

Michel Reis Messoria

***Influência do Plasma Rico em Plaquetas
no reparo ósseo de defeitos de tamanho
crítico em calvárias de ratos. Estudo
histológico e histométrico.***

ARAÇATUBA-SP
2005

Michel Reis Messoria

***Influência do Plasma Rico em Plaquetas
no reparo ósseo de defeitos de tamanho
crítico em calvárias de ratos. Estudo
histológico e histométrico.***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, para obtenção do Título de MESTRE EM ODONTOLOGIA (Área de Periodontia).

Orientadora: Professora Adjunto Maria José Hitomi Nagata

ARAÇATUBA-SP
2005

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca da FOA / UNESP

M585i Messoria, Michel Reis
Influência do plasma rico em plaquetas no reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico em calvárias de ratos : estudo histológico e histométrico / Michel Reis Messoria. - Araçatuba : [s.n.], 2005
144 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2005
Orientador: Profa. Dra. Maria José Hitomi Nagata
Co-orientador: Prof. Dr. Ronaldo Célio Mariano

1. Regeneração óssea 2. Substâncias de crescimento 3. Plaquetas

Black D6
CDD 617.632

Dados Curriculares

Michel Reis Messoro

Nascimento: 09.09.1980 – Itanhandu/MG

Filiação: Roberto Costa Messoro
Magdala Luzia Reis Messoro

1999-2003: Curso de Graduação em Odontologia
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL

2004-2005: Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área
de Periodontia
Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

Dedicatória

A Deus

Naquela hora, o coração **disparou**
Naquela hora, a emoção **revigorou...**

Naquela hora, tudo parecia ter **acabado**
Naquela hora, nenhum sonho parecia **sobreviver....**

Naquela hora, foi preciso tomar uma **decisão**
Naquela hora, foi preciso **abandonar...**

Naquelas horas... Nessas horas....
Sempre: sua **Santa Onipresença!**

Presença que acalmou, fortaleceu...
Presença que guiou, iluminou...
Presença que deu sentido para tudo! **Presença** que me fez capaz nas minhas limitações!
Presença que ultrapassa minha ingratidão e minhas vaidades...
Presença que simplesmente se faz **Presença** no mais singelo amor!

“Amar-te mais que a mim mesmo
Amar-te mais que aos mais queridos
Amar-te mais do que tudo que há aqui
Amar-te, Amar-te e dar a vida só por Ti!”

Aos meus pais, **Roberto e Magdala**

Mãe,

Cheguei aqui iluminado pela ternura do seu olhar. Suas mãos me acariciaram nos tombos de criança ou nas dores da alma! Meu porto seguro, meu refúgio, meu subterfúgio, meu privilégio! Fecho os olhos agora para pedir e ouvir novamente as palavras mágicas que me guiam ao longo da vida: “A sua benção mãe...”

Pai,

Você sempre me olhou nos olhos! Sempre acreditou em mim! Sustentou os meus passos, tornou a dura realidade mais suave. Dignidade absoluta e dedicação suprema, encontrei em você. Meu orgulho, meu companheiro, minha inspiração, meu grande e melhor AMIGO!

Vocês,

“Foram minha força quando eu estava fraco...

Foram minha voz quando eu não podia falar...

Foram meus olhos quando eu não podia ver...

Sempre estiveram “lá”, por mim...

Me deram asas e me fizeram voar...

Tocaram minha mão para que eu pudesse tocar o céu...

Disseram que nenhuma estrela estava fora de alcance...

Me devolveram a fé quando eu a perdi...

**E hoje, sou tudo que sou,
Porque vocês me amaram!”**

Aos meus avós, **Alcino e Wanda**

Filhos e netos: as duas vertentes da vida de vocês! A paixão sublime pela família!
A dedicação incondicional... O amor que não morre, que não diminui, que não adocece...
O equilíbrio de toda a nossa família!

Mãos calejadas, cabelos brancos, andar cansado, olhos brilhantes!!!
Olhos reluzentes de vida, de sonhos que não se acabam, de otimismo...
Olhos, incondicionalmente, crentes na vida!

Seus netos partiram... Farmácia, Medicina, Odontologia...
A cada conquista, a participação efetiva de vocês!
A cada partida, a lágrima da benção! A cada volta, o abraço mais gostoso do mundo!
Avós protetores, amigos, sonhadores!

A força da experiência e da juventude entrelaça nossos corações!
Nada nos separou e nada nos separará! Nem a morte e nem a vida...
Porque estamos unidos em um plano divinamente atemporal!

Amo vocês!

Ao professor e amigo, **Ronaldo Célio Mariano**

Um respeitado professor, exalando a docência e despertando novas vocações...

Incansável sonhador e idealizador do ensino...

Ético, justo, apaixonado pelo bisturi...

Foi assim que encontrei o ***Docente...***

Segui as suas inspirações, abracei os seus conselhos....

Tive medo... Fui encorajado!

Tive dúvidas.... Prontamente, foram esclarecidas!

Caí... O caminho para prosseguir foi apontado!

Foi assim que encontrei o ***Amigo...***

Amizade e ***D***ocência se misturam nesta conquista em um cálice de eterna gratidão!

Chegou a hora professor!

Chegou a hora de concretizar o sonho que você me ajudou a sonhar!

**“Às vezes estamos sem rumo,
mas alguém entra em nossa vida
e se torna o nosso destino.”**

(Luiz Fernando Veríssimo)

Agradecimento Especial

A minha orientadora Professora Dra. **Maria José Hitomi Nagata**

Eu assisti aos seus olhos transbordando **seriedade**...

Movido por esta inspiração, batalhei, busquei, acreditei, procurei!

Eu assisti aos seus olhos transbordando **entusiasmo**...

Vibre! Fiz da ciência o prazer sublime! Encantei-me pela arte de pesquisar como o poeta e o artista pela sua obra!

Eu assisti aos seus olhos transbordando **coragem**...

Entendi que não podia parar! Sonhos são incondicionalmente feitos de sacrifícios!

Eu assisti aos seus olhos transbordando **fé**...

Percebi o quanto minha crença ainda era pequena!

E, enquanto eu assisti ao seu olhar, suas mãos me assistiam em cada passo desta caminhada...

Percebi que o professor é **espelho** e que sou reflexo em construção!

Com alegria, contemplei, então, a translucidez de cada cristal do espelho que me orientou: competência, dedicação, uma doce fragilidade, uma respeitada força, justiça, honra, vocação...

Cristais límpidos, incontestáveis, brilhantes, irradiando o **sorriso** mais estimulante que já conheci!

Serei eternamente grato a ti, **professora**, pela confiança e pelo carinho!

**“Um professor influi para a eternidade...
Nunca se pode dizer até onde vai sua influência...”**

(Henry B. Adams)

Agradecimentos

A MINHA SINCERA GRATIDÃO...

À Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, nas pessoas de seu Diretor Prof. Dr. **Paulo Roberto Botacin** e Vice-Diretor Prof. Dr. **Célio Percinotto**

Pela oportunidade da realização deste curso e desta pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, na pessoa de seu Coordenador Prof. Dr. **Wilson Roberto Poi** e de todo o corpo docente

Quando as palavras do mestre gravam a alma, perduram para sempre!

Aos Professores da Disciplina de Periodontia Dr. **Alvaro Francisco Bosco** e Dr. **Valdir Gouveia Garcia**

“Ninguém pode livrar o homem da dor, mas será bendito aquele que fizer renascer neles a coragem para suportar!” Jamais me esquecerei de cada palavra de estímulo, de cada vitória comemorada, de cada sonho plantado... Obrigado por me acolherem aqui com cuidados de pai...

Ao Professor Dr. **Wilson Roberto Poi**

“Quando acreditamos nos nossos sonhos, movemos um tufão de positivismo ao nosso redor e aí tudo se torna atingível...” Jamais me esquecerei destas suas palavras, professor! Obrigado por toda a sua atenção!

Ao Professor do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada Dr. **Tetuo Okamoto**

“A noite abre as flores em silêncio e deixa que o dia receba os agradecimentos.” Sua humildade e doação são jóias raras!

Obrigado pelo auxílio inestimável na análise histológica deste estudo!

À Professora Dra. **Rita Cássia Menegati Dorneles**

Sua seriedade e o prazer irradiado a cada nova descoberta me motivaram diariamente!

Obrigado pela acolhida e por toda a assistência e paciência no transcorrer dos experimentos deste estudo! Sem você não teríamos conseguido!

À Professora Dra. **Suely Regina Mogami Bomfim**

“Sê tu aquele que afasta as pedras do caminho.” Foi muito bom partilhar contigo tantas manhãs de trabalho...

Seus olhos fixos no microscópio.... Seus olhos atentos para as necessidades do ser humano!

Obrigado pela presença amiga e pela dedicação! Você foi a serenidade imprescindível para a conclusão desta pesquisa!

Ao doutorando **Juliano**

Obrigado pelo grande auxílio nos procedimentos cirúrgicos deste trabalho.

À Professora Dra. **Maria Lucia Marçal Mazza Sundefeld**

Obrigado pelo empenho na realização da análise estatística desta pesquisa.

Ao Professor **Sandro Isaías Santana**

Obrigado pela colaboração na concretização da metodologia deste trabalho.

Aos meus tios **Magali e Délio**

Mais uma tio! Mais uma etapa tia!

A alegria e a torcida de vocês sempre caminharão lado a lado comigo! Deus os abençoe!

Aos meus primos **Alcino e Renan**

Crescemos juntos, sonhamos juntos e aqui estamos! Meus irmãos! Laços mais do que consangüíneos nos unem!

À **Rosa** e à **Zeze**

Vocês são parte de mim, da minha família, das nossas vidas! Obrigado pela lealdade e pelo carinho!

À amiga **Gracieli**

Você foi um doce divisor de águas na minha vida! Transformou-me! Fez brotar poços de água onde existia terra seca! A eternidade se fez concreta em nosso relacionamento!

À amiga **Professora Lourdes Dias**

“A prova mais clara de sabedoria é uma alegria constante!”

Você tornou meus dias iluminados pelo seu sorriso e pela sua filosofia de viver!

Obrigado por me ajudar sempre a reencontrar o caminho em dias de pouca luz!

À amiga **Flávia**

“As pessoas pouco se lembrarão do que você fez ou falou! Mas jamais se esquecerão do que vocês as fez sentir!”

Sou hoje uma pessoa melhor porque você existe! Caminhar ao teu lado foi um presente da Providência Divina! Nossa amizade foi selada em Deus e construída ao toque de Suas mãos!

À amiga **Tatiana**

Sua praticidade e sua transparência foram remédios para a alma! Seu bom senso foi um guia seguro em muitas encruzilhadas! Obrigado pela disponibilidade, pelas boas gargalhadas, pela sua sincera amizade!

Ao amigo **Luiz Gustavo**

Um ombro para desabafar, para apoiar e para estimular a caminhada! Nas recordações das madrugadas de micrófono e biotério, longas e reflexivas conversas ou feriados intensivos de trabalho ficará sempre a certeza de que um verdadeiro amigo é um tesouro que poucos têm o privilégio de encontrar!

À amiga **Célia**

Aprendi com você que o esforço e o desejo são as maiores armas da conquista! Aprendi que a paciência antecede o sucesso! Obrigado pela partilha de vida nestes dois anos!

Aos amigos **Thiago** e **Fernando**

Iniciamos juntos! Terminamos juntos! A convivência, com seus erros e acertos, se torna hoje a principal razão de comemoração!

Aos amigos **Willian, Ribamar, Mariana, Andréa** e **Marina**

Algumas pessoas entram em nossa vida e nos ajudam a construirmos os nossos sonhos!

Aos amigos e colegas do Mestrado e Doutorado em Periodontia **Alex, Célia, Danielle,**

Fernando, Flávia, Juliano, Luciana, Luiz Gustavo, Samara, Sérgio,

Tatiana, Thiago e **Valmir**

Embora as afinidades sejam diversas, um só ideal é compartilhado, uma só meta é almejada...

Em cada conquista, no tornamos mais do que cúmplices!

Aos colegas do Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, nas Áreas de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, Estomatologia, Odontopediatria, Ortodontia e Prótese Dental

Os dons são vários, mas a vocação é única! Nas experiências vividas, fica a certeza de que o respeito e a partilha são os melhores atalhos para atingirmos nossos objetivos.

Ao Dr. **Mário** e à Sra. **Hermínia Nagata**

A família que deixei distante para buscar este sonho se tornou próxima na acolhida e no carinho de vocês!

Ao Dr. **Stephen Fucini**

A solidariedade é a chama que transforma o mundo! Obrigado por todo o auxílio nas traduções e pelas valiosas sugestões científicas!

À **Nica**

Você é um exemplo de força, coragem, honestidade e dignidade! Cuidou da casa, cuidou de mim... Mostrou-me que a felicidade está em pequenas coisas...

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP,

Camilo, José Lúcio, João Batista

A disponibilidade e a alegria de servir serão para sempre lembradas!

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba –

UNESP, **Marina e Valéria**

O bom humor que socorre, abriga e fortalece! O bom humor que é calor humano vivo e diário... O bom humor, custe o que custar...! Cada sorriso foi um bálsamo para o espírito!

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, da Faculdade de

Odontologia de Araçatuba – UNESP, **Antônia, Bernadete, Claudiomiro, Cleide,**

Dirce, Gilmar e Odair

Mais do que um minucioso serviço laboratorial, vocês colheram as lágrimas da saudade de casa, provocaram as mais demoradas gargalhadas, mostraram o lado mais sublime do ser humano, transformaram o árduo trabalho em uma inesquecível convivência!

Aos funcionários e professores do Departamento de Ciências Básicas, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pela acolhida de cada dia!

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP:

**Alexandra, Ana Claudia, Claudia, Cláudio, Helena, Isabel, Ivone,
Izamar, Jessica, Luzia e Maria Cláudia**

A nobreza do ser humano é revelada na maneira como ele trata seu semelhante! A atenção dispensada, o sorriso de estímulo e as palavras de coragem tornaram o nosso dia-a-dia mais caloroso!

À **Izabel**, pelo empenho na arte gráfica deste trabalho.

A todos os pacientes, pela confiança depositada a cada atendimento...

Aos animais que sublimaram a própria vida por um bem maior...

Epígrafe

“Gutta cavat lapidem saepe cadendo.”

A gota esburaca a pedra à força de cair.

(Adágio latino)

Resumo

MESSORA, M. R. **Influência do Plasma Rico em Plaquetas no reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico em calvárias de ratos.** Estudo histológico e histométrico. 2005. 144 f. Dissertação (Mestrado em Periodontia) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba.

O propósito deste estudo foi avaliar, histologicamente, a influência do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) no reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico (DTC) criados cirurgicamente em calvárias de ratos. 32 ratos foram divididos em 2 grupos: C (controle) e PRP (Plasma Rico em Plaquetas). Um DTC de 8 mm de diâmetro foi criado na calvária de cada animal. No Grupo C, o defeito foi preenchido somente com coágulo sanguíneo. No Grupo PRP, o defeito foi preenchido com Plasma Rico em Plaquetas. Cada grupo foi subdividido para eutanásia em 4 ou 12 semanas pós-operatórias (n=8). Foram realizadas análises histológica e histométrica. A quantidade de osso neoformado foi calculada como uma proporção da área total do defeito original. Esses valores foram transformados em arcoseno para a análise estatística (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$). Nenhum defeito reparou completamente com tecido ósseo. O Grupo PRP apresentou significativamente mais neoformação óssea que o Grupo C, tanto em 4 semanas (17,68% e 7,20%, respectivamente) como em 12 semanas (24,69% e 11,65%, respectivamente) pós-operatórias. Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que o PRP aumentou significativamente o reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico em calvárias de ratos.

Palavras-chave: Regeneração óssea; substâncias de crescimento; plaquetas.

Abstract

MESSORA, M. R. **Bone healing in critical-size-defects treated with Platelet Rich Plasma.** A histologic and histometric study in rat calvaria. 2005. 144 p. Dissertation (Master in Periodontics) – Dental School of Araçatuba, São Paulo State University, Araçatuba.

The purpose of this study was to histologically analyze the influence of Platelet Rich Plasma (PRP) on bone healing in surgically created critical-size-defects (CSD) in rat calvaria. 32 rats were divided into 2 groups: C (control) and PRP (Platelet Rich Plasma). An 8 mm diameter CSD was created in the calvarium of each animal. In Group C the defect was filled by blood clot only. In Group PRP it was filled with Platelet Rich Plasma. Both groups were divided into subgroups (n=8) and euthanized at either 4 or 12 weeks post-operative. Histometric, using image analysis software, and histologic analyses were performed. Amount of new bone was calculated as percentage of total area of original defect. Percentage data were transformed into arccosine for statistical analysis (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$). No defect completely regenerated with bone. Group PRP had a statistically greater amount of bone formation than Group C at both 4 (17.68% and 7.20%, respectively) and 12 weeks (24.69% and 11.65%, respectively) post-operative. Within the limits of this study, it can be concluded that PRP significantly enhanced bone healing in critical-size-defects in rat calvaria.

Key words: Bone regeneration; growth substances; blood platelets.

Lista de Figuras

- Figura 1 - Defeito de tamanho crítico (DTC) e marcações com amálgama criados na calvária. 48
- Figura 2 - (A) Corte longitudinal ao longo da linha central do defeito cirúrgico indicado em azul; (B) Cortes transversais indicados em verde; (C) Espécime histológico pronto para ser incluído em parafina. 48
- Figura 3 - Imagem capturada de um corte histológico. A Área Total (AT) é delimitada pela linha vermelha e corresponde à área da calvária onde o defeito cirúrgico foi originalmente criado. A altura da Área Total (X) corresponde à espessura do osso original da calota (Y). A Área de Osso Neoformado (AON) está delimitada pelas linhas azuis. 49
- Figura 4 - Esfregação de amostra de PRP (A) mostrando maior número de plaquetas (setas) que o esfregação de amostra de sangue periférico (B). Panótico. Aumento 1000x. PRP = Plasma Rico em Plaquetas. 52
- Figura 5 - Quantidade média de plaquetas/ μ l presentes nas amostras de PRP e de sangue periférico. PRP = Plasma Rico em Plaquetas. 52

- Figura 6 - Grupo C. 4 semanas pós-operatórias. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico. As setas indicam as margens do defeito cirúrgico original. H.E. Original 25x. (B) Maior aumento (63x) do quadrado visto em A: pequena quantidade de tecido ósseo neoformado junto às margens do defeito cirúrgico. H.E. C = Controle 53
- Figura 7 - Grupo C. 12 semanas pós-operatórias. Visão panorâmica do defeito cirúrgico. Praticamente toda a extensão do defeito apresenta-se ocupada por tecido conjuntivo fibroso. As setas indicam as margens do defeito cirúrgico original. H.E. Original 25x. C = Controle. 53
- Figura 8 - Grupo PRP. 4 semanas pós-operatórias. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico. As setas indicam as margens do defeito cirúrgico original. H.E. Original 25x. (B) Maior aumento (63x) do quadrado visto em A: tecido ósseo neoformado estendendo-se em direção ao centro do defeito cirúrgico. H.E. Original 63x. PRP = Plasma Rico em Plaquetas. 54
- Figura 9 - Tecido conjuntivo sem diferenciação óssea nos espécimes do Grupo PRP (A) apresentando feixes de fibras colágenas mais organizadas e espessas que aquelas observadas nos espécimes do Grupo C (B). 4 semanas pós-operatórias. H.E. Original 160x. PRP = Plasma Rico em Plaquetas; C = Controle. 54

- Figura 10 - Grupo PRP. 12 semanas pós-operatórias. Visão panorâmica do defeito cirúrgico. A maior parte do defeito apresenta-se com tecido ósseo neoformado, que se mostra mais delgado que o osso original da calota. As setas indicam as margens do defeito cirúrgico original. H.E. Original 25x. PRP = Plasma Rico em Plaquetas. 55
- Figura 11 - Médias (%) e desvios-padrão da Área de Osso Neoformado (AON) para os Grupos C e PRP. 4 e 12 semanas pós-operatórias. C = Controle; PRP = Plasma Rico em Plaquetas. 55
- Figura 12 - Correlação entre a quantidade de plaquetas presentes nas amostras de PRP e de sangue periférico. PRP = Plasma Rico em Plaquetas. 135
- Figura 13 - Correlação entre a quantidade de plaquetas presentes nas amostras de PRP e a porcentagem de Área de Osso Neoformado (AON). PRP = Plasma Rico em Plaquetas. 136

Lista de Tabelas

Tabela 1	- Porcentagem média da Área de Osso Neoformado (AON) dentro da área do defeito cirurgicamente criado, com comparação entre os grupos. 4 e 12 semanas pós-operatórias.	55
Tabela 2	- Testes de Normalidade.	133
Tabela 3	- Análise de variância da variável Área de Osso Neoformado (AON), medida em porcentagem, com transformação em arcoseno.	133
Tabela 4	- Teste de Tukey para comparação das médias da variável Área de Osso Neoformado (AON) nos dois períodos de tempo analisados (valores em proporção).	134
Tabela 5	- Teste de Tukey para comparação das médias da variável Área de Osso Neoformado (AON) dos grupos analisados (valores em proporção).	134
Tabela 6	- Teste de Correlação de Pearson para a quantidade de plaquetas presentes nas amostras de sangue periférico e de Plasma Rico em Plaquetas (PRP).	135
Tabela 7	- Teste de Correlação de Pearson para a quantidade de plaquetas presentes nas amostras de Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e a Área de Osso Neoformado (AON).	136

Lista de Anexos

Anexo A -	Revisão da Literatura	67
Anexo B -	Referências da Revisão da Literatura	116
Anexo C -	Figuras e Tabelas da Análise Estatística	133
Anexo D -	Autorização da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA)	137
Anexo E -	Normas para Publicação segundo o Periódico “Clinical Oral Implants Research”	138

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACD-A	=	Ácido Citrato Dextrose-A
ANOVA	=	Análise de Variância
AON	=	Área de Osso Neoformado
AT	=	Área Total
BMPs	=	Proteínas Ósseas Morfogenéticas
C	=	Controle
cm	=	Centímetro(s)
cm ²	=	Centímetro(s) quadrado(s)
CPD	=	Citrato Fosfato Dextrose
DBP	=	Osso humano desmineralizado seco congelado em pó
DFDBA	=	Osso desmineralizado seco congelado
DNA	=	Ácido Desoxirribonucléico
DTC	=	Defeito(s) de Tamanho Crítico
EDTA	=	Ácido Etilenodiaminotetracético
FDA	=	“Food and Drug Administration”
FDBA	=	Osso mineralizado seco congelado
FGF	=	Fator de Crescimento de Fibroblasto
G	=	Gravidade
g	=	Gramas(s)
G.L.	=	Grau de Liberdade
H.E.	=	Hematoxilina e Eosina
IGF	=	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina

Kg	=	Quilograma(s)
Ltda.	=	Limitada
mg	=	Miligrama(s)
ml	=	Mililitro(s)
mm	=	Milímetro(s)
mm ²	=	Milímetro(s) quadrado(s)
ng	=	Nanograma(s)
μl	=	Microlitro(s)
μm	=	Micrômetro(s)
PCCS	=	Platelet Concentrate Collection System
PDGF	=	Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas
pH	=	Potencial Hidrogeniônico
pO ₂	=	Pressão parcial de gás Oxigênio
PPP	=	Plasma Pobre em Plaquetas
PRGF	=	Plasma Rico em Fatores de Crescimento
PRP	=	Plasma Rico em Plaquetas
rhBMP-7	=	Proteína Óssea Morfogenética Recombinante Humana-7
rpm	=	Rotações por minuto
RTG	=	Regeneração Tecidual Guiada
β-TCP	=	β -Fosfato de Tricálcio
TGF-β	=	Fator de Crescimento Transformador-β
TP	=	Tempo de Protrombina
TTPa	=	Tempo de Tromboplastina Parcial ativada
TRAP	=	Peptídeo Ativador do Receptor de Trombina

Lista de Símbolos

p	=	Probabilidade do valor do teste
$<$	=	menor
n	=	Tamanho da amostra
$\%$	=	Por cento
β	=	Beta
$^{\circ}\text{C}$	=	Graus Celsius
x	=	Vezes
r	=	Coefficiente de correlação
α	=	Alfa
Hg	=	Mercúrio
O ₂	=	Oxigênio
$>$	=	maior
F	=	Valor do teste da análise de variância

Sumário

Manuscrito para Publicação	38
Anexos	67

*Manuscrito para
Publicação**

*Segundo as normas do periódico "Clinical Oral Implants Research"

Influência do Plasma Rico em Plaquetas no reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico em calvárias de ratos. Estudo histológico e histométrico.

Michel R. Messoro, Cirurgião-Dentista ¹

Maria J. H. Nagata, Cirurgiã-Dentista, Doutora¹

¹Disciplina de Periodontia, Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Brasil.

Título resumido (“Running title”): **Reparo ósseo de defeitos críticos tratados com PRP**

Autora responsável pela correspondência:

Maria José Hitomi Nagata

Telephone: +55 18 3636 3239

Fax: +55 18 3636-3333

Rua José Bonifácio, 1193

CEP: 16015 - 050 Araçatuba, SP, Brazil

e-mail: mjnagata@uol.com.br

Palavras-chave: regeneração óssea; substâncias de crescimento; plaquetas.

Messora, M. R.; Nagata M. J. H. Influência do Plasma Rico em Plaquetas no reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico em calvárias de ratos. Estudo histológico e histométrico. *Clin Oral Impl Res*

Resumo

Objetivo: O propósito deste estudo foi avaliar, histologicamente, a influência do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) no reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico (DTC) criados cirurgicamente em calvárias de ratos. **Material e Método:** 32 ratos foram divididos em 2 grupos: C (controle) e PRP (Plasma Rico em Plaquetas). Um DTC de 8 mm de diâmetro foi criado na calvária de cada animal. No Grupo C, o defeito foi preenchido somente com coágulo sanguíneo. No Grupo PRP, o defeito foi preenchido com Plasma Rico em Plaquetas. Cada grupo foi subdividido para eutanásia em 4 ou 12 semanas pós-operatórias (n=8). Foram realizadas análises histológica e histométrica. A quantidade de osso neoformado foi calculada como uma proporção da área total do defeito original. Esses valores foram transformados em arcoseno para a análise estatística (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$). **Resultados:** Nenhum defeito reparou completamente com tecido ósseo. O Grupo PRP apresentou significativamente mais neoformação óssea que o Grupo C, tanto em 4 semanas (17,68% e 7,20%, respectivamente) como em 12 semanas (24,69% e 11,65%, respectivamente) pós-operatórias. **Conclusão:** Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que o PRP aumentou significativamente o reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico em calvárias de ratos.

Introdução

Métodos de reconstrução óssea são pré-requisitos essenciais para a reabilitação funcional de perdas ósseas traumáticas ou decorrentes de patologias. Há uma constante busca por meios de se obter um reparo mais rápido e com maior densidade óssea (Raghoobar et al. 2005).

Em 1998, Marx et al. propuseram o uso local do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) para acelerar a maturação de enxertos ósseos autógenos. Segundo estes autores, os enxertos ósseos autógenos com PRP repararam mais rapidamente e apresentaram maior densidade óssea que os enxertos sem PRP. A racionalidade para o uso local do PRP está, sobretudo, no aumento do nível de fatores de crescimento no sítio da ferida após a degranulação das plaquetas.

Entre os fatores de crescimento presentes no PRP destacam-se o Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas (PDGF) e o Fator de Crescimento Transformador- β (TGF- β) (Whitman et al. 1997; Marx et al. 1998). Estudos *in-vivo* e *in-vitro* da ação isolada destes fatores concluíram que os mesmos são potenciais agentes terapêuticos para acelerar o reparo de defeitos ósseos (Lynch et al. 1987; Nasch et al. 1992; Cassiede et al. 1996; Ducey et al. 2000).

Apesar dos resultados promissores relatados por Marx et al. (1998), estudos clínicos avaliando o uso do PRP associado a diversos enxertos e materiais aloplásticos para levantamento de seios maxilares (Wiltfang et al. 2003; Kassolis & Reynolds 2005), aumento de rebordos alveolares (Shanaman et al. 2001), reconstrução de mandíbulas atroficas (Robiony et al. 2002) ou tratamento de defeitos periodontais (Camargo et al. 2002; Lekovic et al. 2002) têm apresentado resultados controversos em relação à formação e maturação ósseas.

Resultados controversos também têm sido obtidos em estudos animais. O PRP tem sido avaliado como meio de acelerar a osseointegração de implantes de titânio (Zechner et al.

2003), em levantamento de seio maxilar combinado com hidroxiapatita bovina (Furst et al. 2003) ou com osso autógeno (Jakse et al. 2003), em tratamento de defeitos mandibulares associado ao osso autógeno (Fennis et al. 2004; Choi et al. 2004) e no tratamento de defeitos craniais combinado com osso autógeno (Aghaloo et al. 2002), osso bovino (Aghaloo et al. 2004) ou enxertos alógenos (Aghaloo et al. 2005).

Portanto, vários estudos foram realizados para avaliar a associação do PRP com enxertos ou materiais aloplásticos. Contudo, como esses enxertos e materiais são geralmente osteocondutores, eles poderiam, potencialmente, obscurecer os efeitos osteocondutores genuínos do PRP (Pryor et al. 2005). Assim, a realização de novos estudos é fundamental para avaliar os reais benefícios do uso isolado do PRP na reconstrução dos tecidos duros e moles (Wiltfang et al. 2003).

Poucos estudos foram realizados para avaliar a ação isolada do PRP no reparo ósseo. Defeitos ósseos tratados apenas com PRP em fêmur (Dallari et al. 2005) ou crânio (Aghaloo et al. 2005) de coelhos e mandíbulas de cães (Yamada et al. 2004) não mostraram vantagens no processo de neoformação óssea. Entretanto, resultados favoráveis foram relatados por Anitua (1999), Sammartino et al. (2005) e Simon et al. (2004) no reparo ósseo de cavidades alveolares tratadas apenas com PRP. Ao analisar alguns desses estudos, verifica-se que a falta de análise histométrica do novo osso formado (Anitua 1999; Sammartino et al. 2005), a não utilização de defeitos de tamanho crítico (Anitua 1999; Sammartino et al. 2005; Aghaloo et al. 2005) e a ausência de análise histológica dos sítios controle (Sammartino et al. 2005) foram fatores que dificultaram o estabelecimento de conclusões definitivas sobre o efeito biológico do PRP quando usado isoladamente.

O propósito deste estudo foi avaliar, histologicamente, a influência do PRP no reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico criados cirurgicamente em calvárias de ratos.

Material e métodos

Modelo experimental

Foram utilizados 32 ratos machos (*Rattus norvegicus, albinus*, Wistar), com idade entre 5 e 6 meses, pesando entre 450 e 500 g (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Biotério da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba-SP). Os animais foram mantidos em ambiente com ciclo de 12 horas de luz por dia e temperatura entre 22 e 24° C. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da UNESP – Campus de Araçatuba. Durante todo o experimento, os animais consumiram ração sólida selecionada e água *ad libitum*. Eles foram aleatoriamente divididos em 2 grupos experimentais: Grupo C (Controle) e Grupo PRP (Plasma Rico em Plaquetas).

Procedimento cirúrgico

Para realização de todos os procedimentos experimentais, os ratos foram anestesiados por injeção intramuscular de xilazina (6 mg/kg) e quetamina (70 mg/kg). Após tricotomia e anti-sepsia da parte dorsal do crânio de cada animal, foi feita uma incisão semi-lunar na calvária e um retalho de espessura total foi rebatido em direção posterior. Um defeito de tamanho crítico (DTC) de 8 mm de diâmetro foi criado com uma trefina acoplada em uma peça de mão de baixa rotação, sob irrigação abundante com solução salina estéril. O defeito incluiu uma porção da sutura sagital. Com auxílio de um guia cirúrgico previamente confeccionado, uma marcação no formato de “L” foi feita 2 mm anterior e outra 2 mm posterior às margens do defeito cirúrgico. O maior eixo de cada “L” localizou-se sobre uma linha imaginária longitudinal crânio-caudal que dividia o defeito cirúrgico ao meio. As marcações foram feitas com uma broca carbide tronco-cônica sob irrigação contínua com

solução salina estéril e, posteriormente, preenchidas com amálgama (Figura 1). Estas marcações foram úteis para a identificação do meio do defeito cirúrgico original durante o processamento laboratorial e, também, para localizar as suas margens ósseas originais durante a análise histométrica.

No Grupo C, o defeito cirúrgico foi preenchido somente com coágulo sangüíneo. No Grupo PRP, ele foi preenchido com 0,35 ml de Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e coberto com 0,35 ml de Plasma Pobre em Plaquetas (PPP).

Os tecidos moles foram, então, reposicionados e suturados para se obter um fechamento primário da ferida. Cada animal recebeu uma injeção intra-muscular de 24.000 unidades de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico* Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge[®] Saúde Animal Ltda., Campinas, SP).

Preparo do PRP

Antes da realização dos defeitos cirúrgicos, os animais do grupo PRP foram submetidos à canulação da veia jugular, através de uma adaptação da técnica de Harms & Ojeda (1974). Usando uma seringa descartável de 5 ml, contendo 0,35 ml de citrato de sódio a 10%, foram coletados 3,15 ml de sangue de cada animal. O sangue retirado foi armazenado em tubos a vácuo (Vacuum II[®], Vitfend Corporation Indústria e Comércio Ltda., Itupeva, SP, Brasil) de 5 ml, com paredes siliconizadas. A mesma quantidade retirada de sangue de cada animal foi imediatamente repostada através de injeção de solução salina estéril. A cânula introduzida na veia jugular foi então retirada e um hemostático aplicado no local. Os tecidos foram reposicionados e suturados.

O preparo do PRP foi feito de acordo com uma adaptação do protocolo de Sonnleitner et al. (2000), utilizando-se uma centrífuga laboratorial refrigerada (Beckman J-6M Induction Drive Centrifuge, Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EUA) e uma capela de fluxo

laminar (Cabina de Fluxo Laminar Vertical Veco[®], Veco do Brasil Indústria e Comércio de Equipamentos Ltda., Campinas, SP, Brasil) para a manipulação das amostras biológicas. O sangue coletado foi, inicialmente, centrifugado a 160 G por 20 minutos, à temperatura ambiente (22° C). Foram então observadas uma fração inferior vermelha (componente de células vermelhas) e uma fração superior amarelada (componente seroso). Um ponto foi marcado 1,4 mm abaixo da linha que divide as duas frações, sendo todo o conteúdo acima deste ponto pipetado e transferido para outro tubo a vácuo de 5 ml, no qual havia uma marcação correspondente ao volume de 0,35 ml a partir do fundo do tubo. A amostra foi então submetida a uma nova centrifugação a 400 G por 15 minutos, resultando em dois componentes, um localizado acima da marcação existente no tubo (Plasma Pobre em Plaquetas – PPP) e outro abaixo da mesma (Plasma Rico em Plaquetas - PRP). Quantidades iguais de PRP e PPP (0,35 ml) foram pipetadas e transferidas para potes dappen estéreis distintos, sendo ativadas com uma solução de cloreto de cálcio a 10% (Calcium Chloride 10% Solution, ScienceLab.com Inc., Houston, TX, EUA), na proporção de 0,05 ml para cada 1 ml de PRP ou PPP, no momento da aplicação clínica. Ambos apresentaram-se com consistência gelatinosa aproximadamente 1,5 minutos após a ativação e foram imediatamente utilizados nos defeitos cirúrgicos.

Contagem de plaquetas

As plaquetas presentes no sangue periférico do animais e nas amostras de PRP foram contadas manualmente em câmara de Neubauer, utilizando um microscópio óptico binocular com a objetiva de 40x. Para realização deste método, cada amostra de sangue foi separada, diluída e homogeneizada em Líquido de Brecher. Além disso, foram feitos esfregaços das amostras de sangue periférico e de PRP, corados com “Panótico Rápido LB” (LaborClin, Pinhais, PR, Brasil).

Processamento tecidual

Cada grupo de animais foi subdividido em dois para a realização da eutanásia em 4 ou 12 semanas pós-operatórias. A área do defeito cirúrgico original e os tecidos circunjacentes foram removidos em bloco. As peças foram fixadas em solução de formol neutro a 10%, lavadas em água corrente e descalcificadas em solução de Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) a 18%. Após descalcificação inicial, cada peça foi dividida longitudinalmente em dois blocos, exatamente ao longo do centro do defeito cirúrgico original, usando-se os maiores eixos de cada marcação de amálgama em formato de “L” como referência. Foram realizados, também, cortes transversais que tangenciaram o eixo menor de ambas as marcações em “L”, de modo que cada espécime apresentou-se com 12 mm de extensão no sentido longitudinal. Assim, tornou-se possível a determinação precisa dos limites do defeito cirúrgico original para realização da análise histométrica (Figura 2). Após um período de descalcificação adicional, as peças foram processadas e incluídas em parafina. Foram realizados cortes seriados longitudinais, com 6 µm de espessura, iniciados a partir do centro do defeito cirúrgico original. Os cortes foram corados pelas técnicas de Hematoxilina e Eosina (H.E.) ou Tricrômico de Masson para análises com microscopia de luz.

Análise histomorfométrica

Foram selecionados 4 cortes histológicos, representando o centro do defeito cirúrgico original, para as análises histológica e histomorfométrica. As imagens dos cortes histológicos foram capturadas por meio de uma câmera digital acoplada a um microscópio óptico, com um aumento de 32x e salvas em um computador. Como não foi possível capturar o defeito inteiro em uma mesma imagem devido ao aumento usado, foram unidas 3 imagens digitais para formar um quadro único que compreendia toda a extensão do defeito e as suas margens ósseas

originais. A análise histomorfométrica foi realizada com o auxílio do software “ImageLab 2000” (Diracon Bio Informática Ltda., Vargem Grande do Sul, SP, Brasil).

Os seguintes critérios foram usados para padronizar a análise histomorfométrica das imagens digitalizadas:

- 1) A Área Total (AT) a ser analisada correspondeu à área total do defeito cirúrgico original. Esta área foi determinada, primeiramente, pela identificação das superfícies externa e interna da calvária original nas margens direita e esquerda do defeito cirúrgico. Estas superfícies foram conectadas com linhas desenhadas seguindo suas respectivas curvaturas. Foram então medidos, a partir de ambas as extremidades do espécime, 2 mm em direção ao centro do defeito para estabelecer os limites do defeito cirúrgico original (Figura 3).
- 2) A Área de Osso Neoformado (AON) foi delineada dentro dos limites da AT (Figura 3).
- 3) A AT foi medida em mm^2 e considerada 100% da área a ser analisada. A AON também foi medida em mm^2 e calculada como uma porcentagem da AT, de acordo com a seguinte fórmula proposta no estudo de Nagata et al. (2003): $\text{AON} (\text{mm}^2) / \text{AT} (\text{mm}^2) \times 100$.

Análise estatística

Os valores de AON de cada animal foram representados pela porcentagem média dos 4 cortes histológicos. A significância das diferenças entre os grupos em relação à AON foi determinada pela análise de variância, com os dados percentuais transformados em arcoseno, seguida por um Teste de Tukey *post hoc* quando a análise de variância sugeriu uma diferença significativa entre os grupos. Tanto a relação entre a quantidade de plaquetas do PRP e a AON como a relação entre a quantidade de plaquetas do PRP e a do sangue periférico foram

analisadas pelo Teste de Correlação de Pearson. Para todos os testes, o nível de 5% de significância foi adotado.

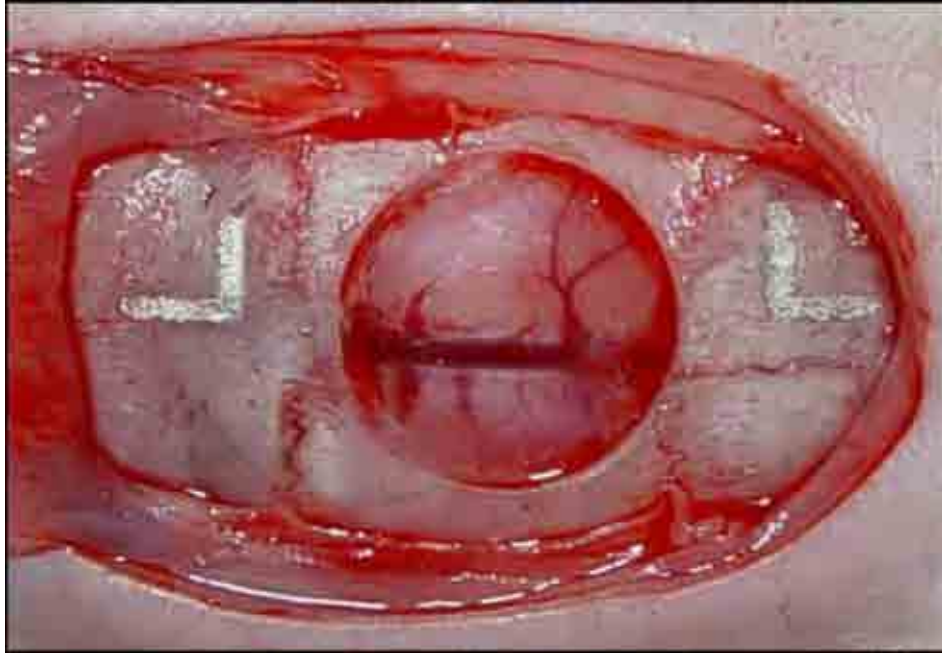


FIGURA 1 – Defeito de tamanho crítico (DTC) e marcações com amálgama criados na calvária.

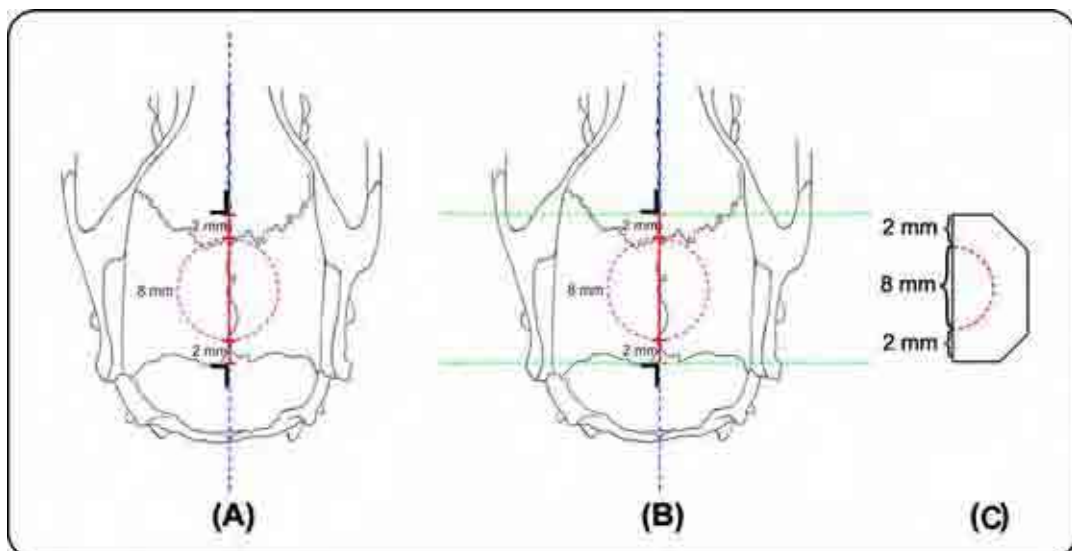


FIGURA 2 – (A) Corte longitudinal ao longo da linha central do defeito cirúrgico indicado em azul; (B) Cortes transversais indicados em verde; (C) Espécime histológico pronto para ser incluído em parafina.

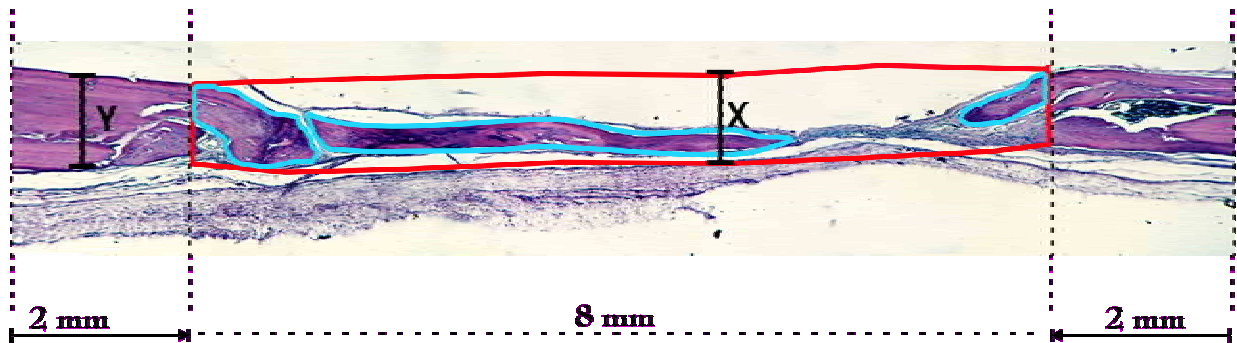


FIGURA 3 – Imagem capturada de um corte histológico. A Área Total (AT) é delimitada pela linha vermelha e corresponde à área da calvária onde o defeito cirúrgico foi originalmente criado. A altura da Área Total (X) corresponde à espessura do osso original da calota (Y). A Área de Osso Neoformado (AON) está delimitada pelas linhas azuis.

Resultados

Acompanhamento clínico

Os animais toleraram bem o procedimento cirúrgico e mantiveram-se saudáveis durante todo o período experimental. O pós-operatório transcorreu sem complicações.

Estudo da contagem de plaquetas

Esfregaços de amostras de PRP exibiram maior quantidade de plaquetas do que esfregaços de amostras do sangue periférico (Figura 4). Este achado foi confirmado pela contagem, em câmara de Neubauer, de plaquetas do sangue periférico e das amostras de PRP de cada animal. A quantidade média de plaquetas presentes nas amostras de sangue periférico dos animais foi $676,06 \pm 157,37 \times 10^3$ plaquetas/ μl , enquanto que as amostras de PRP apresentaram a média de $2644,06 \pm 1084,85 \times 10^3$ plaquetas/ μl (Figura 5). Portanto, a

quantidade média de plaquetas nas amostras de PRP foi aproximadamente 3,9 vezes maior que aquela observada nas amostras de sangue periférico.

Análise histológica qualitativa

Grupo C (controle)

Em 4 semanas pós-operatórias, praticamente toda a extensão do defeito cirúrgico estava ocupada por tecido conjuntivo com feixes de fibras colágenas orientadas paralelamente à superfície da ferida. Observou-se, junto às margens do defeito cirúrgico, pequena quantidade de tecido ósseo neoformado (Figura 6), exibindo pequeno número de osteoblastos em suas bordas. O número de fibroblastos era moderado em todos os espécimes.

Em 12 semanas pós-operatórias, alguns espécimes apresentaram tecido ósseo neoformado ocupando maior espaço do defeito cirúrgico quando comparados aos espécimes de 4 semanas. Outros, no entanto, apresentaram as mesmas características observadas nos espécimes de 4 semanas pós-operatórias (Figura 7). O tecido conjuntivo, sem diferenciação óssea, exibia moderado número de fibroblastos e muitos feixes de fibras colágenas.

Grupo PRP (Plasma Rico em Plaquetas)

Em 4 semanas pós-operatórias, a maioria dos espécimes apresentou maior quantidade de tecido ósseo neoformado junto às margens do defeito cirúrgico quando comparados aos espécimes do Grupo C, no mesmo tempo de análise (Figura 8). O tecido ósseo neoformado exibia pequeno número de osteoblastos em suas bordas. O tecido conjuntivo, sem diferenciação óssea, apresentava numerosos feixes de fibras colágenas dispostas paralelamente à superfície da ferida, mais organizadas e com maior espessura que aquelas observadas nos espécimes do Grupo C (Figura 9). Observou-se moderado número de fibroblastos.

Em 12 semanas pós-operatórias, todos os espécimes apresentavam tecido ósseo neoformado, com um pequeno número de osteoblastos em suas bordas, ocupando uma maior área do defeito cirúrgico quando comparados com os espécimes de 4 semanas do mesmo grupo. Em três espécimes, o tecido ósseo neoformado estendia-se por quase todo o defeito cirúrgico, mostrando-se mais delgado que o osso original da calota (Figura 10). O tecido conjuntivo apresentava um moderado número de fibroblastos, mantendo características similares àquelas observadas nos espécimes de 4 semanas do mesmo grupo.

Análises histométrica e estatística

A normalidade e a homocedasticidade dos dados foram comprovadas. As médias e os desvios-padrão de AON para os Grupos C e PRP de 4 e 12 semanas pós-operatórias, assim como os resultados da comparação entre os grupos, estão apresentados na Tabela 1 e na Figura 11. Não foram observadas correlações estatisticamente significativas tanto entre a quantidade de plaquetas presentes nas amostras de sangue periférico e de PRP ($r = 0.36$, $p = 0,167$), como entre a quantidade de plaquetas nas amostras de PRP e a AON ($r = 0.21$, $p = 0,441$).

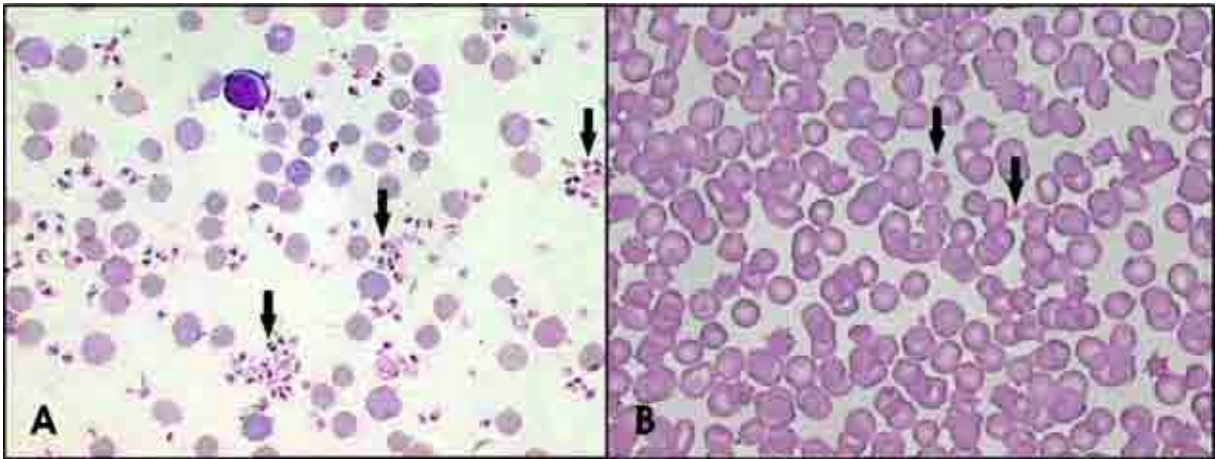


FIGURA 4 – Esfregaço de amostra de PRP (A) mostrando maior número de plaquetas (setas) que o esfregaço de amostra de sangue periférico (B). Panótico. Aumento 1000x. PRP = Plasma Rico em Plaquetas.

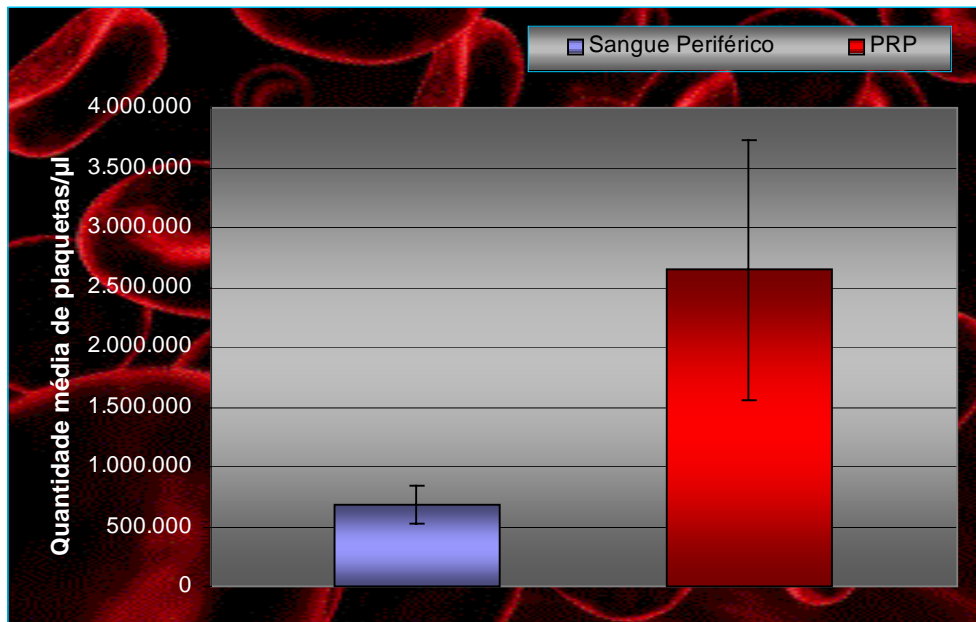


FIGURA 5 – Quantidade média de plaquetas/µl presentes nas amostras de PRP e de sangue periférico. PRP = Plasma Rico em Plaquetas.

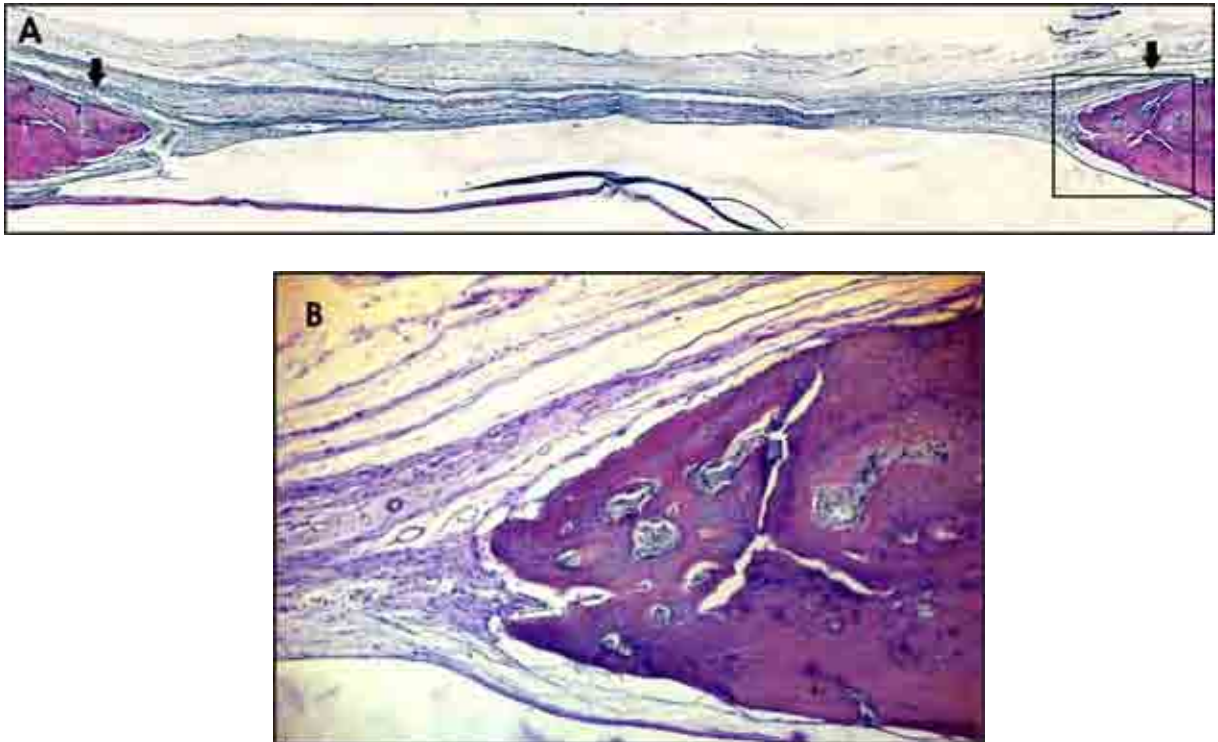


FIGURA 6 – Grupo C. 4 semanas pós-operatórias. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico. As setas indicam as margens do defeito cirúrgico original. H.E. Original 25x. (B) Maior aumento (63x) do quadrado visto em A: pequena quantidade de tecido ósseo neoformado junto às margens do defeito cirúrgico. H.E. C = Controle



FIGURA 7 – Grupo C. 12 semanas pós-operatórias. Visão panorâmica do defeito cirúrgico. Praticamente toda a extensão do defeito apresenta-se ocupada por tecido conjuntivo fibroso. As setas indicam as margens do defeito cirúrgico original. H.E. Original 25x. C = Controle.

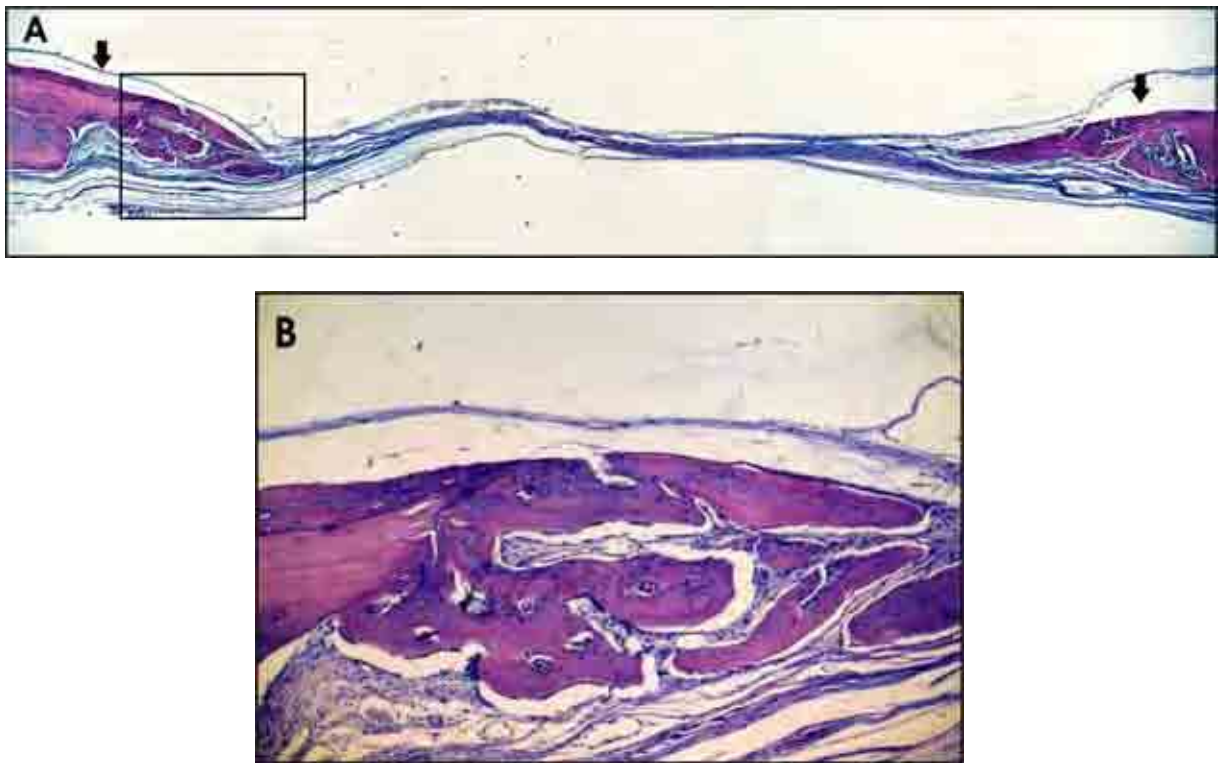


FIGURA 8 – Grupo PRP. 4 semanas pós-operatórias. (A) Visão panorâmica do defeito cirúrgico. As setas indicam as margens do defeito cirúrgico original. H.E. Original 25x. (B) Maior aumento (63x) do quadrado visto em A: tecido ósseo neoformado estendendo-se em direção ao centro do defeito cirúrgico. H.E. Original 63x. PRP = Plasma Rico em Plaquetas.

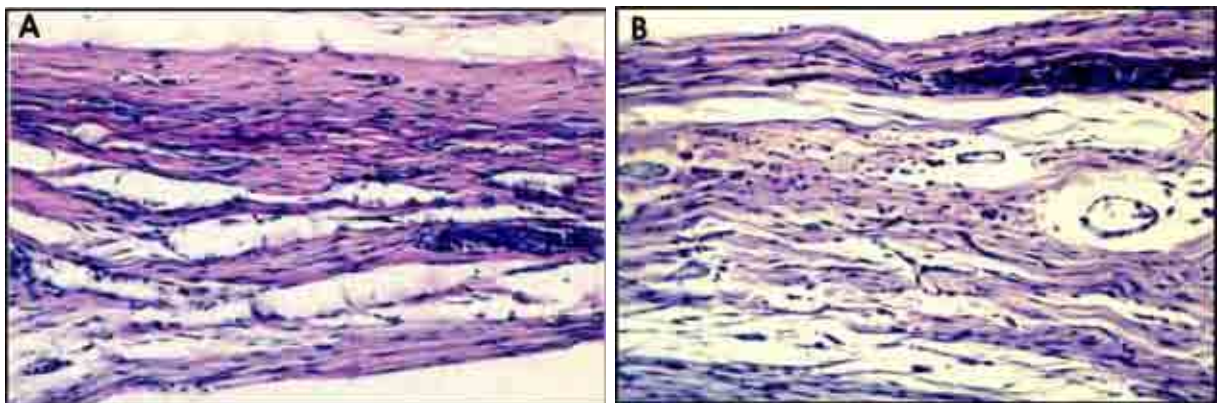


FIGURA 9 – Tecido conjuntivo sem diferenciação óssea nos espécimes do Grupo PRP (A) apresentando feixes de fibras colágenas mais organizadas e espessas que aquelas observadas nos espécimes do Grupo C (B). 4 semanas pós-operatórias. H.E. Original 160x. PRP = Plasma Rico em Plaquetas; C = Controle.

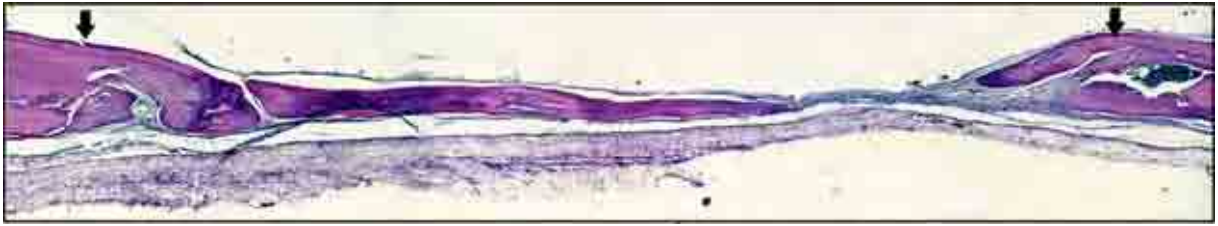


FIGURA 10 – Grupo PRP. 12 semanas pós-operatórias. Visão panorâmica do defeito cirúrgico. A maior parte do defeito apresenta-se com tecido ósseo neoformado, que se mostra mais delgado que o osso original da calota. As setas indicam as margens do defeito cirúrgico original. H.E. Original 25x. PRP = Plasma Rico em Plaquetas.

Tabela 1 – Porcentagem média da Área de Osso Neoformado (AON) dentro da área do defeito cirurgicamente criado, com comparação entre os grupos. 4 e 12 semanas pós-operatórias.

Grupo	n	Médias de AON (%) 4 semanas	Desvio-Padrão 4 semanas	Médias de AON (%) 12 semanas	Desvio-Padrão 12 semanas
Controle	8	7,20a	± 2,75	11,65c	± 6,10
PRP	8	17,68b	± 4,50	24,69d	± 5,83

*Letras diferentes indicam que há diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$)

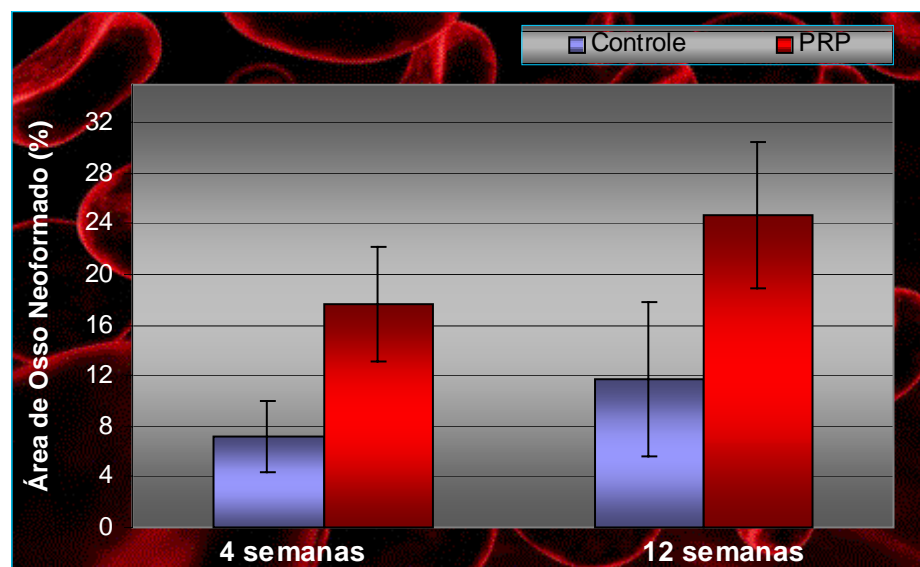


FIGURA 11 – Médias (%) e desvios-padrão da Área de Osso Neoformado (AON) para os Grupos C e PRP. 4 e 12 semanas pós-operatórias. C = Controle; PRP = Plasma Rico em Plaquetas.

Discussão

O PRP atua acelerando o processo de regeneração dos tecidos através da liberação dos fatores de crescimento contidos nos grânulos α das plaquetas (Marx et al. 1998). Portanto, alterações qualitativas e/ou quantitativas nas plaquetas podem, potencialmente, afetar a capacidade regenerativa do PRP. Assim, vários fatores fundamentais devem ser considerados na metodologia de obtenção do PRP para que se possa garantir a sua qualidade e, conseqüentemente, seu efeito biológico. A necessidade de estudos com metodologias padronizadas para analisar as potencialidades do PRP foi enfatizada por Grageda et al. (2004) e Marx (2004).

O presente estudo foi planejado levando-se em consideração a quantidade e a qualidade de plaquetas nas amostras de PRP. Em relação à quantidade de plaquetas, o protocolo de dupla centrifugação utilizado neste estudo, conforme recomendado por Marx (2001), permitiu um aumento percentual médio de aproximadamente 390% na quantidade de plaquetas do PRP quando comparada com aquela do sangue periférico. De acordo com Marx (2004), um PRP com esta concentração de plaquetas seria definido como um “PRP terapêutico”, capaz de favorecer a regeneração de tecidos duros e moles. Estudos em animais demonstraram que o uso de amostras de “PRP terapêutico” acelerou o reparo ósseo (Kim et al. 2002; Weibrich et al. 2004). Em relação à qualidade das plaquetas, alguns fatores fundamentais foram considerados no presente estudo para assegurar a integridade das mesmas nas amostras de PRP, tais como a escolha do anticoagulante e do coagulante, a seleção da força de rotação e do número de centrifugações e o tempo decorrente entre a ativação da amostra e seu uso clínico. A importância desses fatores tem sido enfatizada em vários estudos (Efeoglu et al. 2004; Dugrilon et al. 2002; Marx et al. 1998). Segundo Marx (2004), qualquer dano às plaquetas durante o processamento do PRP fará com que as mesmas secretem fatores

de crescimento que não se encontram em um estado bioativo, o que pode resultar em efeitos clínicos desfavoráveis.

Outro fator importante no planejamento de um estudo para avaliar os efeitos biológicos do uso do PRP é a seleção de um modelo experimental apropriado. Segundo Marx (2004), alguns estudos avaliaram amostras de PRP homogêneo e, portanto, as respostas biológicas observadas podem ter sido influenciadas pela ocorrência de reações imunológicas. No presente estudo, esta variável foi excluída pelo uso de uma metodologia que permitiu a obtenção de amostras de PRP autógeno, apesar do rato ser um animal de pequeno porte e reduzido volume de sangue. Entre as vantagens apresentadas por esse animal como modelo experimental, destacam-se o baixo custo e a possibilidade de sua utilização em grande quantidade (Schmitz & Hollinger 1986).

Neste estudo, a influência do PRP no reparo ósseo foi avaliada em defeitos considerados de tamanho crítico. A pequena e limitada formação óssea nos espécimes do Grupo C, em ambos os períodos de análise (Tabela 1), confirmou a natureza crítica dos defeitos de 8 mm de diâmetro criados cirurgicamente em calvárias de ratos (Takagi & Urist 1982). Este tipo de defeito é considerado como ideal para se avaliar a influência de um determinado material no reparo ósseo. Somente com a utilização de um material osteogênico, osteocondutivo ou osteoindutor é possível obter um reparo ósseo completo deste tipo de defeito (Bosch et al. 1998).

No presente estudo, uma quantidade significativamente maior de neoformação óssea foi observada no Grupo PRP quando comparado ao Grupo C, em ambos os períodos de análise (Tabela 1). Considerando que este estudo avaliou a ação isolada do PRP no reparo ósseo, que cuidados foram tomados em relação à quantidade e qualidade das plaquetas concentradas e que defeitos de tamanho crítico foram usados, pode-se concluir que o aumento significativo da neoformação óssea observado no Grupo PRP foi devido às propriedades

biológicas deste composto. Possivelmente, este aumento do reparo ósseo ocorreu devido à interação das células osteoprogenitoras presentes na dura-máter dos defeitos cirúrgicos com uma maior quantidade de fatores de crescimento provenientes do PRP (Marx 2001, 2004). Na calvária, a dura-máter é a principal fonte de células osteoprogenitoras (Wang & Glimcher 1999). Assim, a preservação da sua integridade durante a criação dos defeitos cirúrgicos teve importância fundamental nos resultados obtidos no presente estudo. Além de fatores de crescimento, é preciso ressaltar que o PRP contém fibrina, fibronectina e vitronectina. Estas proteínas são capazes de favorecer a adesão celular e atuam como uma matriz para a formação de osso (Marx 2004). A própria membrana plaquetária por si só é capaz de promover a mitose de alguns tipos de células que podem acelerar a regeneração dos tecidos (Gruber et al. 2002).

Neste estudo, o PRP provavelmente guiou o reparo ósseo dos defeitos cirúrgicos agindo como uma membrana biológica. Esta hipótese foi aventada por Lekovic et al. (2002) em estudo clínico avaliando o tratamento de defeitos infra-ósseos com uma associação de osso bovino, PRP e Regeneração Tecidual Guiada (RTG) ou apenas com PRP e osso bovino. Como a RTG não proporcionou nenhum benefício adicional ao resultado obtido apenas com PRP e osso bovino, os autores sugeriram que o PRP deve ter agido como uma membrana biológica, impedindo a migração de células epiteliais para dentro dos defeitos.

Os resultados do presente estudo corroboraram os obtidos em estudos prévios que também demonstraram um melhor reparo ósseo com o uso isolado do PRP quando comparado a grupos controle (Zechner et al. 2003; Simon et al. 2004; Fontana et al. 2004). Contudo, nenhum benefício adicional do PRP no reparo ósseo foi observado por Yamada et al. (2004) quando avaliaram defeitos mandibulares preenchidos com coágulo sangüíneo ou com PRP, em estudo realizado em cães. Variações na concentração e no volume do PRP utilizado (Choi et al. 2005), assim como a variação nos níveis de fatores de crescimento presentes no PRP poderiam explicar esta controvérsia de resultados.

Alguns estudos mostraram que não existe uma correlação precisa entre o número de plaquetas e os níveis de fatores de crescimento (Weibrich et al. 2002, 2003). No presente estudo, os níveis de fatores de crescimento não foram mensurados. Contudo, como existe uma relação entre os níveis de fatores de crescimento presentes nas plaquetas e a quantidade de neoformação óssea no reparo de um defeito (Marx et al. 1998), avaliou-se, neste estudo, a existência ou não de uma correlação significativa entre a quantidade de plaquetas das amostras de PRP e a quantidade de osso neoformado nos defeitos cirúrgicos. Como esta correlação não foi demonstrada, pode-se inferir que os níveis de fatores de crescimento realmente nem sempre se correlacionam com o número de plaquetas, corroborando os estudos de Weibrich et al. (2002, 2003).

A quantidade exata de fatores de crescimento necessária para um relevante efeito biológico ainda não foi determinada (Weibrich et al. 2003). Os números considerados satisfatórios são baseados em estudos *in-vitro* ou aplicações de fatores isolados em modelos animais (Pierce et al. 1989; Beck et al. 1991). Estes modelos, porém, não representam o que de fato ocorre no PRP, ou seja, múltiplos fatores agindo simultaneamente, com efeitos sinérgicos uns sobre os outros. Neste contexto, novos estudos são necessários para avaliar os níveis de fatores de crescimento presentes nas amostras de PRP e sua relação com o reparo ósseo.

Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que o PRP aumentou significativamente o reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico criados cirurgicamente em calvárias de ratos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba (FOA) – UNESP na pessoa do seu Chefe de Departamento, Prof^a Dr^a Rita Cássia Menegati Dorneles, pelo empréstimo de vários equipamentos e materiais essenciais para a realização deste estudo, bem como pela assessoria técnica prestada; à Prof^a Dr^a Suely Regina Mogami Bomfim da Faculdade de Medicina Veterinária do Campus de Araçatuba – UNESP, pelo preparo do PRP e ao Prof. Dr. Tetuo Okamoto da FOA – UNESP, pelo auxílio inestimável na análise histológica deste estudo.

Referências

- Anitua, E. (1999) Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of sites for implants. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **14**: 529-534.
- Aghaloo, T. L., Moy, P. K. & Freymiller, E. G. (2002) Investigation of platelet rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **60**: 1176-1181.
- Aghaloo, T. L., Moy, P. K. & Freymiller, E. G. (2004) Evaluation of platelet-rich plasma in combination with anorganic bovine bone in the rabbit cranium: a pilot study. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **19**: 59-65.
- Aghaloo, T. L., Moy, P. K. & Freymiller, E. G. (2005) Evaluation of platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone in the rabbit cranium. A pilot study. *Clinical Oral Implants Research* **16**: 250-257.

- Beck, L. S., Ammann, A. J., Aufdemorte, T. B., Deguzman, L., Xu, Y., Lee, W. P., McFatrige, L. A. & Chen, T. L. (1991) In vivo induction of bone by recombinant human transforming growth factor beta 1. *Journal of bone and mineral research* **6**: 961-968.
- Bosch, C., Melsen, B. & Vargervik, K. (1998) Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regeneration materials. *The Journal of Craniofacial Surgery* **9**: 310-316.
- Camargo, P. M., Lekovic, V., Weinlaender, M., Vasilic, N., Madzarevic, M. & Kenney, E. B. (2002) Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *Journal of Periodontal Research* **37**: 300-306.
- Cassiede, P., Dennis, J. E., Ma, F. & Caplan, A. I. (1996) Osteochondrogenic potential of marrow mesenchymal progenitor cell exposed to TGF-beta 1 or PDGF-BB as assayed in vivo and in vitro. *Journal of bone and mineral research* **11**: 1264-1273.
- Choi, B. H., Im, C. J., Huh, J. Y., Suh, J. J. & Lee, S. H. (2004) Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **33**: 56-59.
- Choi, B. H., Zhu, S. J., Kim, B. Y., Huh, J. Y., Lee, S. H. & Jung, J. H. (2005) Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation alveolar bone cells: an in vitro study. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **34**: 420-424.
- Dallari, D., Fini, M., Stagni, C., Torricelli, P., Nicoli Aldini, N., Giavaresi, G., Cenni, E., Baldini, N., Cenacchi, A., Bassi, A., Giardino, R., Fornasari, P. M. & Giunti, A. (2005) In vivo study on the healing of bone defects treated with bone marrow stromal cells, platelet rich plasma and freeze-dried bone allografts, alone and in combination. *Journal of Orthopaedic Research* **13**.
- Ducy, P., Schinke, T. & Karsenty, G. (2000) The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* **289**: 1501-1504.

- Dugrillon, A., Eichler, H., Kern, S. & Kluter, H. (2002) Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **31**: 615-619.
- Efeoglu, C., Akcay, Y. D. & Erturk, S. (2004) A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **62**: 1403-1407.
- Fennis, J. P., Stoelinga, P. J. & Jansen, J. A. (2004) Mandibular reconstruction: a histological and histomorphometric study on the use of autogenous scaffolds, particulate cortico-cancellous bone grafts and platelet rich plasma in goats. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **33**: 48-55
- Fontana, S., Olmedo, D. G., Linares, J. A., Guglielmotti, M. B. & Crosa, M. E. (2004) Effect of platelet-rich plasma on the peri-implant bone response: an experimental study. *Implant Dentistry* **13**: 73-78.
- Furst, G., Gruber, R., Tangl, S., Zechner, W., Haas, R., Mailath, G., Sanroman, F. & Watzek, G. (2003) Sinus grafting with autogenous platelet-rich plasma and bovine hydroxyapatite. A histomorphometric study in minipigs. *Clinical Oral Implants Resesarch* **14**: 500-582.
- Grageda, E. (2004) Platelet-rich plasma and bone graft materials: a review and a standardized research protocol. *Implant Dentistry* **13**: 301-309.
- Gruber, R., Varga, F., Fischer, M. B. & Watzek, G. (2002) Platelets stimulate proliferation of bone cells: involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes. *Clinical Oral Implants Research* **13**: 529-535.
- Harms, P. G. & Ojeda, S. R. (1974) A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. *Journal of Applied Physiology* **36**: 391-392.
- Jakse, N., Tangl, S., Gilli, R., Berghold, A., Lorenzoni, M., Eskici, A., Haas, R. & Pertl, C. (2003) Influence of PRP on autogenous sinus grafts. An experimental study on sheep. *Clinical Oral Implants Research* **14**: 578-583.

- Kassolis, J. D. & Reynolds, M. A. (2005) Evaluation of the adjunctive benefits of platelet-rich plasma in subantral sinus augmentation. *The Journal of Craniofacial Surgery* **16**: 280-287.
- Kim, S. G., Kim, W. K., Park, J. C. & Kim, H. J. (2002) A comparative study of osseointegration of Avana implants in a demineralized freeze-dried bone alone or with platelet-rich plasma. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **60**: 1018-1025.
- Lekovic, V., Camargo, P. M., Weinlaender, M., Vasilic, N. & Kenney, E. B. (2002) 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. *Journal of Periodontology* **73**: 198-205.
- Lynch, S. E., Nixon, J. C., Colvin, R. B. & Antoniades, H. N. (1987) Role of platelet-derived growth factor in wound healing: Synergistic effects with other growth factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 7696-7700.
- Marx, R. E., Carlson, E. R., Eichstaedt, R. M., Schimmele, S. R., Strauss, J. E. & Georgeff, K. R. (1998) Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* **85**: 638-646.
- Marx, R. E. (2001) Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dentistry* **10**: 225-228.
- MARX, R. E. (2004) Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **62**: 489-496.
- Nagata, M. J. H., Melo, L. G. N., Leite, C. M., Ribeiro, L. L. G. & Bosco, A. F. (2003) Bone healing with bioactive glass and/or calcium sulfate. *Journal of Periodontology* **74**: 1559-1560.
- Nash, T. J., Howlett, C. R., Martin, C., Steele, J., Johnson, K. A. & Hicklin, D. J. (1994) Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. *Bone* **15**: 203-208.

- Pierce, G. F., Mustoe, T. A., Lingelbach, J., Masakowski, V. R., Griffin, G. L., Senior, R. M. & Deuel, T. F. (1989) Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta enhance tissue repair activities by unique mechanisms. *The Journal of Cell Biology* **109**: 429-440.
- Pryor, M. E., Polimeni, G., Koo, K. T., Hartman, M. J., Gross, H., April, M., Safadi, F. F. & Wikesjo, U. M. (2005) Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: histologic and histometric observations. *Journal of Clinical Periodontology* **32**: 966-972.
- Raghoobar, G. M., Schortinghuis, J., Liem, R. S., Ruben, J. L., van der Wal, J. E. & Vissink, A. (2005) Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? *Clinical Oral Implants Research* **16**: 349-356.
- Robiony, M., Polini, F., Costa & Politi, M. (2002) Osteogenesis distraction and platelet-rich plasma for bone restoration of the severely atrophic mandible: preliminary results. *Journal of Oral and Maxillofac Surgery* **60**: 630-635.
- Sammartino, G., Tia, M., Marenzi, G., di Lauro, A. E., D'Agostino, E. & Cláudio, P. P. (2005) Use of autologous platelet-rich plasma (PRP) in periodontal defect treatment after extraction of impacted mandibular third molars. *Journal of Oral and Maxillofac Surgery* **63**: 766-770.
- Schmitz, J. P. & Hollinger, J. O. (1986) The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clinical Orthopaedics* **205**: 299-308.
- Shanaman, R., Filstein, M. R. & Danesh-Meyer, M. J. (2001) Localized ridge augmentation using GBR and platelet-rich plasma: case reports. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* **21**: 345-355.
- Simon, D., Maneul, S., Geetha, V. & Naik, B. R. (2004) Potential for osseous regeneration of platelet-rich plasma – a comparative study in mandibular third molar sockets. *Indian Journal of Dental Research* **15**: 133-136.

- Sonnleitner, D., Huemer, P. & Sullivan, D. Y. (2000) A simplified technique for producing Platelet-rich plasma and Platelet Concentrate for intraoral bone grafting techniques: A technical note. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **15**: 879-882.
- Takagi, K. & Urist, M. R. (1982) The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Annals of Surgery* **196**: 100-109.
- Yamada, Y., Ueda, M., Naiki, T., Takahashi, M., Hata, K. & Nagasaka, T. (2004) Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue-engineered bone regeneration. *Tissue Engineering* **10**: 955-964.
- Wang, J. & Glimcher, M. J. (1999) Characterization of matrix-induced osteogenesis in rat calvarial bone defects: II. Origins of bone-forming cells. *Calcified Tissue International* **65**: 486-493.
- Weibrich, G., Kleis, W. K., Hafner, G., Hitzler, W. E. (2002) Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *Journal of Cranio-maxillo-facial Surgery* **30**: 97-102.
- Weibrich, G., Kleis, W. K., Hafner, G., Hitzler, W. E., Wagner, W. (2003) Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. *Clinical Oral Implants Research* **14**: 357-362.
- Weibrich, G., Hansen, T., Kleis, W., Buch, R. & Hitzler, W. E. (2004) Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone* **34**: 665-671.
- Whitman, D. H., Berry, R. L. & Green, D. M. (1997) Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **55**: 1294-1299.
- Wiltfang, J., Schlegel, K. A., Schultze-Mosgau, S., Nkenke, E., Zimmermann, R. & Kessler, P. (2003) Sinus floor augmentation with beta-tricalciumphosphate (beta-TCP): does platelet-

rich plasma promote its osseous integration and degradation? *Clinical Oral Implants Research* **14**: 213-218.

Zechner, W., Tangl, S., Tepper, G., Furst, G., Bernhart, T., Haas, R., Mailath, G. & Watzek, G. (2003) Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorphometric study in minipigs. The *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **18**: 15-22.

Anexos

1. *A* evolução

Diante de uma injúria traumática ou cirúrgica onde ocorre dano vascular, manifesta-se um dos mais complexos mecanismos a favor da vida: a hemostasia. Três grupos de fenômenos fisiológicos compõem este evento: histovasculoplaquetários, plasmáticos e tromboodinâmicos (VANDER et al., 1981; BERNE; LEVY, 2000; GUYTON; HALL, 2002; SANTOS; SANTOS, 2004).

A destruição da rede vascular é seguida de vasoconstrição reflexa. Assim, há diminuição da velocidade do fluxo do sangue e conseqüente aumento de sua viscosidade, que permitirá a concentração de leucócitos, hemácias e, principalmente, plaquetas no ambiente da lesão. Com a exposição do subendotélio e dos tecidos adjacentes, as plaquetas exercem sua primeira função: adesividade. Elas aderem a qualquer superfície diferente do endotélio vascular íntegro. A seguir, exercem sua segunda função: agregabilidade, ou seja, a capacidade de aderir a outras plaquetas e, assim, formar o trombo plaquetário ou trombo branco (BERNE; LEVY, 2000).

Entretanto, o trombo plaquetário é suficiente para promover a hemostasia apenas de pequenos vasos. Caso o volume hemorrágico seja maior, o organismo utilizará outros fenômenos, chamados plasmáticos, ou simplesmente, coagulação. É a fase da hemostasia em que o organismo transforma o tecido sangüíneo líquido em gel e, a seguir, em sólido (coágulo). As globulinas presentes no plasma e fabricadas pelo fígado, medula óssea e outras células são ativadas pela ação de enzimas plasmáticas e proteínas não-enzimáticas ou,

simplesmente, pelo contato com uma superfície diferente do endotélio vascular íntegro (SANTOS; SANTOS, 2004).

Inicia-se, então, um conjunto de eventos biológicos de maneira seqüencial, perfeitamente ordenados. No local da injúria tecidual, forma-se a tromboplastina, com a participação de fatores unicamente plasmáticos (via intrínseca) ou a partir de material tromboplástico tecidual (via extrínseca). A tromboplastina, por sua vez, atua sobre a protrombina, que se transforma em trombina (a mais potente substância coagulante conhecida). A ação da trombina sobre o fibrinogênio o converte em fibrina, finalizando a coagulação do sangue (GUYTON; HALL, 2002; SANTOS; SANTOS, 2004).

Em seguida, as plaquetas, contidas dispersamente no coágulo formado, sofrem uma transformação metabólica denominada metamorfose viscosa. São emitidos pseudópodes que, em sua extensão máxima, encontram outros com os quais se aderem, formando uma rede celular plaquetária. Nesse momento, há produção de uma proteína (tromboastenina) que, liberando energia, promove a retração dos pseudópodes e do coágulo. Essa retração expulsa o plasma que permeia o trombo, tornando-o mais firme, mais obliterante, mais tamponante e eficaz (VANDER et al., 1981).

Começam, então, neste ambiente delimitado pelo coágulo sangüíneo, todos os processos biológicos de regeneração ou reparação tecidual através da liberação de fatores de crescimento contidos nas plaquetas (GUYTON; HALL, 2002). O mecanismo denominado de “reparo” consiste em uma restauração tecidual sem que esta apresente as características biológicas das estruturas anteriormente existentes no local. Caso ocorra uma reconstrução similar aos tecidos anteriormente existentes e manutenção das características fisiológicas originais, acontecerá um processo de “regeneração” (THE AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 2001). Quando se trata do tecido ósseo propriamente dito, a literatura traz, em muitos estudos, estes dois termos como sinônimos, indicando a recuperação da

integridade tecidual original (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986; HOLLINGER; KLEINSCHMIDT, 1990; MCKINNEY; HOLLINGER, 1996; VIKJAER et al., 1997; MALEKZADEH et al., 1998; BIDIC et al., 2003) Para evitar interpretações confusas ou errôneas, o termo “reparo ósseo” será, portando, adotado ao longo desta revisão.

O tecido ósseo exibe um potencial de reparo surpreendente (VIKJAER et al., 1997). Porém, esta capacidade apresenta limitações na ausência de suprimento sangüíneo, em situações de instabilidade mecânica e na presença de defeitos extensos (SCHENK, 1994). Defeitos ósseos extensos provocados por traumas, infecções, neoplasias e anomalias de desenvolvimento não são reparados espontaneamente, representando um problema atual na medicina e odontologia (ASCENCIO et al., 2004).

Basicamente, para que o processo de regeneração tecidual ocorra, é necessária a consolidação de uma tríade composta por três pilares: um arcabouço, moléculas sinalizadoras e células especializadas (UEDA, 2001). O coágulo sangüíneo parece estar estruturado sobre estes três pilares, sendo, na verdade, o palco perfeito para que o espetáculo regenerativo possa ocorrer e ponto de partida para o estudo e compreensão dos mecanismos envolvidos na reconstrução dos tecidos. Fibrina, plaquetas e fatores de crescimento, constituintes naturais do coágulo, são alvo de quase um século de pesquisas e tentativas de imitar os caminhos naturais da regeneração tecidual.

Como já mencionado, um dos principais objetivos da hemostasia é formar fibrina. A formação de fibrina e sua estabilização representam o primeiro dos três componentes citados anteriormente, fundamental para que a regeneração tecidual seja alcançada: um arcabouço. A rede de fibrina do coágulo sangüíneo é uma matriz fértil na qual populações celulares poderão aderir-se e iniciar diversos eventos, tais como síntese de Ácido Desoxirribonucléico (DNA), quimiotaxia, citodiferenciação e síntese de matriz extracelular (LYNCH et al., 1999).

As propriedades da fibrina têm sido extensivamente estudadas desde 1909 (BHANOT; ALEX, 2002). Selantes de fibrina foram primeiramente usados para estabelecer a hemostasia no início do século. Em 1940, Young e Medawar misturaram trombina bovina com fibrinogênio do plasma para produzirem o primeiro adesivo biológico. Porém, o método de isolamento usado nesta época não permitiu uma concentração de fibrinogênio suficientemente alta. Somente com o progresso nas técnicas de fracionamento do plasma foi possível produzir altas concentrações de fibrinogênio. Os selantes de fibrina tornaram-se comercialmente disponíveis na Europa apenas a partir de 1970 (SOFFER et al., 2003). Esses produtos, também chamados “colas de fibrina” ou “adesivos teciduais de fibrina”, são derivados do plasma humano e mimetizam os estágios finais da coagulação do sangue (YAMADA et al., 2003). A cola de fibrina pode ser obtida a partir do sangue de vários doadores ou do sangue de um único doador. No caso de um único doador, ela pode ser autógena ou alógena. A purificação dos compostos para inativação de possíveis vírus envolve tratamentos que utilizam um solvente químico ou calor seco (SIERRA, 1993). A possibilidade de transmissão de vírus é ainda um assunto de muito debate, tornando as formulações autógenas mais atrativas. No Estados Unidos, a “Food and Drug Administration” (FDA) não aprovou qualquer preparado comercial obtido de vários doadores de sangue. Produtos derivados de um único doador (previamente submetido a vários testes para averiguar possíveis contaminações virais) ou fontes autógenas de fibrinogênio são mais comumente empregados (SIERRA, 1993).

O fibrinogênio é isolado do sangue a partir de um processo de centrifugação combinado com crioprecipitação ou precipitação por etanol, sulfato de amônia e polietilenoglicol. As soluções concentradas de fibrinogênio são, então, misturadas com trombina, transformando-se em um adesivo de fibrina (SILVER et al., 1995). Estes produtos, biodegradáveis e biocompatíveis, são usados topicamente para se alcançar a hemostasia e

selamento dos tecidos. Eles também são usados para acelerar o reparo de tecidos enxertados ou injuriados, bem como para melhorar o fechamento da ferida juntamente com suturas. São rotineiramente usados em cirurgia cardiovascular e torácica, neurocirurgia, cirurgia oftálmica, cirurgia reconstrutiva e cirurgia buco-maxilo-facial (SILVER et al., 1995; SOFFER et al., 2003; YUCEL et al., 2003).

A fibrina não é somente um hemostático, ela está intimamente ligada aos processos regenerativos. Em se tratando de defeitos ósseos, a literatura mostra sua utilização em estudos clínicos (MARCHAC; RENIER, 1990; CORRENTE et al., 1997; HALLMAN et al., 2001) e em animais (BOSCH et al., 1980; GRECO et al., 1988; ONO et al., 1988) como uma matriz ou carreador para vários materiais de enxerto. Os resultados dessas associações mostraram uma melhor condensação e manuseio do material de enxerto no sítio receptor, bem como um reparo mais favorável.

Em 1994, Tayapongsak et al. demonstraram, na reconstrução de defeitos mandibulares de 33 pacientes, uma incorporação e remodelamento precoces de enxertos de osso medular associados a um adesivo autógeno de fibrina. Comparados com o grupo controle, no qual o remodelamento radiográfico dos enxertos empregados ocorreu somente após 8 semanas, os enxertos associados com fibrina foram incorporados em apenas 4 semanas pós-operatórias. A melhora do reparo foi atribuída ao substrato formado pela adição do selante de fibrina. Segundo os autores, este substrato, composto por fibronectina, fibrina, fator XIII da coagulação e trombina, funcionou como uma matriz para a migração de células mesenquimais, acelerou a revascularização, inibiu o crescimento de microrganismos e favoreceu a quimiotaxia de fibroblastos e osteoblastos.

Os adesivos de fibrina reproduzem o último passo da cascata da coagulação, independente dos mecanismos hemostáticos do indivíduo. Entretanto, não existe neste tipo de “coágulo de fibrina” a participação de nenhum componente celular para sua formação e

estabilização. A ausência de plaquetas neste tipo de “coágulo”, que são um dos principais constituintes do coágulo sanguíneo natural, parece explicar o motivo do fracasso de vários estudos experimentais que tentaram mostrar uma maior neoformação óssea quando adesivos de fibrina foram testados isoladamente em defeitos ósseos (SOFFER et al., 2003). Além de um arcabouço para que a regeneração dos tecidos ocorra, é necessária também a presença de moléculas sinalizadoras. Sabe-se que as plaquetas são um reservatório natural destas moléculas, os chamados fatores de crescimento.

Em uma visão ultra-estrutural, as plaquetas podem ser divididas em três zonas: 1) zona sol-gel, constituindo o sistema citoesquelético; 2) zona das organelas, composta pelos elementos de depósitos e os metabólitos e 3) o sistema canalicular, responsável pela comunicação com o plasma e pela rota de liberação das organelas de depósito (corpos densos e grânulos plaquetários). Merecem especial atenção os grânulos α plaquetários, que são os verdadeiros responsáveis pela liberação dos fatores de crescimento quando ocorre a granulação (quebra) plaquetária (MARX; GARG, 1999).

Fatores de crescimento são proteínas que servem como agentes sinalizadores para as células. Três tipos de ação são possíveis: (1) a autócrina, na qual o fator de crescimento influencia a célula de origem ou outras células de fenótipo idêntico (por exemplo, um fator de crescimento produzido por um osteoblasto influencia a atividade de um outro osteoblasto); (2) a parácrina, na qual o fator de crescimento influencia uma célula vizinha que tenha fenótipo diferente da célula de origem (por exemplo, um fator de crescimento produzido por um osteoblasto estimula a diferenciação de uma célula indiferenciada); e (3) a endócrina, na qual o fator de crescimento influencia uma célula com fenótipo diferente da célula de origem e que se encontra em um local anatômico remoto (por exemplo, um fator de crescimento produzido no tecido neural estimula a atividade de um osteoblasto). Assim, um fator de crescimento

pode ter efeitos em múltiplos tipos de células, induzindo uma infinidade de funções celulares em vários tecidos (LIEBERMAN et al., 2002).

Alguns fatores de crescimento foram identificados durante diferentes fases de reparo de fraturas ósseas experimentais (LIEBERMAN et al., 2002). Avaliando-se esses fatores de crescimento, pôde-se concluir que eles são potenciais agentes terapêuticos para acelerar o reparo de defeitos ósseos. Entre estes polipeptídeos, pode-se citar a família do Fator de Crescimento Transformador- β (TGF- β), as Proteínas Ósseas Morfogenéticas (BMPs), o Fator de Crescimento de Fibroblasto (FGF), o Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas e suas isoformas (PDGF-AA, PDGF-BB e PDGF-AB) e o Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF). Dentre estes fatores, o PDGF e o TGF- β são liberados, principalmente, pelos grânulos α plaquetários (LIEBERMAN et al., 2002).

Estudos em culturas de células mostraram um importante papel do PDGF no processo de regeneração tecidual. Dentre suas habilidades, são contundentes a capacidade de estimular a quimiotaxia, promover a ativação celular e aumentar a proliferação de fibroblastos e osteoblastos (LYNCH et al., 1987; MATSUDA et al., 1992). A administração de PDGF exógeno permitiu o reparo ósseo de fraturas em tíbia (NASH et al., 1994) e defeitos de tamanho crítico (DTC) em calvária de coelhos (VIKJAER et al., 1997). Algumas evidências sugerem, também, que o PDGF pode aumentar o reparo e a regeneração periodontal (PARK et al., 1995).

O papel de TGF- β no reparo ósseo foi estudado nos modelos experimentais que envolvem injeções subperiosteais em fêmur (JOYCE et al., 1990) e calvária (NODA; CAMILLIERE, 1989) de ratos, DTC em tíbias de coelhos (LIND et al., 1993) e dispositivos protéticos para crescimento ósseo em cães (SUMNER et al., 1995). A mais importante função do TGF- β parece ser a promoção da quimiotaxia de precursores de osteoblastos e o controle da diferenciação de osteoblastos *in-vivo* (DUCY et al., 2000). TGF- β também aumenta a

proliferação de células mesenquimais indiferenciadas *in-vitro* e induz a formação óssea a partir destas células *in-vivo* (CASSIEDE et al., 1996).

Posto que o PDGF e TGF- β podem agir de diversos modos no processo de cicatrização das feridas, pode-se pressupor que a combinação destes fatores de crescimento é capaz de resultar em um estímulo sinérgico de diferentes funções metabólicas (YAZAWA et al., 2004b). Alguns estudos mostraram resultados satisfatórios após o uso da combinação de PDGF-BB e TGF- β 1 (PFEILSCHIFTER et al., 1990; LIND, 1998). De fato, estes fatores combinados podem realmente aumentar a vascularização dos tecidos, promover a proliferação de fibroblastos, elevar a taxa de colágeno, acelerar a formação de tecido de granulação e realçar a osteogênese (LOZADA et al., 2001).

Sem dúvida, a aplicação clínica dos fatores do crescimento tem o potencial de melhorar significativamente o tratamento dos defeitos ósseos. Entretanto, a purificação destes compostos ou a produção dos mesmos através da tecnologia do DNA recombinante são processos que envolvem elevados custos financeiros (MARLOVITS et al., 2004). Assim, há uma constante busca por sistemas apropriados que permitam ao cirurgião-dentista ou médico utilizar os fatores de crescimento aplicando técnicas bem sucedidas da engenharia tecidual, com menor custo e morbidade.

Uma das estratégias propostas é acelerar e otimizar os efeitos dos fatores de crescimento contidos nas plaquetas (YAZAWA et al., 2004b). As plaquetas podem proporcionar uma combinação simultânea de múltiplos fatores de crescimento no microambiente das células ósseas, trazendo benefícios que superam o uso isolado destes polipeptídeos (MARLOVITS et al., 2004).

Um aparente sucesso dos concentrados de plaquetas tem sido relatado nas áreas de otorrinolaringologia, oftamologia, cirurgia de cabeça e pescoço, neurocirurgia e cirurgia cardíaca. Vários autores mostraram que a reinfusão de concentrados de plaquetas autógenos

durante cirurgias cardíacas abertas reduziu a perda de sangue no trans e pós-operatório, bem como evitou a transfusão de produtos homogêneos (MISUMI et al., 1995; YAMAMOTO et al., 1996). Saindo do campo dos benefícios hemostáticos e passando para o lado regenerativo, o gel de plaquetas tem sido utilizado, por exemplo, em cirurgias oftalmológicas para fechamento de buracos de mácula (GAUDRIC et al., 1995; KOROBELNIK et al., 1996; MINIHAN et al., 1997).

A partir desses conhecimentos, Whitman et al. (1997) propuseram uma modificação da antiga cola de fibrina, que já vinha sendo usada com resultados clínicos satisfatórios, especialmente como um potencial carreador para materiais de enxerto no tratamento de defeitos ósseos maxilo-faciais. A cola de fibrina funcionava apenas como uma matriz para a reconstrução tecidual. Assim, Whitman et al. (1997), buscando a excelência da regeneração e observando as propriedades do coágulo natural, propuseram o uso de uma cola de fibrina autógena associada a fatores de crescimento, o denominado Plasma Rico em Plaquetas (PRP).

O PRP é usado como uma tentativa de enriquecer o coágulo natural. Enquanto este último contém 95% de células vermelhas, 4% de plaquetas e 1% de células brancas, o PRP possui 4% de células vermelhas, 95% de plaquetas e 1% de células brancas (DINATO et al., 2001). A alta concentração de plaquetas e, conseqüentemente, de fatores de crescimento consolidam o segundo dos três pilares essenciais para a regeneração dos tecidos, ou seja, a presença de moléculas sinalizadoras.

Os fatores de crescimento presentes no PRP incluem os três isômeros do Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas (PDGF-AA, PDGF-BB e PDGF-AB), dois dos numerosos Fatores de Crescimento Transformadores- β (TGF- β 1 e TGF- β 2), o Fator de Crescimento Endotelial Vascular e o Fator de Crescimento Epitelial (WHITMAN et al., 1997; MARX et al., 1998). Além destas substâncias, o PRP contém fibrina, fibronectina e vitronectina. Estas proteínas são capazes de favorecer a adesão celular e atuam como uma

matriz para a formação de osso, tecido conjuntivo e epitélio (MARX, 2004). A presença de leucócitos em sua constituição também lhe confere uma resistência natural aos processos infecciosos e/ou alérgicos (MARX; GARG, 1999).

O PRP é um composto autógeno, seguro, livre de riscos relativos à transmissão de doenças ou desenvolvimento de reações antigênicas. Sua ação é marcada pelo aumento (mitogênese) de células responsáveis pela regeneração dos tecidos perdidos e pelo estímulo do crescimento vascular (angiogênese) (MARX, 2001).

2. *A* técnica

A técnica de obtenção do PRP, segundo Whitman et al. (1997), envolve a coleta pré-operatória imediata de sangue total do paciente, aproximadamente 450 ml, diretamente para uma bolsa de coleta contendo o anticoagulante citrato-fosfato-dextrose. O sangue é, inicialmente, centrifugado (Elmd-500 Autotransfusion system, Medtronic Electromedic, Parker, CO, USA) à 5600 rpm para separar o Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) dos eritrócitos e do “buffy coat”, que contém plaquetas e leucócitos. A velocidade da centrífuga é então reduzida para 2400 rpm, a fim de permitir uma separação adicional do “buffy coat”, suspenso em 30 ml de plasma, da camada de células vermelhas. Quantidades de plaquetas no PRP em torno de 500.000 a 1.000.000 são rotineiramente obtidas com esta técnica.

O PRP é armazenado até que o cirurgião esteja pronto para seu uso. Uma vez preparado o leito cirúrgico, o PRP é misturado com trombina bovina (10.000 unidades) dissolvida em 10 ml de cloreto de cálcio a 10%. Dentro de 5 a 30 segundos, o conteúdo assume a consistência de um gel, o que facilita a sua aplicação (WHITMAN et al., 1997).

Em cirurgia buco-maxilo-facial, Whitman et al. (1997) mostraram a utilização do PRP associado a procedimentos ressectivos, reconstrução mandibular, reparo do processo alveolar na presença de fístulas, levantamento de seio maxilar e colocação de implantes osseointegráveis. Melhor condensação e estabilização do material de enxerto e um reparo ósseo mais rápido são algumas das vantagens clínicas observadas com o uso do PRP.

Os reais benefícios do PRP no reparo ósseo puderam ser melhor evidenciados somente com o trabalho de Marx et al. (1998). Estes autores estudaram, em 88 pacientes, a combinação de PRP e enxertos ósseos medulares no tratamento de defeitos mandibulares contínuos, com 5 a 6 cm, resultantes da remoção de tumores benignos e malignos. Os resultados deste estudo mostraram maturação mais rápida dos enxertos com PRP (1,16 a 2,16 vezes), bem como uma maior densidade óssea dos mesmos quando comparados aos enxertos sem PRP. A contagem de plaquetas de todas as amostras de sangue mostrou um aumento de 338% de plaquetas no PRP em relação ao sangue periférico dos pacientes. Com a utilização de anticorpos monoclonais, foi possível identificar fatores de crescimento presentes no PRP, especificamente PDGF e TGF- β , como também a presença de receptores para estes fatores na células dos enxertos.

A presença de quantidades aumentadas de PDGF e TGF- β justifica, sem dúvida, um processo de maturação mais rápido do enxerto medular combinado com altas concentrações plaquetárias. O modo de ação destes fatores de crescimento nos mecanismos de regeneração tecidual envolvendo enxertos ósseos foi descrito detalhadamente por Marx et al. (1998). Um enxerto medular celular esponjoso, seja para um defeito da continuidade mandibular, uma fenda alveolar ou uma cirurgia para levantamento de seio maxilar, é colocado em um espaço morto, preenchido com sangue coagulado. O espaço morto da ferida é hipóxico ($pO_2 = 5-10$ mm Hg), acidótico (pH = 4-6) e contém plaquetas, leucócitos, células sangüíneas vermelhas e fibrina em um complexo coágulo adjacente aos osteoblastos endosteais, osteócitos e células

mesenquimais medulares transferidos. Do lado externo ao periósteo que recobre o espaço da ferida, o tecido é fisiologicamente normal, sendo normóxico ($pO_2 = 45-55$ mm Hg) e com pH fisiológico ($pH = 7.42$). Além disso, contém uma população muito pequena de células tronco, capilares cortados com coágulos e células endoteliais expostas.

O reparo ósseo começa com a liberação de PDGF e TGF- β através da degranulação das plaquetas no enxerto. O PDGF estimula a mitogênese das células tronco-medulares e osteoblastos endosteais transferidos com o enxerto. A mitose de células endoteliais também é estimulada. O TGF- β , inicialmente, ativa a mitose de fibroblastos e pré-osteoblastos e promove a diferenciação destes últimos em osteoblastos maduros. A secreção contínua de TGF- β influencia os osteoblastos e fibroblastos a depositarem, respectivamente, matriz óssea e colágena para suportar a invaginação de capilares. Estas atividades iniciam-se imediatamente após o fechamento da ferida. Por volta do terceiro dia, capilares podem ser vistos penetrando no enxerto, sendo que aos 14 ou 17 dias, todo o enxerto encontra-se permeado por capilares.

A vida média de uma plaqueta em uma ferida e o período de influência direta de seus fatores de crescimento é menor do que cinco dias. A atividade de reparo ósseo é, então, completada por outros dois mecanismos. O primeiro é o aumento e diferenciação de células tronco-medulares em osteoblastos, que também secretam TGF- β . O segundo e mais dominante mecanismo parece ser a quimiotaxia e ativação de macrófagos que substituem as plaquetas como fonte primária de fatores de crescimento após o terceiro dia. O macrófago é atraído ao enxerto pelas ações do PDGF e por um gradiente de oxigênio, maior do que 20 mm Hg, entre o espaço morto do enxerto e o tecido normal adjacente. De fato, a hipóxia inerente ao enxerto, em torno de 5 a 10 mm Hg, estabelece um gradiente de oxigênio de 30 a 40 mm Hg adjacente aos tecidos normóxicos, os quais possuem 45 a 55 mm Hg.

À medida que a influência do PDGF diminui, os fatores de crescimento angiogênicos e fatores de crescimento derivados do macrófago o substituem. Estes fatores são idênticos ao PDGF. A única diferença é que eles são sintetizados por macrófagos e não por plaquetas. Além dos macrófagos, é preciso considerar que as células tronco-medulares continuarão a secretar TGF- β para estimular a formação óssea. Por volta de 4 semanas, a revascularização completa do enxerto elimina o gradiente de oxigênio necessário para manter a atividade de macrófagos. Assim, os macrófagos deixam a área, não sendo mais requeridos pelo enxerto que se torna, então, um tecido imaturo, porém auto-sustentado.

A maturação total do enxerto envolve um terceiro e último grupo de fatores de crescimento, as BMPs. Assim que a matriz óssea é formada e mineralizada pelos osteoblastos, as BMPs são depositadas dentro desta matriz. As BMPs são, então, liberadas pela reabsorção osteoclástica no processo de remodelação do osso. As BMPs liberadas agem sobre as células tronco adjacentes, promovendo o aumento e diferenciação das mesmas em osteoblastos funcionais, capazes de secretarem, ativamente, matriz óssea. Dessa forma, o enxerto progride para um osso funcional maduro, que se auto-mantém através de um ciclo normal de remodelação e reabsorção.

Observando o processo de reparo ósseo descrito acima, percebe-se que todo o processo tem início, basicamente, com a formação de um coágulo de fibrina, agregação plaquetária e liberação do conteúdo dos grânulos α plaquetários. O sucesso da técnica de Marx et al. (1998) consistiu, justamente, na utilização aumentada de constituintes naturais do coágulo sanguíneo (fibrina e plaquetas) a partir do PRP. A combinação de células especializadas transferidas juntamente com os enxertos ósseos, uma matriz de fibrina e potentes moléculas sinalizadoras, princípios fundamentais da Engenharia Tecidual, tornou possível a reconstrução dos tecidos perdidos (MARX et al., 1998).

A partir dos promissores resultados do estudo de Marx et al. (1998), o PRP destacou-se, no campo odontológico, como um agente capaz de potencializar os caminhos naturais da regeneração tecidual de forma segura e barata. O interesse inicial concentrou-se, então, nas formas de produção deste composto.

Segundo Whitman et al. (1997) e Marx et al. (1998), o PRP é obtido através do método de separação celular descontínua e o volume de sangue utilizado é de aproximadamente 450 ml. Entretanto, este protocolo é limitado pela tecnologia empregada e pelo volume de sangue necessário, ficando restrito a institutos de transfusão de sangue ou ambiente hospitalar (TOZUM; DEMIRALP, 2003).

Assim, a produção do PRP em pequenas quantidades, usando-se centrífugas de bancada controladas eletronicamente, tornou-se uma técnica mais atrativa em função do baixo custo de produção envolvido e da possibilidade de execução em ambiente ambulatorial e consultórios dentários (WEIBRICH et al., 2003).

Surgiram, portanto, diversos protocolos simplificados para produção do PRP. Diferentes velocidades e tempos de centrifugação do sangue foram testados e recomendados. No protocolo de Anitua (1999), por exemplo, o sangue é colhido antes da anestesia do paciente em tubos de 5 ml contendo 10% de solução de citrato de sódio a 3,8% como anticoagulante. Os tubos são centrifugados a 160 G por 6 minutos em temperatura ambiente, promovendo a separação do sangue em três componentes: células vermelhas do sangue, que se depositam no fundo do tubo; PRP, localizado no meio do tubo; e PPP, na porção superior do tubo. O autor recomenda a pipetagem do composto em duas etapas. Inicialmente, 1ml do plasma da parte superior de cada tubo (PPP) é pipetado e separado. Este composto contém apenas 15% das plaquetas do sangue total. Logo em seguida, o plasma remanescente dos tubos de 5ml é coletado, incluindo 1 a 2 mm da porção superior de células vermelhas e

armazenado em outro recipiente. Este último corresponde ao PRP e contém altas concentrações de plaquetas.

O PRP também pode ser obtido, em ambulatório, através do protocolo proposto por Sonnleitner et al. (2000). De acordo com estes autores, o sangue deve ser colhido através de punção venosa e acondicionado em tubos a vácuo contendo citrato de sódio como anticoagulante. Os tubos são primeiramente centrifugados a 160 G por 20 minutos, resultando na divisão do sangue em três componentes básicos, conforme o protocolo de Anitua (1999). Para maximizar a concentração de plaquetas, os autores enfatizaram a necessidade de marcar-se um ponto, localizado de 6 a 8 mm aquém da linha que separa o plasma das células vermelhas do sangue. Todo líquido acima deste ponto deve ser pipetado e acondicionado em um outro tubo, sem anticoagulante, para uma segunda centrifugação a 400 G por 15 minutos. Após esta segunda centrifugação, obtém-se o PRP.

Landesberg et al. (2000) também propuseram um protocolo de dupla centrifugação, semelhante ao protocolo de Sonnleitner et al. (2000). Entretanto, neste protocolo, os autores recomendaram que tanto a primeira como a segunda centrifugação do sangue fosse de 200 G por 10 minutos.

Analisando-se o desenvolvimento dos vários protocolos simplificados para obtenção do PRP conclui-se que houve uma euforia inicial no uso desta biotecnologia, o que fez com que vários detalhes técnicos envolvidos na sua produção fossem negligenciados. Somente com o amadurecimento científico neste campo de pesquisa, estes detalhes, tais como o tipo de centrífuga, o anticoagulante usado nos sistemas de coleta de sangue, a velocidade de centrifugação selecionada, a quantidade e tipo de fatores de crescimento existentes e o número de plaquetas presentes (EFEUGLU et al., 2004), dentre outros, passaram a ser cuidadosamente observados nas investigações atuais como parâmetros determinantes da

correlação existente entre a qualidade do concentrado de plaquetas e o efeito biológico proporcionado.

O PRP atua acelerando o processo de regeneração tecidual através da degranulação dos grânulos α das plaquetas, os quais contêm fatores de crescimento. A secreção ativa destes fatores é iniciada 10 minutos após a formação do coágulo sangüíneo e mais de 95% deles são secretados na primeira hora após a coagulação do sangue (MARX, 2004). Percebe-se, portanto, que alterações na quantidade de plaquetas podem resultar em maiores ou menores concentrações de fatores de crescimento que modularão diretamente a reconstrução dos tecidos perdidos (FREYMILLER; AGHALOO, 2004).

Dentro dos grânulos α plaquetários, os fatores de crescimento permanecem em um estado incompleto. Assim que o processo de coagulação é ativado, os fatores de crescimento são secretados através da membrana celular. Neste processo, os grânulos α fundem-se com a membrana plaquetária, através da qual os fatores de crescimento protéicos são completados, mudando para um estado bioativo pela adição de carboidratos. Portanto, qualquer dano às plaquetas durante o processamento do PRP fará com que as mesmas secretem fatores de crescimento que não se encontram em um estado bioativo, o que pode resultar em efeitos clínicos desapontadores (MARX, 2004).

Como visto, alterações qualitativas e/ou quantitativas nas plaquetas podem afetar diretamente o poder regenerativo do PRP. Em relação à quantidade de plaquetas, Liu et al. (2002) mostraram que a proliferação de fibroblastos e a produção de colágeno tipo I foram aceleradas dependendo da quantidade de plaquetas utilizada nos meios de cultura. Marx (2004) define, então, como um “PRP terapêutico” aquele que possui aproximadamente 1.000.000 de plaquetas/ μ l, considerando que os seres humanos apresentam cerca de 200.000 \pm 75.000 plaquetas/ μ l no sangue periférico. Estudos em animais demonstraram, também, que esta concentração de plaquetas é capaz de acelerar o reparo ósseo. Kim et al. (2002a) e

Weibrich et al. (2004) confirmaram que esta dose de plaquetas/ μ l no PRP demonstrou-se eficaz na aceleração da formação óssea em cães e coelhos.

De acordo com o estudo de Weibrich et al. (2004), o PRP que apresentou aproximadamente 1.000.000 de plaquetas/ μ l foi capaz de acelerar a formação óssea ao redor de implantes de titânio inseridos em fêmur de coelhos. De modo inverso, o grupo que recebeu o PRP com concentrações plaquetárias menores que 1.000.000 de plaquetas/ μ l não exibiu nenhuma vantagem, em termos de aceleração da formação óssea, sobre o grupo controle. Concentrações maiores de plaquetas (1.845.000 a 3.200.00 plaquetas/ μ l) foram capazes de, inclusive, inibir a formação óssea.

Uma investigação dos protocolos de obtenção do PRP disponíveis na literatura mostrou que nem todas as técnicas garantem adequadas concentrações plaquetárias (MARX, 2004). Os protocolos de Anitua (1999) e Landesberg et al. (2000) revelaram aumentos nas concentrações de plaquetas de apenas 190% e 150% respectivamente (MARX, 2004). Uma possível explicação para a baixa concentração de plaquetas obtida com o protocolo de Anitua (1999) seria o fato de haver uma única centrifugação do sangue no processo de preparação do PRP. De acordo com Marx (2001), para que se possa verdadeiramente concentrar plaquetas do sangue autógeno, o protocolo selecionado deve utilizar dupla centrifugação. A primeira centrifugação (chamada também de centrifugação pesada) separará a maioria das células vermelhas do plasma, o qual contém plaquetas, leucócitos e fatores da coagulação. A segunda centrifugação (chamada de centrifugação leve) refina a amostra, separando as plaquetas do plasma, juntamente com leucócitos e uma pequena quantidade de células vermelhas. Esta segunda centrifugação, livre do grande número de células vermelhas presentes no momento da primeira centrifugação, produz o PRP e o separa do PPP. Portanto, de acordo com Marx (2001), protocolos de única centrifugação não produzem PRP, mas sim uma mistura de PPP e PRP que tem revelado baixas concentrações plaquetárias.

Não só o número de centrifugações é importante no preparo do PRP, mas também a força de rotação selecionada. No protocolo de Landesberg et al. (2000), recomenda-se a utilização de centrifugações a 200 G por 10 minutos, o que proporcionou um aumento médio na concentração de plaquetas de $205.7\% \pm 22.2$. Efeoglu et al. (2004) fizeram uma modificação deste protocolo, alterando as forças de rotação e tempo de preparo das amostras de sangue em coelhos. Com uma centrifugação inicial do sangue a 300 G por 10 minutos e uma segunda centrifugação de 5000 G por 5 minutos, foi possível obter o PRP com um aumento médio de 429% de plaquetas em relação à quantidade de plaquetas encontradas no sangue periférico.

É preciso ressaltar que as forças mecânicas usadas no preparo do PRP podem, também, ativar precocemente as plaquetas, levando à liberação dos fatores de crescimento e, conseqüentemente, perda dos mesmos no plasma sobrenadante durante o processo de centrifugação, comprometendo a eficiência terapêutica do PRP (DUGRILLON et al., 2002).

Dugrillon et al. (2002) mostraram em seu estudo que, embora a concentração de plaquetas tenha aumentado proporcionalmente quando forças de 400 G e 1200 G foram utilizadas, a quantidade de TGF- β 1 não aumentou após centrifugações maiores que 800 G. Os autores concluíram que forças superiores a esta promoveram a ativação das plaquetas, com liberação e conseqüente perda dos fatores de crescimento.

Partindo do princípio de que um determinado número de plaquetas pode não corresponder à quantidade de fatores de crescimento presentes, Weibrich et al. (2002a) investigaram a correlação existente entre a idade do doador, sexo e quantidade de plaquetas com os níveis de fatores de crescimento nas amostras de PRP. Os autores, contrariamente aos estudos de Weibrich et al. (2002b) e Yazawa et al. (2004a), não encontraram nenhuma correlação entre a quantidade de plaquetas e de fatores de crescimento, bem como nenhuma influência do sexo e idade nestas variáveis. Alertaram, então, que o número de plaquetas, um

dos critérios primordiais no controle de qualidade das amostras de PRP, não é um parâmetro confiável para prever seguramente a quantidade de fatores de crescimento.

A eficiência do PRP depende, indubitavelmente, do nível de fatores de crescimento presentes. Assim, a determinação dos níveis destes fatores é fundamental para assegurar a validade terapêutica do PRP antes de qualquer aplicação clínica (WEIBRICH et al., 2002a). Entretanto, o alto custo dos testes envolvidos e o tempo necessário para este tipo de análise são fatores que dificultam o uso clínico rotineiro destes testes (DUGRILLON et al., 2002).

Recomenda-se que o PRP seja preparado no máximo até 6 horas antes da cirurgia e seu uso tem que ser imediato após a ativação (MARX et al., 1998). Isto dificulta a avaliação da qualidade do PRP produzido. Para contornar estes problemas, FÜRST et al. (2004a, 2004b) propuseram a utilização do Plasma Rico em Fatores de Crescimento (PRGF), obtido a partir do sobrenadante do PRP após centrifugação das plaquetas ativadas. Como vantagem deste composto, os autores citaram a possibilidade de utilizar-se sangue alogênico, já que não existem membranas plaquetárias e, portanto, nenhum risco de reações imunológicas. Ressaltaram, ainda, a vantagem de poder armazenar o PRGF após o seu preparo, possibilitando a realização de testes que assegurem a sua qualidade antes da aplicação clínica. Entretanto, em seus estudos experimentais, nenhum benefício adicional foi obtido na quantidade de formação óssea em relação aos grupos controles, quando o PRGF foi usado para tratamento de defeitos mandibulares de mini-porcos (FÜRST et al. 2004a, 2004b).

A despeito das dificuldades existentes para mensurar o nível de fatores de crescimento presentes no PRP antes de sua utilização clínica e da inexistência de uma correlação segura entre a quantidade de plaquetas e fatores de crescimento (WEIBRICH et al., 2002a; WEIBRICH et al, 2003), sistemas padronizados para o preparo do PRP surgiram no mercado com o objetivo de produzir amostras com melhor potencial terapêutico.

Entre os sistemas comercialmente disponíveis, encontra-se o SmartPreP[®] (Harvest Technologies Inc, Plymouth, MA, USA), o Curasan PRP Kit[®] (Curasan, Kleinostheim, Germany) e o Platelet Concentrate Collection System - PCCS[®] (3i Implant Innovations, Palm Beach Gardens, FL, USA). Estes sistemas são acompanhados de dispositivos especiais de coleta de sangue e alguns deles possuem, ainda, modelos específicos de centrífugas.

Marx (2004) relata que apenas os sistemas PCCS[®] e SmartPreP[®] são aprovados pelo FDA. De acordo com os testes realizados por este autor, os aumentos médios nas concentrações de plaquetas obtidos com os sistemas PCCS[®] e SmartPreP[®] foram de 324% e 404%, respectivamente. A quantidade de fatores de crescimento também mostrou-se em níveis satisfatórios tanto para o PCCS[®] (PDGF-AB 103 ± 27 ng/ml; TGF- β $144 \pm 31,1$ ng/ml) como para o SmartPreP[®] (PDGF-AB $133 \pm 29,2$ ng/ml; TGF- β $170 \pm 42,3$ ng/ml).

Em uma comparação dos sistemas PCCS[®] e Curasan[®], sangue foi coletado de doadores saudáveis e o PRP foi preparado de acordo com as recomendações de cada sistema. Concentrações mais altas de plaquetas foram obtidas com o PCCS[®] (WEIBRICH et al., 2002b; WEIBRICH; KEIS, 2002). Estes achados foram corroborados por Marx (2004) que também mostrou menores aumentos nas concentrações de plaquetas (139%) quando o método Curasan[®] foi usado.

Com relação à quantidade de fatores de crescimento, nas investigações de Weibrich et al. (2002b), a quantidade de fatores obtida com o método PCCS[®] (PDGF-AB 251.8 ng/ml; TGF- β 1 46.7 ng/ml) e com o método Curasan[®] (PDGF-AB 314.1 ng/ml; TGF- β 1 79,7 ng/ml) foram diferentes daquelas reportadas por Marx (2004). De maneira peculiar neste estudo de Weibrich et al. (2002b), estas concentrações pareceram, também, ter uma correlação com a quantidade de plaquetas ou leucócitos obtidos com ambos os sistemas. A maior quantidade de plaquetas no PRP (PCCS[®] 2.232.500 plaquetas/ μ l; Curasan[®] 1.140.500 plaquetas/ μ l) estava correlacionada com um nível mais alto de TGF- β 1, enquanto que maiores taxas de leucócitos

(PCCS[®] 15.300 leucócitos/ μ l; Curasan[®] 33.150 leucócitos/ μ l) tinham uma correlação, apesar de menor, com níveis mais altos de PDGF-AB. Isto sugere que diferentes fontes destes fatores de crescimento (plaquetas, leucócitos e plasma) estão presentes no PRP, sendo necessários estudos adicionais a este respeito.

A quantidade exata de fatores de crescimento necessária para um relevante efeito biológico ainda não foi determinada (WEIBRICH et al., 2003). Os números considerados satisfatórios são baseados em estudos *in-vitro* ou aplicações de fatores isolados em modelos animais (MUSTOE et al., 1987; PIERCE et al., 1989; BECK et al., 1991). Estes modelos, porém, não representam o que de fato ocorre no PRP, ou seja, múltiplos fatores agindo simultaneamente, com efeitos sinérgicos uns sobre os outros. Lynch et al. (1989) aplicaram PDGF, TGF- β e TGF- α , Fator de Crescimento Endotelial (EGF), FGF e IGF-I em várias combinações para determinar os efeitos destes fatores na cicatrização de feridas em pele de porcos. O efeito sinérgico de PDGF (500 ng) e IGF-I (250 ng) foi ótimo na taxa de 2:1 e superior à aplicação de PDGF (500 ng) ou TGF- β 1 (250 ng) isolados. Portanto, doses menores de alguns fatores no PRP podem resultar nos mesmos efeitos biológicos que grandes quantidades de fatores isolados (YAZAWA et al., 2004a). No PRP, inclusive, a própria membrana plaquetária por si só promove a mitose de alguns tipos celulares (GRUBER et al., 2002).

Além do modelo de centrifuga, da velocidade de centrifugação, da quantidade de plaquetas e dos níveis dos fatores de crescimento, um outro fator extremamente importante no processamento do PRP é o anticoagulante selecionado para a coleta do sangue. Algumas dessas substâncias podem danificar as plaquetas (LANDESBURG et al., 2000).

Entre os anticoagulantes usados para a coleta do sangue, o Ácido Etilenodiaminotetraacético (EDTA) a 15% promove níveis mais altos de plaquetas durante o preparo do PRP quando comparado ao citrato de sódio. Esta é a conclusão do estudo de Landesberg et al.

(2000), mas é preciso considerar que, nas amostras de EDTA, a microscopia de luz revelou plaquetas com superfícies alteradas e consideráveis restos não-celulares suspensos. Segundo os autores, embora o citrato de sódio tenha proporcionado menor rendimento plaquetário, as amostras de PRP com este anticoagulante apresentavam plaquetas íntegras e em quantidades suficientes para a formação de um bom coágulo.

O citrato de sódio inibe o processo de coagulação do sangue ligando-se aos íons de cálcio e formando um composto químico chamado quelato. Este anticoagulante não altera a membrana das plaquetas, permitindo que o estado anticoagulado da amostra possa ser revertido para um estado coagulado pela adição de uma solução de cloreto de cálcio. (ANITUA, 1999). Além disso, a ativação das plaquetas durante os procedimentos de coleta do sangue com citrato de sódio é menor quando comparada com as amostras coletadas com EDTA (EFEOGLU et al., 2004).

Marx (2001) afirma que existem apenas dois anticoagulantes capazes de sustentarem o metabolismo das plaquetas: o Ácido Citrato Dextrose-A (ACD-A) e o Citrato Fosfato Dextrose (CPD). Nestes compostos, o citrato, como anteriormente mencionado, liga-se ao cálcio para impedir a coagulação do sangue, enquanto a dextrose e outros ingredientes sustentam o metabolismo plaquetário. De acordo com Marx (2001), ambos são efetivos, mas o ACD-A é preferido por manter a viabilidade das plaquetas de forma mais significativa, sendo também o anticoagulante de escolha para o estoque de plaquetas em bancos de sangue. O CPD, embora bastante útil, é 10% menos efetivo do que o ACD-A na manutenção da viabilidade plaquetária.

É importante destacar que o meio de coleta de sangue e o acesso escolhido para isso podem interferir nos parâmetros hematológicos das amostras, produzindo hematócritos variados e severos graus de hemólise (SUBER; KODELL, 1985; SMITH et al., 1986; NEMZEK et al., 2001). Estes fatores devem ser levados em consideração nos estudos

envolvendo a utilização do PRP, uma vez que podem comprometer a sua qualidade. A estocagem do sangue centrifugado ou não até seu uso clínico é outro fator importante, pois se armazenado em baixas temperaturas, podem ocorrer alterações na contagem de plaquetas (OLSEN et al., 2001). Estas alterações são ainda mais acentuadas se a coleta de sangue foi realizada no trans-operatório ou se houve demora na separação do PPP e PRP após a centrifugação (MARX, 2001).

No momento da aplicação clínica do PRP, é necessário que a amostra anticoagulada passe para um estado coagulado. A obtenção desse coágulo é importante para que ocorra a liberação dos fatores de crescimento dos grânulos α plaquetários e formação de uma rede de fibrina, mecanismos pelos quais o PRP agirá na regeneração dos tecidos perdidos (MARX et al., 1998, 2001, 2004).

Assim como na coleta de sangue, a substância utilizada neste processo de coagulação da amostra não deve danificar ou promover a lise das plaquetas, mas apenas iniciar uma atividade biológica. Quando uma substância promove a lise das plaquetas, como o NP40[®] (Calbiochem, Darmstadt, Germany) por exemplo, a mensuração dos níveis de fatores de crescimento presentes na amostra acusará altas doses, porém estes fatores não se encontrarão em um estado bioativo (YAZAWA et al., 2004b).

Diversos agentes podem ser usados para promover a coagulação do PRP, como a trombina bovina, solução de cloreto de cálcio, agente ITA[®] e, mais recentemente, o peptídeo ativador do receptor de trombina (TRAP) e trombina humana (MARX et al., 1998; ANITUA, 1999; LANDESBURG et al., 2000; LANDESBURG et al., 2005; DE SOMER et al., 2005).

Marx et al. (1998) preconizaram a formação do gel de PRP pela adição de trombina bovina (10.000 unidades) dissolvida em 10 ml de cloreto de cálcio a 10%. A preocupação com a possibilidade de desenvolvimento de coagulopatias a partir do uso da trombina bovina fez com que Landesberg (1998) questionasse a segurança do uso desta substância. Segundo a

autora, as preparações de trombina bovina têm restos de fator V da coagulação que podem estimular negativamente o sistema imune humano a combaterem o próprio fator V do organismo. Este fenômeno parece não ser dose dependente, fazendo com que muitos cirurgiões evitem o uso da trombina em cirurgias neurais e cardíacas.

A literatura traz relatos de coagulopatias quando da exposição à trombina bovina. Cmolik et al. (1993) relataram um acompanhamento de nove pacientes durante 32 meses, os quais apresentaram deficiência do fator V induzida pelo uso de trombina bovina após cirurgia cardíaca. A coagulopatia foi caracterizada por tempos de protrombina (TP) e tromboplastina parcial ativada (TTPa) marcadamente elevados e níveis extremamente diminuídos do fator V e XI. Dos nove pacientes, quatro desenvolveram sangramento coagulopático, sendo que um evoluiu a óbito. Spero (1993) também relatou uma série de três casos de pacientes que desenvolveram anticorpos para o fator de coagulação V, induzidos por trombina bovina, após procedimentos neurocirúrgicos.

Assim, Landesberg et al. (2000) estudaram uma alternativa para substituir o uso da trombina bovina na formação do gel de PRP. Os autores compararam os níveis de fatores de crescimento de amostras de PRP coaguladas com uma solução de cloreto de cálcio associada à trombina bovina ou a partir de um Agente de Geleificação ITA[®] (Nastrex Technologies Inc, Greenville, NC). Os dois produtos utilizados para a formação do gel de PRP promoveram níveis estatisticamente iguais de PDGF e TGF- β . A consistência e tamanho dos coágulos formados com ambos os sistemas também foram semelhantes. O agente ITA[®] foi apontado, então, como um bom substituto da trombina bovina.

Sonnleitner et al. (2000) propuseram o uso do adesivo de fibrina Tissel[®] (Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, IL, USA) para a produção do gel de PRP. Este adesivo é formado por 2 compostos: um concentrado de fibrinogênio, enriquecido com fator XIIIa, e trombina humana associada ao cloreto de cálcio.

Já Anitua (1999), com o mesmo objetivo, relatou a produção do coágulo de PRP unicamente a partir de solução de cloreto de cálcio a 10% na proporção de 50 µl para 1,2 ml de PRP. A não utilização de qualquer componente homogêneo no preparo do PRP preservaria uma de suas principais vantagens, ou seja, sua natureza autógena. A ativação do PRP apenas com cloreto de cálcio foi também facilmente obtida nos estudos de Dugrillon et al. (2002).

Em relação à controvérsia sobre a utilização da trombina bovina no gel de PRP, Marx (2000, 2004) esclareceu que todos os relatos de aparecimento de coagulopatias após exposição cirúrgica à trombina bovina tópica ocorreram em uma época em que a trombina era processada com alto teor de contaminação do fator V bovino. A concentração deste contaminante, que se situava em torno de 50 a 100 µl/ml em 1993 e 1994, foi reduzida pela adição de etapas de purificação, sendo atualmente menor que 0,2 µl/ml. Além disso, nos casos onde ocorreu o desenvolvimento de coagulopatias, os preparados de trombina bovina foram usados em altas doses (maior que 10.000 unidades) e aplicados diretamente em feridas abertas onde ocorria a absorção pela circulação sistêmica. Já no PRP, doses muito menores são empregadas (menor do que 200 unidades de trombina bovina) e o composto entra em contato com os tecidos humanos no estado coagulado, descartando qualquer possibilidade de absorção pela circulação sistêmica. Todas as substâncias remanescentes são digeridas por macrófagos, assim como o próprio coágulo.

Marx (2000) relatou, ainda, ter utilizado a trombina bovina tópica para formar o gel de PRP em 312 pacientes, que não apresentaram nenhum tipo de desenvolvimento de coagulopatias. Destes pacientes, 136 tiveram, inclusive, TP monitorados nas primeiras duas semanas e 16 deles foram avaliados quanto à presença de anticorpos do fator V anti-humano pré e pós-tratamento com PRP. O autor ratificou, portanto, a indicação e a validade do uso da trombina bovina tópica associada ao PRP, uma vez que são remotos os riscos de

antigenicidade, o coágulo de PRP obtido é de natureza mais consistente e o tempo de formação do gel é menor.

Apesar dos esclarecimentos de Marx, alguns autores ainda são relutantes quanto ao uso da trombina bovina e continuam buscando alternativas para este composto. Recentemente, Landesberg et al. (2005) estudaram a ação do TRAP na formação do gel de PRP. O PRP foi preparado pela centrifugação do sangue e coagulado com trombina bovina ou TRAP. Foram monitorados o tempo de coagulação das amostras e o nível de retração do coágulo. O TRAP causou uma menor retração do coágulo (15%) quando comparado à trombina bovina (43%). O tempo de formação do coágulo também foi menor com o TRAP, fazendo deste composto uma alternativa eficaz para a substituição da trombina bovina.

Em relação à retração do coágulo deve-se salientar que uma menor retração evitará a rápida liberação dos fatores de crescimento presentes nas plaquetas, fazendo com que a biodisponibilidade destes polipeptídeos seja prolongada e evitando a perda dos mesmos no interstício tecidual. Além disso, ajudará a manter o enxerto ósseo dentro dos limites do defeito ósseo (LANDESBURG et al., 2005; TSAY et al., 2005).

De Somer et al. (2005), também preocupados com a possibilidade de transmissão de doenças e desenvolvimento de anticorpos, afirmaram que o uso da trombina humana autógena é a única fonte segura para obtenção do gel de PRP. Porém, o preparo desta substância é incômodo e consome parte do PRP. Desse modo, alguns kits têm sido desenvolvidos para produzir trombina autógena a partir do PPP, entre eles o activAT[®] (Dideco, a Sorin Group company, Italy). Uma possível desvantagem desse sistema seria o resto de uma fração de etanol (1,18%) no PRP. De Somer et al. (2005) mostraram, entretanto, que o PRP preparado com este kit e usado para cicatrização de nervos ciáticos dissecados em porcos não causou nenhuma diferença significativa quanto ao infiltrado inflamatório ou necrose de fibras

colágenas quando comparado com os grupos nos quais não foi usado PRP com remanescentes de etanol.

Avaliando-se a história do PRP, pode-se observar a existência de vários estudos que mostraram uma grande sensibilidade da técnica. De fato, são muitos os fatores que devem ser considerados na preparação do PRP para que sua eficácia terapêutica possa ser assegurada. Weibrich et al. (2003) afirmaram que a qualidade do PRP deve ser a principal preocupação do clínicos.

Cada método de preparo do PRP pode resultar em diferenças significativas quanto ao número de plaquetas, taxas de ativação das mesmas e perfil dos fatores de crescimento (EPPLEY et al., 2004). É preciso considerar, também, que, de acordo com alguns estudos (WEIBRICH et al., 2002a; 2003), não existe uma correlação precisa entre o número de plaquetas e o nível de fatores de crescimento. Portanto, para se obter um determinado efeito biológico do PRP, é necessário que ele contenha um determinado número de plaquetas que é variável de indivíduo para indivíduo (WEIBRICH et al., 2002a).

Na verdade, muitos dos estudos avaliando técnicas de obtenção do PRP foram desenvolvidos com o objetivo de tentar elucidar a controvérsia de resultados observada nos trabalhos que analisaram o efeito biológico do PRP. À luz desses conhecimentos, o clínico pode, atualmente, observar de forma crítica os estudos disponíveis na literatura. Todo estudo deveria, fundamentalmente, envolver a produção de um PRP de qualidade para então avaliar os efeitos biológicos produzidos por ele (MARX, 2004).

Neste contexto, a aplicação clínica controlada de um determinado protocolo de produção do PRP ou o estudo deste em modelos animais são de fundamental importância para que se possa, concretamente, mensurar e compreender os seus verdadeiros benefícios biológicos no processo de regeneração tecidual (WEIBRICH et al., 2005).

3. *As Controvérsias*

A reconstrução de defeitos de tecido duro do esqueleto maxilo-facial é um campo marcadamente evolutivo. Enquanto o foco das pesquisas sobre cicatrização em 1980 foi a coleta, manuseio e transplante de células osteocompetentes, o foco do século 21 gira ao redor do uso de fatores de crescimento capazes de estimular e dar suporte àquelas células (CARLSON, 2000).

Pesquisadores no campo da cirurgia buco-maxilo-facial buscam, continuamente, melhorar as técnicas de enxerto ósseo, bem como tentam encontrar meios para se obter uma regeneração dos defeitos existentes com maior densidade óssea e no menor tempo possível (RAGHOEBAR et al., 2005). Foi prometendo estes benefícios, demonstrados no estudo de Marx et al. (1998), que o PRP despontou no campo odontológico como uma nova estratégia regenerativa para acelerar a maturação de enxertos autógenos (BUTTERFIELD et al. 2005).

De acordo com Karring et al. (1999), os vários enxertos e materiais utilizados para o tratamento de defeitos ósseos podem ser divididos em 4 categorias: enxertos autógenos (quando envolve o mesmo indivíduo), aloenxertos (quando envolve indivíduos diferentes geneticamente, porém da mesma espécie), heteroenxertos ou xenoenxertos (quando envolve espécies diferentes) e materiais aloplásticos (materiais inertes, substitutos dos enxertos ósseos). O uso destes enxertos e materiais aloplásticos favorecem o reparo ósseo, pois podem conter células formadoras de osso (osteogênese), servir como suporte para a formação óssea (osteocondução) ou possuir substâncias indutoras da formação óssea (osteoidução).

Sob o ponto de vista da aceitação biológica, o melhor material de enxerto ou transplante é o autógeno, sendo aquele que apresenta o melhor prognóstico. Por isso e,

também, devido ao seu potencial osteogênico, é considerado o “padrão ouro” nos procedimentos regenerativos (KIM et al., 2002a, 2002b; SCHLEGEL et al., 2004; WILTFANG et al., 2004; YAMADA et al., 2004; THORWARTH et al., 2005).

A possibilidade de aumentar o potencial osteogênico destes enxertos com a adição do PRP foi demonstrada de maneira promissora por Marx et al. (1998) na reconstrução de defeitos mandibulares contínuos. Estes benefícios foram confirmados por Oyama et al. (2004) ao mostrarem uma potencialização do reparo ósseo quando enxertos ósseos autógenos com PRP foram utilizados no tratamento de pacientes com fissuras labiais e palatais.

Mazor et al. (2004) relataram redução no período de maturação óssea, melhor manuseio do enxerto e recuperação mais rápida dos tecidos moles quando o PRP foi utilizado juntamente com enxertos ósseos autógenos e implantes osseointegráveis na reabilitação posterior de maxila severamente atrófica de 105 pacientes. Formação e mineralização precoces de osso foram, do mesmo modo, relatadas por Robiony et al. (2002), quando o PRP foi combinado com enxertos ósseos autógenos em procedimentos de distração osteogênica para tratamento de mandíbulas atróficas.

Apesar dos bons resultados clínicos dos estudos anteriores (OYAMA et al., 2004; MAZOR et al., 2004; ROBIONY et al., 2002) a ausência de grupos controle não permitiu uma análise comparativa para uma avaliação apropriada dos verdadeiros benefícios do PRP. Estudos clínicos controlados são necessários para determinar se a adição de PRP aos enxertos ósseos aumenta significativamente ou não a maturação e formação ósseas, conforme demonstrado por Marx et al. (1998).

Seguindo este raciocínio, Raghoobar et al. (2005) propuseram-se a avaliar os efeitos do PRP na formação óssea em levantamento bilateral de seio maxilar, onde um dos lados pode funcionar como controle no mesmo indivíduo. Os autores estudaram o efeito do PRP na remodelação de enxertos ósseos autógenos utilizados para levantamento bilateral de assoalho

de seio maxilar de 5 pacientes. Apenas em um dos lados os enxertos foram associados com PRP. As análises radiográfica e histométrica deste estudo não confirmaram os resultados de Marx et al. (1998), pois nenhum benefício adicional do uso do PRP foi observado. Entretanto, os autores utilizaram defeitos ósseos de tamanho não-crítico (defeitos ósseos que têm capacidade espontânea de reparo) e afirmaram que, em DTC (defeitos de tamanho crítico), como nas reconstruções do estudo de Marx et al. (1998), o PRP poderia ter algum valor terapêutico.

Outros estudos em modelos animais que utilizaram defeitos ósseos não-críticos não mostraram benefícios significativos advindos do uso do PRP associado ao osso autógeno. Jakse et al. (2003) realizaram a elevação do seio maxilar de ovelhas com osso autógeno com ou sem PRP e concluíram que a capacidade regenerativa do PRP aos 6 e 12 meses pós-operatórios foi de baixa potência. Estas conclusões foram corroboradas por Butterfield et al. (2005) que também não mostraram nenhum efeito estimulante direto do PRP na remodelação de enxertos de osso autógeno em levantamentos de seios maxilares de coelhos.

Buscando não utilizar enxertos de osso endocondral, como nas investigações anteriores (JAKSE et al., 2003; BUTTERFIELD et al., 2005), Aghaloo et al. (2002) avaliaram o potencial do PRP no reparo ósseo de defeitos cirúrgicos, também de natureza não-crítica, criados em crânio de coelhos e preenchidos com osso autógeno cortical intramembranoso. Semelhantemente aos outros estudos, as análises radiográfica e histométrica dos espécimes não revelaram nenhuma diferença significativa na formação óssea quando os enxertos foram misturados com PRP ou utilizados isoladamente.

Tentando reproduzir, então, defeitos de natureza crítica, semelhantes àqueles reportados por Marx et al. (1998), Fennis et al. (2002) realizaram um estudo radiográfico em cabras, no qual um total de 28 animais foram submetidos à ressecção do ângulo da mandíbula e divididos em dois grupos, tratados com enxertos obtidos da crista ilíaca associados ou não

ao PRP. Nas avaliações radiográficas, o grupo com PRP mostrou-se significativamente melhor, com maior obliteração dos “gaps” ósseos localizados anterior e posteriormente ao defeito após 6 e 12 semanas, maior formação de calo ósseo em 6 semanas e ausência de reabsorção interna em 12 semanas pós-operatórias.

Os achados histomorfométricos do estudo de Fennis et al. (2004) foram publicados 3 anos depois e confirmaram as informações obtidas através da análise radiográfica. A encapsulação fibrosa dos enxertos foi vista mais frequentemente no grupo não tratado com PRP. Já o grupo tratado com PRP apresentou maior crescimento vascular e preenchimento ósseo do defeito.

Também utilizando defeitos de tamanho crítico, Schlegel et al. (2004) investigaram a capacidade do PRP, com duas diferentes concentrações plaquetárias, de acelerar a formação óssea quando combinado com enxertos ósseos autógenos ou materiais aloplásticos em calvária de porcos. As análises micro-radiográfica e histológica dos defeitos mostraram que o PRP alterou significativamente a cronologia de formação óssea no grupo do osso autógeno, acelerando a maturação desses enxertos de maneira diretamente proporcional à concentração de plaquetas. No período de 12 semanas pós-operatórias, o grau médio de mineralização óssea observado no grupo do osso autógeno sozinho foi em torno de 50 a 60%. Essa média foi alcançada pelos enxertos ósseos com PRP duas semanas antes, ou seja, uma maturação mais rápida dos enxertos foi observada neste grupo, corroborando os achados de Marx et al. (1998).

Contudo, os achados de Schlegel et al. (2004) não foram confirmados por Choi et al. (2004) em defeitos contínuos, de natureza crítica, criados cirurgicamente em mandíbula de cães. A análise histológica deste estudo não mostrou nenhum benefício do PRP na formação óssea e a microscopia de fluorescência evidenciou um atraso no processo de remodelação dos enxertos ósseos autógenos com PRP. A análise histométrica confirmou estas observações,

mostrando baixos percentuais de formação óssea nos defeitos do grupo tratado com PRP (36,8%) quando comparados com o grupo do osso autógeno sozinho (56,7%).

Uma possível explicação para as controvérsias nos resultados obtidos nos estudos apresentados é o tipo de enxerto autógeno utilizado, que pode ser resultante de ossificação intramembranosa (CHOI et al., 2004; SCHLEGEL et al., 2004) ou endocondral (MARX, 1998; FENNIS et al. 2001, 2004), bem como o método de obtenção do PRP. Em relação a este último, no estudo de Schlegel et al. (2004) o PRP foi preparado através de métodos cujas eficiências foram reconhecidamente comprovadas em outros trabalhos. Além disso, o valor terapêutico das amostras foi garantido com a determinação da concentração de plaquetas e dos níveis de fatores de crescimento presentes. Contrariamente, Choi et al. (2004), apesar de realizarem a contagem de plaquetas do PRP, não avaliaram os níveis de fatores de crescimento e modificaram o método de Whitman et al. (1997) para o preparo do PRP.

Tentando compreender o resultado negativo do uso do PRP associado ao osso autógeno em seu estudo realizado em cães, Choi et al. (2005) investigaram os efeitos de variadas concentrações de PRP sobre osteoblastos *in-vitro*. Observaram que altas concentrações de PRP podem suprimir o crescimento celular, sendo as amostras com mais de 30% de PRP consideradas citotóxicas. Os autores constataram, também, que a relação entre o volume de PRP e a quantidade de enxerto ósseo é capaz de influenciar os resultados dos procedimentos regeneradores. Assim, o uso de pequenas quantidades de osso misturadas com um grande volume de PRP seria desfavorável para o reparo ósseo, pois inibiria a proliferação de osteoblastos. Portanto, a explicação para os diferentes resultados encontrados nos estudos envolvendo PRP e osso autógeno pode estar nos variados volumes e concentrações de PRP utilizados.

No estudo de Choi et al. (2004), no qual foi averiguada a influência do PRP na remodelação de enxertos ósseos autógenos em defeitos cirurgicamente criados em mandíbula

de cães, um volume de 1 ml de 100% de PRP foi misturado com osso triturado a partir de um bloco de apenas 15 mm de extensão. Estes valores trouxeram efeitos negativos para o processo de reparo ósseo, uma vez que uma amostra de PRP, 100% concentrada, foi misturada com um pequeno volume de enxerto ósseo. Os valores utilizados no estudo de Marx et al. (1998), por exemplo, foram bastante diferentes. Estes pesquisadores relataram resultados positivos com o uso de um volume de 70 ml de PRP, produzido a partir de 400-450 ml de sangue, sendo esta quantidade misturada com osso autógeno para o tratamento de defeitos muito maiores, cerca de 50 mm de diâmetro ou mais.

Existem, realmente, poucos estudos controlados, principalmente em humanos, avaliando a influência do PRP quando associado ao osso autógeno no reparo de defeitos do esqueleto maxilo-facial. Embora as vantagens desta associação não tenham sido comprovadas, vários pesquisadores propuseram-se a avaliar o uso do PRP associado a materiais aloplásticos, xenoenxertos ou aloenxertos em procedimentos regeneradores (FÜRST et al., 2003).

A quantidade limitada, aumento da morbidade e necessidade de sítios doadores são algumas das desvantagens dos enxertos autógenos que levaram à busca por materiais substitutos. Estes materiais, entretanto, não têm as mesmas propriedades dos enxertos autógenos, como, por exemplo, a capacidade de osteogênese e osteoindução (THORWARTH et al., 2005). A adição do PRP poderia facilitar e acelerar a integração biológica destes materiais ou enxertos (WILTFANG et al., 2003).

Para testar esta hipótese, Wiltfang et al. (2003) investigaram, em humanos, a ação do PRP na degradação dos grânulos de β -Fosfato de Tricálcio (β -TCP). Neste estudo randomizado e prospectivo, levantamentos de seios maxilares foram realizados e preenchidos com β -TCP, com ou sem a adição de PRP. Uma degradação mais rápida do material cerâmico associado ao PRP não foi constatada.

Quando esta metodologia foi empregada para avaliar o uso do vidro bioativo associado ou não ao PRP, também não se observou diferenças de resultados entre os grupos tratados com vidro bioativo com ou sem PRP. A análise histológica mostrou a presença de tecido conjuntivo circundando as partículas de vidro bioativo com limitada quantidade de novo osso formado (DANESH et al., 2001).

Avaliando o enxerto xenógeno (Bio-Oss[®]) associado ao PRP, Froum et al. (2002) corroboraram os resultados do estudo de Danesh et al. (2001), não encontrando nenhuma diferença quanto à quantidade de formação óssea após levantamentos de seios maxilares de 3 pacientes. Um paciente teve, inclusive, implantes testes colocados no momento da cirurgia, os quais foram removidos e avaliados quanto ao percentual de contato osso-implante. Nenhum benefício foi notado com a adição de PRP ao Bio-Oss[®] (38% de contato osso-implante no grupo Bio-Oss[®] e PRP e 34% no grupo do Bio-Oss[®] sozinho).

Dois estudos clínicos controlados avaliaram a influência do PRP associado ao osso bovino no tratamento de defeitos periodontais. Lekovic et al. (2002) compararam uma associação de osso bovino, PRP e Regeneração Tecidual Guiada (RTG) com uma combinação de apenas PRP e osso bovino para o tratamento de defeitos infra-ósseos em humanos. Aos 6 meses pós-operatórios, o exame clínico dos pacientes mostrou redução da profundidade de sondagem e ganho de inserção clínica, bem como o preenchimento ósseo dos defeitos na avaliação realizada em procedimentos cirúrgicos de re-entrada. Como os resultados dos dois grupos foram semelhantes, pôde-se concluir que a RTG não proporcionou nenhum benefício quando combinada com osso bovino e PRP.

Os resultados de Lekovic et al. (2002) podem ser talvez explicados pelas próprias características da fibrina existente no PRP, a qual pode agir também como uma membrana e, conforme os estudos *in-vitro* de Kawase et al. (2005), promove a síntese de colágeno e adesão celular. A adição de fatores de crescimento é um outro aspecto favorável do PRP, pois os

mesmos podem acelerar o processo regenerativo, fazendo com que as células do ligamento periodontal e osso alveolar povoem a área do defeito mais rapidamente do que as células epiteliais, tornando o efeito promovido pela RTG insignificante.

Na tentativa de investigar melhor o papel dos componentes usados no estudo de Lekovic et al. (2002) para a regeneração periodontal, Camargo et al. (2002) compararam a associação de osso bovino, PRP e RTG com apenas RTG no tratamento de defeitos infra-ósseos. Todos os parâmetros clínicos avaliados foram significativamente melhores no grupo que recebeu a terapia tripla, sugerindo que PRP e osso bovino proporcionaram efeitos adicionais à RTG. Entretanto, neste modelo investigativo, assim como no estudo anterior de Lekovic et al. (2002), não foi possível determinar qual a participação individual do PRP e do osso bovino na obtenção dos resultados.

Para esclarecer esta situação, Hanna et al. (2004) avaliaram, em humanos, defeitos infra-ósseos tratados apenas com osso bovino ou osso bovino com PRP. Um efeito significativo na resposta periodontal foi evidente quando o osso bovino foi associado ao PRP.

Okuda et al. (2005) avaliaram, também em humanos, o tratamento de defeitos periodontais infra-ósseos com uma hidroxiapatita sintética associada ao PRP e mostraram que esta terapia combinada proporcionou bons resultados na cicatrização periodontal. Avaliando defeitos semelhantes a estes, Camargo et al. (2005) relataram melhores resultados nos sítios tratados com osso bovino, PRP e RTG que nos sítios tratados apenas com debridamento cirúrgico.

A utilização de terapias combinadas nos mais diferentes modelos experimentais também foi investigada em animais, trazendo resultados divergentes. Fürst et al. (2003) realizaram levantamentos bilaterais de seios maxilares em 12 mini-porcos, usando enxerto Bio-Oss[®] sozinho em um lado e Bio-Oss[®] misturado com PRP no outro lado. Simultaneamente, 2 implantes de titânio foram colocados juntamente com os enxertos. Ambos

os grupos mostraram um aumento percentual, em função do tempo, no contato do osso cortical da parede facial do seio e do material enxertado com o implante. Na avaliação do contato enxerto-implante, o grupo PRP exibiu os melhores resultados já em 3 semanas pós-operatórias. Porém, na análise do contato osso cortical-implante, o grupo que recebeu o PRP somente superou o lado tratado com Bio-Oss[®] sozinho em 12 semanas pós-operatórias. A possibilidade de ocorrência de reações inflamatórias e diferenciação de osteoclastos pela adição de fatores de crescimento foram supostamente apontadas pelos autores como responsáveis pelo reduzido contato do osso cortical com os implantes nos períodos iniciais do processo de reparo ósseo.

Usando o modelo experimental semelhante ao de Fürst et al. (2003), Roldán et al. (2004b) avaliaram o potencial regenerativo do PRP ou da Proteína Morfogênica Óssea Recombinante Humana-7 (rhBMP-7) associados ao Bio-Oss[®]. A análise histométrica e o exame de microscopia de fluorescência revelaram que o PRP não foi capaz de acelerar ou aumentar a osseointegração de implantes de titânio quando comparado com rhBMP-7. Como peculiaridade deste estudo, convém destacar que os autores adicionaram 15% de osso autógeno ao Bio-Oss[®] nos seios maxilares que receberam o PRP, diferentemente da investigação de Fürst et al. (2003), com o intuito de garantir os efeitos mitogênicos do PRP sobre os osteoblastos. Os autores realizaram este procedimento devido aos resultados de um estudo prévio (ROLDÁN et al., 2004a), onde se observou que o PRP implantado com Bio-Oss[®] em um sítio extra-ósseo em ratos não foi osteoindutivo e, muito menos, permitiu o crescimento ósseo sobre a matriz bovina. Ainda neste mesmo estudo (ROLDÁN et al., 2004a), quando o PRP foi associado ao Bio-Oss[®] para aumentos mandibulares, a análise histomorfométrica não mostrou uma maior área de osso neoformado em relação às regiões tratadas apenas com Bio-Oss[®]. A microscopia de fluorescência, entretanto, evidenciou que o PRP acelerou a formação de osso cortical sobre a mandíbula e sobre os enxertos a partir de 2

semanas. Como a histometria foi realizada apenas após 6 semanas e os defeitos estudados não foram críticos, os autores concluíram que a análise de períodos mais precoces poderia ter demonstrado um efeito positivo do PRP.

É interessante observar que, apesar das semelhanças no modelo animal e nos critérios de análise histométrica em dois estudos descritos anteriormente (FÜRST et al, 2003; ROLDÁN et al., 2004b), métodos diferentes para assegurar a validade terapêutica do PRP produzido foram utilizados, o que pode proporcionar maior ou menor valor científico aos resultados apresentados, assim como explicar algumas divergências. Fürst et al. (2003), por exemplo, validaram o protocolo de obtenção do PRP através do teste do mesmo em culturas de fibroblastos gengivais, observando um efeito mitótico dose-dependente do PRP sobre estas células em função da concentração de plaquetas. Já Roldán et al. (2004b) apenas realizaram a contagem de plaquetas do PRP. Estes pesquisadores ressaltaram, ainda, ter encontrado uma grande variação na quantidade de plaquetas presentes no sangue periférico dos animais estudados, o que pode ter contribuído para a produção de amostras de PRP com diferentes concentrações de fatores de crescimento, dificultando a padronização dos resultados.

Em relação à análise de outros sítios experimentais, há dois estudos que avaliaram o uso do PRP com Bio-Oss[®] em defeitos ósseos criados cirurgicamente em crânio de coelhos. A análise radiográfica e tomografia computadorizada em um destes estudos mostraram densidade óssea significativamente maior nos defeitos tratados com Bio-Oss[®] associado ao PRP do que nos defeitos tratados apenas com Bio-Oss[®] (KIM et al., 2001). Estes dados foram confirmados histomorfometricamente em um outro modelo (AGHALOO et al., 2004), no qual se constatou que a adição de PRP ao Bio-Oss[®] aumentou a porcentagem de formação óssea nos três períodos de observação (1, 2 e 4 meses).

Com o objetivo de analisar a associação do PRP com diversos substitutos ósseos, bem como a influência dos meios de obtenção do PRP no reparo ósseo, Wiltfang et al. (2004)

realizaram um estudo em mini-porcos. Os autores avaliaram o efeito de duas diferentes concentrações plaquetárias (*ad modum* Curasan[®] e *ad modum* 3i[®]) no reparo ósseo de DTC (defeitos de tamanho crítico), cirurgicamente criados em calvária e tratados com osso bovino (Bio-Oss[®]), esponja de colágeno bovina (Colloss[®]), β -Fosfato de Tricálcio (Cerasorb[®]) ou osso autógeno. Através de uma análise imunohistoquímica, na qual se determinou a expressão de proteínas da matriz óssea (BMP-2 e Osteocalcina), os autores puderam concluir que o PRP somente acelerou o reparo ósseo dos defeitos tratados com osso autógeno, sendo esta vantagem exclusiva dos compostos com maiores quantidades de plaquetas.

Contudo, alguns estudos mostraram resultados contrários ao de Wilfang et al. (2004). Em modelos experimentais realizados em mandíbula de cães, o PRP mostrou-se capaz de influenciar a velocidade e qualidade de neoformação óssea quando combinado com β -TCP (KOVACS et al., 2005; SUBA et al., 2004). Conclusões semelhantes foram obtidas por Yazawa et al. (2004a) quando testaram este composto em calvária de coelhos.

O PRP tem sido, também, combinado com matrizes ósseas orgânicas, tais como osso mineralizado seco congelado (FDBA) ou osso desmineralizado seco e congelado (DFDBA). Os estudos nesta categoria apresentam, também, resultados conflitantes.

Em um estudo clínico, radiográfico e histológico, Kassolis et al. (2000) avaliaram levantamentos de seios maxilares e aumentos de rebordo alveolar realizados com FDBA e DFDBA associados ao PRP em 15 pacientes. A análise histológica mostrou numerosas áreas de formação de tecido ósseo ao redor das partículas dos enxertos, sem a ocorrência de nenhum infiltrado significativo de células inflamatórias. Estas conclusões foram corroboradas pelos achados de Shanaman et al. (2001). Estes autores concluíram que a adição de PRP aos enxertos alógenos permitiu uma nova formação óssea e melhorou o manuseio desses enxertos para aumentos de rebordo alveolar em 3 pacientes, facilitando a colocação e estabilização dos materiais.

Apesar dos bons resultados relatados por Kassolis et al. (2000) e Shanaman et al. (2001), estes estudos não apresentaram grupo controle de pacientes, dificultando, portanto, a avaliação objetiva dos possíveis benefícios terapêuticos da adição do PRP aos materiais de enxerto. Inclusive, Shanaman et al. (2001) reconheceram a necessidade de novos estudos controlados e chamaram a atenção para alguns detalhes que deveriam ser observados em futuras pesquisas, tais como a interferência da adição de enxertos autógenos aos compostos alo gênicos, a influência da perfuração da cortical do leito receptor, o uso de diferentes materiais de barreira e variações na concentração de fatores de crescimento do PRP.

Assim, Kassolis e Reynolds (2005) realizaram um estudo clínico controlado para investigar a influência do PRP em enxertos alógenos. Levantamentos bilaterais de seios maxilares foram realizados em 10 pacientes, onde um dos lados foi preenchido com PRP e FDBA e o outro lado com FDBA e uma membrana. A análise histométrica mostrou, aos 4, 5 e 6 meses pós-operatórios, uma maior quantidade de osso vital presente no grupo com PRP. Quando esta metodologia foi transportada para animais, os resultados não foram animadores. A associação de PRP e enxertos alógenos não acelerou ou aumentou o reparo ósseo em levantamentos de seios maxilares em ovelhas (GRAGEDA et al., 2005). Porém, quando usado com implantes, a associação de PRP e osso alógeno mostrou benefícios regenerativos. Kim et al. (2002a) colocaram implantes dentais na crista ilíaca de cães e criaram defeitos ósseos ao redor das roscas mais superficiais dos implantes. Estes defeitos foram preenchidos com osso humano desmineralizado seco e congelado em pó (DBP), associado ou não ao PRP. Um contato osso-implante mais direto foi visto no grupo com PRP. Quando uma mistura de dentina e sulfato de cálcio foi usada em substituição ao DBP em um outro estudo usando o mesmo modelo experimental, a adição de PRP também pareceu aumentar o contato osso-implante (KIM et al., 2002b).

Os resultados dos estudos de Kim et al. (2002a, 2002b) não foram confirmados por Jensen et al. (2005). Estes autores inseriram implantes revestidos com hidroxiapatita em côndilos femorais de cães associados com osso alo gênico fresco e congelado ou osso alo gênico processado (calor-seco, irradiação e tratamento químico), ambos com ou sem a adição de PRP. Nenhuma influência na fixação dos implantes ou formação óssea foi observada pela adição do PRP aos enxertos ósseos ou pelos métodos de processamento dos enxertos alo gênicos.

Três outros estudos usaram modelos experimentais em cães para investigar a eficiência do PRP combinado com osso alógeno. Defeitos criados em calvária (Palmisano et al., 2002), arco zigomático (Harris et al., 2003) ou processo alveolar (Duziak; Block, 2003) de cães não exibiram, na avaliação radiográfica ou histológica, nenhuma vantagem no reparo ósseo quando tratados com PRP e enxertos alógenos. Estes achados foram corroborados por Aghaloo et al. (2005) que também mostraram, através de análises radiográfica e histométrica, que a adição de PRP ao FDBA ou DFDBA para o tratamento de defeitos cirúrgicos não-críticos em calvária de coelhos não proporcionou um aumento significativo na densidade óssea ou na quantidade de novo osso quando comparado com o uso dos enxertos ósseos somente.

4. *A* necessidade

Dos materiais utilizados para o tratamento de defeitos ósseos, apenas o osso autógeno possui células osteocompetentes e células mesenquimais indiferenciadas na base do canal

medular. A ação do PRP ocorre sobre estas células que têm, reconhecidamente, potencial para responder às citocinas presentes no PRP (MARX, 2001, 2004).

Vários estudos *in-vitro* mostraram a capacidade do PRP em promover o crescimento e diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas e osteoblastos (LUCARELLI et al., 2003; SOFFER et al., 2004; GRAZIANI et al., 2005; KANNO et al. 2005; DOUCET et al., 2005), bem como sua influência positiva em células do ligamento periodontal e fibroblastos gengivais (OKUDA et al., 2003; LIU et al., 2002). A proliferação de células do tendão humano também tem sido relatada, encorajando o uso do PRP na ortopedia (ANITUA et al., 2005).

Com base nestes estudos, a associação de PRP com células mesenquimais indiferenciadas expandidas *in-vitro* para uso clínico já é uma realidade e parece inaugurar uma nova forma de tratamento dos defeitos esqueléticos cranio-maxilo-faciais. A literatura traz relatos do uso de PRP com células mesenquimais indiferenciadas no tratamento de defeitos criados cirurgicamente no metatarso de ovelhas (LUCARELLI et al., 2005), em aumento de seio maxilar em humanos (UEDA et al., 2005), em reconstruções mandibulares em cães (ITO et al, 2005; YAMADA et al., 2004) ou para a produção ectópica de osso em cavidades abdominais de cães (ASCENCIO et al., 2004).

A ação do PRP ocorre sobre células vivas. Assim, os vários enxertos ou materiais substitutos do osso autógeno agem apenas como um carreador para o PRP, retendo por mais tempo os fatores de crescimento liberados pelas plaquetas. Todavia, o tempo de retenção destes fatores é dependente do tipo de substituto ósseo usado (TSAY et al., 2005), o que pode explicar a grande controvérsia de resultados existentes entre os estudos que avaliaram a adição do PRP a vários substitutos do osso autógeno.

Fatores de crescimento ativados no local e na seqüência temporal apropriados iniciam os mecanismos de reparo ósseo. Do ponto de vista regenerativo, a liberação gradual e,

conseqüentemente, uma ação prolongada destes fatores no sítio da ferida são extremamente vantajosas. No estudo *in-vitro* de Tsay et al. (2005), amostras de PRP ativadas com o TRAP e associadas com osso bovino, DFDBA ou vidro bioativo exibiram, entre si, diferenças significativas no tempo de liberação e biodisponibilidade de determinados fatores de crescimento. Diferenças significativas também foram observadas entre estes grupos e os grupos com amostras de PRP ativado com trombina bovina. Portanto, as diferenças ocorreram tanto em função do tipo de enxerto ósseo ou implante usado como do tipo de ativador das amostras de PRP.

Apesar dos resultados favoráveis com a associação de PRP a vários enxertos e materiais substitutos do osso autógeno, Pryor et al. (2005) alertaram que a interferência destes materiais no curso do processo regenerativo pode obscurecer os efeitos osteocondutores genuínos do PRP. Wiltfang et al. (2003) afirmaram ser, portanto, fundamental a realização de novos estudos sobre a influência do PRP, usado isoladamente, no processo de reconstrução dos tecidos.

Em se tratando da regeneração de tecidos moles, o uso isolado do PRP tem sido avaliado em procedimentos odontológicos e médicos. Petrunaro (2001) publicou uma série de casos nos quais PRP, enxertos de tecido conjuntivo subepitelial e membranas de colágeno foram usados para cobrir recessões gengivais. O PRP foi aplicado na área cirúrgica, entre a superfície radicular e o enxerto, e esta foi coberta com uma camada protetora de PPP. Embora a terapia tenha sido efetiva em todos os casos, estudos clínicos controlados são necessários para determinar a verdadeira significância do PRP no tratamento de recessões gengivais.

Tratando úlceras crônicas com PRP, Knighton et al. (1990) obtiveram um tempo de epitelização de 8 semanas, enquanto que no grupo controle este tempo foi de 15 semanas. Gano et al. (1993) ratificaram estes resultados ao observarem expressivos benefícios quando utilizaram esta técnica para tratar úlceras crônicas de pacientes que tinham, inicialmente,

indicação de amputação de seus membros. No final das avaliações, 78% dos indivíduos tratados com PRP não tiveram seus membros amputados.

Man et al. (2001) avaliaram a utilização do PPP e PRP em cirurgias plásticas cosméticas. Usando uma amostra de 20 pacientes, os autores concluíram que o uso do PRP e da cola autógena de fibrina resultou em várias vantagens, tais como um tempo mais curto de cirurgia, eliminação da necessidade de drenos, redução da utilização de bandagens compressivas, diminuição da dor e edema pós-operatório e tempo de recuperação mais curto dos pacientes.

A literatura, entretanto, traz poucos estudos *in-vivo* sobre a ação isolada do PRP na reconstrução de tecidos duros. Um destes estudos foi realizado por Anitua (1999). O autor comparou o reparo alveolar pós-extração dentária de 20 pacientes divididos em dois grupos. Em um grupo, após as exodontias, os pacientes tiveram seus alvéolos dentários preenchidos com PRP e, no outro, apenas coágulo sanguíneo (controle). Transcorridas 10 a 16 semanas pós-operatórias, pôde-se notar que a epitelização dos alvéolos do grupo PRP foi superior ao grupo coágulo. As biópsias ósseas realizadas nos sítios tratados mostraram que os espécimes do grupo PRP apresentavam osso maduro e compacto, com trabéculas ósseas organizadas e com morfologia normal. Já os espécimes do grupo controle exibiram tecido conjuntivo entremeando as novas trabéculas ósseas, o que caracterizou um atraso no processo de reparo ósseo quando comparado ao grupo PRP.

Sammartino et al. (2005) também obtiveram bons resultados com a utilização do PRP em alvéolos de terceiros molares extraídos, tendo sido possível minimizar a ocorrência de complicações periodontais na raiz distal do segundo molar adjacente. Menor incidência de alveolite e dor pós-operatórias, bem como maior densidade óssea radiográfica com o uso do PRP em alvéolos foram relatadas por Mancuso et al. (2003).

Buscando uma melhor avaliação do PRP em modelos animais, Yazawa et al. (2004a) avaliaram o reparo ósseo de defeitos mandibulares bicorticais em coelhos, tratados com cola de fibrina e PRP ou apenas cola de fibrina como controle. A análise histológica mostrou, aos 7 dias pós-operatórios, a presença de matriz cartilaginosa no grupo com PRP, enquanto que no grupo controle ainda se via remanescentes da cola de fibrina, indicando que a adição de PRP realmente acelerou o reparo ósseo dos defeitos.

Embora Anitua (1999), Sammartino et al. (2005) e Yazawa et al., (2004a) tenham evidenciado bons resultados histológicos nos sítios tratados com PRP, a falta de uma análise histométrica do novo osso formado (ANITUA, 1999; SAMARTINO et al., 2005; YAZAWA et al., 2004a), de análise histológica dos sítios controle (SAMARTINO et al., 2005), bem como a não utilização de defeitos de tamanho crítico (ANITUA, 1999; SAMARTINO et al., 2005; YAZAWA et al., 2004a) ou associação do PRP com fibrina alógena (YAZAWA et al., 2004a) dificultaram o estabelecimento de conclusões mais objetivas e confiáveis sobre a capacidade do PRP em aumentar ou acelerar a formação óssea quando usado isoladamente.

Contornando estas limitações, Fontana et al. (2004) avaliaram histomorfometricamente o efeito do PRP aplicado ao redor de implantes laminares colocados em tibia de ratos. Os resultados mostraram que o grupo no qual os implantes foram associados ao PRP ($30 \pm 7 \text{ cm}^2$) apresentou significativamente mais osso do que o grupo controle ($16 \pm 3 \text{ cm}^2$). Estes resultados também foram confirmados em estudos realizados em cães (YAMADA et al. 2004) ou mini-porcos (ZECHNER et al., 2003; SCHLEGEL et al., 2003).

Ainda preocupados em analisar o efeito isolado do PRP no processo de reparo ósseo, Pryor et al. (2005) aplicaram preparados de plaquetas em defeitos de tamanho crítico (6 mm) criados cirurgicamente em calvária de ratos, não observando nenhum benefício adicional na formação óssea em relação aos controles (sem PRP).

Apesar dos resultados insatisfatórios do estudo de Pryor et al. (2005), é preciso ressaltar que os autores utilizaram lisado de plaquetas e não PRP. Além disso, os concentrados de fatores de crescimento foram obtidos a partir de animais doadores e uma esponja de colágeno absorvível foi associada ao composto. Embora considere-se que esta esponja seja isenta de propriedades osteocondutoras ou osteoindutoras capazes de mascarar as potencialidades dos materiais testados. Independentemente destas variações e dos resultados apresentados, deve-se enfatizar que o sítio anatômico selecionado para o estudo do reparo ósseo foi adequado. Bastante louvável, também, foi a preocupação em se criar DTC (defeitos de tamanho crítico).

O DTC possibilita a padronização de controles para a avaliação de qualquer material com potencial de reparo ósseo maxilo-facial (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986), pois o defeito representa um desafio biológico e permite a observação do reparo ósseo tanto por osteocondução como por osteoindução (CHESMEL et al., 1998).

Um DTC foi inicialmente definido como a menor ferida intra-óssea em determinado tipo de osso e espécie animal que não cicatriza espontaneamente durante toda a vida do animal (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986).

Em 1990, Hollinger e Kleinschmidt (1990) definiram os DTC como os defeitos que mostram menos de 10% de reparo ósseo durante a vida do animal. Se o fechamento completo do defeito por osso não foi alcançado em um ano, especialmente em animais que não estão mais em fase de crescimento, é improvável que ele ainda ocorrerá.

Dentre as regiões ósseas onde são criados defeitos experimentais em animais, destaca-se a calvária, que tem sido utilizada há mais de um século no estudo de substitutos para o enxerto de osso autógeno (SENN, 1889).

DTC em calvária de ratos são ideais para avaliar a capacidade dos biomateriais em promover o reparo ósseo, pois a calvária, diferentemente dos ossos longos, é composta

exclusivamente de osso membranoso com limitado suprimento sangüíneo e mínimas chances de reparo ósseo espontâneo (KRAMER et al., 1968; REID et al., 1981; SATO; URIST, 1985; SCHMITZ; HOLLINGER, 1986). Além disso, os ratos são animais pequenos, baratos, podem ser utilizados em grande quantidade, além de proporcionarem uma análise de resultados mais fácil do que a de animais maiores (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986; SWEENEY et al., 1995).

A capacidade de reparo ósseo espontâneo dos defeitos de craniotomia está diretamente relacionada ao tamanho da cavidade. Em calvária de ratos, tem sido relatado que defeitos de 2 mm (FREEMAN; TURNBULL, 1973; HEROLD et al., 1974), 4 mm (MULLIKEN; GLOWACKI, 1980; GLOWACKI et al., 1981), 5 mm (BOSCH, 1998), 6 mm (BRUNEL et al., 1996; PRYOR et al., 2005), 8 mm (TAKAGI; URIST, 1982) e 9 mm (ARNAUD et al., 1999) preenchem os requisitos de um DTC. Estas variações sobre o tamanho de um DTC devem-se a fatores inerentes ao próprio animal ou ao procedimento cirúrgico propriamente dito. Assim, a idade e a raça do animal (BOSCH et al., 1998; MARDAS et al., 2002; SATO; URIST, 1985; TAKAGI; URIST, 1982), a integridade do periósteo e da dura-máter durante a confecção cirúrgica dos defeitos (BOSCH et al., 1998; BRAZ et al., 2003; MELCHER, 1969; PRITCHARD, 1946; SCHMITZ et al., 1990; TAKAGI; URIST, 1982; WANG; GLIMCHER, 1999), a remoção ou a presença de ambas as placas corticais (HJORTING-HANSEN; ANDREASEN, 1971) e determinados procedimentos realizados no ato cirúrgico (BOSCH et al., 1998; DEPORTER et al., 1988) podem afetar diretamente o resultado do reparo ósseo.

Encontram-se na literatura vários estudos avaliando defeitos ósseos realizados na calvária de ratos, medindo 8 mm de diâmetro e seguindo o modelo proposto por Takagi e Urist (1982) (HOLLINGER et al., 1989; WANG et al., 1998; LIM et al., 2000; SIKAVITSAS et al., 2003; SCHLIEPHAKE et al., 2004). Em todos estes estudos, os defeitos criados corresponderam aos padrões de um DTC.

Estes defeitos em calvária são, segundo Schmitz e Hollinger (1986), bastante apropriados para o estudo de agentes particulados ou gelatinosos. Sendo assim, são bons candidatos para a análise das potencialidades do PRP na reconstrução de tecidos duros.

O uso de DTC e atenção cuidadosa para com todos os detalhes técnicos envolvidos na produção do PRP são os primeiros passos na realização de pesquisas padronizadas que possam, realmente, esclarecer as dúvidas existentes em relação às propriedades deste material.

Grageda et al. (2004) sugeriram alguns pontos-chave que devem estar presentes nas investigações futuras, tais como a contagem manual de plaquetas do sangue periférico e das amostras de PRP, a quantificação dos fatores de crescimento, a análise histométrica dos espécimes, a presença de grupos controle, a análise da correlação existente entre a histometria e o número de plaquetas e/ou fatores de crescimento, o uso de modelos animais que permitam a obtenção de um PRP autógeno e o ajuste da quantidade de plaquetas ideal para o PRP do modelo animal estudado, uma vez que existem variações entre as espécies na quantidade de plaquetas presentes no sangue periférico.

A utilização do PRP como substituto ou potencializador dos procedimentos de enxertia e otimizador do processo de reconstrução tecidual abre, sem dúvidas, novos horizontes para futuras pesquisas, sendo um campo promissor para alcançar o verdadeiro objetivo da engenharia tecidual, isto é, proporcionar ao paciente a recuperação total e funcional dos seus tecidos perdidos com rapidez e menor morbidade.

Contudo, sem uma adequada padronização da metodologia dos estudos não será possível determinar se o PRP, realmente, auxilia no reparo ósseo quando usado de forma isolada ou associado a outros materiais (GRAGEDA et al., 2004).

Encontram-se na literatura vários estudos com resultados conflitantes sobre a associação do PRP com diversos materiais e enxertos ósseos. Contudo, há poucos estudos que tenham analisado o uso isolado do PRP na reconstrução dos tecidos duros e estes apresentam

resultados contraditórios. Torna-se evidente, portanto, a necessidade de novos estudos padronizados para avaliar o uso isolado do PRP no reparo ósseo. Somente então, fundamentado em bases científicas confiáveis, é que o PRP poderia ser integrado na rotina dos procedimentos cirúrgicos odontológicos.

Anexo B – Referências da Revisão da Literatura

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.*, 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*, v. 19, n. 1, p. 59-65, Jan./Feb. 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. *Clin. Oral Implants Res.*, v. 16, n. 2, p. 250-257, Apr. 2005.

ANITUA, E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of sites for implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.*, v. 14, n. 4, p. 529-534, July/Aug. 1999.

ANITUA, E. et al. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J. Orthop. Res.*, v. 23, n. 2, p. 281-286, Mar. 2005.

ARNAUD, E. et al. Osteogenesis with coral is increased by BMP and BMC in a rat cranioplasty. *Biomaterials*, v. 20, n. 20, p. 1909-1918, Oct. 1999.

ASCENCIO, D. et al. Experimental induction of heterotopic bone in abdominal implants. *Wound Repair Regen.*, v. 12, n. 6, p. 643-649, Nov./Dec. 2004.

BECK, L. S. et al. In vivo induction of bone by recombinant human transforming growth factor beta 1. *J. Bone Miner. Res.*, v. 6, n. 9, p. 961-968, Sep. 1991.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N. O sistema cardiovascular. In: _____. *Fisiologia*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 303-308.

BHANOT, S.; ALEX, J. C. Current applications of platelet gels in facial plastic surgery. *Facial Plast. Surg.*, v. 18, n. 1, p. 27-33, Feb. 2002.

BIDIC, S. M. et al. Rabbit calvarial wound healing by means of seeded Caprotite scaffolds. *J. Dent. Res.*, v. 82, n. 2, p. 131-135, Feb. 2003.

BOSCH, P. Experimental investigation of the effect of the fibrin adhesive on the Kiel heterologous bone graft. *Arch. Orthop. Trauma Surg.*, v. 96, p. 177-185, 1980.

BOSCH, C.; MELSEN, B.; VARGERVIK, K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regeneration materials. *J. Craniofac. Surg.*, v. 9, n. 4, p. 310-316, July 1998.

BRAZ, F. et al. Emprego de matriz óssea orgânica bovina e hidroxiapatita no reparo de defeito induzido em crânio de ratos. *Acta Cir. Bras.*, v. 18, n. 1, p. 19-24, Jan./Fev. 2003.

BRUNEL, G. et al. Regeneration of rat calvarial defects using a bioabsorbable membrane technique: influence of collagen cross-linking. *J. Periodontol.*, v. 67, n. 12, p. 1342-1348, Dec. 1996.

BUTTERFIELD, K. J. et al. Effect of platelet-rich plasma with autogenous bone graft for maxillary sinus augmentation in a rabbit model. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 63, n. 3, p. 370-376, Mar. 2005.

CAMARGO, P. M. et al. Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *J. Periodontal Res.*, v. 37, n. 4, p. 300-306, Aug. 2002.

CAMARGO, P. M. et al. A reentry study on the use of bovine porous bone mineral, GTR, and platelet-rich plasma in the regenerative treatment of intrabony defects in humans. *Int. J. Periodontics Restorative Dent.*, v. 25, n. 1, p. 49-59, Feb. 2005.

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

CASSIEDE, P. et al. Osteochondrogenic potential of marrow mesenchymal progenitor cell exposed to TGF-beta 1 or PDGF-BB as assayed in vivo and in vitro. *J. Bone Miner. Res.*, v. 11, n. 9, p. 1264-1273, Sep. 1996.

CHESMEL, K. D. et al. Healing response to various forms of human demineralized matrix in athymic rat cranial defects. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 56, n. 7, p. 857-863, July 1998.

CHOI, B. H. et al. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 33, n. 1, p. 56-59, Jan. 2004.

CHOI, B. H. et al. Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation alveolar bone cells: an in vitro study. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 34, n. 4, p. 420-424, June 2005.

CMOLIK, B. L. et al. Redo cardiac surgery: late bleeding complications from topical thrombin-induced factor V deficiency. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, v. 105, n. 2, p. 222-228, Feb. 1993.

CORRENTE, G. et al. Supracrestal bone regeneration around dental implants using a calcium carbonate and a fibrin-fibronectin sealing system: clinical and histologic evidence. *Int. J. Periodontics. Restorative Dent.*, v. 17, n. 2, p. 170-81, Apr. 1997.

DANESH-MEYER, M. J.; FILSTEIN, M. R.; SHANAMAN, R. Histological evaluation of sinus augmentation using platelet rich plasma (PRP): a case series. *J. Int. Acad. Periodontol.*, v. 3, n. 2, p. 48-56, Apr. 2001.

DEPORTER, D. A. et al. Reconstituted bovine skin collagen enhances healing of bone wounds in the rat calvaria. *Calcif. Tissue Int.*, v. 42, n. 5, p. 321-325, May 1988.

DE SOMER, F. et al. Can autologous thrombin with a rest fraction of ethanol be used safely for activation of concentrated autologous platelets applied on nerves? *Eur. Spine J.*, v. 17, June 2005.

DINATO, C. J. et al. Plasma Rico em Plaquetas. In: DINATO, C. J.; POLIDO, D. W. *Implantes osseointegrados: cirurgia e prótese*. São Paulo: Artes Médicas, 2001. p. 315-342.

DOUCET, C. et al. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: A safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J. Cell. Physiol.*, v. 205, n. 2, p. 228-236, Nov. 2005.

DUCY, P.; SCHINKE, T.; KARSENTY, G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*, v. 289, n. 5484, p. 1501-1504, Sep. 2000.

DUZIAK, M. E.; BLOCK, M. S. Ridge augmentation with PRP/PPP and mineralized bone in dogs. *J. Oral. Maxillofac. Surg.*, v. 61, suppl, p. 41, 2003. (Abstract)

DUGRILLON, A. et al. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 31, n. 6, p. 615-619, Dec. 2002.

EFEUGLU, C.; AKCAY, Y. D.; ERTURK, S. A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 62, n. 11, p. 1403-1407, Nov. 2004.

EPPLEY, B. L.; WOODSELL, J. E.; HIGGINS, J. Platelet quantification and growth factor analysis form platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast. Reconstr. Surg.*, v. 114, n. 6, p. 1502-8, Nov. 2004.

FENNIS, J. P.; STOELINGA, P. J.; JANSEN, J. A. Mandibular reconstruction: a clinical and radiographic animal study on the use of autogenous scaffolds and platelet-rich plasma. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 31, n. 3, p. 281-286, June 2002.

FENNIS, J. P.; STOELINGA, P. J.; JANSEN, J. A. Mandibular reconstruction: a histological and histomorphometric study on the use of autogenous scaffolds, particulate cortico-cancellous bone grafts and platelet rich plasma in goats. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 33, n. 1, p. 48-55, Jan. 2004.

FONTANA S. et al. Effect of platelet-rich plasma on the peri-implant bone response: an experimental study. *Implant Dent.*, v. 13, n. 1, p. 73-78, Mar. 2004.

FREEMAN, E.; TURNBULL, R. S. The value of osseous coagulum as a graft material. *J. Periodont. Res.*, v. 8, n. 4, p. 229-236, 1973.

FREYMILLER, E. G.; AGHALOO, T. L. Platelet-rich plasma: ready or not? *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 62, n. 4, p. 484-488, Aug. 2004.

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

FUERST, G. et al. Effect of platelet-released growth factors and collagen type I on osseous regeneration of mandibular defects. A pilot study in minipigs. *J. Clin. Periodontol.*, v. 31, n. 9, p. 784-790, Sep. 2004a.

FUERST, G. et al. Effects of fibrin sealant protein concentrate with and without platelet-released growth factors on bony healing of cortical mandibular defects. An experimental study in minipigs. *Clin. Oral Implants Res.*, v. 15, n. 3, p. 301-307, June 2004b.

FURST, G. et al. Sinus grafting with autogenous platelet-rich plasma and bovine hydroxyapatite. A histomorphometric study in minipigs. *Clin. Oral Implants Res.*, v. 14, n. 4, p. 500-582, Aug. 2003.

GANIO, C. et al. The treatment of chronic nonhealing wounds using autologous platelet-derived growth factors. *J. Foot Ankle Surg.*, v. 32, n. 3, p. 263-268, May/June 1993.

GAUDRIC, A. et al. Autologous platelet concentrate for the treatment of full-thickness macular holes. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, v. 233, n. 9, p. 549-54, Sep. 1995.

GLOWACKI, J.; ALTOBELLI, D.; MULLIKEN, J. B. Fate of mineralized and demineralized osseous implants in cranial defects. *Calcif. Tissue Int.*, v. 33, n. 1, p. 71-76, Jan. 1981.

GRAGEDA, E. Platelet-rich plasma and bone graft materials: a review and a standardized research protocol. *Implant Dent.*, v. 13, n. 4, p. 301-309, Dec. 2004.

GRAGEDA, E. et al. Bone formation in the maxillary sinus by using platelet-rich plasma: an experimental study in sheep. *J. Oral Implantol.*, v. 31, n. 1, p. 2-17, 2005.

GRAZIANI, F. et al. In vitro effects of different concentration of PRP on primary bone and gingival cell lines. Preliminary results. *Minerva Stomatol.*, v. 54, n. 1-2, p. 15-22, Jan./Feb. 2005.

GRECO, F. et al. Experimental investigation into reparative osteogenesis with fibrin adhesive. *Arch. Orthop. Trauma Surg.*, v. 107, p. 99-104, 1988.

GRUBER, R. et al. Platelets stimulate proliferation of bone cells: involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes. *Clin. Oral Implants Res.*, v. 13, n. 5, p. 529-535, Oct. 2002.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Hemostasia e Coagulação Sangüínea. In: _____. *Tratado de Fisiologia Médica*. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 394-404.

HALLMAN, M. et al. A clinical histologic study of bovine hydroxyapatite in combination with autogenous bone and fibrin glue for maxillary sinus floor augmentation. Results after 6 to 8 months of healing. *Clin. Oral Implants Res.*, v. 12, n. 2., p. 135-143, Apr. 2001.

HANNA, R.; TREJO, P. M.; WELTMAN, R. L. Treatment of intrabony defects with bovine-derived xenograft alone and in combination with platelet-rich plasma: a randomized clinical trial. *J. Periodontol.*, v. 75, n. 12, p. 1668-1677, Dec. 2004.

HARRIS, D.; FARRELL, B.; BLOCK, M.S. Zygomatic arch defects grafted with mineralized bone with PRP or PPP in dogs. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 61, suppl, p. 42, 2003. (Abstract)

HEROLD, H. Z. et al. Stimulation of osteoblastic activity with components of cartilage extract. *Isr. J. Med. Sci.*, v. 10, n. 11, p. 1438-1447, Nov. 1974.

HJORTING-HANSEN, E.; ANDREASEN, J. O. Incomplete bone healing of experimental cavities in dog mandibles. *Br. J. Oral Surg.*, v. 9, n. 1, p. 33-40, July 1971.

HOLLINGER, J. O.; KLEINSCHMIDT, J. C. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J. Craniofac. Surg.*, v. 1, n. 1, p. 60-68, Jan. 1990.

HOLLINGER, J. O. et al. An evaluation of two configurations of tricalcium phosphate for treating craniotomies. *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 23, n. 1, p. 17-29, Jan. 1989.

ITO, K. et al. Osteogenic potential of injectable tissue-engineered bone: a comparison among autogenous bone, bone substitute (Bio-oss), platelet-rich plasma, and tissue-engineered bone with respect to their mechanical properties and histological findings. *J. Biomed. Mater. Res. A*, v. 73, n. 1, p. 63-72, Apr 1. 2005.

JAKSE, N. et al. Influence of PRP on autogenous sinus grafts. An experimental study on sheep. *Clin. Oral Implants Res.*, v. 14, n. 5, p. 578-583, Oct. 2003.

JENSEN, T. B. et al. No effect of platelet-rich plasma with frozen or processed bone allograft around noncemented implants. *Int. Orthop.*, v. 29, n. 2, p. 67-72, Apr. 2005.

JOYCE, M. E.; JINGUSHI, S.; BOLANDER, M. E. Transforming growth factor-beta in the regulation of fracture repair. *Orthop. Clin. North Am.*, v. 21, n. 1, p. 199-209, Jan. 1990.

KANNO, T. et al. Platelet-rich plasma enhances human osteoblast-like cell proliferation and differentiation. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 63, n. 3, p. 362-369, Mar. 2005.

KARRING, T.; LINDHE, J.; CORTELLINI, P. Tratamento Periodontal Regenerativo. In: LINDHE, J. *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 428-462.

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

KASSOLIS, J. D.; REYNOLDS, M. A. Evaluation of the adjunctive benefits of platelet-rich plasma in subantral sinus augmentation. *J. Craniofac. Surg.*, v. 16, n. 2, p. 280-287, Mar. 2005.

KAWASE, T. et al. In vitro evidence that the biological effects of platelet-rich plasma on periodontal ligament cells is not mediated solely by constituent transforming-growth factor-beta or platelet-derived growth factor. *J. Periodontol.*, v. 76, n. 5, p. 760-767, May 2005.

KIM, E. S.; PARK, E. J.; CHOUNG, P. H. Platelet concentration and its effect on bone formation in calvarial defects: an experimental study in rabbits. *J. Prosthet. Dent.*, v. 86, n. 4, p. 428-433, Oct. 2001.

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.*, v. 60, n. 9, p. 1018-1025, Sep. 2002a.

KIM, S. G. et al. 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*, v. 17, n. 1, p. 86-94, Jan./Feb. 2002b.

KNIGHTON, D. R. et al. Stimulation of repair in chronic, nonhealing, cutaneous ulcers using platelet-derived wound healing formula. *Surg. Gynecol. Obstet.*, v. 170, n. 1, p. 56-60, Jan. 1990.

KOROBELNIK, J. F. et al. Autologous platelet concentrate as an adjunct in macular hole healing: a pilot study. *Ophthalmology*, v. 103, n. 4, p. 590-594, Apr. 1996.

KOVACS, K. et al. Histomorphometric and densitometric evaluation of the effects of platelet-rich plasma on the remodeling of beta-tricalcium phosphate in beagle dogs. *J. Craniofac. Surg.*, v. 16, n. 1, p. 150-154, Jan. 2005.

KRAMER, I. R.; KILLEY, H. C.; WRIGHT, H. C. A histological and radiological comparison of the healing of defects in the rabbit calvarium with and without implanted heterogenous anorganic bone. *Arch. Oral Biol.*, v. 13, n. 9, p. 1095-1106, Sep. 1968.

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

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

LANDESBERG, R. et al. Activation of platelet-rich plasma using thrombin receptor agonist peptide. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 63, n. 4, p. 529-35, Apr. 2005.

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

LIEBERMAN, J. R.; DALUISKI, A.; EINHORN, T. A. The role of growth factors in the repair of bone: biology and clinical applications. *J. Bone Joint Surg.*, v. 84-A, n. 6, p. 1032–1044, June 2002.

LIM, S. C.; LEE, M. J.; YEO, H. H. Effects of various implant materials on regeneration of calvarial defects in rats. *Pathol. Int.*, v. 50, n. 8, p. 594-602, Aug. 2000.

LIND, M. et al. Transforming growth factor-beta enhances fracture healing in rabbit tibiae. *Acta Orthop. Scand.*, v. 64, n. 5, p. 553–556, Oct. 1993.

LIND, M. Growth factor stimulation of bone healing. Effect on osteoblasts, osteotomies, and implant fixation. *Acta Orthop. Scand. Suppl.*, v. 283, p. 2-37, Oct. 1998.

LIU, Y. et al. Fibroblast proliferation due to exposure to a platelet concentrate in vitro is pH dependent. *Wound Repair Regen.*, v. 10, n. 5, p. 336-40, Sep./Oct. 2002.

LOZADA, J. L. et al. Platelet-rich plasma application in sinus graft surgery: Part I – Background and processing techniques. *J. Oral Implantol.*, v. 27, n. 1, p. 38-42, 2001.

LUCARELLI, E. et al. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials*, v. 24, n. 18, p. 3095-3100, Aug. 2003.

LUCARELLI, E. et al. Stromal stem cells and platelet-rich plasma improve bone allograft integration. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, v. 435, p. 62-68, June 2005.

LYNCH, S. E. et al. Role of platelet-derived growth factor in wound healing: Synergistic effects with other growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 84, n. 21, p. 7696-7700, Nov. 1987.

LYNCH, S. E.; COLVIN, R. B.; ANTONIADES, H. N. Growth factors in wound healing. Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. *J. Clin. Invest.*, v. 84, n. 2, p. 640-646, Aug. 1989.

LYNCH, S. E.; GENCO, R. J.; MARX, R. E. *Tissue Engineering*. Chicago: Quintessence, 1999. 297 p.

MALEKZADEH, R. et al. Isolation of human osteoblast-like cells and in vitro amplification for tissue engineering. *J. Periodontol.*, v. 69, n. 11, p. 1256-1262, Nov. 1998.

MAN, D.; PLOSKER, H.; WINLAND-BROWN, J. E. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast. Reconstr. Surg.*, v. 107, n. 1, p. 229-237, Jan. 2001.

MANCUSO, J. D. et al. Platelet-rich plasma: a preliminary report in routine impacted mandibular third molar surgery and the prevention of alveolar osteitis. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 61, suppl, p. 40, 2003. (Abstract)

MARCHAC, D.; RENIER, D. Fibrin glue in craniofacial surgery. *J. Craniofac. Surg.*, v. 1, n. 1, p. 32-34, Jan. 1990.

MARDAS, N.; KOSTOPOULOS, L.; KARRING, T. Bone and suture regeneration in calvarial defects by e-PTFE-membranes and demineralized bone matrix and the impact on calvarial growth: an experimental study in the rat. *J. Craniofac. Surg.*, v. 13, n. 3, p. 453-464, May 2002.

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

MARX, R. E.; GARG, A. K. Bone Graft physiology with use of platelet-rich plasma and hiperbaric oxygen. In: _____. *The Sinus Bone Graft*. 1. ed. Colorado: Quintessence Books, 1999. p.183-189.

MARX, R. E. Discussion: Quantification of growth factors levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 58, n. 3, p. 300-3001, Mar. 2000.

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

MARX, R. E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 62, n. 4, p. 489-496, Apr. 2004.

MARLOVITS, S. et al. A new simplified technique for producing platelet-rich plasma: a short technical note. *Eur. Spine J.*, v. 13, suppl 1, p. 102-106, Oct. 2004.

MATSUDA, N. et al. Mitogenic, chemotatic, and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro. *J. Periodontol.*, v. 63, n. 6, p. 515-525, June 1992.

MAZOR, Z. et al. Platelet-rich plasma for bone graft enhancement in sinus floor augmentation with simultaneous implant placement: patient series study. *Implant Dent.*, v. 13, n. 1, p. 65-72, Mar. 2004.

MCKINNEY, L.; HOLLINGER J. O. A bone regeneration study: transforming growth factor-beta 1 and its delivery. *J. Craniofac. Surg.*, v. 7, n. 1, p. 36-45, Jan. 1996.

MELCHER, A. H. Role of the periosteum in repair of wounds of the parietal bone of the rat. *Archs. Oral Biol.*, v. 14, n. 9, p. 1101-1109, Sept. 1969.

MINIHAN, M.; GOGGIN, M.; CLEARY, P.E. Surgical management of macular holes: results using gas tamponade alone, or in combination with autologous platelet concentrate, or transforming growth factor beta 2. *Br. J. Ophthalmol.*, v. 81, n. 12, p. 1073-1079, Dec. 1997.

MISUMI, T. Effect of autologous platelet rich plasma on adult open heart surgery. *Nippon Kyobu Geka Gakkai Zasshi*, v. 43, n. 1, p. 6-9, Jan. 1995.

MULLIKEN, J. B.; GLOWACKI, J. Induced osteogenesis for repair and construction in the craniofacial region. *Plast. Reconstr. Surg.*, v. 65, n. 5, p. 553-559, May 1980.

MUSTOE, T. A. et al. Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor-beta. *Science*, v. 237, n. 4820, p. 1333-6, Sep. 1987.

NASH, T. J. et al. Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. *Bone*, v. 15, p. 203-208, Mar./Apr. 1994.

NEMZEK J. A. et al. Differences in normal values for murine white blood cell counts and other hematological parameters based on sampling site. *Lab. Anim.*, v. 35, n. 2, p. 147-52, Apr. 2001.

NODA, M.; CAMILLIERE, J. J. In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor-beta. *Endocrinology*, v. 124, p. 2991-2994, June 1989.

OKUDA, K. et al. Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J. Periodontol.*, v. 74, n. 6, p. 849-857, June 2003.

OKUDA, K. et al. Platelet-rich plasma combined with a porous hydroxyapatite graft for the treatment of intrabony periodontal defects in humans: a comparative controlled clinical study. *J. Periodontol.*, v. 76, n. 6, p. 890-898, June 2005.

OLSEN, A. K. et al. Effect of pre-analytical handling on haematological variables in minipigs. *Lab. Anim.*, v. 35, n. 2, p. 147-152, Apr. 2001.

ONO, K. et al. Apatite-wollastonite containing glass ceramic fibrin mixture as a bone defect filler. *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 22, n. 10, p. 869-85, Oct. 1988.

OYAMA, T. et al. Efficacy of platelet-rich plasma in alveolar bone grafting. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 62, n. 5, p. 555-558, May 2004.

PARK, J. B. et al. Periodontal regeneration in Class III furcation defects of beagle dogs using guided tissue regenerative therapy with platelet-derived growth factor. *J. Periodontol.*, v. 66, n. 6, p. 462-477, June 1995.

PALMISANO, W.; DEGEN, M.; BLOCK, M. S. Craniotomy bone defect healing with PRP combined with mineralized bone. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 60, suppl, p.39, 2002. (Abstract)

PETRUNGARO, P. Using Platelet-rich plasma to accelerate soft tissue maturation in esthetic periodontal surgery. *Compend. Contin. Educ. Dent.*, v. 22, n. 9, p. 729-745, Sep. 2001.

PFEILSCHIFTER, J. et al. Stimulation of bone matrix apposition in vitro by local growth factors: A comparison between insulin-like growth factor I, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor beta. *Endocrinology*, v. 127, p. 69-75, July 1990.

PIERCE, G. F. et al. Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta enhance tissue repair activities by unique mechanisms. *J. Cell Biol.*, v. 109, n. 1, p. 429-440, July 1989.

PRITCHARD, J. J. Repair of fractures of the parietal bone in rats. *J. Anat.*, v. 80, p. 55-60, 1946.

PRYOR, M. E. et al. Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: histologic and histometric observations. *J. Clin. Periodontol.*, v. 32, n. 9, p. 966-972, Sep. 2005.

RAGHOEBAR, G. M. et al. Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? *Clin. Oral Implants Res.*, v. 16, n. 3, p. 349-356, June 2005.

REID, C. A.; McCARTHY, J. G.; KOLBER, A. B. A study of regeneration in parietal bones defects in rabbits. *Plast. Reconstr. Surg.*, v. 67, n. 5, p. 591-596, May 1981.

ROBIONY, M. et al. Osteogenesis distraction and platelet-rich plasma for bone restoration of the severely atrophic mandible: preliminary results. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 60, n. 6, p. 630-635, June 2002.

ROLDAN, J. C. et al. Bone formation in the presence of platelet-rich plasma vs. bone morphogenetic protein-7. *Bone*, v. 34, n. 1, p. 80-90, Jan. 2004a.

ROLDAN, J. C. et al. Sinus floor augmentation with simultaneous placement of dental implants in the presence of platelet-rich plasma or recombinant human bone morphogenetic protein-7. *Clin. Oral Implants Res.*, v. 15, n. 6, p. 716-723, Dec. 2004b.

SAMMARTINO, G. et al. Use of autologous platelet-rich plasma (PRP) in periodontal defect treatment after extraction of impacted mandibular third molars. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 63, n. 6, p. 766-770, June 2005.

SANTOS, M. D.; SANTOS, M. C. D. O sangue e a medula óssea. In: PONTUAL, M. A. B.; MAGINI, R. S. *Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e Fatores de Crescimento – das Pesquisas Científicas à Clínica Odontológica*. São Paulo: Santos, 2004. p. 3-44.

SATO, K.; URIST, M. R. Induced regeneration of calvaria by bone morphogenetic protein (BMP) in dogs. *Clin. Orthop.*, v. 197, p. 301-311, July/Aug. 1985.

SCHENK, R. Bone regeneration: biologic basis. In: BUSER, D.; DHALIN, C; SCHENK. *Guided Bone Regeneration in implant dentistry*. 1. ed. Chicago: Quintessence, 1994. p. 49-100.

SCHLEGEL, K. A. et al. Bone conditioning to enhance implant osseointegration: an experimental study in pigs. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v. 18, n. 4, p. 505-511, July/Aug. 2003.

SCHLEGEL, K. A. De novo bone formation using bovine collagen and platelet-rich plasma. *Biomaterials*, v. 25, n. 23, p. 5387-5393, Oct. 2004.

SCHLIEPHAKE, H. et al. Use of a mineralized collagen membrane to enhance repair of calvarial defects in rats. *Clin. Oral Implants Res.*, v. 15, n. 1, p. 112-118, Feb. 2004.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin. Orthop.*, v. 205, p. 299-308, Apr. 1986.

SCHMITZ, J. P. et al. Characterization of rat calvarial nonunion defects. *Acta Anat.*, v. 138, n. 2, p. 185-192, July 1990.

SENN, N. On the healing of aseptic bone cavities by implantation of antiseptic decalcified bone. *Am. J. Med. Sci.*, v. 98, p. 219-243, 1889.

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.*, v. 21, n. 4, p. 345-355, Aug. 2001.

SIERRA, D. H. Fibrin sealant adhesive system: a review of the chemistry, material properties and clinical applications. *J. Biomater. Appl.*, v. 7, n. 4, p. 309-352, Apr. 1993.

SIKAVITSAS, V. I. et al. Influence of the *in vitro* culture period on the *in vivo* performance of cell/titanium bone tissue-engineered constructs using a rat cranial critical size defect model. *J. Biomed. Mater. Res. A.*, v. 67, n. 3, p. 944-951, Dec.1 2003.

SILVER, F. H.; WANG, M. C.; PINS, G. D. Preparation and use of fibrin glue in surgery. *Biomaterials*, v. 16, n. 12, p. 891-903, Aug. 1995.

SMITH, C. N.; NEPTUN, D. A.; IRONS, R. D. Effect of sampling site and collection method on variations in baseline clinical pathology parameters in Fischer-344 rats. II. Clinical hematology. *Fundam. Appl. Toxicol.*, v. 7, n. 4, p. 658-663, Nov. 1986.

SOFFER, E.; OUHAYOUNG, J. P.; ANAGNOSTOU, F. Fibrin sealants and platelet preparations in bone and periodontal healing. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, v. 95, n. 5, p. 521-528, May 2003.

SOFFER, E. et al. Effects of platelet lysates on select bone cell functions. *Clin. Oral Implants Res.*, v. 15, n. 5, p. 581-588, Oct. 2004.

SONNLEITNER, D.; HUEMER, P.; SULLIVAN, D. Y. A simplified technique for producing Platelet-rich plasma and Platelet Concentrate for intraoral bone grafting techniques: A technical note. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v. 15, n. 6, p. 879-882, Nov./Dec. 2000.

SPERO, J. A. Bovine thrombin-induced inhibitor of factor V and bleeding risk in postoperative neurosurgical patients. *J. Neurosurg.*, v. 78, n. 5, p. 817, May 1993.

SUBA, Z. et al. Facilitation of beta-tricalcium phosphate-induced alveolar bone regeneration by platelet-rich plasma in beagle dogs: a histologic and histomorphometric study. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v. 19, n. 6, p. 832-838, Nov./Dec. 2004.

SUBER, R. L.; KODELL, R. L. The effect of three phlebotomy techniques on hematological and clinical chemical evaluation in sprague-dawley rats. *Vet. Clin. Pathol.*, v. 14, n. 1, p. 23-30, 1985.

SUMNER, D. R. et al. Enhancement of bone ingrowth by transforming growth factor-beta. *J. Bone Joint Surg. Am.*, v. 77, n. 8, p. 1135-1147, Aug. 1995.

SWEENEY, T. M. et al. Repair of critical size rat calvarial defects using extracellular matrix protein gels. *J. Neurosurg.*, v. 83, p. 710-715, Oct. 1995.

TAKAGI, K.; URIST, M. R. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Ann. Surg.*, v. 196, n. 1, p. 100-109, July 1982.

TAYAPONGSAK, P. et al. Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 52, n. 2, p. 161-165, Feb. 1994.

THE AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. *Glossary of Periodontal Terms*. 4. ed. Chicago: AAP, 2001. 53 p.

THORWARTH, M. et al. Expression of bone matrix proteins during de novo bone formation using a bovine collagen and platelet-rich plasma (prp)--an immunohistochemical analysis. *Biomaterials*, v. 26, n. 15, p. 2575-2584, May 2005.

TOZUM, T. F.; DEMIRALP, B. Platelet-rich plasma: a promising innovation in dentistry. *J. Can. Dent. Assoc.*, v. 69, n. 10, p. 664. Nov. 2003.

TSAY, R. C. et al. Differential growth factor retention by platelet-rich plasma composites. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 63, n. 4, p. 521-528, Apr. 2005.

UEDA, M.; TOHNAI, I.; NAKAI, H. Tissue engineering research in oral implant surgery. *Artif. Organs*, v. 25, n. 3, p. 164-171, Mar. 2001.

UEDA, M. et al. Clinical case reports of injectable tissue-engineered bone for alveolar augmentation with simultaneous implant placement. *Int. J. Periodontics Restorative Dent.*, v. 25, n. 2, p. 129-137, Apr. 2005.

VANDER, A. J. et al. Circulação. In: _____. *Fisiologia Humana: os mecanismos da função de órgãos e sistemas*. São Paulo: McGraw-Hill, 1981. p. 368-377.

VIKJAER, D. et al. Effect of platelet-derived growth factor-BB on bone formation in calvarial defects: an experimental study in rabbits. *Eur. J. Oral Science*, v. 105, n. 1, p. 59-66, Feb.1997.

YAMADA, Y. et al. Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue. *J. Craniomaxillofac. Surg.*, v. 31, n. 1, p. 27-33, Feb. 2003.

YAMADA, Y. et al. Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue-engineered bone regeneration. *Tissue Eng.*, v. 10, n. 5-6, p. 955-964, May/June 2004.

YAMAMOTO, K. et al. A comparative study of the effect of autologous platelet-rich plasma and fresh autologous whole blood on haemostasis after cardiac surgery. *Cardiovasc. Surg.*, v. 4, n. 1, p. 9-14, Feb. 1996.

YAZAWA, M. et al. Basic studies on the bone formation ability by platelet rich plasma in rabbits. *J. Craniofac. Surg.*, v. 15, n. 3, p. 439-446, May 2004a.

YAZAWA, M. et al. Influence of antiplatelet substances on platelet-rich plasma. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 62, n. 6, p. 714-718, June 2004b.

YOUNG, J. Z.; MEDAWAR, P. B. Fibrin suture of peripheral nerves. *Lancet*, v. 1, p. 126, 1940.

YUCEL, E. A. et al. Effects of fibrin glue on wound healing in oral cavity. *J. Dent.*, v. 31, n. 8, p. 569-575, Nov. 2003.

WANG, J. et al. Expression of bone microsomal casein kinase II, bone sialoprotein, and osteopontin during the repair of calvarial defects. *Bone*, v. 22, n. 6, p. 621-628, June 1998.

WANG, J.; GLIMCHER, M. J. Characterization of matrix-induced osteogenesis in rat calvarial bone defects: II. Origins of bone-forming cells. *Calcif. Tissue Int.*, v. 65, n. 6, p. 486-493, Dec. 1999.

WEIBRICH, G.; KLEIS, W. K. Curasan PRP kit vs. PCCS PRP system. Collection efficiency and platelet counts of two different methods for the preparation of platelet-rich plasma. *Clin. Oral Implants Res.*, v. 13, n. 4, p. 437-443, Mar./Apr. 2002.

WEIBRICH, G. et al. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J. Craniomaxillofac. Surg.*, v. 30, n. 2, p. 97-102, Apr. 2002a.

WEIBRICH, G.; KLEIS, W. K.; 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*, v. 17, n. 2, p. 184-190, Apr. 2002b.

WEIBRICH, G. et al. Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. *Clin. Oral Implants Res.*, v. 14, n. 3, p. 357-362, June 2003.

WEIBRICH, G. et al. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone*, v. 34, n. 4, p. 665-671, Apr. 2004.

WEIBRICH, G. et al. Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma-rich-in-growth-factors kit to produce platelet-rich plasma: a technical report. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v. 20, n. 1, p. 118-123, Jan./Feb. 2005.

WHITMAN, D. H.; BERRY, R. L.; GREEN, D. M. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 55, n. 11, p. 1294-1299, Nov. 1997.

WILTFANG, J. et al. Sinus floor augmentation with beta-tricalciumphosphate (beta-TCP): does platelet-rich plasma promote its osseous integration and degradation? *Clin. Oral Implants Res.*, v. 14, n. 2, p. 213-218, Apr. 2003.

WILTFANG, J. et al. Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. An animal experiment. *Clin. Oral Implants Res.*, v. 15, n. 2, p. 187-193, Apr. 2004.

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

Anexo C – Figuras e Tabelas da Análise Estatística

Tabela 2 - Testes de Normalidade

Teste Estatístico		p valor		
Shapiro-Wilk	W	0,9873	Pr<W	0,9636
Kolmogorov-Smirnov	D	0,1223	Pr>D	>0,1500
Cramer-von Mises	W-Sq	0,0381	Pr>W-Sq	>0,2500
Anderson-Darling	A-Sq	0,2040	Pr>A-Sq	>0,2500

Tabela 3 - Análise de variância da variável Área de Osso Neoformado (AON), medida em porcentagem, com transformação em arco-seno

Fonte de variação	G. L.	Somas de quadrado	Quadrado médio	F	p valor
Tempo	1	0,000412	0,000412	9,57	0,0044*
Grupo	1	0,002021	0,002021	46,94	< 0,0001*
Tempo*Grupo	1	0,000001	0,000001	0,04	0,8495
Resíduo	28	0,001206	0,000043		
Total	31	0,003641			

*Significativo ao nível de 5%

Tabela 4 - Teste de Tukey para comparação das médias da variável Área de Osso Neoformado (AON) nos dois períodos de tempo analisados (valores em proporção)

Conclusão	Médias	Desvio-Padrão	n	Tempo
A	0,124	0,065	16	4 semanas
B	0,181	0,088	16	12 semanas

* Médias com letras iguais não são diferentes significativamente ($p > 0,05$)

Tabela 5 - Teste de Tukey para comparação das médias da variável Área de Osso Neoformado (AON) dos grupos analisados (valores em proporção)

Conclusão	Médias	Desvio-Padrão	N	Grupo
A	0,094	0,051	16	C
B	0,211	0,062	16	PRP

* Médias com letras iguais não são diferentes significativamente ($p > 0,05$)

Tabela 6 - Teste de Correlação de Pearson para a quantidade de plaquetas presentes nas amostras de sangue periférico e de Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

Grupo	Médias	Desvio-Padrão	n	$r = 0,36318$
Plaquetas - Sangue Periférico	676.062,5	157.372,8985	16	$r^2 = 0,1319$
Plaquetas - PRP	2.644.063	1.084.851	16	$p \text{ valor} = 0,167^*$

* Não significativo ao nível de 5%

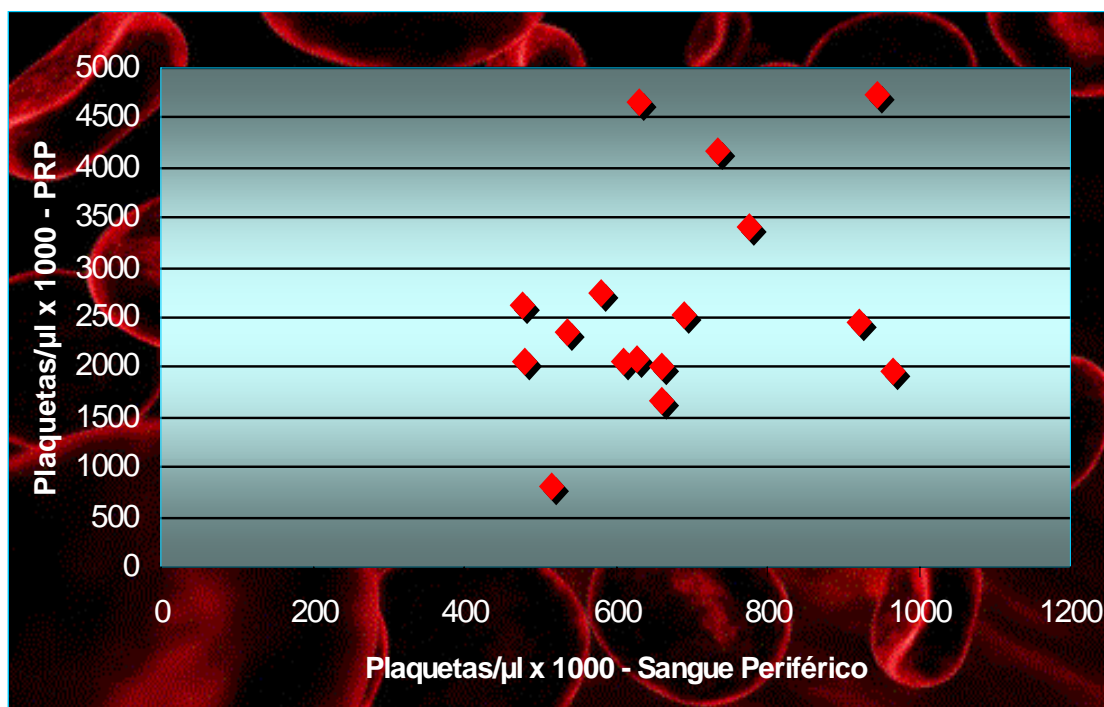


FIGURA 12 - Correlação entre a quantidade de plaquetas presentes nas amostras de PRP e de sangue periférico. PRP = Plasma Rico em Plaquetas.

Tabela 7 - Teste de Correlação de Pearson para a quantidade de plaquetas presentes nas amostras de Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e a Área de Osso Neoformado (AON)

Grupo	Médias	Desvio-Padrão	n	$r = 0,207389$
Plaquetas - PRP	2.644.063	1.084.851	16	$r^2 = 0,04301$
Área de Osso Neoformado	0,213909	0,063847	16	$p \text{ valor} = 0,441^*$

Não significativo ao nível de 5%

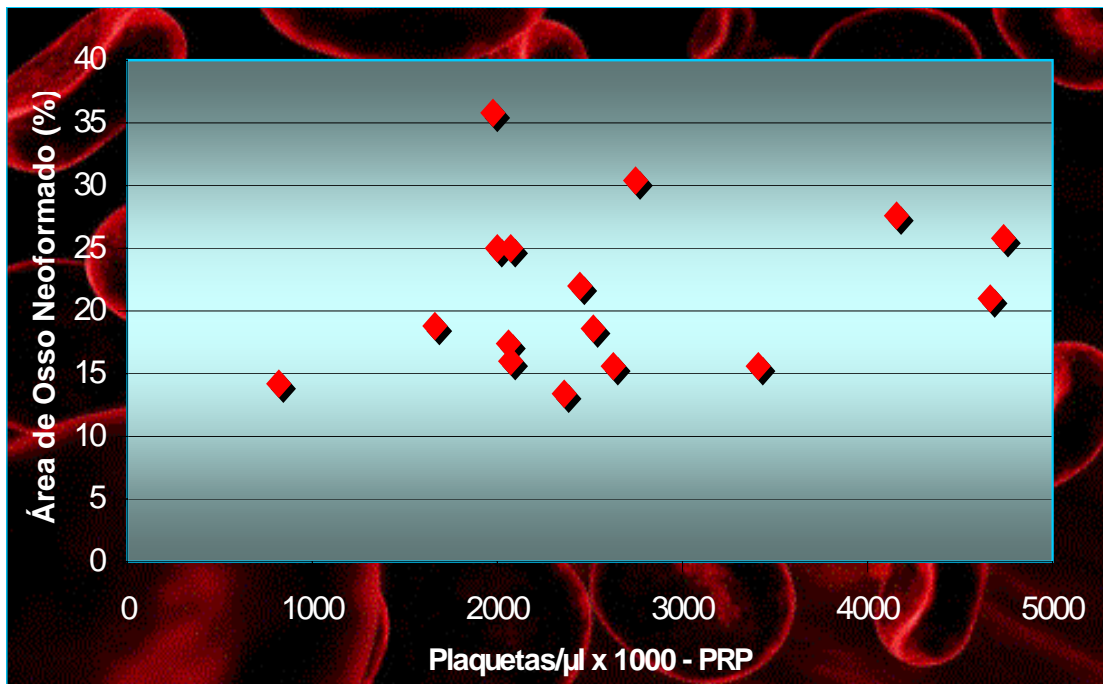


FIGURA 13 - Correlação entre a quantidade de plaquetas presentes nas amostras de PRP e a porcentagem de Área de Osso Neoformado (AON). PRP = Plasma Rico em Plaquetas.

*Anexo D – Autorização da Comissão de Ética na
Experimentação Animal (CEEA)*

*Anexo E – Normas para Publicação segundo o
Periódico – “Clinical Oral Implants
Research”*

138

Clinical Oral Implants Research

Official publication of the European Association for Osseointegration

Edited by:

Niklaus P. Lang



ISI Journal Citation Reports® Ranking: 2004: 5/48 (Dentistry, Oral Surgery & Medicine);
8/42 (Engineering, Biomedical)

Impact Factor: 2.139

Author Guidelines

Download Instructions to Authors as [PDF file](#) (size 43 kb).

Manuscripts should be sent in quadruplet to the editorial address below:

**Clinical Oral Implants Research
Department of Comprehensive Dental Care
University of Berne School of Dental Medicine
Freiburgstrasse 7
CH-3010 Berne
Switzerland**

or to one of the Associate Editors:

**Dr. Hans-Peter Weber, DDS, DMD
Harvard School of Dental Medicine
Department of Periodontology
188 Longwood Avenue
Boston
MA 02115
USA**

**Prof. Dr. DR.H.C. Daniel van Steenberghe, MD, LDS
Department of Periodontology
Catholic University of Leuven
Capucynenvoer 7
B-3000 Leuven
Belgium**

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work has not been published before, is not being considered for publication elsewhere and has been read and approved by all authors. The submission of the manuscript by the authors means that the authors automatically agree to assign exclusive copyright to Blackwell Munksgaard if and when the manuscript is accepted for publication. When the manuscript has been accepted, the corresponding author will receive a Copyright Assignment Form from the editorial office to be returned signed on behalf of all co-authors. You can also download the [Copyright Assignment Form](#) here.

The work shall not be published elsewhere in any language without the written consent of the publisher. The articles published in this journal are protected by copyright, which covers translation rights and the exclusive right to reproduce and distribute all of the articles printed in the journal. No material published in the journal may be stored on microfilm or videocassettes or in electronic databases and the like or reproduced photographically without the prior written permission of the publisher.

The instructions to authors will be strictly adhered to by the Editor. Manuscripts otherwise prepared will be returned to the authors for revision prior to review.

Acceptable material - Original investigations, reviews, and case reports. The last will be published only if they provide new fundamental knowledge and if they use language understandable to the clinician. Proceedings of international meetings may also be considered for publication at the discretion of the Editor.

Manuscripts - Provide your manuscript on one newly formatted 3.5-inch floppy disk; 4 printed, double-spaced copies including figures and tables must accompany the disk. The paper manuscript and the file on the disk must be the same. Label the disk clearly with the journal name, author and title, file content, computer system (DOS, Windows or Macintosh),

word processor (Word, WordPerfect etc.) and version used. Do not convert your manuscript to ASCII format. Include only the files corresponding to the manuscript. Full details of manuscript submission of disk will be sent following notification of acceptance of the manuscript. The author is responsible for all statements made in the work, including changes made by the copy editor, which must be reviewed in proof. Manuscripts must be written in English. All material, including legends and references, must be typed **double-spaced** on only one side of plain white paper, size ISO A4 (210 x 297 mm), U.S. letter size (8.5 x 11 inches), with margins of at least 25 mm, or 1 inch. Articles should not normally exceed 10 printed pages, including illustrations and references. One printed page is the equivalent of 3.8 typed double-spaced pages using a 12-pitch font (12 characters per inch). Additional pages will be charged to the author(s) at the rate of DKK 800 per page. The article should be clearly divided as follows:

Title page - The first page should contain the title of the article, name(s) of the author(s), full first name(s), and institutional affiliation(s), a running title not to exceed 60 letters and spaces, and the name, telephone and fax numbers and complete mailing address of the author responsible for correspondence. The author must list appropriate key words for indexing purposes.

Abstract - A separate abstract page should contain the name(s) of the author(s) followed by initials, title of the article, followed by the abbreviated journal title (*Clin Oral Impl Res*); and an abstract *not to exceed 250 words*. This should be structured into: objectives - material and methods - results - conclusions, and no other information.

Introduction - Summarise the rationale and purpose of the study, giving only strictly pertinent references. Do not review existing literature extensively. State clearly the working hypothesis.

Material and methods - Material and methods should be presented in sufficient detail to allow confirmation of the observations. Published methods should be referenced and discussed only briefly, unless modifications have been made. Indicate the statistical methods used, if applicable.

Results - Present your results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all data in the tables and illustrations. The important observations should be emphasised.

Discussion - Summarise the findings without repeating in detail the data given in the Results section. Relate your observations to other relevant studies and point out the implications of the findings and their limitations. Cite other relevant studies.

Acknowledgements - Acknowledge persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. Sources of financial support may be acknowledged.

Short communications -Short communications, limited to two printed pages including illustrations and references, will be considered for rapid publication. Such papers must be based on work that is of special importance or has the potential for great impact. Short communications need not follow the usual division into Material and methods, etc., but should have an abstract.

References - in the text should quote the last name(s) of the author(s) and the year of publication (Black & Miller 1988). Three or more authors should always be referred to as, for example, (Fox et al. 1977).

A list of references should be given at the end of the paper and should follow the recommendations in *Units, symbols and abbreviations: a guide for biological and medical editors and authors* (1988), p. 52, London: The Royal Society of Medicine.

a) The arrangement of the references should be alphabetical by author's surname.

b) The order of the items in each reference should be:

(i) for journal references:

name(s) of author(s), year, title of paper, title of journal, volume number, first and last page numbers.

(ii) for book references:

name(s) of author(s), year, title of book, edition, volume, chapter and/ or page number, town of publication, publisher.

c) Author's names should be arranged thus: Daniels, J.A., Kelly, R.A. & Til, T.C. Note the use of the ampersand and omission of comma before it. Author's names when repeated in the next reference are always spelled out in full.

d) The year of publication should be surrounded by parentheses: (1966).

e) The title of the paper should be included, without quotation marks.

f) The journal title should be written in full, italicised (single underlining on typescript), and followed by volume number in bold type (double underlining on typescript), and page numbers.

Examples - Tonetti, M. S., Schmid, J., Hämmerle, C. H. & Lang, N. P. (1993) Intraepithelial antigen-presenting cells in the keratinized mucosa around teeth and osseointegrated implants. *Clinical Oral Implants Research* 4: 177- 186.

Poole, B., Ohkuma, S. & Warburton, M. (1978). Some aspects of the intracellular breakdown of erogenous and endogenous proteins. In: Segal, H.S. & Doyle, D.J., eds. *Protein turnover and lysosome function*, 1st edition, p. 43. New York: AcademicPress.

Illustrations - All figures should clarify the text and their number should be kept to a minimum. Details must be large enough to retain their clarity after reduction in size. Illustrations should preferably fill a single-column width (81 mm) after reduction, although in exceptional cases 120mm (double-column) and 168 mm (full page) widths will be accepted. Micrographs should be designed to be reproduced without reduction, and they should be dressed directly on the micrograph with a linear size scale, arrows, and other designators as needed. Submit at least one original set of illustrations, identifying each with a label on the back which indicates the number, author's name, and the top. Alternatively, arrange micrographs into plates fitting the space appropriately. Copies of the original illustration maybe submitted with the second and third copies of the manuscript. Line drawings should be professionally drawn; halftones should exhibit high contrast. Figure legends must be typed *double-spaced* on a separate page at the end of the manuscript. Colour illustrations in small numbers may be accepted free of charge to the authors at the discretion of the Editor. Otherwise the author must pay for the illustrations at a rate to be quoted by the publisher. Authors must submit the original colour transparencies and 2 sets of colour prints with the manuscript.

Tables - Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals. Type each table on a separate sheet, with titles making them self-explanatory. Due regard should be given to the proportions of the printed page.

Scientific names - Proper names of bacteria should be binomial and should be singly underlined on the typescript. The full proper name (e.g., *Streptococcus sanguis*) must be given

upon first mention. The generic name may be abbreviated thereafter with the first letter of the genus (e.g., *S. sanguis*). If abbreviation of the generic name could cause confusion, the full name should be used. If the vernacular form of a genus name (e.g., streptococci) is used, the first letter of the vernacular name is not capitalised and the name is not underlined. Use of two letters of the genus (e.g., *Ps. for Peptostreptococcus*) is incorrect, even though it might avoid ambiguity. With regard to drugs, generic names should be used instead of proprietary names. If a proprietary name is used, it must be attached when the term is first used.

Abbreviations and symbols - The symbol % is to be used for percent, h for hour, min for minute, and s for second. *In vitro*, *in vivo*, *in situ* and other Latin expressions are to be italicised. Use only standard abbreviations. All units will be metric. Use *no roman* numerals in the text. In decimals, a decimal point and not a comma will be used. Avoid abbreviations in the title. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement. In cases of doubt, the spelling orthodoxy of *Webster's third new international dictionary* will be adhered to.

Author material archive policy - Please note that unless specifically requested, Blackwell Publishing will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible if you have not yet done so.

Proofs - Page proofs only will be sent. Only minor corrections are allowed without extra cost.

Offprints - The senior authors are given 50 offprints of their article. Additional offprints can be ordered from the publisher by using the offprint order form accompanying the proofs when page proofs are returned.