas do sangue para que as plaquetas jovens e ricas em fatores de crescimento pudessem ser incluídas no PRP conforme relatado por (MARX et al., 1998) (Figura 08).

Fig. 06: Tubo centrifugado isolado mostrando as frações de eritrócitos (fundo do tubo), PRP (meio do tubo) e PPP (topo do tubo).
Fonte: Programa de Pós-Graduação em CTBMF da FO/PUCRS, Porto Alegre, 2003.

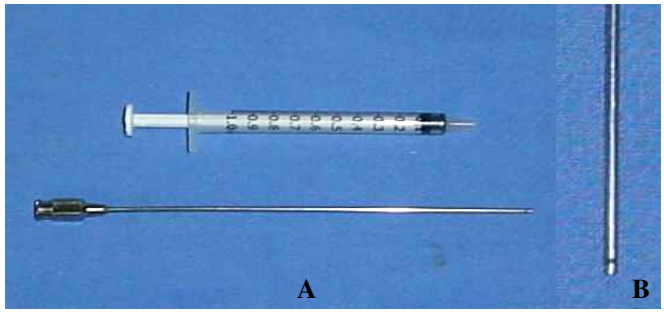


Fig. 07: Em A seringa de insulina e agulha para punção lombar, em B vista aproximada da extremidade da agulha evidenciando a ausência de bisel e a marcação de 1mm.
Fonte: Programa de Pós-Graduação em CTBMF da FO/PUCRS, Porto Alegre, 2003.

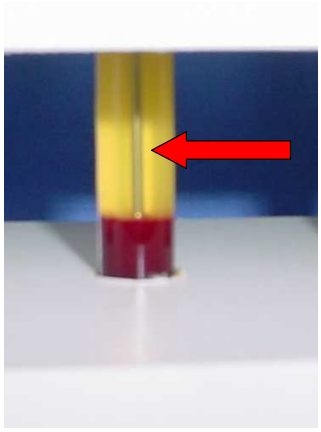


Fig. 08: Visão mais próxima do tubo já centrifugado, a seta evidencia a localização aproximada do PRP.
Fonte: Programa de Pós-Graduação em CTBMF da FO/PUCRS, Porto Alegre, 2003.

A coleta foi auxiliada pela utilização de um dispositivo especialmente confeccionado para este fim (Figura 09) composto por uma caixa de madeira com perfurações que possibilitam o encaixe preciso dos tubos de vácuo. O dispositivo também contém uma tampa que se encaixa aos tubos de vácuo em sua porção superior, apresentando uma perfuração que coincide com o centro do tubo, por onde a agulha para coleta era introduzida.

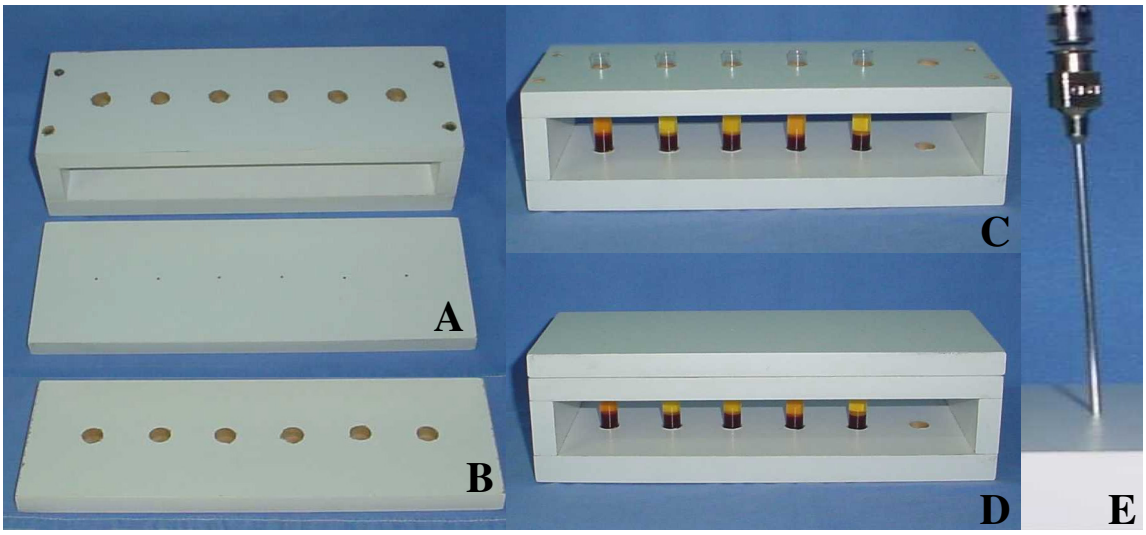


Fig. 09: Em A dispositivo mais tampa em vista superior, B tampa em visão inferior, C dispositivo com os tubos centrifugados, D dispositivo completo com tampa encaixando na porção superior dos tubos, E agulha penetrando pelo furo da tampa.
Fonte: Programa de Pós-Graduação em CTBMF da FO/PUCRS, Porto Alegre, 2003.

O local para aspiração do PRP era escolhido por análise visual, o volume coletado era cerca de 1ml que era prontamente acondicionado em um novo tubo de ensaio para que pudesse ser submetido à contagem plaquetária que foi realizada no laboratório de Análises Clínicas do Curso de Farmácia da Universidade do Vale do Itajaí, antes de ser levado novamente a sala de cirurgia para sua ativação e aplicação cirúrgica.

As contagens plaquetárias no sangue total de cada coelho e nas amostras de PRP a 160G e 560G eram realizadas no contador de células automatizado (Coulter STKS) (Figura 10), conforme especificações do fabricante.

Fig. 10: Contador de células automatizado (Coulter STKS).
Fonte: Programa de Pós-Graduação em CTBMF da FO/PUCRS, Porto Alegre, 2003.

4.7 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

As cirurgias foram realizadas no Laboratório de Cirurgia Experimental do Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Vale do Itajaí (Figura 11).

Fig. 11: Instalações do Laboratório de Cirurgia Experimental do Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Vale do Itajaí.
Fonte: Dados da Pesquisa (2009).

Todas as etapas dos procedimentos anestésicos foram supervisionados por um Médico Veterinário[1], que acompanhou o pré, trans e pós-operatório dos animais.

[1] Médico Veterinário: Dr. Marcel Frajblat.

Anestesia foi obtida por meio de uma associação de drogas: solução cloridrato de xilazina a 2% e cloridrato de zolazepam (125mg) com cloridrato de tiletamina (125mg). O primeiro, caracteriza-se por ser miorrelaxante e analgésico. Já o segundo, trata-se de um agente anestésico dissociativo capaz de atuar sobre o córtex cerebral seletivamente, causando analgesia e perda da consciência. A associação destas duas drogas possui uma ação complementar, e geralmente proporciona uma anestesia efetiva para procedimentos cirúrgicos de estímulos moderados (LIPMAN; MARINI; FLECKNELL, 1994).

As drogas anteriormente citadas foram administradas por injeções intramusculares de: Kensol® na dose de 2 mg/kg de peso e Zoletil®, na dose de 5 mg/kg de peso, nesta sequência, com um tempo médio de indução anestésica de 5 minutos ± 1 minuto.

Foi realizada a administração parenteral de Benzilpenicilina Benzatina 600.000 UI por via intramuscular, de uma dose de 60.000 Unidades Internacionais por quilograma de peso, como medida profilática (GILLETT, 1994).

A punção da veia auricular marginal era procedida com a utilização de um jelco pediátrico de número 24 e equipamento de Soro Fisiológico a 0,9% era adequadamente montado (Figura 12), para que pudesse ser estabelecido um acesso para veiculação de volume intra-vascular através de Soro Fisiológico 0,9%, tendo em vista a retirada de 10ml de sangue do animal para a preparação do PRP (conforme anteriormente detalhadamente descrita), e assim evitar possíveis alterações hemodinâmicas .

Fig. 12: Animal preparado no pré-operatório já sob anestesia geral.
Fonte: Dados da Pesquisa (2009).

A região superior da cabeça de cada espécime foi tricotomizada (Figura 13) utilizando-se para tal barbeador elétrico juntamente com a tricotomia da orelha para exposição adequada da artéria e veia auricular (Figura 14).

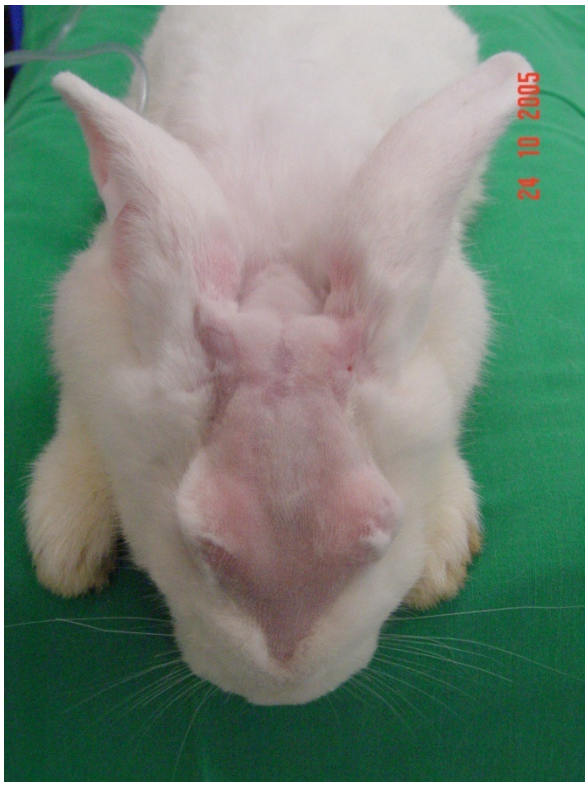


Fig. 13: Tricotomia da cabeça do animal para facilitar o acesso cirúrgico.
Fonte: Dados da Pesquisa (2009).

Fig. 14: Tricotomia auricular expondo a artéria auricular.
Fonte: Dados da Pesquisa (2009).

Durante os preparos pré-operatórios do animal então a mesa cirúrgica era devidamente preparada (Figura 15).

Fig. 15: Preparo da mesa cirúrgica.
Fonte: Dados da Pesquisa (2009).

A seguir, realizou-se a antissepsia com gluconato de clorhexedina a 4% (Figura 16) e campos cirúrgicos estéreis foram posicionados para isolar o campo operatório.

Fig. 16: Anti-sepsia da cabeça do animal antes do acesso cirúrgico.
Fonte: Dados da Pesquisa (2009).

Na região a ser incisada, procedeu-se uma infiltração local de lidocaina a 2% com epinefrina na concentração de 1:100.000 no espaço subcutâneo (Figura 17) na dose de 9 mg/kg de peso (MASSONE, 1999).

Fig. 17: Infiltração com anestésico local na área a ser incisada.
Fonte: Dados da Pesquisa (2009).

Uma incisão única, linear e em espessura total foi posicionada do lado esquerdo da cabeça do espécime, num plano parassagital, ou seja, lateral à linha média da superfície externa do crânio (Figura 18). Para tal, utilizou-se um cabo de bisturi n°3 e lâmina de bisturi descartável n°15.

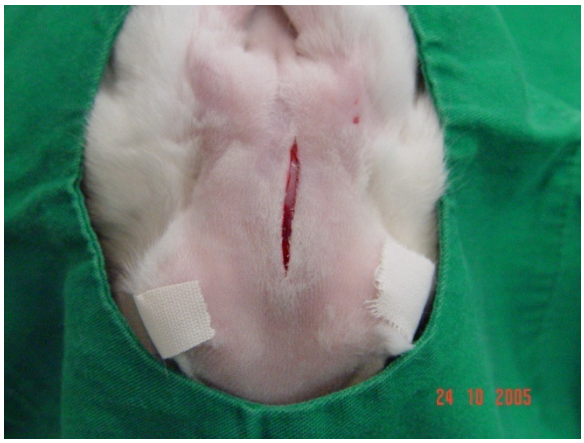


Fig. 18: Incisão em espessura total.
Fonte: Dados da Pesquisa (2009).

O periósteo foi cuidadosamente descolado e rebatido, utilizando-se descoladores do tipo Molt e Freer. Para manter as bordas devidamente afastadas foram utilizados pinças hemostáticas delicadas. Estes reparos foram posicionados de forma a tracionar os tecidos moles, expondo a superfície óssea da cortical externa do crânio dos espécimes, permitindo a visualização adequada (Figura 19).

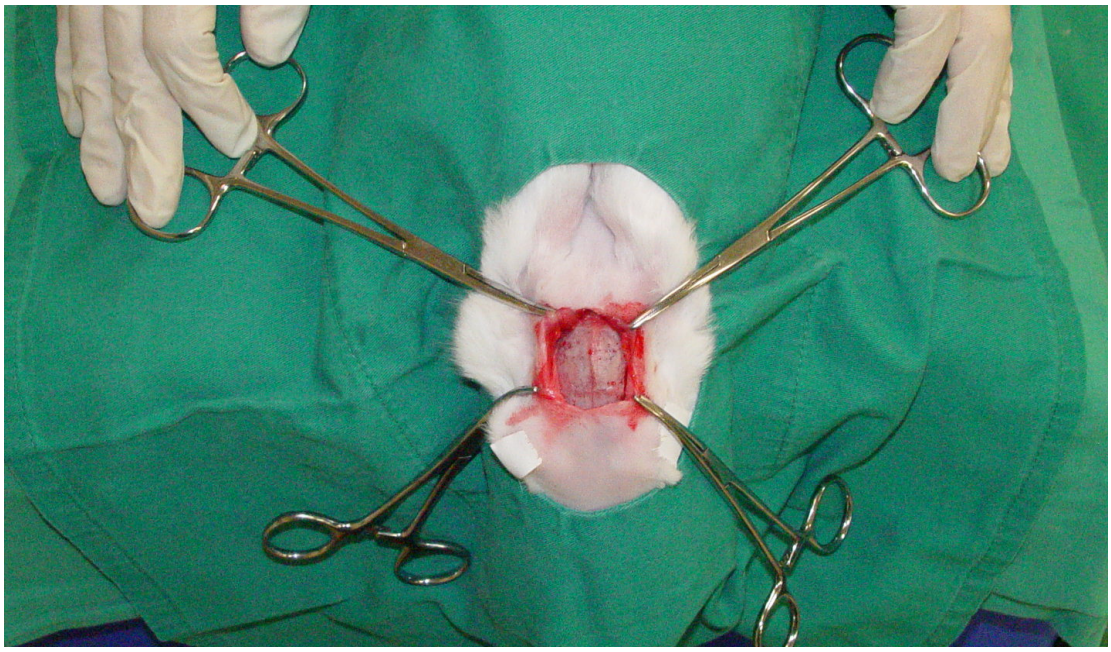


Fig. 19: Afastamento cirúrgico expondo os ossos cranianos frontal, parietal e occipital.
Fonte: Dados da Pesquisa (2009).

Foram confeccionadas 05 lojas cirúrgicas de 05 mm de diâmetro por aproximadamente 02 mm de profundidade (para respeitarmos a cortical interna do crânio do coelho), uma no osso frontal, uma em cada osso parietal e uma em cada osso occipital; para isto foi utilizado motor elétrico em baixa rotação (1500 rpm), contra-ângulo de implante com redução de 16:1 e broca trefina com o diâmetro acima mencionado e marcação de 01mm de profundidade (Figuras 20 e 21).

Fig. 20: Motor Elétrico e Contra-Ângulo, utilizados para confecção das lojas cirúrgicas.
Fonte: Dados da Pesquisa (2009).

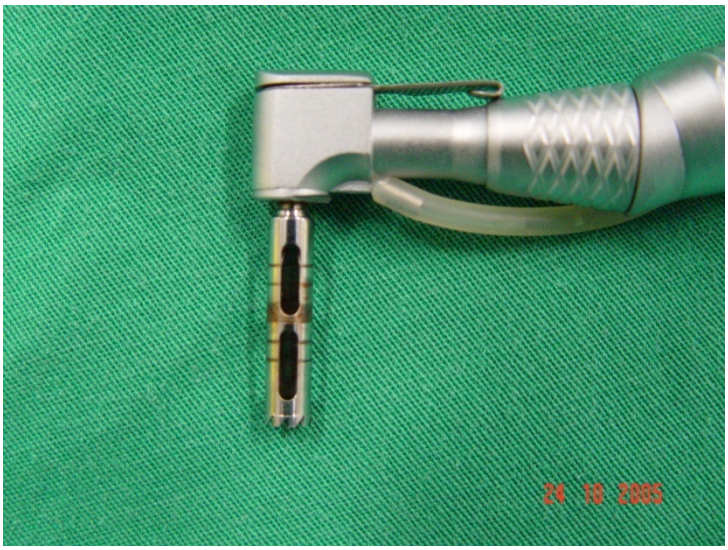


Fig. 21: Evidenciação da utilização de broca trefina montada em contra-ângulo de implante 16:1.
Fonte: Dados da Pesquisa (2009).

Durante as perfurações foi utilizada irrigação abundante com soro fisiológico a 0,9% e aspiração concomitante.

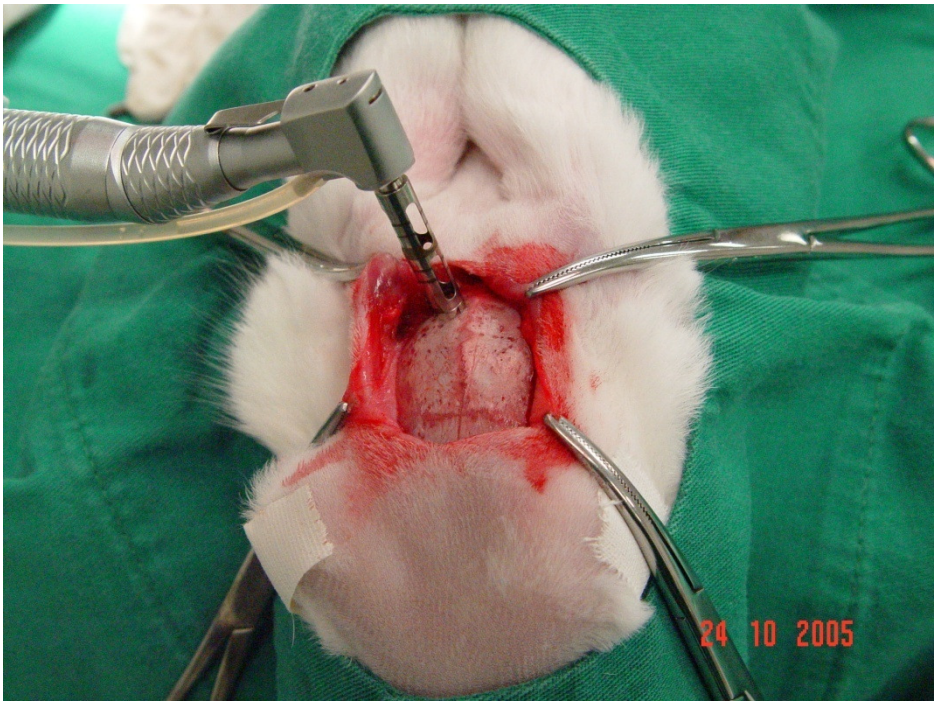


Fig. 22: Preparação para confecção das lojas cirúrgicas.
Fonte: Dados da Pesquisa (2009).

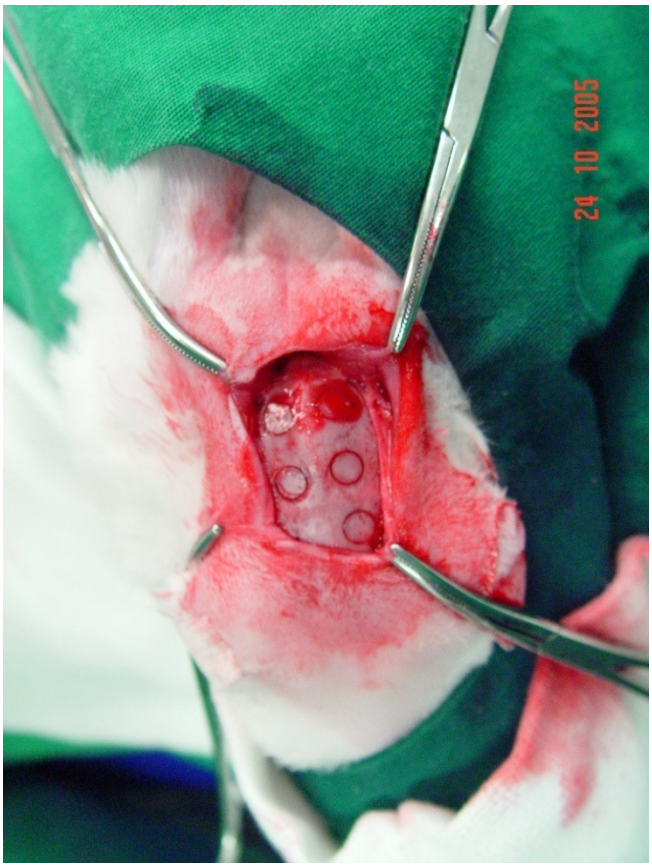


Fig. 23: Aspecto trans-operatório do acesso cirúrgico e osteotomia.
Fonte: Dados da Pesquisa (2009).

O osso obtido durante a confecção das lojas cirúrgicas (cortical externa da calvária do coelho) (Figuras. 22 e 23) foi particulado (Figura 24) com o uso de um osteótomo biarticulado tipo Byer (Figura 25), e utilizado como material de enxerto, sendo que para duas lojas cirúrgicas o osso era aglutinado a um dos tipos de PRP em estudo, que a este momento do ato cirúrgico já estava devidamente preparado para o uso.

No PRP o tempo ideal ainda não foi adequadamente determinado e para Sonnleitner et al. (2000) e Obarrio et al. (2000) o ideal é que a centrifugação sangüínea ocorra no trans-operatório, para que o concentrado seja utilizado imediatamente, devido à possibilidade de os grânulos plaquetários liberarem os fatores de crescimento e eles serem perdidos antes de entrarem em contato com o leito cirúrgico, porém Drugrillon et al. (2002) fazem referência a um prazo de 6 horas para sua utilização.

Fig. 24: Osso coletado após ter sido particulado com Osteótomo de Byer.
Fonte: Dados da Pesquisa (2009).

Fig. 25: Osteótomo de Byer utilizado para particular o osso autógeno coletado na criação das lojas cirúrgicas.
Fonte: Dados da Pesquisa (2009).

Cada loja cirúrgica confeccionada recebeu um tratamento (Figura. 26):

- Loja 1: somente coágulo sangüíneo (controle negativo);
- Loja 2: somente osso autógeno particulado (controle positivo);
- Loja 3: PRP obtido a 160G associado a osso autógeno particulado;
- Loja 4: PRP obtido a 560G associado a osso autógeno particulado;

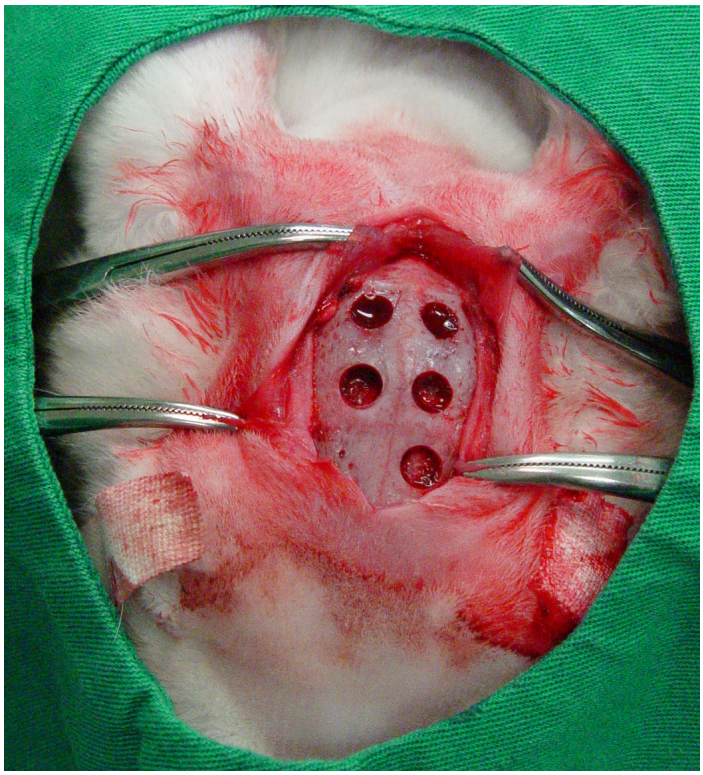


Fig. 26: Lojas cirúrgicas depois de adequada preparação; observar que a cortical interna do crânio foi respeitada.
Fonte: Dados da Pesquisa (2009).

Percebe-se nas figuras 26 e 30 que foram confeccionadas 5 lojas cirúrgicas com intuito de se obter maior volume de material de enxerto, porém somente 4 cavidades serão utilizadas neste experimento conforme indicação das setas na figura 30 e no quadro abaixo.

	LADO ESQUERDO	LADO DIREITO
CAVIDADE POSTERIOR	Osso Autógeno Particulado	PRP 560G + Osso Autógeno Particulado
CAVIDADE ANTERIOR	PRP 160G + Osso Autógeno Particulado	Coágulo Sangüíneo

Quadro 2 – Distribuição das cavidades de acordo com a colocação dos materiais de enxerto.
Fonte: Dados da Pesquisa (2009).

Para instalação dos enxertos particulados aglutinados ao PRP (Figuras 27 e 28), ainda se fez necessário a ativação do componente, com Cloreto de Cálcio a 10%, na proporção de 0,1 ml do ativador para 1ml de PRP; passados aproximadamente 10 minutos a mistura toma uma consistência gelatinosa (Figuras 28 e 29) e está pronta para ser levada a loja cirúrgica.

Fig. 27: Aspecto trans-operatório do PRP antes da ativação.
Fonte: Dados da Pesquisa (2009).

Fig. 28: PRP mais osso autógeno já em ativação; perceber a consistência gelatinosa.
Fonte: Dados da Pesquisa (2009).

Os enxertos foram acomodados nas perfurações com a utilização de descolador de Molt através de seu lado convexo (Figuras 29 e 30).

Fig. 29: Uso de Descolador de molt para acomodação dos materiais de enxerto; observar a consistência gelatinosa do osso autógeno particulado associado ao PRP.
Fonte: Dados da Pesquisa (2009).

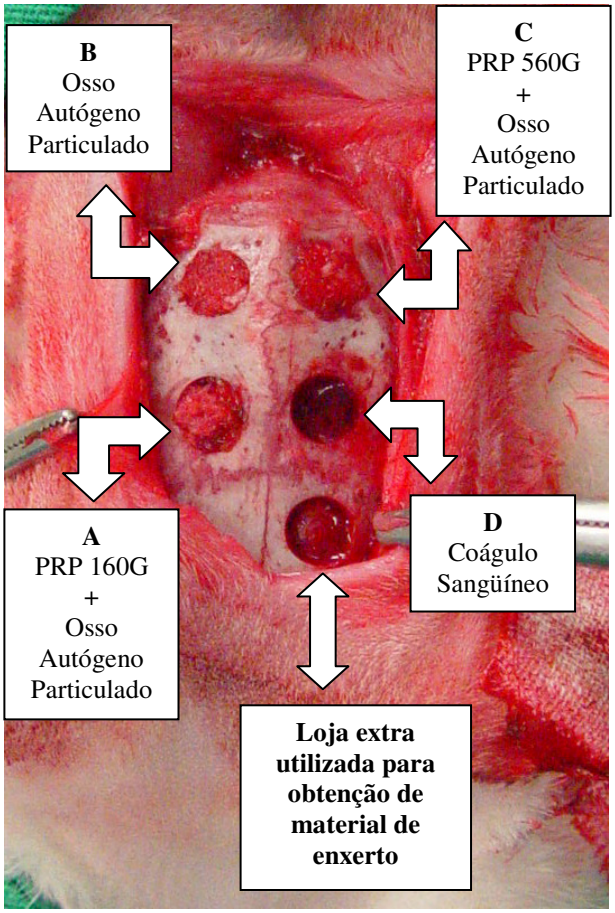


Fig. 30: Enxertos posicionados. A – PRP 160G + Osso Autógeno Particulado, B – Ósso Autógeno Particulado, C - PRP 560G + Osso Autógeno Particulado, D – Coágulo Sangüíneo.
Fonte: Dados da Pesquisa (2009).

Após cuidadosa reposição dos tecidos a sutura foi realizada em pontos contínuos ancorados (Figura 31). O fio utilizado foi monofilamentar de nylon preto (4-0), de 45 cm de comprimento, montado em agulha atraumática semicircular de 1,5 cm de comprimento e seção triangular. Para auxiliar a preensão dos tecidos, foi utilizada uma pinça dentada tipo Adson.

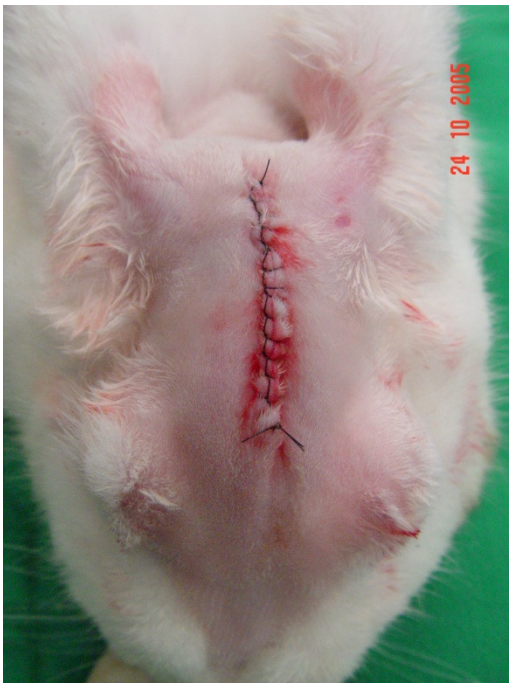


Fig. 31: Aspecto trans-operatório da sutura do tipo contínua ancorada.
Fonte: Dados da Pesquisa (2009).

Durante o pós-operatório imediato foi administrado, de forma endovenosa junto ao soro fisiológico, o antiinflamatório cetoprofeno a 10% (Ketofen®) na dose de 3 mg/Kg de peso corporal.

4.8 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS PEÇAS

Os animais foram sacrificadas com 15, 30 e 45 dias de pós-operatório utilizando-se câmara de CO2 (SOUZA, 1996).

Os intervalos escolhidos como tempo de sacrifício foi embasado no estudo de Roberts e Garetto (2000) que caracterizaram os estágios iniciais da cicatrização Peri-implantar em coelhos descrevendo que: Com duas semanas de cicatrização, um retículo inicial de osso trançado envolve a superfície do implante. Em seguida, (2) com seis semanas ele fica suficientemente compactado, estando apto a receber cargas. O terceiro estágio, a remodelação (3) acontece nos coelhos de duas a seis semanas e o último estágio (4) é a maturação observada de 06 a 18 semanas. Os autores afirmam que não existe nenhum dado quantitativo em relação ao processo inicial de cicatrização em humanos, e que desta forma eles são extrapolados como se observa no quadro a seguir:

Estágio	Coelhos	Humanos (3x)
(1) retículo ósseo inicial trançado	2 semanas	6 semanas
(2) compactação	6 semanas	18 semanas
(3) remodelagem	6 semanas	18 semanas
(4) maturação	18 semanas	54 semanas

Quadro 03 - Modificações ósseas observadas na interface osso/implante. Comparação entre coelhos e humanos.
Fonte: Roberts e Garetto, 2000.

Constatada a morte dos animais realizou-se o mesmo acesso cirúrgico, anteriormente descrito para o procedimento cirúrgico, a calota craniana e a retirada das loja cirúrgicas foi feita com auxilio de um motor elétrico em baixa rotação (1500 rpm), contra-ângulo de implante com redução de 16:1 e broca trefina com o diâmetro de 10 mm.

As peças foram colocadas em vidros previamente preparados e etiquetados, contendo solução de formalina tamponada a 10%. Após a fixação por um período de 48 horas, as peças foram encaminhadas ao Laboratório de Histologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Vale do Itajaí e submetidas à descalcificação por solução de ácido nítrico aquoso a 5%.

Realizou-se o processamento histológico de rotina para confecção das lâminas, sendo incluídas em parafina, divididas em secções com 6 µm de espessura e coradas com hematoxilina e eosina (HE).

Os cortes histológicos foram orientados de forma padronizada para que abrangessem a região mais central da cavidade, veja diagrama a seguir que ilustra os procedimentos técnicos realizados:

A partir do centro da lesão foi realizada a obtenção de 4 secções seriadas das quais se escolheu a melhor lâmina para análise.

A seguir a figura 32 apresenta uma seqüencia esquemática e completa do momento cirúrgico até a obtenção das lâminas histológicas.

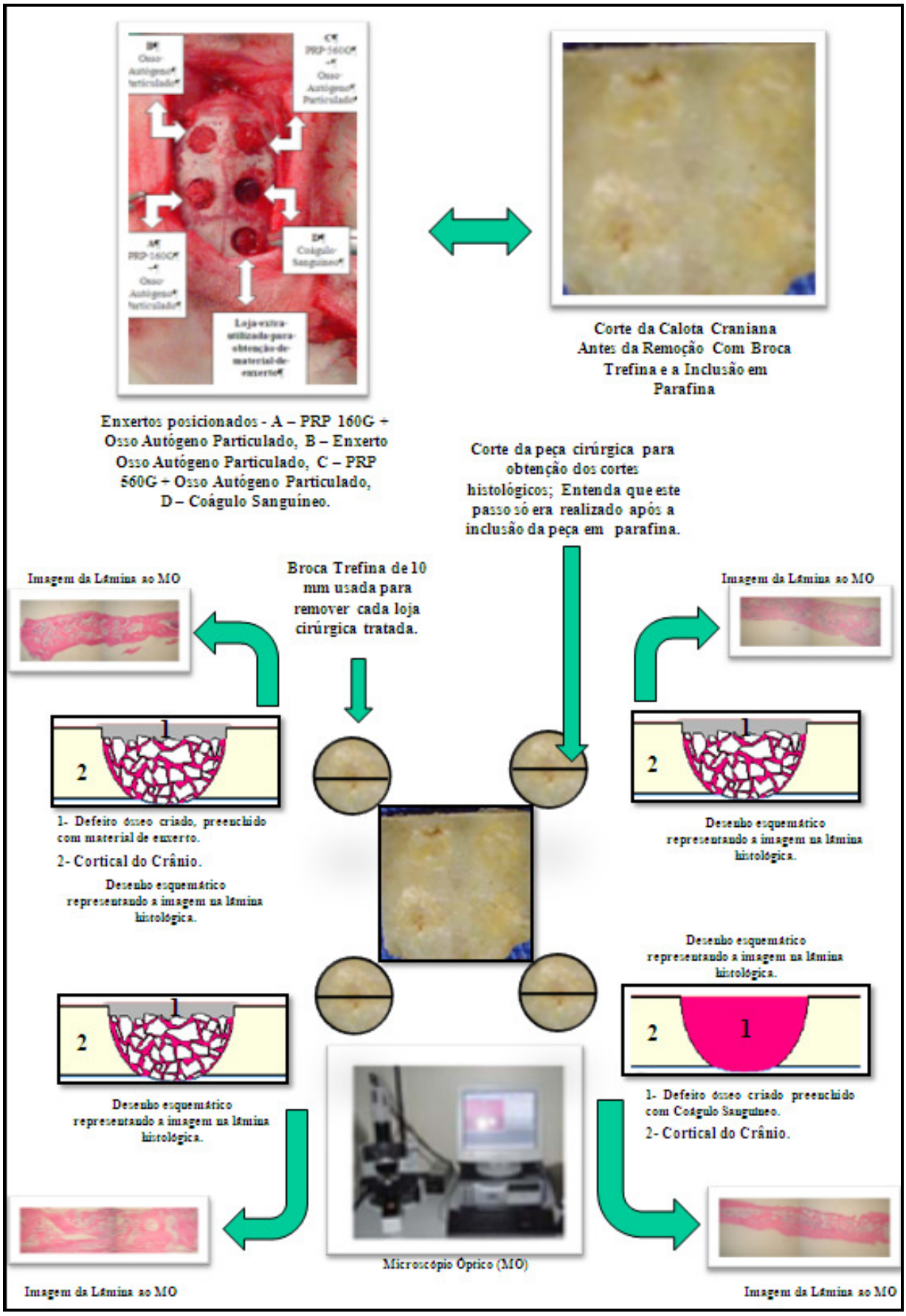


Fig. 32: Resumo Esquemático do Processo de Obtenção das Lâminas para Análise Microscópicas.
Fonte: Dados da Pesquisa (2009).

4.9 CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO E ESTUDO MICROSCÓPICO

O estudo microscópico foi baseado na mensuração da proporção de osso cortical presente dentro do interior das quatro perfurações ósseas. A análise histológica e histomorfométrica foram realizadas através do sistema de processamento e análise de imagem que consistia de:

a) Microscópio Óptico marca Olympus BX 50

b) Câmera Capturadora de Imagem marca Olympus, modelo DXC 107A

c) Microcomputador Compaq com Processador Pentium 4, 128 de RAM

d) Software Image Pro-Plus 4.5.1

De cada lâmina a área selecionada para análise ficava circunscrita ao campo de captura da imagem. A imagem no microscópio, com aumento de 40X era capturada pela câmara de vídeo e transportada para a tela do computador.

Após a aquisição da imagem, realizou-se, com o auxílio do mouse, a delimitação do contorno das regiões desejadas (osso cortical presente dentro do defeito ósseo criado), e o valor dessas áreas, em μm^2, foi quantificado pelo software (Apêndice A). Foi quantificada também a área inicial de cada defeito (Apêndice B) para que pudéssemos obter a proporção de osso neoformado:

$$\textbf{Proporção de Osso Neoformado} = \frac{\textbf{Área de Osso Cortical Presente Dentro do Defeito Ósseo}}{\textbf{Área Total do Defeito}}$$

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos dados obtidos, construiu-se um modelo de *Análise de Variância* (ANOVA), sendo comparados os três grupos (períodos) e materiais utilizados em relação à variável proporção de osso neoformado. Como teste complementar a ANOVA foi utilizado o *Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni,* avaliando quais as médias que variavam de forma estatísticamente significante entre si.

Para a realização do teste estatístico, utilizou-se o software SPSS 11.0 for Windows, tendo-se adotado como nível de significância 0.05 ($p \leq 0.05$).

5 RESULTADOS

Os resultados das contagens plaquetárias média no sangue (hemograma pré-operatório) e nos plasma rico em plaquetas foram (Grafico 1):

- 353.370,00 / mm^3 - Plaquetas no sangue total pré-operatório.

- 984.208,00 / mm^3 - Plaquetas no PRP obtido a 160G.

- 733.583,00 / mm^3 - Plaquetas no PRP obtido a 560G.

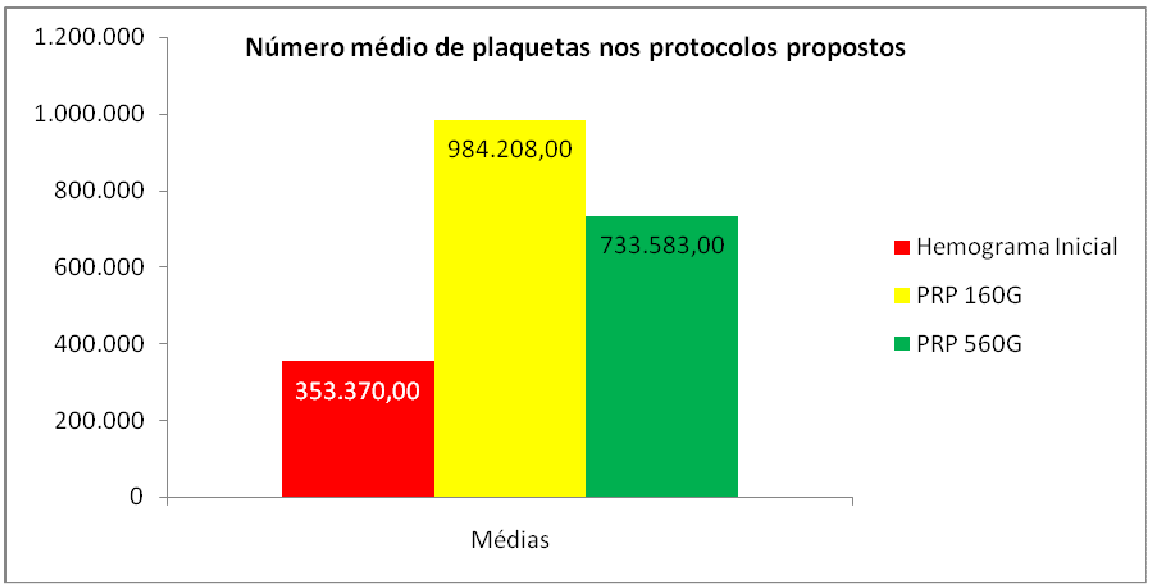


Gráfico 1. Contagem plaquetária média no Hemograma Inicial, PRP a 160G e PRP a 560G.
Fonte: Dados da Pesquisa (2009).

A tabela 1 mostra as médias das proporções de osso neoformado, desvio padrão e intervalos de confiança de cada material de preenchimento dentro de cada grupo formando os subgrupos.

Na comparação das médias de proporção de tecido ósseo neoformado, verificou-se que o grupo 01 (15 dias) mostrou menores médias estatisticamente significantes de formação de tecido ósseo em relação ao grupo 02 e 03 (30 dias e 45 dias, respectivamente).

Na comparação das médias de proporção de tecido ósseo neoformado dos subgrupos do grupo 01 - o PRP 160G + osso autógeno particulado mostrou-se estatiticamente semelhante ao PRP 560G + osso autógeno particulado e ambos

foram estatisticamente melhores do que o osso autógeno particulado e o coágulo sangüíneo.

Para o grupo 02 (30 dias), verificou-se que os seus valores das médias da proporção de tecido ósseo neoformado não apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação aos do grupo 03 (45 dias).

Na comparação das médias de proporção de tecido ósseo neoformado dos subgrupos do grupo 02 - o PRP 160G + osso autógeno particulado se mostrou estatisticamente semelhante ao PRP 560G + osso autógeno particulado, assim como também, estatísticamente semelhante ao osso autógeno particulado, e todos foram maiores e estatisticamente significantes em relação ao coágulo sangüíneo.

Para o grupo 03 (45 dias), verificou-se que os seus valores das médias da proporção de tecido ósseo neoformado não apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo 02 (30 dias) e se mostraram maiores e estatisticamente significantes em relação ao grupo 01 (15 dias).

Na comparação das médias de proporção de tecido ósseo neoformado dos subgrupos do grupo 03 - não houve diferenças estatisticamente significantes entre o PRP 160G + osso autógeno particulado, PRP 560G + osso autógeno particulado, osso autógeno particulado e coágulo sangüíneo

Em todos os grupos durante o desenvolvimento da cicatrização óssea, houve uma neoformação óssea da cortical externa da calvária em espessuras variáveis e mostrando discreta depressão em relação às corticais externas laterais preservadas, como um sinal histomorfológico da velocidade do tecido epitelial ser maior que a velocidade da cicatrização óssea.

Tabela 1. Média das proporções de tecido ósseo neoformado com diferentes materiais nos diferentes intervalos de tempo.

Grupo	Média ± desvio-padrão	Intervalo de Confiança de 95%	Número de amostras	Valor – p*
Grupo 1				**0,006#**
PRP 160G + Osso Autógeno Particulado	0,37 ± 0,14	0,23 – 0,46	08	
PRP 560G + Osso Autógeno Particulado	0,37± 0,15	0,21 – 0,39	08	
Osso Autógeno Particulado	0,28 ± 0,15	0,11 – 0,37	08	
Coágulo Sangüíneo	0,18 ± 0,11	0,08 – 0,34	08	
Grupo 2				**0,1**
PRP 160G + Osso Autógeno Particulado	0,40 ± 0,17	0,26 – 0,54	08	
PRP 560G + Osso Autógeno Particulado	0,39± 0,13	0,27 – 0,53	08	
Osso Autógeno Particulado	0,39 ± 0,17	0,27 – 0,50	08	
Coágulo Sangüíneo	0,30 ± 0,16	0,11 – 0,45	08	
Grupo 3				**0,3**
PRP 160G + Osso Autógeno Particulado	0,41 ± 0,12	0,25 – 0,53	08	
PRP 560G + Osso Autógeno Particulado	0,39± 0,15	0,27 – 0,55	08	
Osso Autógeno Particulado	0,40 ± 0,15	0,27 – 0,52	08	
Coágulo Sangüíneo	0,40 ± 0,16	0,29 – 0,57	08	

*teste ANOVA (p≤0,05)
Estatisticamente Significante

Fonte: Dados da pesquisa (2009).

Os resultados apresentados no gráfico 2 expressam as médias das proporções de tecido ósseo neoformado, com os três materiais de preenchimento e mais o controle coágulo sangüíneo, nos 3 diferentes grupos do experimento.

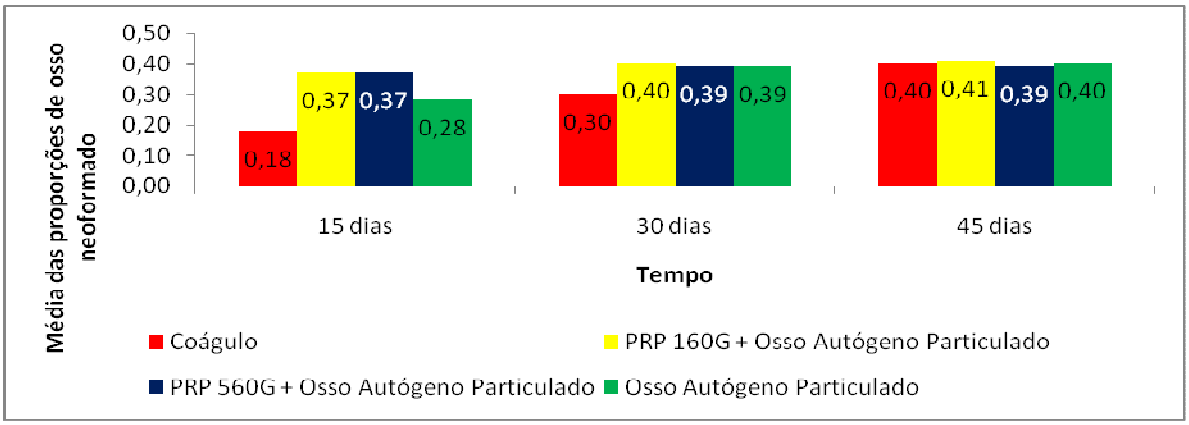


Gráfico 2. Comparação das médias das proporções de tecido ósseo neoformado, com diferentes materiais de preenchimento nos 3 grupos,15, 30 e 45 dias respectivamente.
Fonte: Dados da pesquisa (2009).

5.1 ANÁLISE MICROSCÓPICA E DESCRIÇÃO HISTOLÓGICA

As figuras de números 33 a 44 mostram as fotografias das lâminas histológicas de seu subgrupo. A seguir uma descrição histológica de cada uma das figuras que representam o seu subgrupo.

5.1.1 GRUPO 01 (15 DIAS)

5.1.1.1 Coágulo

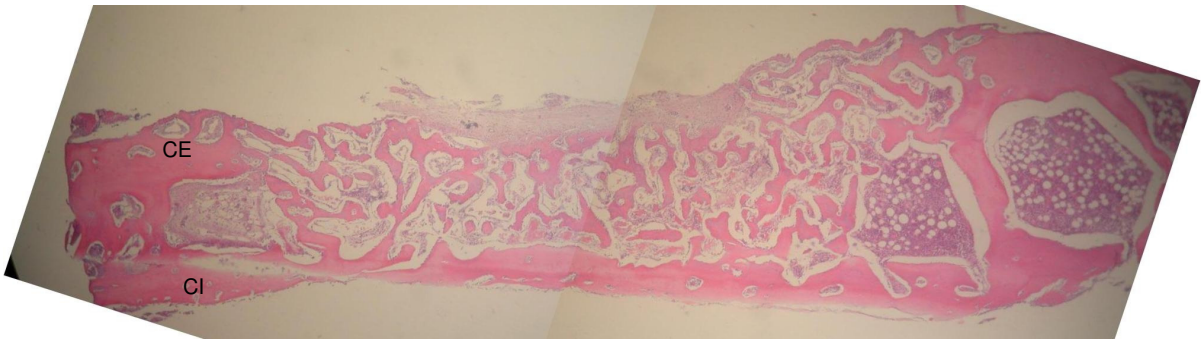


Fig. 33: Amostra histológica da perfuração preenchida por coágulo aos 15 dias. Coloração HE (40X).
Fonte: Dados da pesquisa (2009).

O defeito ósseo apresenta-se nítido, com o rompimento completo da díploe. Há tecido ósseo em neoformação em todas as áreas do defeito cirúrgico, nas margens, na região central e nas corticais interna (CI) ou externa (CE).

Há formação de um tecido conjuntivo desorganizado permeando as áreas de neoformação óssea que preenche a cavidade cirúrgica.

5.1.1.2 Osso Autógeno Particulado

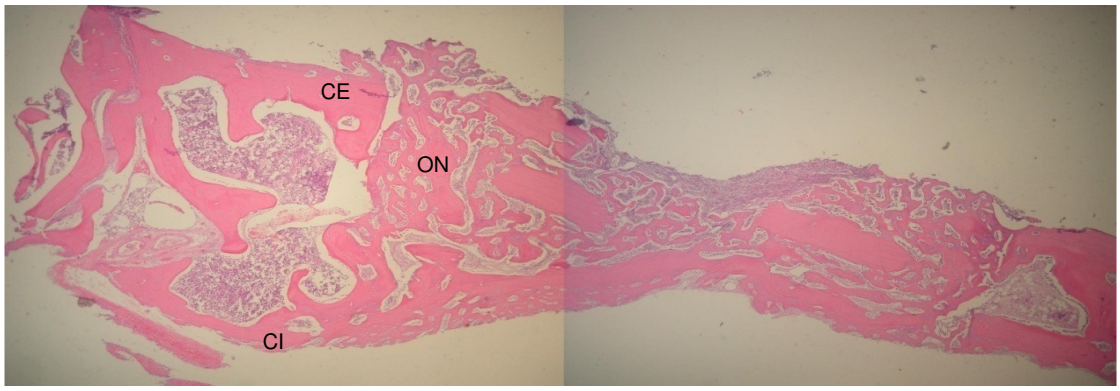


Fig. 34: Amostra histológica da perfuração preenchida por Osso Autógeno Particulado aos 15 dias.Coloração HE (40X).
Fonte: Dados da pesquisa (2009).

O defeito ósseo apresenta-se nítido, com o rompimento completo da díploe. Há tecido ósseo em neoformação (ON) massociado aos fragmentos do enxerto ósseo em todas as áreas do defeito cirúrgico, nas margens, na região central e nas corticais interna (CI) ou externa (CE).

Formação de tecido conjuntivo desorganizado permeando as áreas de neoformação óssea ao redor dos fragmentos do enxerto ósseo que preenche a cavidade cirúrgica. Observa-se que o tecido ósseo em neoformação apresenta-se mais compactado e nesta figura evidenciam-se dois grandes fragmentos de enxerto ósseo já com ligações a todas as outras áreas de neoformação óssea.

5.1.1.3 PRP 160G + Osso Autógeno Particulado

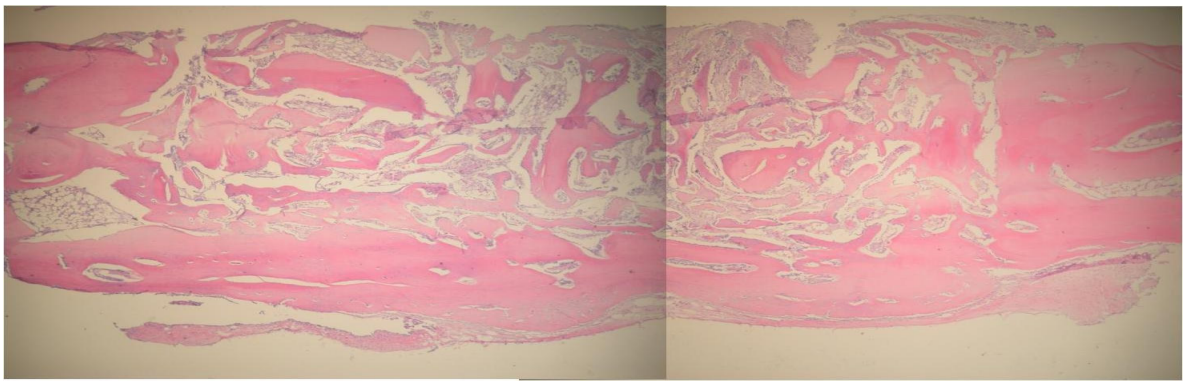


Fig. 35: Amostra histológica da perfuração preenchida por PRP 160G + Osso Autógeno Particulado aos 15 dias. Coloração HE (40X).
Fonte: Dados da pesquisa (2009).

O defeito ósseo apresenta-se nítido, com o rompimento completo da díploe. Há tecido ósseo em neoformação associado aos fragmentos do enxerto ósseo em todas as áreas do defeito cirúrgico, nas margens, na região central e nas corticais interna ou externa.

Há formação de tecido conjuntivo desorganizado permeando as áreas de neoformação óssea ao redor dos fragmentos do enxerto ósseo que preenche a cavidade cirúrgica.

5.1.1.4 PRP 560G + Osso Autógeno Particulado

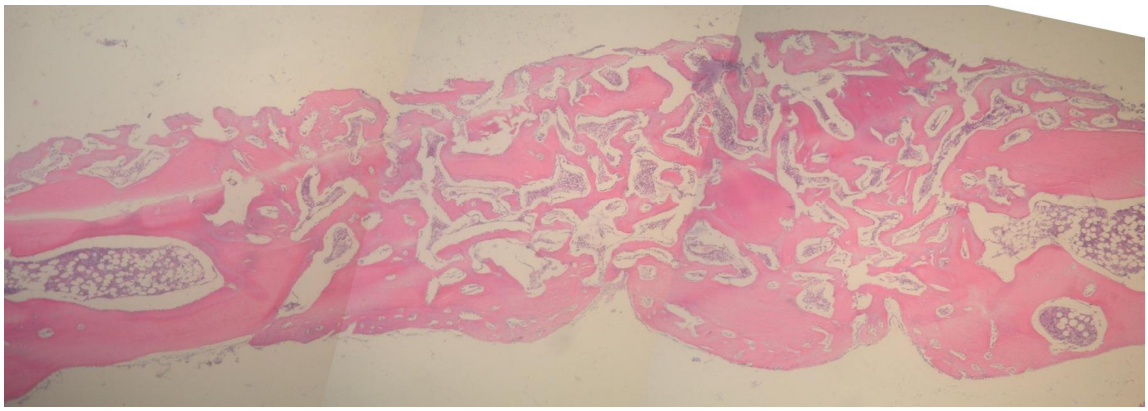


Fig. 36: Amostra histológica da perfuração preenchida por PRP 560G + Osso Autógeno Particulado aos 15 dias. Coloração HE (40X).
Fonte: Dados da pesquisa (2009).

O defeito ósseo apresenta-se nítido, com o rompimento completo da díploe. Há tecido ósseo em neoformação associado aos fragmentos do enxerto ósseo em todas as áreas do defeito cirúrgico, nas margens, na região central e nas corticais interna ou externa.

Há formação de tecido conjuntivo desorganizado permeando as áreas de neoformação óssea ao redor dos fragmentos do enxerto ósseo que preenche a cavidade cirúrgica.

5.1.2 GRUPO 02 (30 DIAS)

5.1.2.1 Coágulo

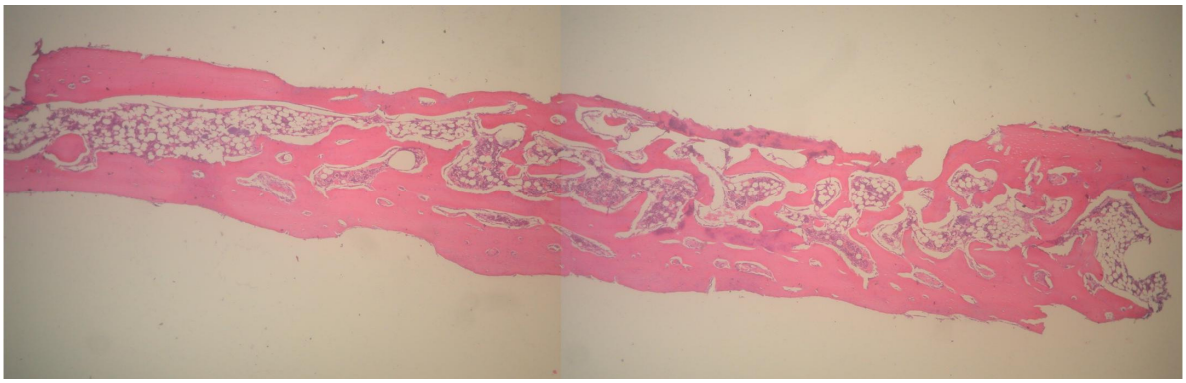


Fig. 37: Amostra histológica da perfuração preenchida por coágulo aos 30 dias. Coloração HE (40X).
Fonte: Dados da pesquisa (2009).

Discretas áreas de tecido conjuntivo organizado. Áreas de formação de tecido ósseo medular permeado por áreas de tecido ósseo compacto, sugerindo uma estrutura óssea em remodelamento.

Toda a cavidade óssea apresenta formação de osso nas margens, na região central e nas corticais interna e externa.

5.1.2.2 Osso Autógeno Particulado

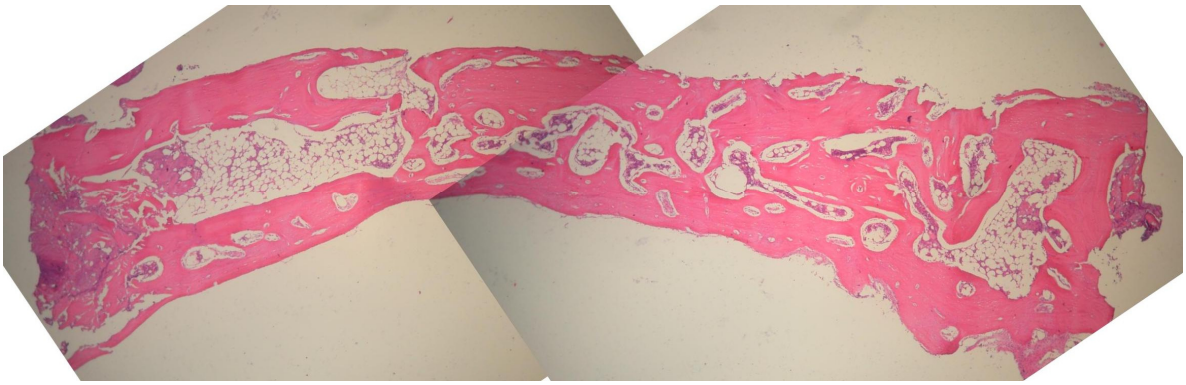


Fig. 38: Amostra histológica da perfuração preenchida por Osso Autógeno Particulado aos 30 dias. Coloração HE (40X).
Fonte: Dados da pesquisa (2009).

Áreas de formação de tecido ósseo medular permeado por áreas maiores de tecido ósseo compacto, sugerindo uma estrutura óssea em remodelamento e com grau de maturidade histológica superior ao coágulo sangüíneo.

Toda a cavidade óssea apresenta formação de osso nas margens, na região central e nas corticais interna e externa.

5.1.2.3 PRP 160G + Osso Autógeno Particulado

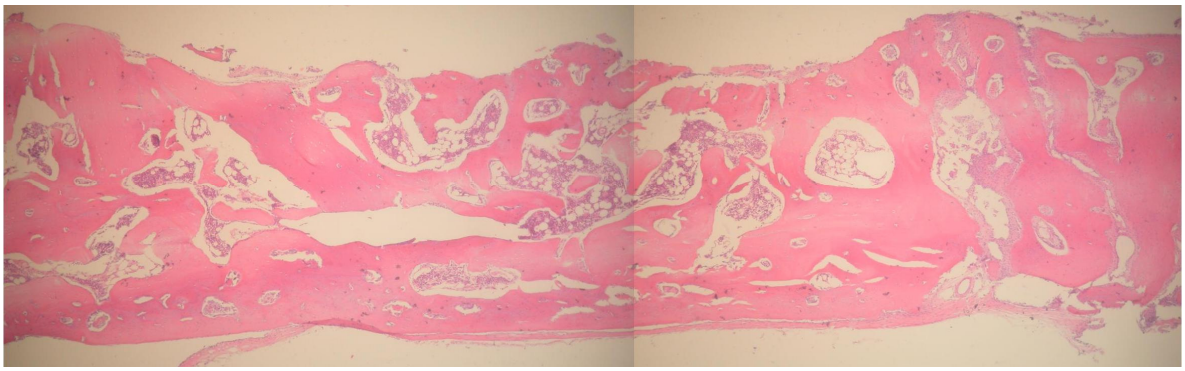


Fig. 39: Amostra histológica da perfuração preenchida por PRP 160G + Osso Autógeno Particulado aos 30 dias. Coloração HE (40X).
Fonte: Dados da pesquisa (2009).

Áreas de formação de tecido ósseo medular permeado por áreas maiores de tecido ósseo compacto, sugerindo uma estrutura óssea em remodelamento e com grau de maturidade histológica superior ao coágulo sangüíneo.

Toda a cavidade óssea apresenta formação de osso nas margens, na região central e nas corticais interna e externa.

5.1.2.4 PRP 560G + Osso Autógeno Particulado

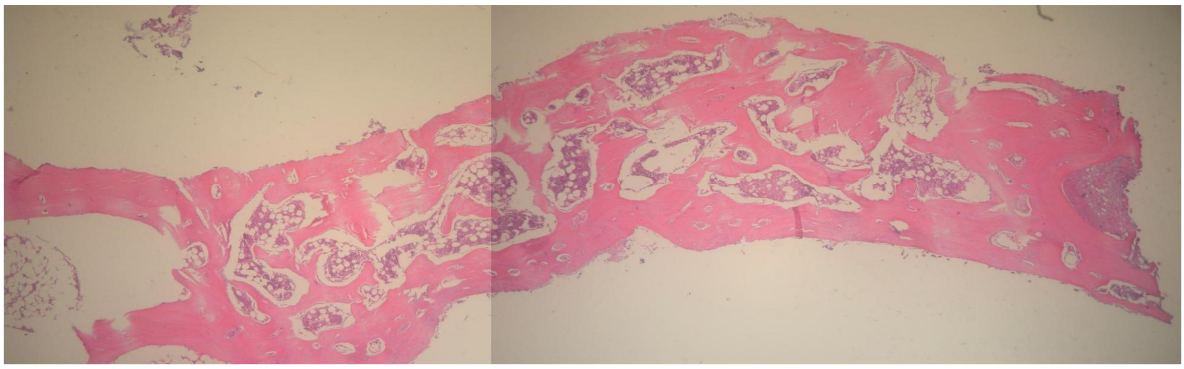


Fig.40: Amostra histológica da perfuração preenchida por PRP 560G + Osso Autógeno Particulado aos 30 dias. Coloração HE (40X).
Fonte: Dados da pesquisa (2009).

Áreas de formação de tecido ósseo medular permeado por áreas maiores de tecido ósseo compacto, sugerindo uma estrutura óssea em remodelamento e com grau de maturidade histológica superior ao coágulo sangüíneo.

Toda a cavidade óssea apresenta formação de osso nas margens, na região central e nas corticais interna e externa.

5.1.3 GRUPO 03 (45 DIAS)

5.1.3.1 Coágulo

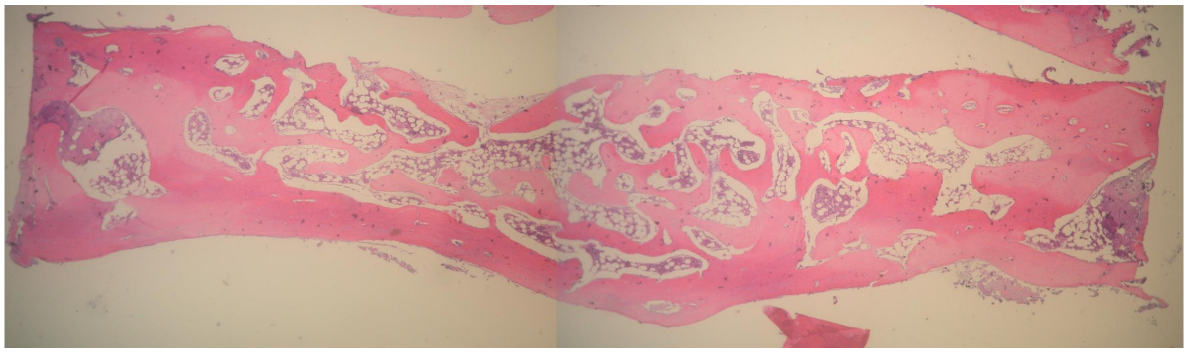


Fig. 41: Amostra histológica da perfuração preenchida por coágulo aos 45 dias. Coloração HE (40X). Fonte: Dados da pesquisa (2009).

Áreas de formação de tecido ósseo medular permeado por áreas de tecido ósseo compacto, com arquitetura óssea histológica que sugere um completo processo de cicatrização do tecido ósseo.

Toda a cavidade óssea apresenta formação de osso nas margens, na região central e nas corticais interna e externa.

5.1.3.2 Osso Autógeno Particulado

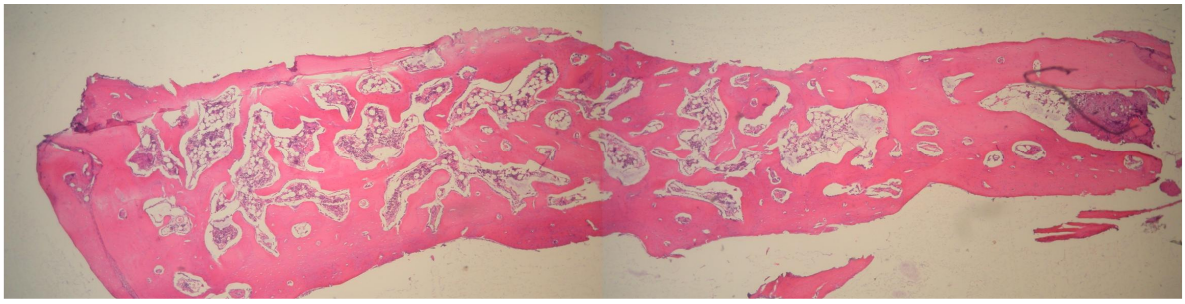


Fig. 42: Amostra histológica da perfuração preenchida por Osso Autógeno Particulado aos 45 dias. Coloração HE (40X).
Fonte: Dados da pesquisa (2009).

Áreas de formação de tecido ósseo medular permeado por áreas de tecido ósseo compacto, com arquitetura óssea histológica que sugere um completo processo de cicatrização do tecido ósseo.

Toda a cavidade óssea apresenta formação de osso nas margens, na região central e nas corticais interna e externa.

5.1.3.3 PRP 160G + Osso Autógeno Particulado

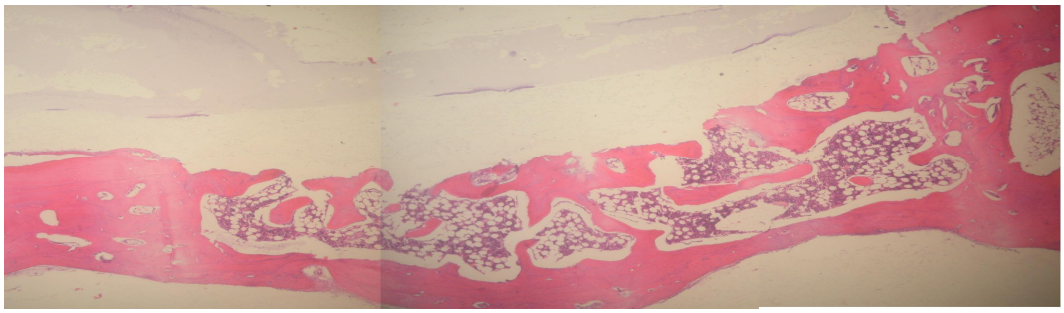


Fig. 43: Amostra histológica da perfuração preenchida por PRP 160G + Osso Autógeno Particulado aos 45 dias. Coloração HE (40X).
Fonte: Dados da pesquisa (2009).

Áreas de formação de tecido ósseo medular permeado por áreas de tecido ósseo compacto, com arquitetura óssea histológica que sugere um completo processo de cicatrização do tecido ósseo.

Toda a cavidade óssea apresenta formação de osso nas margens, na região central e nas corticais interna e externa.

5.1.3.4 PRP 560G + Osso Autógeno Particulado

Fig. 44: Amostra histológica da perfuração preenchida por PRP 560G + Osso Autógeno Particulado aos 45 dias. Coloração HE (40X).
Fonte: Dados da pesquisa (2009).

Áreas de formação de tecido ósseo medular permeado por áreas de tecido ósseo compacto, com arquitetura óssea histológica que sugere um completo processo de cicatrização do tecido ósseo.

Toda a cavidade óssea apresenta formação de osso nas margens, na região central e nas corticais interna e externa.

6 DISCUSSÃO

Com base nos resultados obtidos, segue-se a discussão em relação aos achados na literatura.

Dentre características importantes a se encontrar em um biomaterial, certamente lembraríamos a facilidade de manuseio e inserção nos locais de destino, não imunorreatividade e atoxicidade. O PRP é um produto 100% orgânico, autógeno, atóxico e não imunorreativo (LYNCH et al., 1991a; MARX et al., 1998; ANITUA, 1999; LENHARO, 2001), em relação às propriedades de uso do PRP associado ao osso autógeno como material de enxerto, verificou-se a fácil manipulação das amostras que continham o osso envolvido em PRP, independente do protocolo de 160G ou 560G aplicados para obtenção dos mesmos; trazendo uma diminuição dos problemas quanto à dispersão dos fragmentos ósseos particulados, que se apresentaram presos a rede de fibrina do PRP quando ativado para inserção na loja cirúrgica.

O material de enxerto escolhido foi osso autógeno particulado tendo como justificativa o fato de estarmos usando produtos para intensificar a cicatrização óssea (PRP) e sinalizarem ou não a influencia da diferença na contagem plaquetária dos preparados, descartando assim a possibilidade da influencia de outras variáveis advindas de outros materiais de enxerto.

Outras justificativas para utilização do osso autógeno são encontradas em publicações científicas como a de Ellis III (1996), falando sobre o conhecimento básico de como se dá a cicatrização dos enxertos ósseos autógenos e que ela ocorreria por intermédio de dois processos básicos: O primeiro processo surge a partir de células viáveis do próprio enxerto, capazes de formar tecido osteóide, já o segundo é observado no leito receptor e é iniciado por intensa angiogênese e proliferação fibroblástica com posterior osteogênese; Becker et al. (1995) e Cancian et al. (1999) que relatam ser o osso autógeno considerado o “padrão-ouro” dentre os materiais de enxerto, em função de suas propriedades osteocondutoras, osteoindutoras e osteogênicas; Misch, (2000) e Neves, (2001) afirmam ser o osso autógeno o único biomaterial de enxerto disponível com propriedades osteogenicas, ou seja, capacidade de formar osso diretamente a partir das células do osso transplantadas e, sua forma mais eficaz é o osso esponjoso, que fornece a maior concentração de células ósseas.

Apesar de vários autores (BUSER et al., 1995; OBARRIO et al., 2000; CAMARGO et al., 2001; KIM et al., 2002a; KIM et al., 2002b) fazerem citações de melhora de cicatrização óssea com uso de PRP associado a outros materiais de enxerto que não osso autógeno, somos conservadores como o estudo de Shanaman et al. (2001); Froum et al. (2002), Aghaloo et al. (2005) ao ponto de entendermos a regeneração tecidual guiada como Lynch et al. (1999) e Marx (1999), sobre a ótica de um aumento ou melhoria do caminho natural da regeneração óssea, pela presença de matriz, sinais moleculares (fatores de crescimento) e células; uma tríade reconhecidamente destacada pela engenharia tecidual para otimização do reparo.

Em testes com implantes *in vivo*, o espécime animal é selecionado de acordo com o tamanho do implante a ser utilizado e a duração prevista do teste em relação ao período de vida do animal; também levamos em consideração a disponibilidade e a facilidade para obtenção do sangue.

Optou-se pela utilização de coelhos, pois precisava-mos de sangue em volume suficiente para obtenção do PRP, e os animais deveriam também suportar a perda sangüínea sem alterações hemodinâmicas.

A escolha permitiu a utilização de uma maior amostra de animais, devido à disponibilidade desses, oferecida pelo Colégio Agricola de Camboríu, inclusive em relação ao espaço de armazenamento.

Optou-se pela utilização da calota craniana de coelhos por se tratar de um osso componente do complexo craniofacial, que apresenta uma díploe, ou seja, duas corticais com quantidade de medular entre elas, comparando-se à mandíbula, e possibilitou a criação de uma cavidade cirúrgica em tamanho apropriado, compatível com os materiais de enxerto em utilização.

A realização dos defeitos neste local impede que os animais contaminem a área, através da boca e das patas e, além disso, permite que o material permaneça na cavidade sem movimentação, por tratar-se de um osso imóvel.

Os resultados obtidos na contagem plaquetária para o protocolo de única centrifugação a 160G, aproximam-se dos encontrados nos estudos de Aghaloo et al. (2002) que utilizaram coelhos e um protocolo de duas centrifugações, sendo que, a média de plaquetas no sangue periférico foi de 144.000/µl com variação de 70.000 a 260.000/µl e no PRP foi de 1.050.000/µl com variação de 625.000 a 1.495.000/µl.; Kim et al. (2002b) que utilizaram cachorros e um protocolo de duas centrigugações,

a contagem automatizada do sangue periférico revelou uma média de 443.000/µl, com uma variação de 400.000 a 505.000/µl; já a média de plaquetas no PRP foi de 1.735.000/µl, com uma variação de 1.520.000 a 2.005.000/µl; Zechner et al. (2003) que utilizaram miniporcos e um protocolo de duas centrifugações, afirmando que, com este protocolo de centrifugação, é possível a obtenção do PRP com uma contagem plaquetária que varia de 800.000 a 1.000.000 de plaquetas por microlitro; Aghaloo et al. (2004) que utilizaram coelhos e um protocolo de duas centrifugações, sendo que, a média de plaquetas no sangue periférico foi de 118.000/µl com variação de 100.000 a 135.000/µl e no PRP foi de 960.000/µl com variação de 660.000 a 1.265.000/µl e Aghaloo et al. (2005) que utilizaram coelhos e um protocolo de duas centrigurações, sendo que, a média de plaquetas no sangue periférico foi de 112.333/µl com variação de 90.000 a 135.000/µl e no PRP foi de 1.137.667000/µl com variação de 800.000 a 1.465.000/µl.

Ao submeter às plaquetas a altas forças de centrifugação para obtenção do PRP, há a possibilidade de ocorrer ativação plaquetária e a liberação de seu conteúdo granular.

Para Chaves e Beltrão (2003) as forças de 160G a 560G não foram capazes de causar formação de grumos plaquetários, em nenhuma de suas amostras que sofreram avaliação histológica a partir de esfregaço de PRP; em contrapartida Landesberg et al. (2000) submeteram o PRP a uma centrifugação de 200 G e o PRP coletado foi imediatamente recentrifugado a forças maiores que 250 G, quando então os autores fizeram relato da presença de agregações plaquetárias, para Drugrillon et al. (2002) que também submeteram o PRP a recentrifugações que chegaram a uma força centrífuga de 800 G, quando surgiram indícios de agregação plaquetária, a diferença entre os últimos dois estudos é que, no último, o PRP era mantido após a primeira centrifugação em “descanso” durante uma noite, para então, ser submetido à segunda centrifugação, sugerindo ser este o motivo para a diferença dos resultados.

A literatura ainda é confusa sobre o método a se utilizar para preparar o PRP, alguns autores relatam uma centrifugação, outros tantos duas centrifugações, alguns utilizando baixas forças centrífugas, outros, altas forças centrífugas, porém os resultados sempre apontam para a mesma direção que seria um incremento substancial no número de plaquetas em relação à contagem inicial no sangue

periférico; e uma tendência de o PRP manter-se atuante somente na fase inicial do processo de cicatrização óssea, sendo que outros tempos de avaliação sempre sugerem que a cicatrização segue um curso de normalidade, sem apresentar incrementos significantes pelo fato de se ter usado PRP.

Os resultados apresentados sugerem que os fatores de crescimento têm função sobre a cicatrização do tecido ósseo somente nas fases iniciais deste processo biológico, conforme citado por Marx (1999), haja vista, o fato de haver diferença entre as amostras que continham PRP em relação ao osso autógeno particulado, somente no grupo 01, sendo que, após este período de observação todas as outras amostras no grupo 02 e 03 não mostram diferença estatisticamente significante na comparação dos subgrupos (osso autógeno particulado, PRP 160G + osso autógeno particulado, PRP 560G + osso autógeno particulado).

Apesar de todos os defeitos mostrarem uma depressão morfológica na área do defeito ósseo, acreditamos que o não uso de membranas como barreira local foi acertado para que não incluíssemos mais um elemento de variabilidade dos resultados, haja vista, a complexidade para padronização de cada passo da construção do experimento, e entendendo que o objetivo principal era avaliar o processo de reparo ósseo frente aos materiais inseridos nas cavidades.

No grupo 01 os subgrupos mostraram diferença estatísticamente significantes quando comparamos as médias de proporção de tecido ósseo neoformado das amostras de PRP + osso autógeno particulado, com as médias das amostras de osso autógeno particulado e do coágulo sangüíneo, desta forma, houve uma aceleração no processo de cicatrização óssea local, ratificando as citações de (MARX, 1999; GARG, 1999; LANDESBERG et al., 2000).

Neste experimento não houve nenhum acontecimento de abertura da ferida cirúrgica ou infecção da área operada.

É importante salientar que os riscos de infecção pós-operatória ficam diminuídos, devido à presença de grande quantidade de células de defesa contidas no PRP (OBARRIO et al., 2000) e diminui-se o acontecimento descência de suturas, devido a atuação dos mesmos fatores de crescimento sobre a cicatrização dos tecidos moles da região (GUYTON et al., 1996; WANG et al., 1994; MATSUDA et al., 1992).

Os resultados sugerem que a diferença na contagem plaquetária não foi suficiente para causar alterações no reparo do tecido ósseo frente ao PRP preparado a 160G e a 560G.

Importante lembrar que segundo Chaves e Beltrão (2003) os fatores de crescimento presentes no PRP são receptores dependentes, desta forma, não adiantaria termos 2X fatores de crescimento e X receptores celulares; se isto realmente acontece, a “sobra” de fatores de crescimento caracterizaria uma perda de tempo para obtenção dos mesmos, com a elevação do custo final dos procedimentos.

Sugere-se que o importante é levar ao leito cirúrgico um concentrado plaquetário, sem se preocupar com o número absoluto final das plaquetas; o defeito ósseo que vai receber o material de enxerto deve ter tamanho adequado para recebê-lo em bom volume, com intuito de que a cavidade fique totalmente preenchida de forma compactada com a matriz enxertada (osso autógeno) e não com o PRP.

A metodologia para obtenção do PRP é difícil por si só, então devemos empregar o menor número de passos possíveis para que não se perca o uso clínico da tecnologia, importante frisar que a centrifugação seqüencial (02 ou quantas outras centrifugações se proponha fazer), com intuito de concentrar grandes números e plaquetas, pode romper as mesmas através da formação precoce de grumos plaquetários (por influência da força centrífuga) (LANDESBERG et al., 2000; DRUGRILLON et al., 2002); por se tratar de um derivado sangüíneo, o PRP deve ser manipulado com muito cuidado senão seu elemento morfofuncional, as plaquetas, são perdidas e levam consigo o que carreiam, os fatores de crescimento.

Weibrich et al. (2002) e Froum et al. (2002) relatam em seus estudos que a contagem plaquetária, bem como os níveis dos fatores de crescimento, provavelmente dependem da técnica utilizada para obtenção de PRP. Desta forma torna-se ainda mais evidente a necessidade de um protocolo rígido de obtenção do PRP, devido à dificuldade técnica intrínseca a este procedimento, que esteja embasado em resultados científicos e leve em consideração os cuidados especiais relatados anteriormente, com o objetivo de maximizar a quantidade e a qualidade plaquetária obtida nos concentrados, independente do tipo de método utilizado pelo cirurgião.

A possibilidade da simplificação do método de obtenção do PRP para que o procedimento possa ser executado em ambiente ambulatorial ou em consultórios odontológicos foi sem dúvida algo que alavancou as pesquisas com esta proposta, já que, segundo Weibrich et al. (2002), o processo utiliza pequenos volumes de sangue, é rápido e gera custos reduzidos.

As características técnicas de colheita e aplicação rápida do PRP servem para reduzir os riscos de uma pré-doação (WHITMAN et al., 1997), bem como, preservar a função máxima das plaquetas (RAVEL,1997) e as atividades dos fatores de crescimento derivados dos grânulos α-plaquetários (MARX, 1999; ANITUA, 1999).

Estes argumentos foram fortes na hora da decisão pelo desenvolvimento deste estudo, pois em consonância com os autores citados, também acreditamos que a disponibilização desta tecnologia para aplicação em regime ambulatorial poderá proporcionar uma segurança adicional aos profissionais que executam os procedimentos de enxertia óssea, já que, os mesmos não podem ser considerados totalmente previsíveis.

Como justificativa para esta linha de pensamento, é necessário reforçar que a metodologia proposta visa à tentativa da simplificação do protocolo para obtenção de PRP. Observem que usamos instrumentais e materiais para coleta e processamento sangüíneo que podem ser facilmente obtidos e colocados à disposição em um consultório odontológico, como sistema de vácuo para retirada sangüínea, seringa de insulina, uma agulha anestésica para punção lombar e uma microcentrífuga.

Este experimento também teve como objetivo a aplicabilidade clínica de uma biotecnologia simplificada; acreditamos que através de procedimentos mais simplificados (com a possibilidade de realização dentro de uma sala cirúrgica de atendimento odontológico) para obtenção do PRP, este, possa sedimentar-se como ferramenta cirúrgica da clínica Bucomaxilofacial diária, pois traz sabidamente ótimos resultados aos pacientes que são o objetivo maior.

O processo simplificado é executado em minicentrífugas preconizadas para uso em ambiente ambulatorial ou em consultórios odontológicos (ANITUA, 1999); este, tem ganho força por sua facilidade na obtenção do PRP com pequenos volumes de sangue, rapidez e reduzida geração de custos (WEIBRICH et al., 2002). A maior vantagem deste método é conseguir concentrações de plaquetas em

quantidade suficiente sem ter a necessidade de reinfusão das células vermelhas do sangue coletado, devido ao tamanho da coleta (KASSOLIS et al., 2000).

Para o grupo 02 (30 dias) observa-se diferença estatísticamente significantes quando comparamos as médias de proporção de tecido ósseo neoformado com as do grupo 01; em relação ao grupo 03 esta diferença não existe; seus subgrupos PRP 160G + osso autógeno particulado, PRP 560G + osso autógeno particulado e osso autógeno particulado, também não mostraram nenhuma diferença, ou seja, são como se três leitos de enxerto ósseo cicatrizassem ao mesmo tempo, sem a influência de mais nenhum material, no caso, o PRP. Desta forma, se reforça a teoria de que a atuação dos fatores de crescimento sobre os enxertos ósseos dá-se somente em uma fase inicial do processo de cicatrização óssea 07 a 10 dias (MARX, 1999; LANDESBERG et al., 2000).

Assim sugere-se que não se tenha nenhuma ação residual de fatores de crescimento e conseqüentemente outras tantas mil plaquetas que poderiam ter sido levadas ao leito cirúrgico através de uma segunda centrifugação estariam sem nenhum efeito; o que reforça a citação de Chaves e Beltrão (2003) e Anitua (1999) de que os fatores de crescimento são receptores dependentes.

Ao pensar na aplicação clínica desta biotecnologia devemos reforçar a idéia da utilização de um protocolo simplificado para obtenção de PRP com somente uma centrifugação, como forma de fazer com que mais profissionais sintam-se aptos a aderirem a esta ferramenta cirúrgica, com custos mais reduzidos, bem como, a utilização de materiais mais simplificados na obtenção e veiculação do preparado autógeno.

Para o grupo 03 (45 dias), seu comportamento neste experimento não mostrou nenhuma diferença em relação à formação óssea do grupo 02 somente em relação à maturidade óssea, sendo isto compatível com o período de avaliação histológica escolhido, desta forma, se reforça a teoria de que não há atuação dos fatores de crescimento advindos das plaquetas sobre os enxertos ósseos nas fases finais do processo de cicatrização óssea, conforme já citado por Marx (1999) e Landesberg et al. (2000).

Os resultados deste experimento são consonantes com os resultados apresentados pelos autores a seguir: Aghaloo et al. (2002) concluíram que não houve melhora significante dos defeitos preenchidos com PRP tanto para avaliação radiográfica quanto para histomorfométrica; já os defeitos tratados com osso e osso associado a PRP apresentaram uma tendência radiográfica e histomorfométrica de aumento na formação óssea para 1, 2 e 4 meses quando comparado com o grupo controle e o PRP puro.

Zechner et al. (2003) indicaram que os resultados histológicos para a aplicação tópica de PRP nos alvéolos cirúrgicos incrementou significativamente, quando comparado ao grupo controle, a atividade de regeneração óssea até a sexta semana.

Aghaloo et al. (2004) concluíram que houve melhora significante no reparo ósseo dos defeitos preenchidos com Osso Bovino Inorgânico + PRP quando comparados a Osso Bovino Inorgânico puro e que os defeitos preenchidos com Enxerto Autógeno Particulado foram melhores que os outros grupos na avaliação radiográfica, histomorfológica e histomorfométrica para 1, 2 e 4 meses.

Santana et al. (2006) concluíram não haver diferença estatisticamente significante entre os grupos Coágulo e PRP aos 14 dias pós-operatórios e que o reparo estava adiantado no grupo PRP quando avaliado aos 28 dias ($p < 0,05$). Perceberam ainda que o PRP promoveu aumento da densidade óssea nas adjacências das cavidades cirúrgicas nas quais foi utilizado ($p < 0,05$).

Enquanto publicações não comprovarem realmente a necessidade de grandes concentrações plaquetárias no PRP, a utilização de protocolos simplificados deve ser encarada como de primeira escolha por aproximar determinadas tecnologias à clínica diária, devido à simplificação da metodologia embasada em resultados cientificamente aceitáveis (CHAVES; BELTRÃO, 2003).

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que:

1) o uso de PRP associado a osso autógeno particulado aumentou positivamente a proporção de tecido ósseo neoformado na cicatrização óssea quando comparado aos grupos controle, osso autógeno particulado e coágulo sangüíneo aos 15 dias;

2) Dentro das faixas de concentração plaquetária obtidas no protocolo de 160G e 560G, a contagem plaquetária não influenciou no reparo do tecido ósseo das lojas cirúrgicas tratadas com PRP;

REFERÊNCIAS

AABOE, M.; PINHOLT, E. M.; HJORTING-HANSEN, E. Healing of experimentally created defects: a review. **British Lournal of Oral & Maxillofacial Surgery**, London, v. 33, n. 3, p. 312-318, Oct. 1995.

AABOE, M. et al. Incomplete bone regeneration of rabbit calvarial defects using different membranes. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 9, n. 5, p. 313-320, Oct. 1998.

AGHALOO, T.L.; MOY, P.K.; FREYMILLER, E.G. Investigation of Platelet-Rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study. **J Oral Maxillofac Surg**, Philadelphia, v.60, n.10, p.1176-1181, Oct. 2002.

AGHALOO, T.L.; MOY, P.K.; FREYMILLER, E.G. Evaluation of Platelet-Rich Plasma in Combination with Anorganic Bovine Bone in the Rabbit Cranium: A pilot study. Int **J Oral Maxillofac Implants**, Philadelphia, v.19, n.01, p. 59 -65, Jan. 2004.

AGHALOO, T.L.; MOY, P.K.; FREYMILLER, E.G. Evaluation of Platelet-Rich Plasma in Combination with Freeze-Dried Bone in the Rabbit Cranium: A pilot study. **Clinical Oral Implants Research**, Brussels, v.16, n.02, p. 250 -56, April. 2005.

AGOSTINI, M.; PILATTI, G.L. Uso de enxerto de biomateriais em periodontia. **Revista da Associação Brasileira de Odontologia**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 2, p. 116 -121, 2000.

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

BECKER, W. ET AL. Variations in boné regeneration adjacent to implants augmented with barrier membranes alone or with demineralized freeze-dried boné or autologous grafts: a study in dogs. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 10, n. 2, p. 143 – 154, 1995.

BOGLIOLO. M. C. et al. **Patologia Básica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

BOYNE, P.J. Transplantes teciduais. In: Kruger, G.O. **Cirurgia bucal e maxilofacial**. 5 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, p. 2005-221,1984.

BUSER, D. et al. Osseointegration of titanium implants in bone regenerated in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. **Int J Oral Maxillofac Impl**, Carol Stream, v.10, n. 06, p.666-81, Nov – Dec. 1995.

BURKITT, P. R.; YOUNG, B.; HEATH, J. W. Tecidos esqueléticos. In: _____. **Wheather histologic functional**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. cap. 10. p. 173-186.

BUSER, D.; DAHLIN, C.; SCHENK, R. K. Scientific background of guided bone regeneration. In: _____. **Guided bone regeneration implant dentistry**. Chicago: Qintessence, 1994. p. 33-48.

BRASIL. Constituição (1988). **Constituição da república federativa do Brasil. Brasília**, DF: Senado, 1988.

CAMARGO, M.P.; VOJISTAV, L.; WEINLAENDER, N.V.; MADZAREVIC, M.; KENNEY, E.B. Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. **J Periodontal Res**, Copenhagen, v.37, n.04, p.300 – 306, Aug. 2001.

CAMPBELL, D. T.; STANLEY, J. C. **Delineamentos experimentais e quase experimentais de pesquisa**. 1. ed. São Paulo: EDUSP, 1979.

CANCIAN, D.C.J. et al. Use of biogran and calcite in boné defects: histologic study in monkeys (Cebus paella). **The International Journal of Oral and maxillofacial Implants**, Lombard, v. 14, n. 6, p.859 – 864, 1999.

CATANZARO GUIMARÃES, S. A. **Patologia básica da cavidade bucal**. Ed. Guanabara, Rio de Janeiro, 1982, p.282-315.

CONSOLARO, A. et al. Avaliação de implantes de osso bovino liofilizado ‘’Osseobond’’® e membrana reabsorvível de osso bovino liofilizado- Estudo microscópico em tíbia de ratos. **Revista Brasileira de Implantodontia**, Niterói, v. 4, n. 1, p. 8-14, jan./fev. 1997.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins: patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

COWIN, S.C. **Bone mechanics handbook**. Boca Raton, Flórida: CRC Press, 2001.

CHAI, Y.; BRIGAS, P.JR.; MOGHAREI, A.; SHULER, C.F.; SLAVKIN, H.C. PDGF-A and PDGF-α regulate tooth formation via autocrine mechanism during mandibular morphogenesis in vitro. **Dev Dyn**, New York, v.213, n.4, p.500-11, Dec. 1998.

CHAVES JÚNIOR., A.C.; BELTRÃO, G. Estudo comparativo entre protocolos simplificados para obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP). **Dissertação (Mestrado em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial)**. Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

DERKX, P., et al. Immunolocalization and quantification of noncollagenous bone matrix proteins in methylmethacrylate-embedded adult human bone in combination with histomorphometry. **Bone**, New York, N.Y., v. 22, n. 4, p. 367-373, Apr. 1998.

DUGRILLON, A.; EICHLER, H.; KERN, S.; KLÜTER, H. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. **Int J Oral Maxillofac Surg**, Copenhagen, v.31, n.6, p.615-18, Dec. 2002.

ELLIS III, E. Reconstrução cirúrgica dos defeitos na mandíbula. In: PETERSON, L. J. et al. **Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1996. p. 606-616.

ELLIS III, E.; SINN, D.P. Use of homogous boné in maxillofacial surgery. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, Chicago, v. 51, p. 1181-1193, 1993.

FEINBERG, S. E.; STEINBERG, B.; HELMAN, J. I. Healing of traumatic injuries. In: FONSECA, R. J.; WALKER, R.V. **Oral and Maxillofacial trauma**. v. 1, 2 ed. Philadelphia: Saunders Company, 1997, p. 13-49.

FROUM, S.J.; WALLACE, S.S.; TARNOW, D.P.; CHO, S. Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in humam maxillary sinus grafts: Three bilateral case reports. **Int J Periodontics Restorative Dent**, Carol Strem, v. 22, n. 01, p.45-53, Feb. 2002.

GAMAL, A.Y.; MAILHOT, J.M.; GARNICK, J.J.; NEWHOUSE, R.; SHORAWY, M.M. Human periodontal ligament fibroblast response to PDGF – BB and IGF-I Application on tetracycline HCl conditioned root superfaces. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 25, n.5, p.404-12, May. 1998.

GANIO, C.; TENEWITZ, F.E.; WILSON, R.C.; MOYLES, B.G. The treatment of chronic nonhealing wounds using autologous platelet-derived growth factors. **J Foot Ankle Surg**. Baltimore, MD, v.32, n.3, p.263-67, May – Jun. 1993.

GARG, A.K. Grafting material in repair and restoration. **Tissue Enginnering**, 1ª ed, Illinois, Quintessensse Books, p.83-101, 1999.

GARG, A.K. **Prática da Implantodontia**, São Paulo: Premier, 2001. 83p.

GARG, A.K.; STEVENS, M. Nine-year follow-up of successful placement of endosseous implants in mandibular boné graft. **Implant Dentistry**, v.8, n.4, p. 403 – 406, 1999.

GARTNER, L.P.; HIATT, L.J. **Tratado de histologia em cores**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

GIANNOBILE, W.V.; FINKELMAN, R.D.; LYNCH, S.E. Comparison of canine and non human primate animal models for periodontal regenerative therapy: Results following a single administration of PDGF/IGF-I. **J Periodontol**, Chicago, v. 65, n. 12, p.1158-68, Dec. 1994.

GIANNOBILE, W.V.Periodontal tissue regeneration by polypeptide growth factors and gene transfer. **Tissue Engennering**, 1ª ed. Illinois, Quintessense Books, p.231-43, 1999.

GILLETT, C.S. Selected drug dosages and clinical reference data. In: MANNING, P.J.; RINGELER, D.H.; NEWCOMER, C.E.: **The biology of the Laboratory Rabbit.** Second Edition. San Diego: Academic Press, 1994, p.468-471.

GOLDENBERG, S. **Descomplicando a fisiologia**, 1ª ed., Artes Médicas, Porto Alegre, p.61-5, 1997.

GREGORI, C. **Cirurgia Buco-Dento-Alveolar**. São Paulo: Sarvier, 1996. 274p.

GREEN, R.J.; USUI, M.L.; HART, C.E.; AMMONS, W.F.; NARAYANAN, A.S. Immuno localization of platelet-derived growth factor A and B chains and PDGF-α e β receptors in human gigival nounds. **J Periodontol Res**, Copenhagen, v.32, n.2, p.209-14, Feb. 1997.

GUYTON, A.C. et al. **Tratado de fisiologia médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 820p.

HAASE, H.R.; CLARKSON, R.W.; WATERS, M.J.; BARTOLD, P.M. Growth factor modulation of mitogenic responses and proteoglycan synthesis by human periodontal fibroblasts. **J cell Physiol**, Philadelphia, v.174, n.3, p.353-61, Mar. 1998.

HARRISON, P.; CRAMER, E.M. Platelet alpha granules. **Blood Rev**. Edinburgh, v.7, n. 01, p.52-62, 1993.

HERCULIANI, P. P. et al. Tratamento de defeito ósseo perene em calvária de cobaia com membrana de cortical óssea bovina liofilizada associada ou não a enxerto ósseo bovino desmineralizado. **Revista Brasileira de Implantodontia**, Niterói, v. 1, n. 1, p. 7-14, abr./jun. 2000.

HISLOP, W.S.; FINLAY, P. M.; MOSS, K.F. A preliminary study into the uses of anorganic boné in oral and maxillofacial surgery. **British Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, Edinburgh, v. 31, p. 149 – 153, 1993.

HOLLINGER, J.O.; BUCK, D.C.; BURDER, S.P. Biology of bone healing: Its impact on clinical therapy. **Tissue Engineering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics**. El. Quintessence Books, p. 17-53, 1999.

HUPP, J.R. Reparação das Feridas. In. PETERSON, L.J. et al. **Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea**. 2ªed. Rio de Janneiro: Guanabara Koogan, 1996. Cap. 4, p. 54-62.

HURZELER, M. B. et al. Evaluation of a new bioresorbable barrier to facilitate guided bone regeneration around exposed implant threads. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Copenhagen, v. 27, n. 4, p. 315-320, Aug. 1998.

ITO, K.; NAMBA, K.; MURAI, S. Effects of bioabsorbable and non-resorbable barrier membranes on bone augmentation in rabbit calvaria. **Journal of Periodontology**, Indianapolis, v. 69, n. 11, p. 1229-1237, Nov. 1998.

JIANG, D.; LYNCH, S.E.; DZIAK, R.; STEPHAN, E.B. Modification of an osteoconductive anorganic bovine bone mineral matrix with growth factor. **J Periodontol**, Chicago, v.70, n. 08, p. 834-39, Aug. 1999.

JENSEN, S.S. ET AL. Tissue reaction and material characteristics of four boné substitutes. **International Journal Oral Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 11, n. 1, p. 55-66, 1996.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

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

KIM, S.G. et al. A comparative study of osseointegration of avana implants in a demineralized freeze-dried bone alone or with platelet-rich plasma. **J Oral Maxillofac Surg**, Philadelphia, v.60, n.09, p.1018-1025, Sept. 2002a.

KIM, S.G.; CHUNG, C.H.; KIM, Y.K.; PARK, J.C.; LIM, S.C. Use of particulate dentin-plaster of paris combination with/without platelet-rich plasma in the treatment of bone defects around implants. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Carol Stream, v.17, n.01, p.86-94, Jan./Feb. 2002b.

KATCHBURIAN, E.; ARANA-CHAVES, V.E. **Histologia e embriologia oral: texto-atlas correlações clínicas**. São Paulo: Panamericana, 1999.

LANDESBERG, R. et al. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet – rich plasma gel preparation. **J Oral Maxillofac Surg**, Philadelphia, v.58, n.3, p.297-300, Mar. 2000.

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

LENHARO, A. Plasma rico em plaquetas. **Revista Catarinense de Implantodontia**, Florianópolis, v.1, n.3, p.6-8, Dez. 2001.

LIND, M. Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation. **Acta Orthop Scand Suppl**, Oslo, v. 69, n. 283, p. 1-31, Oct, 1998.

LIPMAN, N.S.; MARINI, R.P.; FLECKNELL, P.A. Anesthesia and Analgesia in Rabbits. In: MANNING, P.J.; RINGELER, D.H.; NEWCOMER, C.E.: **The biology of the Laboratory Rabbit**. Second Edition. San Diego: Academic Press, 1994, Chapter 10, p.205-232.

LUNDGREN, A. K.; SENNERBY, L.; LUNDGREN, D. Guided jaw-bone regeneration using an experimental rabbit model. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Copenhagen, v. 27, n. 2, p. 135-140, Apr. 1998.

LYNCH, S.E.; GENCO, R.J.; MARX, R.E. **Tissue Engineering**, in Garg AK (ed): Grafting Materials in Repair and Restoration. Chicago,IL. Quintessence, 1999, p 83-97.

LYNCH, S.E, DE CASTILLA, G.R, WILLIAMS, R.C, et al. The effects of short-term application of a combination of platelet- derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. **J Periodontol**, Chicago, v. 62, n. 07, p. 458-67, Jul. 1991a.

LYNCH, S.E, BUSER, D., HERNANDEZ, R.A, et al. Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor – In combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. **J Periodontol**, Chicago, v. 62, n. 11, p. 710-16, Nov. 1991b.

MASSONE, F. Neuroleptoanalgesia e anestesia dissociativa. In: MASSONE, F. **Anestesiologia veterinária: farmacologia e técnicas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogam, 1999, capítulo 8, p. 85-89.

McGINNIS, M. et al. Comparision of resorbable and nonresorbable guided bone regeneration materials: a preliminary study. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 13, n. 1, p. 30-35, Jan./Feb. 1998.

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

MARX, R.E. **Tissue Engennering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics**. São Paulo: Quintessence Books, 1999. p.71-82.

MATSUDA, N.; LIN, W.L.; KUMAR, N.M.; CHO, M.I.; GENCO, R.J. Mitogênese chemotactic and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro. **J Periodontol**, Chicago, v.63, n.6, p.515-25, Jun. 1992.

MERUSSE, J. L. B.; LAPICHIK, V. B. V. Instalações e equipamentos. In: COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Manual para técnicos em bioterismo**. 2. ed. São Paulo: H. A. Rotschild, 1996. p. 15-25.

MISCH, CE. **Implantes Dentários Contemporâneos**. 2. ed. São Paulo: Santos, 2000. Cap 29. p. 451-467.

MUNDY, G.R. Regulation of bone formation by bone morphgenetic proteins and other growth factors. **Clin Orthop**, Philadelphia, n. 324, p. 24-28, Mar. 1996.

NEVES, J.B. **Implantodontia oral: uma abordagem dos tecidos mole e duro**. Belo Horizonte: Rona, p. 391, 2001.

NUNES, A.B.; TAMES, D.R.; VALCANAIA, T.D.C. Potencial osteogênico do transplante autógeno de osso imaturo. **Revista Brasileira de Cirurgia e Implantodontia**. V.4, n. 2, p. 19 – 23, 1997.

OBARRIO, J.J. et al. The use of autologous growth factors in periodontal surgical theraphy: platelet gel biotechnology – case reports. **Int J Periodontics Restorative Dent**, Carol Stream, v.20, n.5, p.487-497, Oct. 2000.

OLIVEIRA, R.A.G. et al. Estudo comparativo entre dois métodos diretos para contagem de plaquetas, tendo como parâmetro a automação. **Revista NewsLab**, São Paulo, n. 40, 2000. [site na internet] Disponível em www.newlab.com.br/plaquetas.htm. Acessado: 15 de março de 2002.

PANAGAKOS, F.S. Insulin growth factors-I and II stimulate chemotaxis of osteoblasts isolated from fetal rat calvaria. **Biochimie**, Paris, v.75, n. 11, p.991-4, 1993.

PARK, J.B.; GENCO, R.J.; MATSUMURA, M.; HAN, K.Y.; NORDERYD, O.; LIN, W.L.; CHO, M.F. Periodontal regeneration in class III furcation defects of beagle dogs using guided tissue renerative therapy with platelet-derived growth factor. **J Periodontol**, Chicago, v.66, n.6, p.462-77, Jun. 1995.

PETERSON, L. J. et al. Reparação das feridas.. In: HUPP, J. R. **Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 57-67.

PERROTT, D.H.; SMITH, R.A.; KABAN, L.B. The use of fresh frozen allogeneic bone for maxillary and mandibular reconstrution. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Copenhagen, v. 21, n.5, p. 260 – 265, 1992.

PIATTELLI, A. et al. Evaluation of guided bone regeneration in rabbit tibia using bioresorbable and non-resorbable membranes. **Biomaterials**, Oxford, v. 17, n. 8, p. 791-796, Apr. 1996.

RAMOSHEBI, L. N., et al. Tissue engineering: TGF-b superfamily members and delivery systems in bone regeneration. **Experimental Reviews in Molecular Medicine**, Oxford, Sep. 2002. Disponível em : <http://www.expertreviews.org/02004969h.htm>. Acesso em: 5 ago. 2005.

RAVEL, R. **Laboratório Clínico: Aplicações Clínicas dos Dados Laboratoriais**. 6. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p.109-129.

RIPAMONTI, U.; REDDI, A.H. Periodontal regeneration: potencial role of bone morphogenetic proteins. **J Periodont Res**, Copenhagen, v. 29, n. 04, p. 225-304, Jul. 1994.

ROBERTS; GARETTO. In: MISCH, C. E. **Implantes Dentários Contemporâneos**. São Paulo, Ed. Santos, 2000.

ROBBINS, S.L.; ANGEL, M.; KUMAR, V. Inflamação e reparação. In: ROBBINS, S.L.; ANGEL, M.; KUMAR, V. **Patoligia Básica**. São Paulo: Atheneu, p.32-68, 1986.

ROSSI JÚNIOR, R. et al. Utilização de plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos – **Proposta de um protocolo de obtenção simplificado. Dissertação (Mestrado em Implantodontia)**. Faculdade de Odontologia, Universidade de Santo Amaro, Santo Amaro, 2001.

ROSS, M.H.; ROWRELL, L.J, **Histologia texto e atlas**. São Paulo: Panamericana, 1993, p. 182.

ROSEN,V.; THIES R.S. The BMP proteins in bone formation and repair. **Trends Genet**, Amsterdam, v.8, n.3, p. 97-102, Mar. 1992.

ROSEMBERG, A. E. Sistema esquelético e tumores de partes moles: ossos. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. Robbins. **Patologia estrutural e functional**. 5. ed.Rio de Janeiro: Guanabara- Koogan, 1996, p. 1094-1112.

RUDKIN, G.H.; MILLER, T.A. Growth factors in surgery. **Plast Reconstr Surg**, Hagestown, MD , v.97, n.2, p.469-76, Feb. 1996.

SANTANA, I. S. Processo de Reparo de Cavidade Óssea Cirúrgica Preenchida ou não com Plasma Rico em Plaquetas: Estudo Radiográfico em Calvária de Coelhos, **Revista Brasileira de Implantodontia e Prótese sobre Implantes**, Curitiba, v. 13, n. 49, p.51 – 60, Jan/Mar. 2006.

SEGHATCHIAN, J.; KRAILADSIRI, P. Current position on preparation and quality of leucodepleted platelet concentrates for clinical use. **Transfus Sci**, Oxford, v. 22, n. 1-2, p. 85-88, Feb –Apr. 2000.

SEGHATCHIAN, J.; KRAILADSIRI, P. The platelet storage lesion. **Transfusion Medicine Reviews**, Orlando, FL, v. 11, n. 02, p. 130-44, Apr. 1997.

SONNLEITNER, D.; HUEMER, P.; SULLIVAN, D.Y. A simplified technique for producing platelet-rich plasma and platelets concentrate for intraoral bone grafiting techniques: a technical note. **Int J Maxillofac Implants**, Carol Stream, v.15, n.11, p.879-82, Nov –Dec. 2000.

SOUZA, N. L. Eutanásia. In: COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Manual para técnicos em bioterismo**. 2. ed. São Paulo: H. A. Rotschild, 1996. p. 171-177.

SCARSO FILHO et al apud DINATO, J.C.; POLIDO, W.D. **Implantes Osseointegrados: cirurgia e prótese**. São Paulo: Artes Médicas, 2001. p.398.

SCHENK, R. K. Regeneração óssea: bases biológicas. In: BUSER. D.; DAHLIN, C.; SCHENK, R. K. **Regeneração óssea guiada na implantodontia**. São Paulo: Quintessence Books, 1996. p. 49-100.

SCHMID, J. et al. Blood-filled spaces with and without filler materials in guided bone regeneration. A comparative experimental study in the rabbit using bioresorbable membranes. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 8, n. 2, p. 75-81, Apr. 1997.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Chicago, v. 23, n. 205, p. 299-308, Apr. 1986.

SHANAMAN, R.; FILSTEIN, M.R.; DANESH-MEYER, M.J. Localized ridge augmentation using GBR and platelet –rich plasma: Case reports. **Int J Periodontics Restorative Dent**, Carol Stream, v. 21, n. 04, p.345 – 355, Aug. 2001.

SLATER,M.; PATAVA, J.; KINGHAM, K.; MASON, R.S. Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity. **J Orthop Res**, New York, v.13, n. 05, p. 655 – 63, Sep. 1995.

SMUKLER, H.; BARBOZA, E. P.; BURLISS, C. A new approach to regeneration of surgically reduced alveolar ridges in dogs: a clinical and histologic study. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 10, n. 5, p. 537-551, Sept./Oct. 1995.

SPORN, M.B.; ROBERTS, A.B. Transforming growth factor β: recent progress and new charllenges. **J Cell Biol**, New York, v.119, n. 05, p.1017-21, Dec. 1992.

TAGA, E.M. Biomateriais para uso em clínica médico-odontológica. **Revista Brasileira de Cirurgia e Implantodontia**, Curitiba, v. 3, n. 1, p. 59-70, 1996.

TEN CATE, A. R. **Histologia Bucal**. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2001, p. 95-111.

TROWBRIDGE, H.O; EMLING, R.C. **Inflamação: uma revisão do processo**. Quintessence books, 4 ed., pg ix, 137, 138 – 146, 1996.

YOUNG, B; HEATH, J.W. Tecidos esqueléticos. In: YOUNG, B.; HEATH, J.W. **Histologia funcional**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000, 4 ed., Cap. 10, p.172-192.

WANG, H.L.; PAPPERT, T.D.; CASTELLI, W.A.; CHIEGO, D.J.JR.; SHYR, Y.; SMITH, B.A. The effect of platelet-derived groeth factor on the celular response of the periodontium: na mitoradiographic study on dogs. **J Periodontol**, Chicago, v.65, n.5, p.429-36, May. 1994.

WEIBRICH, G.; KLEIS, W.K.G.; KUNZ-KOSTOMANOLAKIS, M.; LOOS, A.H.; WAGNER, W. Correlation of platelet concentration in platelet-rich plasma to the extraction method, age, sex, and platelet count of the donor. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Carol Stream, v.16, n.5, p.693 – 9, Sec – Oct. 2001.

WEIBRICH, G.; KLEIS, W.K.G.; HAFNER, G. Growth factor levels in the platelet-rich plasma produced by 2 different methods: Curasan-type PRP Kit versus PCCS PRP system. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Carol Stream, v.17, n.2, p.184 – 90, Mar – Apr. 2002.

WHITMAN, D. H.; BERR. Y. R. L.; GREEN, D.M. Platelet Gel: Na autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. **J Oral Maxillofac Surg**, Chicago, v.55, n. 11, p.1294-9, Nov. 1997.

WOJTOWICZ, A.; CHABERECK, S.; KRYST, L.; URBANOWSKA, S.; CIECHOWICZ, K.; OSTROWSKI, K. Fourier and Fractal analysis of maxillary alveolar ridge repair using platelet rich plasma (PRP) and inorganic bovine bone. **Int J Oral Maxillofac Surg**, Copenhagen, v. 32, n. 01, p. 84-6, Feb. 2003.

WORZNEY, J. M. et al. Growth factors influencing boné development. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v.13, p. 149 – 156, 1990.

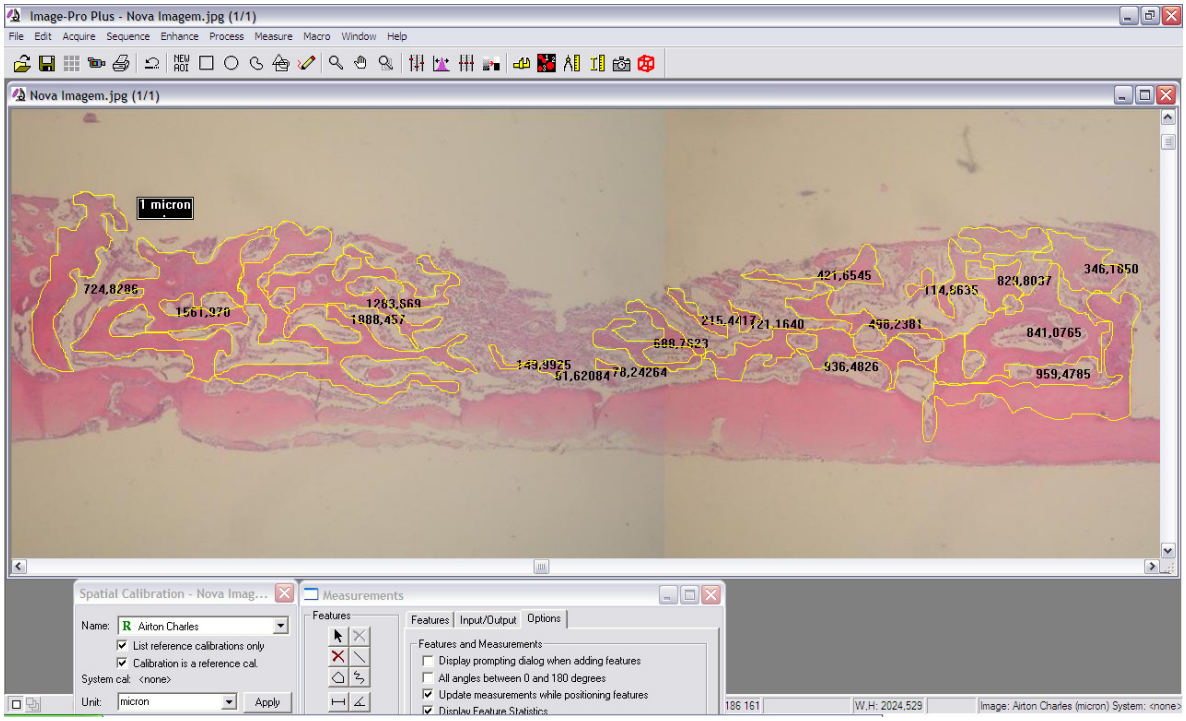
ZAHEDI, S. et al. Evaluation of a diphenylphosphorylazide collagen membrane for guided bone regeneration in mandibular defects in rats. **Journal of Periodontology**, Indianapolis, v. 69, n. 11, p. 1238-1246, Nov. 1998.

ZELLIN, G.; GRITLI-LINDE, A.; LINDE, A. Healing of mandibular defects with different biodegradable and non-biodegradable membranes: an experimental study in rats. **Biomaterials**, Oxford, v. 16, n. 8, p. 601-609, May 1995.

ZECHNER, W. et al. Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorphometric study in minipigs. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Carol Stream, v.18, n.1, p.15 – 22, Jan. / Feb. 2003.

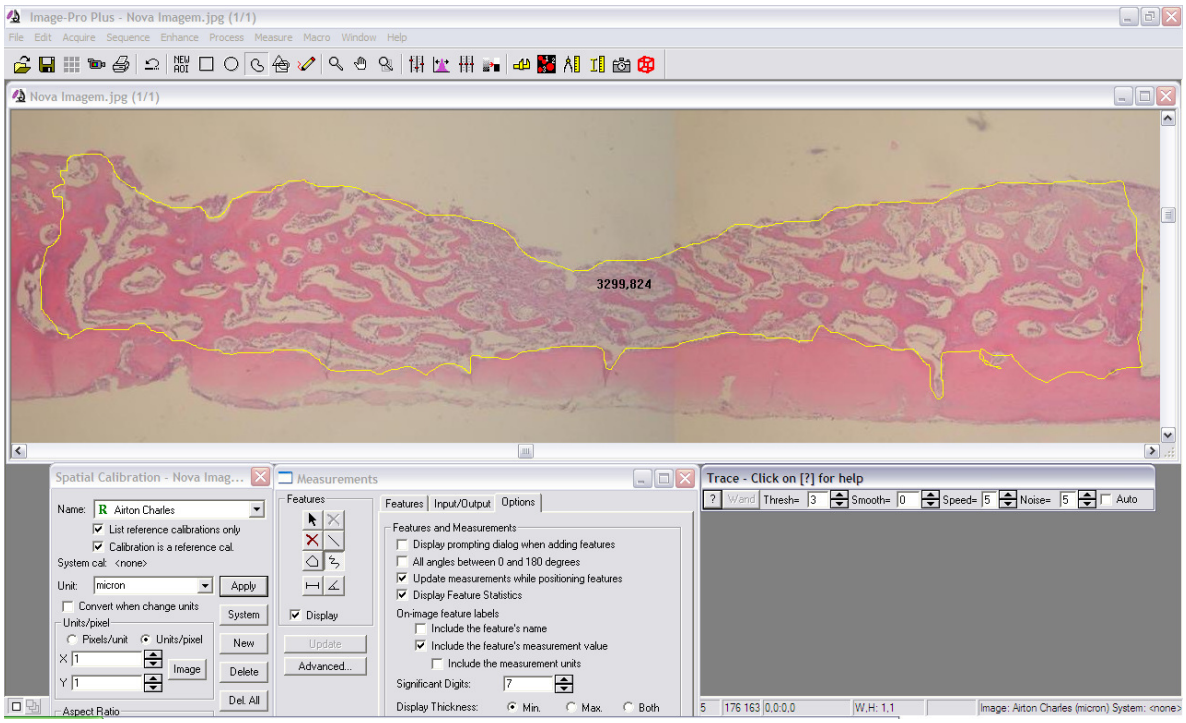
APÊNDICE A

Quantificação da Área de Osso Cortical Presente Dentro do Defeito Ósseo, em μm^2 no Software Image Pro Plus



APÊNCICE B

Quantificação da Área Inicial do Defeito em μm^2 no Software Image Pro Plus



UNIVALI

UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO,
EXTENSÃO E CULTURA

Certificado

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "Os efeitos da contagem plaquetária do plasma rico em plaquetas (PRP) sobre o reparo do tecido ósseo", do pesquisador **Prof. Airton Charles Chaves Júnior**, com a orientação do Prof. Dr. Rogério de Oliveira Belle, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/ MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado através do parecer nº 405/2005 pela Comissão de Ética em Pesquisa da UNIVALI.

Itajaí (SC), 18 de agosto de 2005.

Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho
Pró-Reitor de Pesquisa, Pós-Graduação, Extensão e Cultura

Profª Drª Márcia Maria de Souza
Coordenadora da CEP/UNIVALI

ANEXO A
Aprovação do Projeto de Tese pela Comissão de Ética em Pesquisa da UNIVALI

UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ
Pró-Reitoria de Ensino
Departamento de Administração Discente
Seção de Documentação e Diplomação

Certificado registrado sob o nº f137, livro 32, folha 328.
Itajaí(SC), 05 de setembro de 2005

Prof. Pedro Francisco Bettoni, MSc.
Chefe da SDD

ANEXO B

Aprovação do Projeto de Tese pela Comissão Científica e de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da PUCRS

Comissão Científica e de Ética
Faculdade da Odontologia da PUCRS

Porto Alegre 29 de maio de 2009

O Projeto de: Tese

Protocolado sob nº:	0020/09
Intitulado:	Os efeitos da contagem plaquetária do plasma rico em plaquetas (PRP) sobre o reparo do tecido ósseo
Pesquisador Responsável:	Prof. Dr. Rogério Belle de Oliveira
Pesquisadores Associados	Airton Charles Chaves Júnior
Nível:	Doutorado

Foi ***aprovado*** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em *27 de maio de 2009.*

Este projeto deverá ser imediatamente encaminhado ao CEUA/PUCRS

Prof. Dr. Eraldo Luiz Batista Júnior
Presidente da Comissão Científica e de Ética da
Faculdade de Odontologia da PUCRS

Av. Ipiranga, 6681, Prédio 06 sala 209
Porto Alegre /RS – Brasil – Cx. Postal:1429
90619-900

Fone/Fax: (51) 3320-3538
e-mail: odontologia-pg@pucrs.br

ANEXO C

Normas para a Prática Didático-Científica de Vivissecção de Animais

Art. 1 - Fica permitida, em todo território nacional, a vivissecção de animais, nos termos desta Lei.

Art. 2 - Os biotérios e os centros de experiências e demonstrações com animais vivos deverão ser registrados em órgão competente e por ele autorizados a funcionar.

Art. 3 - A vivissecção não será permitida:

I - sem o emprego de anestesia;
II - em centros de pesquisas e estudos não registrados em órgão competente;
III - sem supervisão de técnico especializado;
IV - com animais que não tenham permanecido mais de 15 (quinze) dias em biotérios legalmente autorizados;
V - em estabelecimento de ensino de 1° e 2° graus e em quaisquer locais freqüentados por menores de idade.

Art. 4 - O animal só poderá ser submetido às intervenções recomendadas nos protocolos das experiências que constituem a pesquisa ou os programas de aprendizagem cirúrgica, quando, durante ou após a vivissecção, receber cuidados especiais.

Parágrafo 1 - Quando houver indicação, o animal poderá ser sacrificado sob estrita obediência às prescrições científicas;
Parágrafo 2 - Caso não sejam sacrificados, os animais utilizados em experiências ou demonstrações somente poderão sair do biotério 30 (trinta) dias após a intervenção, desde que destinados a pessoas ou entidades idôneas que por eles queiram responsabilizar-se.

Art. 5 - Os infratores desta Lei estarão sujeitos:

I - às penalidades cominadas no artigo 64, caput, do Decreto-lei 3.688, de 03/10/41, no caso de ser a primeira infração;
II - à interdição e cancelamento do registro do biotério ou do centro de pesquisas, no caso de reincidência.

Art. 6 - O Poder Executivo, no prazo de 90 (noventa) dias, regulamentará a presente Lei, especificando:

I - o órgão competente para o registro e a expedição de autorização dos biotérios e centros de experiência e demonstrações com animais vivos;

II - as condições gerais exigíveis para o registro e o funcionamento dos biotérios;

III - órgão e autoridades competentes para fiscalização dos biotérios e centros mencionados no inciso I.

Art. 7 - Esta Lei entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 8 - Revogam-se as disposições em contrário.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo