

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara

**COMPORTAMENTO DE MARCADORES SÉRICOS DE FORMAÇÃO E
REABSORÇÃO ÓSSEA APÓS ENXERTO AUTÓGENO EM FISSURA
ALVEOLAR CONGÊNITA: SEM E COM PLASMA RICO EM
PLAQUETAS**

LUIZ HENRIQUE MARCHESANO

Tese para obtenção do grau de
Doutor em Análises Clínicas
Área de Análises Clínicas

Orientador:
Prof. Dr. IGUATEMY LOURENÇO BRUNETTI

ARARAQUARA - SP
2005

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti

(Presidente e Orientador)

Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio

(Membro)

Prof^a. Dr^a. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

(Membro)

Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Pepato

(Membro)

Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Rubo de Rezende

(Membro)

Prof. Dr. Ruy Cesar Camargo Abdo

(Suplente)

Prof. Dr. Eduardo Sant'Ana

(Suplente)

Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior

(Suplente)

Araraquara, 06 de dezembro de 2005.

*Em seu coração o homem planeja o caminho, mas é
Deus que firma seus passos.*

(Prov. 16:9)

DEDICATÓRIA

À minha querida esposa
Sandra
pelo seu amor, companheirismo, incentivo, compreensão e colaboração ativa a este trabalho.

Aos meus filhos
Flávia e Lucas
por compreenderem a minha ausência em muitos momentos importantes de suas vidas. Tenho muito orgulho de vocês.

Aos meus pais
Célia e José Luiz
pela vida, amor, carinho e por acreditarem nos meus objetivos.

Aos meus irmãos
Luiz Carlos e Luiz Fernando (in memorian)
por todos os bons momentos que passamos juntos

Aos meus sogros
Rosa e Paulo (in memorian)
pelo amor, respeito e confiança que sempre externaram por mim.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao

Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti,

*agradeço imensamente pela orientação segura e pela amizade que se solidificou
nestes anos que trabalhamos juntos.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Aos pacientes do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo, que foram imprescindíveis para que este trabalho se realizasse, contribuindo para o desenvolvimento da ciência, o meu sincero agradecimento. Que Deus os abençoe.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho contou com o apoio, dedicação e competência de cada uma dessas pessoas especiais.

À diretoria do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo representada pelo Prof. Dr. José Alberto de Souza Freitas, Prof^ª. Dr^a. Maria Irene Bachega e Prof^ª. Dr^a. Lílían D' Aquino Tavano pela amizade e incentivo.

Ao Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio, Prof^ª. Dr^a. Marília Afonso Rabelo Buzalaf, Prof^ª. Dr^a. Maria Teresa Pepato, Prof^ª. Dr^a. Maria Lúcia Rubo de Rezende, Prof. Dr. Ruy Cesar Camargo Abdo, Prof. Dr. Eduardo Sant'Ana e Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior que participaram da comissão examinadora.

Aos profissionais do Setor de Cirurgia Buco-maxilofacial do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo, Prof^ª. Ms. Roberta Martinelli Carvalho, Prof. Renato A. de Souza Faco, Prof. Dr. Roberto Macoto Suguimoto e Prof. Dr. Reinaldo Mazzottini e aos residentes R2 e R3 Giuliano Henrique Luchi, Cláudia Furlan Felício, Carlos Henrique Bettoni Castro, José Carlos da Cunha Bastos Junior, Danilo Ibrahim e José Henrique Santos Filho pela amizade e colaboração na execução deste trabalho.

Aos profissionais do Setor Radiologia do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo, Prof^ª. Dr^a. Izabel M. M. Carvalho e ao CD Carlos Alberto Carvalho Pires pela amizade, orientação e avaliações radiográficas.

Ao Ms. Flávio Monteiro Amado do Setor de Prótese sobre Implante do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo pela digitalização das imagens radiográficas.

À Prof^ª. Dr^a. Isabel Regina Fischer Rubira Bullen e Prof. Dr. José Humberto Damante da Disciplina de Estomatologia e Radiologia da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo pela orientação a este trabalho.

Ao Prof. Dr. José Mauro Granjeiro do Departamento de Biologia Celular e Molecular do Centro de Estudos Gerais da Universidade Federal Fluminense pela amizade e orientação.

Ao Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris do Departamento Ortodontia, Odontopediatria e Saúde Coletiva da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo pela orientação e tratamento estatístico dos dados.

À Prof^{ra}. Dr^a. Elza Araújo Torres do Laboratório de Imunogenética do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo pela amizade, incentivo e cessão de equipamentos.

À Farmacêutica Thelma Lopes Silva da Disciplina de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo pelo preparo de reagentes.

À Ms. Tânia Yoshico Kamiya do Laboratório de Citogenética do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo pela amizade e cessão de equipamentos.

Às Enfermeiras Janir Biazon, Maria Cristina Herrera, Cláudia Regina Matiole Nunes e Lílían Regina Leandro Bertolini do Centro Cirúrgico do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo pela coleta do sangue para o preparo do PRP.

Ao César Fernandes Júnior do Setor de Farmácia do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo pela amizade, incentivo e digitação deste trabalho.

À Eunice Aparecida Scarpin e Irene Vieira Silva do Setor de Farmácia do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo pela amizade e incentivo.

À Ana Cristina Galian e Nilton Cabreira da DPC-Medlab pela orientação na execução de exames laboratoriais.

À Maria Benedita Esgotti, Ms. Narciso Almeida Vieira, Marcos Vinício Simionato, Silvia Cristina Arantes, Ms. Ana Lúcia Peroni Costa Cardoso, Salete Silvério da Costa e Marina Ponce Ciniciato do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo pela amizade e colaboração na execução dos exames laboratoriais.

Ao Marcos Aparecido Dango e Valéria Cristina de Oliveira Alves do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” pelo preparo de reagentes.

Às Farmacêuticas Jussara Helena Camparis Lessi, Maria Teresa Iannotti e Tânia Navarro Nunes do Núcleo de Apoio à Comunidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” pela colaboração e orientação na execução de exames laboratoriais.

À Dr^a. Valéria Samuel Lando e Márcia Ester Ferreira Machado do Laboratório de Hormônios do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo pela cessão do aparelho de quimiluminescência.

À Ana Aparecida Gomes Grigoli, Janice Lopes Cacere, Ana Regina Carvalho de Ângelo, Poliana Lima Martins, Denise A. Giacheti, Rosimeire Aparecida Gimenez Botelho, Sandra Bim Pinheiro e Alessandra Gimenez da Unidade de Ensino e Pesquisa do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo pela orientação, busca e revisão bibliográfica.

À Cláudia Lúcia Molina, Sônia Ornelas e Laura Rosim da Seção de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” pela atenção dispensada.

Este trabalho foi financiado pelo Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. O meu agradecimento aos membros da Comissão de Pesquisa na pessoa da Prof^a. Dr^a. Maria José Soares Mendes Giannini, presidente desta Comissão.

SUMÁRIO

	página
ABREVIATURAS.....	12
ÍNDICE DE FIGURAS.....	13
ÍNDICE DE TABELAS.....	14
Resumo.....	15
<i>Abstract</i>	17
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1. O tecido ósseo.....	23
2.1.1. Fatores sistêmicos de regulação do metabolismo ósseo.....	26
2.1.2. Fatores locais de regulação do metabolismo ósseo.....	28
2.1.2.1. Fator de crescimento derivado de plaquetas.....	29
2.1.2.2. Fator de crescimento de transformação.....	30
2.1.2.3. Fator de crescimento de fibroblastos.....	30
2.1.2.4. Fator de crescimento semelhante à insulina.....	31
2.1.2.5. Proteína morfogenética óssea.....	32
2.2. Fissura labiopalatina.....	34
2.3. Enxerto ósseo.....	37
2.3.1. Modelo de reparo ósseo.....	40
2.4. Plasma rico em plaquetas.....	43
2.4.1. Plaquetas.....	43
2.4.2. Plasma rico em plaquetas.....	44
2.5. Marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo.....	52
2.5.1. Marcadores bioquímicos de formação óssea.....	53
2.5.1.1. Fosfatase alcalina.....	53
2.5.1.2. Fosfatase alcalina isoforma óssea.....	55
2.5.1.3. Osteocalcina.....	56
2.5.2. Marcadores bioquímicos de reabsorção óssea.....	58
2.5.2.1. Fosfatase ácida tartarato resistente.....	58
3. OBJETIVOS.....	60

4. MATERIAL E MÉTODOS.....	62
4.1. Protocolo de trabalho.....	63
4.2. Sais e reagentes.....	64
4.3. Equipamentos.....	64
4.4. Coleta de material para análise bioquímica.....	64
4.5. Preparo e aplicação do plasma rico em plaquetas.....	65
4.6. Avaliação bioquímica.....	66
4.6.1. Fosfatase alcalina total.....	66
4.6.2. Fosfatase alcalina isoforma óssea.....	67
4.6.2.1. Por imunoensaio.....	67
4.6.2.2. Por inativação térmica.....	67
4.6.2.3. Por inibição química.....	67
4.6.3. Osteocalcina.....	70
4.6.4. Fosfatase ácida tartarato resistente.....	71
4.7. Contagem de plaquetas.....	71
4.8. Avaliação radiográfica.....	72
4.9. Análise estatística.....	73
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
5.1. Características gerais da amostra.....	75
5.2. Comportamento dos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e avaliação do uso do PRP.....	76
5.3. Avaliação radiográfica da área do enxerto.....	89
6. CONCLUSÃO.....	95
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
8. ANEXOS.....	116

ABREVIATURAS

- BMP - Proteína morfogenética óssea
- EGF - Fator de crescimento epitelial
- F - Fisher
- FAL - Fosfatase alcalina
- FAO - Fosfatase alcalina isoforma óssea
- FATR - Fosfatase ácida tartarato resistente
- FGF - Fator de crescimento de fibroblastos
- FLP - Fissura labiopalatina
- GLA - Ácido carboxiglutâmico
- HRAC - Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais
- IGF - Fator de crescimento similar à insulina
- MDAF - Fator de angiogênese derivado de macrófagos
- MDGF - Fator de crescimento derivado de macrófagos
- OC - Osteocalcina
- p - Nível de significância estatístico
- PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas
- PRP - Plasma rico em plaquetas
- PTH - Paratormônio
- TCT - Tireocalcitonina
- TGF - Fator de crescimento de transformação
- USP - Universidade de São Paulo
- VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

ÍNDICE DE FIGURAS

	página
Figura 1: Diagrama representativo da classificação das fissuras segundo SILVA FILHO et al. (1992).....	35
Figura 2: Fluxograma do programa de computador utilizado para calcular as isoformas da fosfatase alcalina (O'CARROL et al., 1975).....	69
Figura 3: Comportamento da fosfatase alcalina sem e com PRP.....	78
Figura 4: Comportamento da fosfatase alcalina isoforma óssea por imuno-ensaio sem e com PRP.....	79
Figura 5: Comportamento da fosfatase alcalina isoforma óssea por inativação térmica sem e com PRP.....	79
Figura 6: Comportamento da fosfatase alcalina isoforma óssea por inibição química sem e com PRP.....	80
Figura 7: Comportamento da osteocalcina sem e com PRP.....	82
Figura 8: Comportamento da fosfatase ácida tartarato resistente sem e com PRP.....	84
Figura 9: Imagem radiográfica periapical ilustrativa da fissura alveolar antes do procedimento cirúrgico.....	92
Figura 10: Imagem radiográfica periapical ilustrativa da presença de trabeculado ósseo organizado com 35 dias médios após a cirurgia no grupo com PRP.....	92
Figura 11: Imagem radiográfica periapical ilustrativa da presença de trabeculado ósseo organizado com 70 dias médios após a cirurgia no grupo com PRP.....	93
Figura 12: Imagem radiográfica periapical ilustrativa da presença de trabeculado ósseo organizado com 35 dias médios após a cirurgia no grupo sem PRP.....	93
Figura 13: Imagem radiográfica periapical ilustrativa da presença de trabeculado ósseo organizado com 70 dias médios após a cirurgia no grupo sem PRP.....	94

ÍNDICE DE TABELAS

	página
Tabela 1: Valores de referência adotados para a FAL total.....	66
Tabela 2: Valores de referência para as isoformas da FAL.....	70
Tabela 3: Valores de referência adotados para a OC.....	71
Tabela 4: Distribuição dos pacientes segundo o tipo de fissura nos grupos sem e com PRP.....	75
Tabela 5: Marcadores bioquímicos séricos de formação e reabsorção óssea.....	77
Tabela 6: Correlação entre a covariável área da fissura e os marcadores de formação e reabsorção óssea.....	85
Tabela 7: Correlação entre o número de plaquetas aplicado e os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo do grupo com PRP.....	86
Tabela 8: Teste de concordância interexaminador após avaliação radiográfica sem e com PRP.....	90
Tabela 9: Teste de concordância intra-examinador após avaliação radiográfica sem e com PRP.....	90

RESUMO

O tratamento cirúrgico da fissura congênita do processo alveolar superior compreende o enxerto ósseo, um procedimento bem aceito e de grande importância na restauração da forma e da função perdidas. Associado ao enxerto ósseo tem-se utilizado um produto atóxico, não imunoreativo e de fácil obtenção, denominado plasma rico em plaquetas (PRP).

Neste estudo foi analisado o comportamento dos marcadores fosfatase alcalina, fosfatase alcalina isoforma óssea, osteocalcina e fosfatase ácida tartarato resistente em 50 pacientes, com idade entre 10 e 20 anos e que foram submetidos à cirurgia de enxerto ósseo autógeno alveolar pelo serviço de Cirurgia Buco-maxilo-facial do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo. O objetivo foi acompanhar de forma sistêmica e em curto período a formação ou reabsorção óssea após a realização do enxerto ósseo alveolar, bem como avaliar a eficácia do uso do plasma rico em plaquetas no processo de formação óssea.

Os pacientes foram subdivididos em 2 grupos: os que receberam o PRP ($13,2 \pm 2,8$ anos, 1º retorno com $35,5 \pm 3,0$ dias e 2º retorno com $72,6 \pm 9,4$ dias) e os que não receberam o PRP ($12,7 \pm 2,3$ anos; 1º retorno com $35,4 \pm 2,6$ dias e 2º retorno com $70,8 \pm 7,9$ dias). O grupo com PRP recebeu cerca de 7,3 mL do produto associado ao enxerto ósseo, num total de $2,5 \times 10^9 \pm 0,9$ de plaquetas.

A análise de covariância para a fosfatase alcalina (FAL) mostrou diferença estatisticamente significativa para o critério tempo ($p < 0,001$), mas não entre os grupos sem e com PRP ($p = 0,567$) e interação ($p = 0,177$). O mesmo foi encontrado para a fosfatase alcalina óssea (FAO) por imunoensaio (com respectivamente $p < 0,001$, $p = 0,655$ e $p = 0,183$) e FAO por inibição química ($p = 0,042$, $p = 0,625$ e $p = 0,320$). Para o marcador FAO por inibição térmica não houve diferença significativa para tempo, grupo e interação ($p = 0,086$, $p = 0,641$ e $p = 0,217$). Para a osteocalcina (OC) houve diferença estatisticamente significativa para a interação ($p < 0,001$), mas não para o tempo ($p = 0,171$) e entre grupos ($p = 0,799$). Para a fosfatase ácida tartarato resistente (FATR) houve diferença estatisticamente significativa para o tempo ($p < 0,001$) e interação ($p < 0,001$), mas não entre grupos ($p = 0,477$).

O estudo concluiu que as propriedades restauradoras do PRP não puderam ser demonstradas por nenhum dos marcadores bioquímicos do

metabolismo ósseo nos primeiros 70 dias do ato cirúrgico; a análise temporal dos marcadores de formação óssea testados demonstrou uma tendência de queda com 35 dias e retorno próximo aos níveis basais com 70 dias do ato cirúrgico nos dois grupos estudados; não houve uma correlação significativa dos marcadores com o número de plaquetas e nem com a área da fissura e o resultado do exame ao raio-x foi considerado inconclusivo para a presença ou não de trabeculado ósseo organizado em fase inicial de formação.

Palavras chaves: enxerto ósseo alveolar, plasma rico em plaquetas, fosfatase alcalina, fosfatase alcalina óssea, osteocalcina, fosfatase ácida tartarato resistente

ABSTRACT

The surgical treatment of the congenital cleft of the upper alveolar process understands the bone graft, a well accepted procedure of great importance in the restoration of the lost form and function. Together with the bone graft it is being used a non-toxic, non immunoreactive and easily obtained product, denominated platelet-rich plasma (PRP).

In this study it was analysed the behavior of the alkaline phosphatase, bone alkaline phosphatase, osteocalcin and tartrate-resistant acid phosphatase markers in 50 patients, with age between 10 and 20 years and that were undergone to alveolar autogenous bone graft performed by the Bucomaxillofacial Service of the "Hospital for Rehabilitation of Craniofacial Anomalies, University of São Paulo". The aim was follow in a sistemic and early way the bone formation or reabsorption after the accomplishment of the alveolar bone graft, as well as to evaluate the effectiveness of the use of the platelet-rich plasma in the process of bone formation.

The patients were subdivided in two groups: the ones who received the PRP (13.2 $\pm$ 2.8 years, first return within 35.5 $\pm$ 3.0 days and second return within 72.6 $\pm$ 9.4 days) and the ones who did not receive the PRP (12.7 $\pm$ 2.3 years, first return within 35.4 $\pm$ 2.6 days and second return within 70.8 $\pm$ 7.9 days). The group with PRP received about 7.3 mL of the product associated to the bone graft, in a total of $2.5 \times 10^9 \pm 0.9$ of platelets.

The covariance analysis for alkaline phosphatase (ALP) showed a significant statistical difference for the criterion time ($p < 0,001$), but not among the groups without and with PRP ($p = 0,567$) and interaction ($p = 0,177$). The same was found for bone alkaline phosphatase (BAP) for imunoassay (with respectively $p < 0,001$, $p = 0,655$ and $p = 0,183$) and BAP for chemical inhibition ($p = 0,042$, $p = 0,625$ and $p = 0,320$). For the marker BAP for thermal inhibition there was not a significant statistical difference for time, groups and interaction ($p = 0,086$, $p = 0,641$, $p = 0,217$). For the osteocalcin (OC) there was a significant statistical difference for the interaction ($p < 0,001$), but not for the time ($p = 0,171$) and among groups ($p = 0,799$). For the tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) there was significant statistical difference for the time ($p < 0,001$) and interaction ($p < 0,001$), but not among the groups ($p = 0,477$).

The study concluded that the restorative properties of the PRP could not be demonstrated by of the biochemistry markers of the bone metabolism in the

first 70 days of the surgery; the temporal analysis of the bone formation markers tested demonstrated a fall tendency in 35 days with return near to basal levels in 70 days in the two studied groups; there was not a significant correlation between markers and the number of platelets and neither with the area of the cleft and the result of the x-ray examination was not considered conclusive for the presence or not of organized bone trabeculae in the initial phase of formation.

Words: alveolar bone graft, platelet-rich plasma, alkaline phosphatase, bone alkaline phosphatase, osteocalcin, tartrate-resistant acid phosphatase.

1. INTRODUÇÃO

A fissura labiopalatina (FLP) é uma malformação embriológica congênita que acomete uma parcela significativa da população mundial (CARREIRÃO; LESSA; ZANINI, 1996). Quando envolve o complexo maxilo-facial, a fissura pode comprometer, individualmente ou em conjunto, o lábio superior, o processo alveolar superior e o palato (GORLIN; COHEN; LEVIN, 1990).

O tratamento cirúrgico da fissura do processo alveolar superior compreende o enxerto ósseo, um procedimento bem aceito e de grande importância na restauração da forma e da função perdidas (TAKANO-YAMAMOTO; KAWAKAMI; SAKUDA, 1993). Tem como objetivos estabilizar a estrutura alveolar e a arcada dentária superior, eliminar a fístula oronasal, aliviar as vias aéreas obstruídas e propiciar a irrupção do canino no corpo do enxerto, entre outros (PAULIN, 1998).

Associado ao enxerto ósseo tem-se utilizado nos últimos anos um produto atóxico, não imunoreativo e de fácil obtenção, denominado plasma rico em plaquetas (PRP). Sua estratégia terapêutica fundamenta-se na modulação e aceleração dos processos reparadores através de fatores de crescimento intrínsecos das plaquetas (SCARSO FILHO et al., 2001). A proposta do uso do PRP associado a materiais de enxerto é levar a uma regeneração óssea em curto período, proporcionar maior densidade do trabeculado do osso maduro, além de acelerar a cicatrização de tecidos moles (CHAGAS; OLIVEIRA; BORTOLI JÚNIOR, 2004).

Os fenômenos metabólicos, fisiológicos ou patológicos relacionados ao tecido ósseo só afetam significativamente sua estrutura mineralizada após um espaço de tempo considerável. Isto torna o emprego da radiografia, da densitometria óssea ou mesmo da tomografia computadorizada limitado para o estudo dinâmico e de curto prazo do metabolismo ósseo. Por outro lado, a análise histológica do tecido ósseo, considerado o melhor meio para se avaliar alterações na formação e reabsorção óssea, é um método invasivo. Existem, entretanto, métodos não

invasivos que podem quantificar substâncias representativas dos processos metabólicos em curso neste tecido, denominados marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo (VIEIRA et al., 1999).

A investigação bioquímica dos processos de formação e de reabsorção óssea mediante o uso destes marcadores, está baseada respectivamente na identificação de produtos sintetizados pelos osteoblastos e de produtos originados da degradação exercida pelos osteoclastos sobre o tecido ósseo, além da determinação da atividade de enzimas relativamente específicas à função destes dois tipos de células (LEIVA, 1996).

Neste contexto, foi analisado o comportamento dos marcadores fosfatase alcalina (FAL), fosfatase alcalina isoforma óssea (FAO), osteocalcina (OC) e fosfatase ácida tartarato resistente (FATR), para acompanhar em curto período o processo de formação ou reabsorção óssea após a realização do enxerto ósseo alveolar, bem como avaliar o efeito regenerativo do PRP.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O TECIDO ÓSSEO

O osso é um tecido metabolicamente ativo que sofre um contínuo processo de renovação e remodelação (JIMÉNEZ-DÍAZ; MARTINEZ MONGE, 1999; VIEIRA, 1999). É constituído por células, fibras, substância fundamental, água e minerais (VIANNA, 1988).

Como principal constituinte do esqueleto, fornece suporte às partes moles do organismo, protege órgãos vitais como os contidos na caixa craniana e torácica, aloja a medula óssea geradora das células do sangue e proporciona apoio aos músculos esqueléticos, transformando suas contrações em movimentos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Outra função, de natureza metabólica, está associada a homeostase mineral, atuando como uma reserva de íons, cuja importância pode ser avaliada pelo fato de aproximadamente 99% do cálcio, 85% do fósforo, 90% do sódio e 50% do magnésio corporal estarem associados ao cristal de hidroxiapatita (ZENI et al., 2001).

Sua atividade é resultado da ação de três tipos de células: os osteoblastos, os osteoclastos e os osteócitos (VIANNA, 1988; VAN STRAALLEN et al., 1991; CRUZ, 1994; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Os osteoblastos são células cubóides derivadas de células mesenquimais primitivas, os pré-osteoblastos da medula óssea (NIJWEIDE; BURGER; FEYEN, 1986). Sintetizam a parte orgânica da matriz óssea (fibras e matriz protéica) e são chamadas de células osteogênicas ou da construção óssea (VIANNA, 1988). A maioria dos osteoblastos dá origem aos osteócitos, outros permanecem como osteoblastos por longos períodos e alguns retornam ao estado de célula osteoprogenitora (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Os osteoclastos são células móveis, gigantes, extensamente ramificadas, com cerca de 6 a 50 núcleos e são responsáveis pelo processo de reabsorção, que é a dissolução da matriz óssea em aminoácidos e minerais (VIANNA, 1988; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Seu citoplasma contém inúmeros lisossomas ricos em fosfatase ácida e collagenase, enzimas necessárias à sua função (VIANNA, 1988). Vários estudos demonstraram que os osteoclastos derivam de células precursoras da linhagem monocítica (NIJWEIDE; BURGER; FEYEN, 1986; DeLACURE, 1994), as quais se unem após contato com o tecido ósseo formando os osteoclastos multinucleados (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Os osteócitos são células fusiformes resultantes da transformação do osteoblasto após a formação da matriz orgânica e sua mineralização. Localizam-se no interior da matriz óssea, dentro de cavidades denominadas osteoplastos. Têm um importante papel no metabolismo ósseo e na manutenção da concentração do cálcio plasmático. Caracterizam-se por apresentarem prolongamentos citoplasmáticos que se comunicam com os osteoblastos da superfície óssea e com outros osteócitos, estabelecendo vias de transporte de nutrientes e metabólitos. Sua morte é seguida por reabsorção da matriz óssea (VIANNA, 1988; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A matriz orgânica protéica é constituída principalmente por colágeno do tipo I e pela fração orgânica não colágena, denominada substância fundamental, que por sua vez é constituída por osteocalcina, osteonectina, osteopontina, fosfatase alcalina, collagenase, lipoproteínas, fosfoproteínas, glicoproteínas e fatores de crescimento (TRIFFITT, 1987; CRUZ, 1994; FERNANDES, 1998). O colágeno do tipo I é uma proteína fibrosa composta principalmente pelos aminoácidos prolina, hidroxiprolina e glicina (CRUZ, 1994; FERNANDES, 1998).

Os íons mais abundantes encontrados no tecido ósseo são o cálcio e o fosfato. Existem ainda, em menores quantidades, bicarbonato, sódio, potássio,

citrato, magnésio, carbonato, lactato, fluoreto, zinco, bário e estrôncio. O cálcio e o fósforo formam um cristal semelhante às apatitas naturais e por ser hidratado, é denominado hidroxiapatita, cuja fórmula molecular é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. A associação entre a hidroxiapatita e as fibras colágenas é a responsável pela dureza e resistência características do tecido ósseo (VIANNA, 1988; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Os ossos originam-se de duas maneiras: no seio de uma membrana conjuntiva ou pela substituição gradual de um modelo cartilaginoso pré-existente. Estes processos são denominados respectivamente de ossificação intramembranosa e endocondral (KATCHBURIAN; ARANA, 1999). Macro-estruturalmente, os ossos subdividem-se em cortical e trabecular (VIANNA, 1988). O osso trabecular é metabolicamente mais ativo e constitui 20% da massa óssea total, enquanto os 80% restantes do esqueleto são formados por osso cortical (AKESSON, 1995; ZENI et al., 2001).

Todos os ossos são revestidos externa e internamente por membranas conjuntivas que possuem células osteogênicas, o perióstio e o endóstio, respectivamente (VIANNA, 1988).

O osso periodontal do maxilar e da mandíbula é uma estrutura biologicamente diferenciada e depende da presença de raiz dental para existir. Sua altura se mantém por meio de um fino equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea. Este equilíbrio se dá graças à ação coordenada de fatores locais e sistêmicos envolvidos nos processos metabólicos ósseos (CARTER-BARTLETT; ACOSTA-MARTÍNEZ V, 1992).

A remodelação óssea é o processo pelo qual os efeitos catabólicos dos osteoclastos estão em equilíbrio com os efeitos anabólicos dos osteoblastos (VIANNA, 1988; RIGGS, 1991; FERNANDES, 1998). Verifica-se um ciclo

extremamente bem regulado onde os osteoclastos se aderem ao tecido ósseo e o removem por acidificação e digestão proteolítica, enquanto os osteoblastos sintetizam no mesmo local uma matriz orgânica protéica que é posteriormente calcificada (FERNANDES, 1998).

No adulto, a massa óssea é mantida através de um balanço contínuo entre formação e destruição. A taxa de remodelação óssea anual é cerca de 4% no osso cortical e 20% no osso trabecular (FERNANDES, 1998).

Alguns fatores como a idade, doenças ósteo-metabólicas, diminuição das atividades de vida diária (AVD) e a ação de drogas podem alterar o equilíbrio entre a formação e a reabsorção, levando ao predomínio de uma sobre a outra (VIEIRA, 1999).

2.1.1. FATORES SISTÊMICOS DE REGULAÇÃO DO METABOLISMO ÓSSEO

Vários são os mediadores bioquímicos produzidos a nível sistêmico que influenciam o desenvolvimento do tecido ósseo: paratormônio (PTH), vitamina D₃, tireocalcitonina (TCT), glicocorticóides, hormônio do crescimento (HC), hormônios tireoideanos, estrogênio e androgênio. O PTH, a vitamina D₃ e o TCT são os mais importantes, atuando principalmente na regulação do cálcio e do fósforo, formadores do cristal de hidroxiapatita (VIANNA, 1988; ACOSTA-MARTÍNEZ; CARTER-BARTLETT III, 1992). A ação coordenada destes 3 hormônios mantém a homeostase do osso e ao mesmo tempo controla os níveis de cálcio e fósforo nos líquidos corporais (ACOSTA-MARTÍNEZ; CARTER-BARTLETT III, 1992).

O PTH é um hormônio elaborado pelas glândulas paratireóides e sua principal função é manter os níveis de cálcio nos líquidos extracelulares (VIANNA, 1988; ACOSTA-MARTÍNEZ; CARTER-BARTLETT III, 1992). É secretado quando

ocorre hipocalcemia e atua sobre os ossos, rins e tubo digestivo. Nos ossos, age estimulando osteoclastos e osteócitos, que removem cálcio e fósforo através do processo de reabsorção óssea (VIANNA, 1988; ACOSTA-MARTÍNEZ; CARTER-BARTLETT III, 1992). Nos rins, o PTH promove aumento da eliminação de fósforo e retenção de cálcio respectivamente por redução e aumento da reabsorção tubular. No intestino, o PTH favorece a absorção de cálcio indiretamente, via vitamina D₃ (VIANNA, 1988).

A vitamina D₃ é um esteróide importante para a regulação do metabolismo do cálcio e do fósforo. Pode ser obtida através da ingestão de alimentos ou pela via fotoquímica na conversão do 7-desidrocolesterol (VIANNA, 1988).

O metabólito 1,25-dihidroxicolecalciferol é a principal forma biológica ativa da vitamina D₃, atuando principalmente na mucosa intestinal, onde promove o aumento da absorção de cálcio e fosfatos; nos rins, aumenta a reabsorção de cálcio (VIANNA, 1988). Sua ação é fundamental na maturação esquelética, pois na sua ausência o esqueleto não se calcifica (ACOSTA-MARTÍNEZ; CARTER-BARTLETT III, 1992).

A TCT é um hormônio produzido pelas células C da glândula tireóide e tem ação hipocalcemiante. A hipocalcemia é decorrente da inibição da reabsorção óssea e representa o principal efeito biológico da TCT. A reabsorção óssea é bloqueada, não só por diminuição do número de osteoclastos, mas também por redução de sua atividade. A secreção de TCT é ativada pelos estados de hipercalcemia, independente do controle hipofisário e tireoideano e não bloqueia a ação do PTH (VIANNA, 1988; RIGGS, 1991; ACOSTA-MARTÍNEZ; CARTER-BARTLETT III, 1992).

2.1.2. FATORES LOCAIS DE REGULAÇÃO DO METABOLISMO ÓSSEO

Os fatores de crescimento são mediadores biológicos que regulam eventos celulares essenciais no reparo de tecidos tais como proliferação celular, diferenciação e síntese de matriz (GARG, 1999). Inicialmente, foram descritos como agentes de ação sistêmica, entretanto, estudos mais profundos evidenciaram que a ação primária destes fatores ocorre localmente (CARTER-BARTLETT; ACOSTA-MARTÍNEZ IV, 1992). Estes fatores são produzidos por diferentes tipos de células e tecidos e, quando sua ação é exercida sobre células do mesmo tipo, são denominados autócrinos; se agirem sobre células diferentes são denominados fatores parácrinos (CANALIS; MCCARTHY; CENTRELLA, 1991; CARTER-BARTLETT; ACOSTA-MARTÍNEZ IV, 1992).

Nos ossos, os fatores de crescimento têm papel muito importante no controle da sua formação e reabsorção (GARG, 1999).

Os principais e mais conhecidos fatores de crescimento que controlam a remodelação óssea incluem o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de transformação (TGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e a proteína morfogenética óssea (BMP) (HAUSCHKA, 1986; MOHAN; BAYLINK, 1991; CARTER-BARTLETT; ACOSTA-MARTÍNEZ IV, 1992; GARG, 1999). São produzidos por diversas células como plaquetas, fibroblastos, osteoblastos, condroblastos e outras de natureza mesenquimal (LYNCH et al., 1991; MARX et al., 1998; SCARSO FILHO et al., 2001). Atuam ainda nos ossos os fatores de crescimento de origem hematopoiética como as interleucinas, linfocinas, interferon, neuromediadores, fator de necrose tumoral, prostaglandinas e leucotrienos (CARTER-BARTLETT; ACOSTA-MARTÍNEZ IV, 1992).

2.1.2.1. FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE PLAQUETAS

O PDGF é um polipeptídeo dimérico, produto de dois genes, o PDGF A e o B. Existem, portanto, 3 formas de PDGF: AA, BB e AB. As cadeias A e B apresentam 60% da sequência de aminoácidos homóloga e as várias isoformas de PDGF têm similar, mas não idêntica, atividade biológica. Inicialmente, foi isolado de plaquetas humanas e posteriormente encontrado em células malignas e outros tecidos, incluindo o tecido ósseo (CANALIS; McCARTHY; CENTRELLA, 1991).

As mais importantes atividades do PDGF são a mitogênese, angiogênese e ativação de macrófagos (MARX et al., 1998; GARG, 1999). É também um fator quimiotático para fibroblastos e células inflamatórias (GREEN et al., 1997).

O PDGF é o primeiro fator de crescimento presente em um ferimento. Inicia o processo de cura, incluindo o reparo ósseo, emergindo da degranulação das plaquetas quando ocorre uma injúria tecidual (CANALIS; McCARTHY; CENTRELLA, 1991; GARG, 1999). Estudos demonstraram que a aplicação de PDGF acelera o fechamento de lesões, a formação de tecido de granulação e a taxa de cura de feridas (GREEN et al., 1997).

Em geral, o PDGF BB é mais mitogênico que o PDGF AB e este por sua vez, é mais que o PDGF AA. As plaquetas e o soro são ricos em PDGF AB e BB, enquanto os tecidos periféricos (esqueléticos e não esqueléticos) contêm principalmente PDGF AA. Isto sugere que o PDGF age como um regulador local e sistêmico do metabolismo tecidual (CANALIS; McCARTHY; CENTRELLA, 1991).

2.1.2.2. FATOR DE CRESCIMENTO DE TRANSFORMAÇÃO

São conhecidos dois TGF, o alfa e o beta. O TGF- α não tem sido isolado de células ósseas, portanto, desconhece-se sua importância na remodelação deste tecido. Os TGF- β são peptídeos sintetizados por muitos tecidos, sendo considerados uma super família de fatores de crescimento e de diferenciação. São encontrados principalmente nos ossos e plaquetas (CANALIS; McCARTHY; CENTRELLA, 1991; CARTER-BARTLETT; ACOSTA-MARTÍNEZ IV, 1992). As funções mais importantes destas proteínas são a quimiotaxia, a mitogênese dos precursores dos osteoblastos e a estimulação da deposição da matriz de colágeno no local de reparo do osso. Além disso, inibem a diferenciação de células da linhagem monocítica em osteoclastos, com conseqüente redução da reabsorção óssea (CANALIS; McCARTHY; CENTRELLA, 1991; MARX, 1994; GARG, 1999).

2.1.2.3. FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS

É um fator de crescimento isolado originalmente da hipófise (CARTER-BARTLETT; ACOSTA-MARTÍNEZ IV, 1992). As duas formas de FGF (FGF-1 e FGF-2) são encontradas na matriz óssea e suas atividades biológicas incluem a capacidade de estimular a migração, proliferação e diferenciação celular (MOHAN; BAYLINK, 1991). Estimulam também a angiogênese, que é crítica para o enxerto ósseo (CANALIS; McCARTHY; CENTRELLA, 1991; GARG, 1999; LYNCH et al., 1991).

2.1.2.4. FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA

Os IGF são polipeptídeos considerados importantes reguladores das funções de diferenciação e crescimento celular (HOCK; CENTRELLA; CANALIS, 1988; CANALIS; McCARTHY; CENTRELLA, 1991).

Existem dois IGF, o IGF-I conhecido como somatomedina C e o IGF-II. Eles têm 65% da sequência de aminoácidos homóloga e atividade biológica similar, mas sua síntese é controlada por diferentes mecanismos e hormônios. Os IGF estão presentes na circulação e também são sintetizados por células esqueléticas, podendo desta maneira agir como reguladores locais e sistêmicos do crescimento ósseo (CANALIS; McCARTHY; CENTRELLA, 1991).

O IGF-I foi isolado pela primeira vez no plasma humano e, juntamente com outras somatomedinas, parece estar relacionado com a mediação da ação do hormônio do crescimento sobre o organismo (CARTER-BARTLETT; ACOSTA-MARTÍNEZ IV, 1992).

Grandes quantidades de IGF são encontradas no tecido ósseo, onde estimulam a replicação de células pré-osteoblásticas, mas seus efeitos mitogênicos são menos pronunciados que os de outros fatores de crescimento. Eles também atuam na diferenciação de osteoblastos e na prevenção da degradação do colágeno ósseo (CANALIS; McCARTHY; CENTRELLA, 1991; GARG, 1999).

Recentemente foi demonstrado que este fator de crescimento melhora a sobrevivência de enxertos ósseos por meio de uma ação dirigida ao osso membranoso (CARTER-BARTLETT; ACOSTA-MARTÍNEZ IV, 1992). Estudos "in vitro" e "in vivo" têm sido realizados para avaliar a associação do IGF com outros fatores de crescimento. Estes estudos mostraram que em cultura de células o IGF-I

quando combinado com o FGF, PDGF ou TGF- β 1 promoveu o aumento da mitogênese de osteoblastos (GARG,1999).

GIANNOBILE e colaboradores em 1994 mostraram em modelo animal, o potencial osteoindutor do IGF-I associado ao PDGF. Estes fatores introduzidos em lesões periodontais promoveram um crescimento ósseo 21,6% superior ao encontrado no grupo controle.

2.1.2.5. PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA

As BMP foram descritas por URIST em 1965 como biomoléculas encontradas no tecido ósseo e que induzem a formação de osso e cartilagem em sítios fora do esqueleto. Até hoje cerca de 20 BMP foram identificadas e são consideradas as substâncias mais promissoras em relação a osteoindução, tendo demonstrado um grande potencial na reparação de defeitos ósseos em vários experimentos realizados em modelo animal (PEREIRA FILHO et al., 2004). Várias BMP descritas na literatura estão relacionadas umas com as outras e são classificadas como pertencentes à super-família de TGF- β por causa de suas seqüências de aminoácidos (GARG, 1999).

Avanços recentes no campo da biologia, biologia molecular e genética têm demonstrado que as BMP não são apenas responsáveis pela indução da formação óssea pós-fetal (incluindo a remodelação óssea normal, cicatrização e reparo), como também são necessárias durante a embriogênese, não somente no que se refere ao sistema esquelético, mas também para a formação de outros tecidos e órgãos (LEE, 1997; PEREIRA FILHO et al., 2004).

Após a decodificação e a clonagem das BMP, as proteínas recombinantes humanas (rhBMP) começaram a ser utilizadas em pesquisas,

principalmente em animais. Experimentos envolvendo fusão espinhal, defeitos segmentares em fêmur, tíbia e mandíbula têm demonstrado a capacidade da reparação óssea das rhBMP₂, rhBMP₄ e rhBMP₇ (PEREIRA FILHO et al., 2004). O aumento da concentração da rhBMP-2 pode aumentar a taxa de formação óssea tanto pela via endocondral como intramembranosa (GARG,1999).

A vantagem de se utilizar morfogenes em relação a fatores de crescimento na regeneração óssea é a não necessidade da pré-existência de células osteoprogenitoras locais. Portanto, a quantidade do osso neoformado é essencialmente ilimitada (LEE, 1997).

2.2. FISSURA LABIOPALATINA

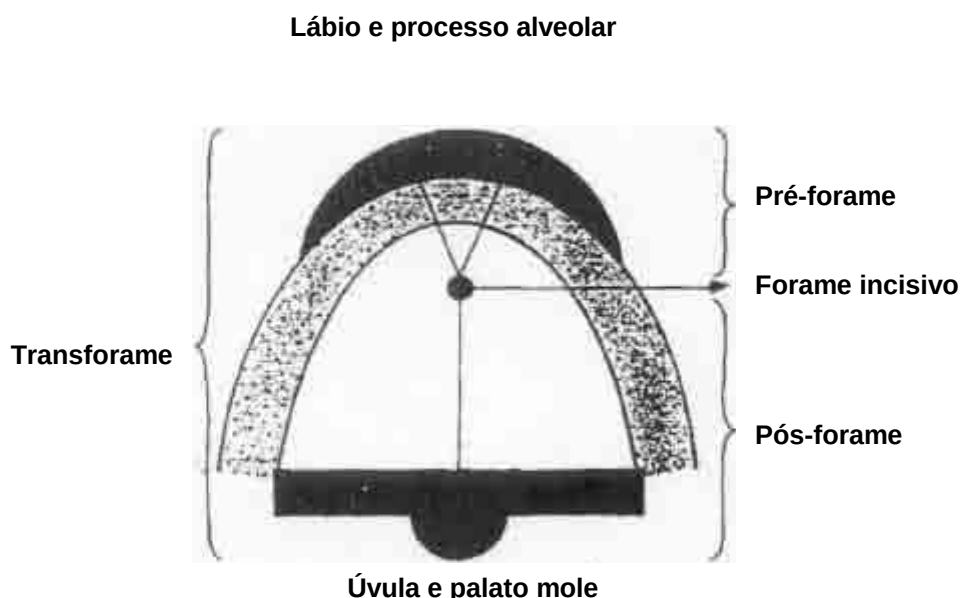
As fissuras orofaciais são uma das malformações congênitas que mais acometem os seres humanos (COHEN, 2000). Várias são as teorias que procuram explicar o aparecimento das fissuras mais freqüentes. Uma delas postula que a falta de fusão dos processos faciais durante a embriogênese seria a responsável pelo aparecimento das fissuras. Outra teoria considera a migração e a penetração mesodérmica como elementos básicos na formação dos componentes da face e que pela falta desta penetração ocorre o aparecimento das fissuras (BAROUND, 1981).

Não existe uma classificação que abranja todas as variedades anatomoclínicas das fissuras de lábio e palato. Alguns autores as classificam utilizando o critério morfológico, tendo como referência o rebordo alveolar ou o forame incisivo, outros se baseiam na embriogênese da deformidade. Mesmo assim, alguns tipos de fissuras, embora enquadradas no sistema de classificação embriológico, necessitam de descrição morfológica complementar (CARREIRÃO; LESSA; ZANINI, 1996).

SPINA et al. (1972) e SILVA FILHO et al. (1992) classificaram as fissuras em quatro grandes grupos, sendo que os três primeiros grupos utilizam o forame incisivo como ponto de reparo anatômico (figura 1). As fissuras pré-forame incisivo (grupo I) envolvem o lábio superior, o processo alveolar superior e o palato primário estendendo-se até o forame incisivo. São chamadas completas quando envolvem as três estruturas citadas e incompletas quando apenas uma ou duas destas estruturas são atingidas. Quanto à localização, podem ser unilaterais, bilaterais ou medianas. As fissuras transforame incisivo (grupo II) são aquelas que envolvem o lábio superior, o processo alveolar superior, o palato primário e o palato secundário. Podem ser também classificadas como unilaterais, bilaterais e medianas. As fissuras pós-forame incisivo (grupo III) são as que acometem

exclusivamente o palato secundário, sendo denominadas completas quando acometem toda a extensão do palato secundário, envolvendo inclusive a úvula e incompletas quando atingem parte do palato secundário, não chegando até o forame incisivo. No grupo IV, que compreende as fissuras raras da face, estão agrupadas as fissuras não relacionadas com palato primário e secundário, acometendo outras estruturas como a maxila e a mandíbula.

FIGURA 1: Diagrama representativo da classificação das fissuras segundo SILVA FILHO et al. (1992)



O estudo da etiologia da doença nos reporta aos primórdios da embriogênese, que pode ser alterada por agentes físicos, químicos e biológicos. A combinação deletéria destes agentes ou a intensificação de um deles pode trazer modificações irreversíveis, propiciando o nascimento de indivíduos fissurados. Os fatores genéticos são responsáveis por 35% das FLP e os fatores ambientais como complicações materno-fetais, estresse, infecções, medicamentos, irradiações e deficiências nutricionais pelos 65% restantes (CARREIRÃO; LESSA; ZANINI, 1996).

Os dados sobre a incidência das FLP são variáveis. A fissura labial com ou sem palato fendido ocorre em 1:500 a 1:1000 nascimentos, variando com a raça e a nacionalidade dos indivíduos afetados. A fissura de palato afeta aproximadamente 1 a cada 1400 nascidos, com pouca variação nos diferentes grupos étnicos. No Brasil, a incidência da doença é de aproximadamente 1:650 nascimentos (CARREIRÃO; LESSA; ZANINI, 1996).

Uma importante parte do tratamento de crianças com fissura do palato primário é a reconstrução do processo alveolar (PAULIN, 1988). As fendas alveolares quando não reconstituídas em tempo oportuno, normalmente causam seqüelas e disfunções dento-alveolares de difícil solução (GIL et al., 1995). Associada à fissura alveolar existe muitas vezes uma fístula oronasal que permite a entrada de alimentos e líquidos no nariz (PAULIN, 1988).

A reconstrução do defeito alveolar em pacientes fissurados utilizando enxertos ósseos é um procedimento bem documentado na literatura e comumente realizado (WITSENBURG, 1985; SINDET-PEDERSEN; ENEMARK, 1990; SILVA FILHO et al., 1995). Esta técnica tem sido empregada desde o início do século, quando provavelmente Von Eiselsberg (1901) iniciou este tipo de cirurgia reconstrutora utilizando enxerto ósseo autógeno (GIL et al., 1995).

2.3. ENXERTO ÓSSEO

O esqueleto é um dos poucos sistemas do organismo humano capaz de se regenerar sem a formação de tecido cicatricial (DeLACURE, 1994). Isto se deve, em grande parte, à habilidade dos fatores de crescimento em direcionar as células-tronco para as vias condrogênicas e osteogênicas e ao papel das forças mecânicas estimulando a remodelação óssea (SICCA et al., 2000).

Entretanto, a reconstrução de defeitos do esqueleto humano tem sido um problema desafiador para a comunidade científica. Neste contexto, o transplante ósseo é objeto de vários experimentos e estudos clínicos, embora a grande maioria dos enxertos autógenos seja utilizada apenas para a reconstrução de pequenos defeitos do esqueleto (DE BOER, 1988).

Os tipos de enxerto ósseo utilizados são: o autógeno, aquele retirado do próprio indivíduo; o alógeno, retirado de indivíduos pertencentes à mesma espécie e o xenógeno, retirado de espécies diferentes e menos utilizado (DE BOER, 1988).

Três funções fisiológicas são atribuídas ao enxerto ósseo autógeno: osteogênese, osteoindução e osteocondução que são respectivamente a formação de osso novo a partir de osteoblastos, a formação de osso novo por diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos e condroblastos e o mecanismo que permite a aposição de um novo tecido ósseo na sua superfície, o que requer a presença de osso adjacente como fonte de células osteoprogenitoras (DE BOER, 1988; MARX, 1994; SICCA et al., 2000). A diferença fundamental entre material osteoindutor e osteocondutor é que o primeiro é biologicamente ativo, enquanto o segundo serve apenas como material de preenchimento (TAGA, 1996).

O enxerto ósseo alveolar é um procedimento bem aceito na reabilitação de pacientes com fissura lábio-palatal (KORTEBEIN; NELSON; SADOVE, 1991). As cirurgias para o fechamento da fístula oronasal utilizando tecidos moles foram extremamente difíceis e muitas vezes houve fracasso no procedimento (ENEMARK; KRANTZ-SIMONSEN; SCHRAMM, 1985).

Os principais objetivos da realização do enxerto ósseo em pacientes com fissura alveolar são: preencher a fissura óssea residual do alvéolo e do palato anterior, para dar suporte para a base alar, reduzindo a assimetria nasal e melhorando o contorno facial; melhorar a oclusão e a fonética; evitar a perda de suporte periodontal na área adjacente à fenda; criar condições favoráveis à higiene; eliminar a fístula oronasal; aliviar as vias aéreas obstruídas; estabilizar a expansão da maxila, especialmente na fissura bilateral com pré-maxila móvel; consolidar a maxila para facilitar a cirurgia secundária e propiciar a irrupção do canino no corpo do enxerto (ÅBYHOLM; BERGLAND; SEMB, 1981; AMANAT; LANGDON, 1991; KORTEBEIN; NELSON; SADOVE, 1991; GIL et al., 1995; COLLINS; JAMES; MARS, 1998; PAULIN, 1998). A condição fundamental para a realização desta técnica cirúrgica é que ela seja efetuada antes da finalização do desenvolvimento da maxila (VELÁZQUEZ et al., 1998).

Para a reconstrução de defeitos ósseos na região buco-maxilo-facial são utilizados enxertos ósseos retirados da crista ilíaca, costela, calota craniana, fíbula e tíbia, o que requer uma equipe médica para executar o procedimento (WITSENBURG, 1985; SINDET-PEDERSEN; ENEMARK, 1990; AMANAT; LANGDON, 1991; GIL et al., 1995; FREITAS; SILVA; BORBA, 2000). Porém, quando pouca quantidade de osso se faz necessária, a mandíbula se presta muito bem como área doadora intrabucal (FREITAS; SILVA; BORBA, 2000). Após a

retirada do osso, os sítios doadores exibem margens irregulares devido à reabsorção e osteopenia, seguido por esclerose (DeLACURE, 1994).

A escolha do osso autógeno se dá em razão deste atender a maioria das exigências para uma cirurgia segura, ou seja, capacidade de osteogênese, osteocondução e osteoindução; capacidade do osso inicialmente formado se transformar em osso medular maduro e baixa taxa de infecção e antigenicidade (VASCONCELOS et al., 1999).

Tradicionalmente, a crista ilíaca, localizada na bacia pélvica, tem sido o sítio doador de escolha para a retirada do enxerto, devido à sua capacidade de fornecer grande quantidade de osso e elementos celulares, que servem como suporte para a osteogênese no período pós-enxerto (SADOVE et al., 1990).

A retirada do enxerto autógeno requer um aumento do tempo da cirurgia e pode causar efeitos maléficos como a perda de osso saudável, deformidade da área doadora, sangramentos excessivos, pneumotórax, infecções locais, dor crônica, edema, dificuldade para caminhar, possibilidade de fratura da crista ilíaca e parestesia, entre outros (TAKANO-YAMAMOTO; KAWAKAMI; SAKUDA, 1993; EBRAHEIM et al., 1997; YOSHIKAWA et al., 2000).

Para o sucesso do enxerto recomenda-se a colheita de osso celular, a compactação do material a ser enxertado, a manutenção da viabilidade celular por meio de manipulação criteriosa e uso de meio isotônico, espaço de tempo curto (minutos) entre a retirada do osso e a colocação do enxerto, leito receptor suficientemente vascularizado e a imobilização do enxerto (MARX, 1994).

As complicações pós-operatórias que podem ocorrer na área enxertada são: deiscência de sutura, necrose, infecções do enxerto com conseqüente perda total ou parcial do transplante, recorrência da comunicação oronasal, perda ou

reabsorção da raiz do dente adjacente e deformidades no desenvolvimento dental (WITSENBURG, 1985).

O enxerto autógeno não é indicado para grandes defeitos pois existem limitações na quantidade de osso que pode ser retirado. Por outro lado, pode-se optar pelo enxerto alógeno com material proveniente de banco de ossos, contudo, existem riscos devido a possíveis reações imunológicas ao transplante, além da pobre função celular deste tipo de tecido (SICCA et al., 2000; YOSHIKAWA et al., 2000).

Com a finalidade de superar as limitações do enxerto autógeno e alógeno, vários pesquisadores têm buscado materiais alternativos para uso na odontologia. O osso bovino desmineralizado e liofilizado e os materiais aloplásticos como as cerâmicas biocompatíveis, fosfato de cálcio, hidroxiapatita sintética, vidros bioativos e polímeros têm sido empregados (TAKANO-YAMAMOTO; KAWAKAMI; SUKUDA, 1993; PEPPAS; LANGER, 1994; YOSHIKAWA et al., 2000; SICCA et al., 2000).

2.3.1. MODELO DE REPARO ÓSSEO

O enxerto retirado da crista ilíaca contém células osteocompetentes, ilhas de osso esponjoso mineralizado, fibrina e plaquetas. Os osteoblastos e as células mesenquimais sobrevivem bem, após o enxerto, nos primeiros 3 a 5 dias em decorrência de sua posição superficial e de sua habilidade em absorver nutrientes dos tecidos adjacentes. Por outro lado, os osteócitos presos dentro do osso esponjoso morrem devido ao revestimento mineralizado que funciona como barreira nutricional. A baixa tensão de oxigênio entre o enxerto e o tecido adjacente ativa a quimiotaxia de macrófagos, que por sua vez secretam o fator de angiogênese

derivado de macrófago (MDAF) e o fator de crescimento derivado de macrófagos (MDGF). No interior do enxerto, as plaquetas liberam o PDGF algumas horas após a cirurgia. Portanto, estes fatores iniciam rapidamente o processo de angiogênese e mitogênese das células osteocompetentes (KNIGHTON et al., 1983).

Após este período, começam a aparecer capilares originários dos tecidos moles circunvizinhos e também do osso adjacente ao enxerto (MARX, 1994). Eles penetram no enxerto formando uma rede completa entre o 10º e 14º dia da cirurgia (KNIGHTON et al., 1983).

Embora o PDGF pareça ser o mensageiro mais adiantado para estimular a formação da matriz orgânica protéica (osteóide), ele é substituído pelo MDGF e outros estimuladores do tecido mesenquimal da família do TGF- β . Do 3º ao 7º dia, a população de células de base e os osteoblastos produzem somente uma pequena quantidade de osteóide. Porém, desde que a rede capilar esteja estabelecida, a produção de osteóide é acelerada pela presença de nutrientes e oxigênio (CAPLAN, 1995).

Do 15º ao 30º dia, a fase celular e bioquímica da regeneração óssea progride para a consolidação clínica do enxerto, pela fusão do osteóide da superfície das trabéculas esponjosas com o osso adjacente. Esta formação inicial de osso a partir de osteoblastos endósteos e células mesenquimais sobreviventes é referida como regeneração óssea fase I, caracterizada pela produção de um osso hipercelular, não lamelar, desorganizado, estruturalmente sadio, mas não a ponto de ser um osso maduro. Posteriormente este osso sofrerá reabsorção obrigatória e será substituído por remodelação pelo osso fase II (MARX, 1994).

Após 30 a 45 dias, o reparo ósseo está quase completo, com a presença de um osso menos celular, mais mineralizado e estruturalmente mais

organizado, além da presença de endóstio e perióstio, portanto, auto-sustentado, o que caracteriza a fase II do reparo ósseo (MARX, 1994).

2.4. PLASMA RICO EM PLAQUETAS

2.4.1. PLAQUETAS

Plaquetas ou trombócitos são fragmentos citoplasmáticos de megacariócitos e desempenham um importante papel no processo de coagulação sangüínea (CHAGAS; OLIVEIRA; BORTOLI JÚNIOR, 2004). Cada megacariócito produz cerca de 3000 plaquetas e, em condições normais, seu número no sangue periférico situa-se entre 150.000 a 400.000/mm³. Apresentam-se na forma de minúsculos discos arredondados, anucleados, com diâmetro médio de 3 a 4 µm e espessura aproximada de 1,0 µm. As plaquetas velhas, lesadas ou inativas são removidas pelo baço. Possuem uma vida média de 8 a 10 dias na circulação (LENHARO et al., 2004).

Em sua camada externa encontram-se antígenos, enzimas e glicoproteínas com receptores para diversos agentes capazes de ativá-las, entre eles, o colágeno e proteínas da matriz extracelular. As glicoproteínas estão envolvidas também no processo de adesão e auto-agregação (LORENZI, 2003; LENHARO et al., 2004). Mais internamente, existe a membrana plaquetária, formada por proteínas, lipídeos e carboidratos (LORENZI, 2003).

No citoplasma existem microfilamentos compostos por actina e miosina, que são os responsáveis por manter a forma discóide, promover a formação de pseudópodes e possibilitar sua contração quando estimuladas. Estes microfilamentos contraídos comprimem as organelas e grânulos do citoplasma, constituindo-se em um sofisticado mecanismo de liberação de biomoléculas produzidas pelos megacariócitos e armazenados nas plaquetas (LENHARO et al., 2004). As principais organelas e grânulos são as mitocôndrias, os grânulos densos e

os grânulos alfa. Os grânulos alfa contêm albumina, fibronectina, fatores envolvidos com a hemostasia (fibrinogênio, V, VII, von Willebrand, fator plaquetário 4, beta-tromboglobulina e trombospondina), fator quimiotático, fator bactericida e fatores de crescimento. Os grânulos densos são reservas de adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), cálcio, serotonina e pirofosfato (LORENZI, 2003; LENHARO et al., 2004).

Estudos realizados com plaquetas identificaram uma lista grande de fatores de crescimento. MARX (2001) destacou a presença de sete destes fatores no PRP: PDGF AA, PDGF BB, PDGF AB, TGF- β_1 , TGF- β_2 , VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e EGF (fator de crescimento epitelial).

2.4.2. PLASMA RICO EM PLAQUETAS

O plasma rico em plaquetas (PRP) foi descrito no início dos anos 70, mas sua aplicação em procedimentos cirúrgicos aconteceu somente após 1989. Os primeiros relatos da sua utilização em cirurgia odontológica apareceram após 1995 (SANTOS; SANTOS, 2004) com sucesso clínico descrito nas áreas de cirurgia reconstrutiva oral, maxilo-facial e em implantodontia associada ao enxerto ósseo (SCARSO FILHO et al., 2001). Este composto aparece na literatura com outras denominações como plasma autógeno de plaquetas, plasma enriquecido de plaquetas, plasma rico em fatores de crescimento, concentrado de plaquetas e gel de plaquetas (PEREIRA FILHO et al., 2004).

O PRP é um produto autógeno, derivado do processamento laboratorial do sangue coletado no período pré-operatório e rico em fatores de crescimento. É composto de plasma, plaquetas e leucócitos (SCARSO FILHO et al., 2001; PEREIRA FILHO et al., 2004), e utilizado para liberar fatores de crescimento em

altas concentrações no local onde se pretende reparar um defeito ou uma lesão no tecido ósseo (BARBIERI; COSTA, 2004). Sua consistência gelatinosa e adesiva facilita muito o manejo cirúrgico dos enxertos ósseos (PEREIRA FILHO et al., 2004).

Existe aproximadamente 0,06 ng de PDGF por milhão de plaquetas ou cerca de 1200 moléculas de PDGF por plaqueta, o que demonstra seu grande potencial reparador (ROSS; RAINES; BOWEN-POPE, 1986).

As plaquetas apresentam a desvantagem de ter uma vida média curta no enxerto, considerando-se o tempo que já permaneceram no sistema vascular. Elas se fragmentam totalmente em torno de 3 a 5 dias e a atividade de seus fatores se extinguem entre 7 e 10 dias (SCARSO FILHO et al., 2001).

Nos últimos anos, muitos trabalhos foram realizados abordando o tema PRP e/ou fatores de crescimento, associados ou não ao enxerto ósseo.

OYAMA et al. (2004) trabalharam com 7 pacientes que receberam o enxerto ósseo alveolar retirado da crista ilíaca, apresentando idade média de 16,1 anos. Mostraram a eficácia do PRP na regeneração óssea, por tomografia computadorizada tridimensional, 6 meses após o ato cirúrgico. A taxa média de volume de osso regenerado foi maior no grupo que recebeu o PRP ($80,19 \pm 6,77 \%$) do que no grupo controle ($60,73 \pm 13,94 \%$).

MARX et al. (1998) trabalhando com 88 pacientes submetidos à cirurgia de enxerto ósseo para a reconstrução da mandíbula após a retirada de tumor maligno ou benigno, avaliaram radiograficamente dois grupos: o que recebeu somente o enxerto e o que recebeu o enxerto suplementado com PRP. Após 2, 4 e 6 meses, os enxertos com PRP alcançaram consistentemente uma taxa de maturação aproximadamente 2 vezes maior que seu nível basal. A avaliação histomorfológica revelou que a densidade óssea no grupo que recebeu o PRP foi 15 a 30% mais alta que nos controles 6 meses após a cirurgia.

JAKSE et al. (2003) submeteram 12 ovelhas a um levantamento de seio maxilar bilateral com osso retirado da crista ilíaca, sendo que um dos lados recebeu o osso autógeno e o outro recebeu osso autógeno com PRP. Os resultados obtidos pela histomorfometria após 1 e 3 meses do procedimento cirúrgico revelaram taxa de neoformação óssea bem próximas. No primeiro mês, as taxas foram de $26,1 \pm 11,7\%$ para o lado que recebeu o osso autógeno e $29,2 \pm 12,1\%$ para o lado que recebeu o osso autógeno com PRP. Com 3 meses as taxas foram respectivamente $46,9 \pm 13,3\%$ e $51,1 \pm 24,6\%$, inexistindo portanto, diferença estatisticamente significativa entre os sítios com e sem PRP. Os autores concluíram que o experimento mostrou um baixo potencial regenerativo do PRP; que não houve uma correlação evidente entre a contagem de plaquetas e a análise histomorfométrica do osso regenerado e que, independente do uso ou não do PRP, todas as áreas enxertadas mostraram uma clara tendência à reabsorção, principalmente após 3 meses de cicatrização óssea.

AGHALOO; MOY; FREYMILLER (2002) avaliaram o efeito do PRP na regeneração óssea através de defeito crítico no crânio de 15 coelhos. Foram planejados 4 grupos de estudo: com PRP, com osso autógeno, osso autógeno associado ao PRP e grupo controle. O osso retirado do crânio na confecção dos defeitos críticos foi particulado e reutilizado no estudo. Os efeitos foram avaliados por radiografia digital, histologia e análise histomorfométrica com 1, 2 e 4 meses. Os autores concluíram que não houve um aumento significativo de formação óssea no grupo que recebeu o enxerto autógeno associado ao PRP em comparação ao grupo que recebeu apenas o osso autógeno. Entretanto, os grupos que receberam enxerto autógeno e enxerto autógeno com PRP quando comparados ao grupo controle e ao PRP aplicado isoladamente, mostraram uma tendência de aumento de formação óssea nos 3 períodos avaliados. Os autores admitiram que o pequeno tamanho da

amostra pode ter contribuído para a baixa diferença estatística entre os grupos com e sem PRP; que os efeitos regenerativos do PRP ocorreram principalmente dentro do primeiro mês do estudo e que o osso cortical membranoso retirado do crânio de coelho difere, segundo alguns estudos, do osso de origem endocondral retirado da crista ilíaca.

FENNIS; STOELINGA; JANSEN (2002) estudaram clínica e radiograficamente a reconstrução mandibular em cabras utilizando osso autógeno particulado retirado da crista ilíaca associado ao PRP em 3 momentos: 3, 6 e 12 semanas. Os autores observaram que o restabelecimento ósseo foi particularmente presente no grupo de 6 semanas que recebeu o PRP. Observaram também que a reabsorção óssea foi menos visível com o uso do PRP em todos os intervalos estudados. Assim concluíram que o uso do PRP intensificou o restabelecimento ósseo consideravelmente. Em 2004, realizaram um estudo semelhante utilizando parâmetros histológicos e histomorfométricos. Os resultados mostraram que o PRP aumentou consideravelmente a restauração óssea, principalmente em dois momentos: com 6 e 12 semanas de estudo. Os autores relataram que os efeitos dos fatores de crescimento tornaram-se visíveis um pouco mais tarde, mas são seus efeitos iniciais que fazem a diferença, principalmente no processo de revascularização do enxerto. Concluem afirmando que os resultados apresentados sustentam o suposto efeito benéfico do PRP quando adicionado ao enxerto ósseo autógeno, todavia, faltam informações sobre a “dose-efeito” e o período de tempo que está ativo.

CHOI et al. (2004) avaliaram o efeito do PRP na regeneração óssea em cães. O dente pré-molar foi extraído de ambos os lados previamente, seguido por um período de restabelecimento de 3 meses. Logo após foram criados defeitos ósseos bilaterais de 15 mm que posteriormente foram reconstituídos com osso

autólogo particulado retirado da mandíbula, associado ou não ao PRP. As biópsias realizadas após 6 semanas mostraram níveis menores de formação óssea no grupo que recebeu o PRP do que no grupo sem o PRP. A microscopia de fluorescência revelou uma demora na remodelação do enxerto com PRP. Concluíram os autores que, a adição de PRP ao enxerto ósseo autólogo retardou a formação de osso novo no defeito mandibular.

ANITUA (1999) avaliou 20 pacientes com indicação de extração dentária em decorrência de fratura vertical ou doença periodontal grave. Dos 10 pacientes do grupo teste, 5 tiveram os alvéolos preenchidos com PRP e 5 receberam uma mistura de osso autólogo associado ao PRP. No grupo controle o PRP não foi utilizado. O monitoramento do experimento foi realizado através de biópsia com trefina de 3 mm de profundidade e acompanhamento radiográfico entre 10 e 16 semanas do ato cirúrgico. A biópsia demonstrou a presença de osso maduro compacto com trabeculado ósseo bem organizado e morfologia normal no grupo que recebeu o PRP. No grupo controle, em nenhum dos casos, verificou-se a presença de osso maduro no mesmo período. Três pacientes apresentaram defeitos bilaterais, sendo um deles tratado com PRP e outro não; entretanto, o lado tratado com PRP foi o que apresentou o melhor resultado.

KIM; PARK; CHOUNG (2001) estudaram os efeitos do PRP em defeito crítico na calvária de coelhos através da radiografia e da tomografia computadorizada. Aplicaram um concentrado de plaquetas 287% superior ao número destas no sangue periférico. No grupo sacrificado com 4 semanas, o percentual da área mineralizada foi de 54,7% para os que receberam osso bovino com PRP e 38,3% para o grupo que recebeu somente osso bovino. Com 8 semanas, os resultados foram respectivamente 77,4% contra 51,0%. Concluíram os autores que o PRP associado ao osso bovino aumenta a formação óssea.

ZECHNER et al. (2003) avaliaram o uso do PRP na regeneração óssea após implantes metálicos em miniporcós. A histomorfometria mostrou que houve maior contato osso-implante após aplicação tópica de PRP na fase de cura no curto período (6 semanas) em relação aos controles (PRP 44,2% e controles 24,2%). Com 12 semanas a extensão da osteogênese foi semelhante nos dois grupos (PRP 44,2% e controles 51,3%). A análise estatística revelou interação não significativa entre o tipo de superfície do implante e o PRP. O estudo mostrou ainda que o PRP aumenta precocemente a regeneração óssea no sítio hospedeiro do implante.

WILTFANG et al. (2004) estudaram os efeitos do PRP na regeneração óssea em defeito crítico no crânio de 24 miniporcós após 2, 4 e 12 semanas do início do estudo, através de microrradiografias e imunohistoquímica. O PRP foi preparado por dois sistemas diferentes (PRP 1 *ad modum* Curasan e PRP 2 *ad modum* 3i) e acrescentado ao osso autógeno particulado e a substitutos ósseos xenógenos (grânulos de fosfato tricálcico - CeraSorb™, blocos de osso esponjoso bovino - BioOss™ e uma esponja de colágeno bovino - Colloss™) para preenchimento dos defeitos. Os autores concluíram que o PRP não mostrou nenhuma influência consistente dentro dos vários grupos estudados.

AGHALOO; MOY; FREYMILLER (2005) avaliaram o efeito do PRP na regeneração óssea de defeito crítico no crânio de coelhos. Foram planejados 4 grupos de estudo: osso mineralizado seco-congelado e osso desmineralizado seco-congelado, ambos com e sem PRP. Após 1, 2 e 4 meses, os efeitos foram avaliados por radiografia e análise histomorfométrica. Não houve diferença significativa entre os grupos sem e com PRP, embora tenha havido uma tendência ao aumento da densidade e da área óssea nos grupos que receberam o PRP.

O emprego de fatores de crescimento isolados foi estudado na regeneração óssea inicialmente por LYNCH et al. em 1991. Os autores utilizaram o

PRP e o IGF em defeitos ósseos periodontais, encontrando um excelente crescimento ósseo nos casos tratados quando comparados aos controles. Ainda em 1991, LYNCH et al. testaram uma mistura dos mesmos fatores de crescimento em defeitos ao redor de implantes. Os resultados foram semelhantes aos encontrados nos defeitos periodontais.

FUERST et al. (2004) estudaram os efeitos do PDGF e do colágeno tipo I na regeneração de defeito ósseo na mandíbula de miniporcos isoladamente ou em associação. Os animais foram divididos em 3 grupos e sacrificados após 4 e 8 semanas para exame histológico e histomorfométrico. Os autores concluíram que somente o colágeno tipo I, isoladamente, pode auxiliar o reparo ósseo em curto período.

ROLDÁN et al. (2004) avaliaram a formação óssea na presença de PRP e rhBMP-7 em ratos Wistar. As análises quantitativas por fluorocromo sugerem que o PRP e a rhBMP-7 aceleram o crescimento ósseo, entretanto, a histomorfometria mostrou que não há diferença significativa na área de osso recentemente mineralizado e que, tampouco existe influência do PRP ou da rhBMP-7 no enxerto autógeno. Do mesmo modo, a adição de PRP ao osso bovino não orgânico não mostrou diferença estatística em relação ao grupo controle, mas uma grande estimulação da produção óssea foi observada pela combinação de rhBMP-7 com este tipo de material. No modelo extra-esquelético, novamente a formação óssea foi evidente na presença de rhBMP-7, mas não com o PRP. Os autores concluíram que, de acordo com histomorfometria, a adição de PRP falhou na intensificação da formação óssea com osso bovino não orgânico e com o enxerto autógeno.

Como se percebe na literatura, existem controvérsias sobre a eficácia do uso do PRP associado ao enxerto autógeno, xenógeno e a fatores de

crescimento, entretanto, observa-se a falta de padronização na produção do PRP, modelos de estudo com diferentes períodos de análise, diferentes metodologias para monitoramento do experimento e, em alguns casos, a inexistência da contagem de plaquetas.

2.5. MARCADORES BIOQUÍMICOS DO METABOLISMO ÓSSEO

A análise histológica do tecido ósseo através de biópsias é o método preferido para avaliar alterações na formação e reabsorção óssea. Existem entretanto, métodos não invasivos com as mesmas finalidades, denominados marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo (VAN STRAALLEN et al., 1991).

Estes marcadores são uma nova e importante ferramenta clínica para a avaliação e monitoração do metabolismo ósseo. Comparados a procedimentos como a densitometria óssea que requer de 2 a 3 anos para mostrar uma resposta, os marcadores de reabsorção respondem rapidamente, em aproximadamente 3 meses, enquanto os de formação demoram alguns meses a mais (CHRISTENSON, 1997).

A investigação bioquímica dos processos de formação e de reabsorção óssea mediante o uso de marcadores bioquímicos séricos e urinários baseia-se na identificação dos produtos sintetizados pelos osteoblastos durante a elaboração da matriz mineralizada, na identificação dos produtos originários da degradação promovida pelos osteoclastos e na avaliação da atividade de enzimas relativamente específicas e correlacionadas com a função destes dois tipos de células (DELMAS,1993; AKESSON,1995; LEIVA,1996).

Os principais marcadores bioquímicos de formação óssea presentes no sangue são a fosfatase alcalina (FAL), a fosfatase alcalina isoforma óssea (FAO), osteocalcina (OC) e peptídeos do colágeno tipo I. Os principais marcadores de reabsorção óssea presentes na urina são o cálcio, hidroxiprolina, piridinolinas totais, piridinolina e/ou desoxipiridinolina livre, N-telopeptídeo (NTX) e C-telopeptídeo (CTX); no sangue, existe a fosfatase ácida tartarato resistente (FATR) (ARGENTE;

HEINEGARD, 1994; WITHOLD et al., 1995; LEIVA, 1996; ESPINOSA; COMPAÑÓ, 1998; VIEIRA, 1999).

Poucos marcadores do metabolismo ósseo têm demonstrado cumprir com os requisitos de sensibilidade, especificidade e de uma boa correlação com as análises histomorfométricas (LEIVA, 1996). Entretanto, pesquisas avançadas têm descoberto novos marcadores que são mais específicos e sensíveis que a fosfatase alcalina total sérica, hidroxiprolina e cálcio urinário. Eles abriram a possibilidade de avaliar mudanças discretas no metabolismo ósseo, como as que ocorrem na osteoporose (ARGENTE; HEINEGARD, 1994; AKESSON, 1995; LEIVA, 1996).

2.5.1. MARCADORES BIOQUÍMICOS DE FORMAÇÃO ÓSSEA

2.5.1.1. FOSFATASE ALCALINA

A fosfatase alcalina é uma glicoproteína de membrana com atividade enzimática (AKESSON, 1995). Esta enzima catalisa reações como a hidrólise dos ésteres fosfóricos de álcoois, fenóis e mononucleotídeos. No metabolismo ósseo, a FAL se relaciona com a capacidade de mineralização dos osteoblastos, atuando no controle da concentração dos inibidores da mineralização como os pirofosfatos inorgânicos, através de um aumento da concentração local de íons fosfatos, removendo o fosfato de outras proteínas e/ou possivelmente atuando como transportador iônico (USTÁRIZ et al., 1998).

É encontrada no soro humano e em tecidos que formam os ossos, rins, fígado, intestino e placenta, entre outros (GARNERO; DELMAS, 1993; AKESSON, 1995; USTÁRIZ, 1998). As duas formas predominantes em circulação são a

hepática e a óssea. (FARLEY; BAYLINK, 1995; VIEIRA, 1999). As isoenzimas intestinal e placentária são fontes menos presentes (AKESSON, 1995).

As FAL são codificadas no mínimo por 4 “loci gênicos” (GARNERO; DELMAS, 1993). Enquanto a produção de FAL de origem intestinal e placentária é controlada por diferentes “loci gênicos”, as de origem hepática e óssea são codificadas por um único gene não-tecido-específico (CHRISTENSON, 1997). Estas diferem apenas quanto ao grau de glicosilação, um fenômeno pós-tradução (GARNERO; DELMAS, 1993; FARLEY; BAYLINK, 1995; CHRISTENSON, 1997; VIEIRA, 1999). Portanto, estas frações não são consideradas isoenzimas verdadeiras, mas isoformas da FAL (GARRIDO; AGUAYO; MORENO, 1992; BURTIS; ASHWOOD, 1999).

Embora as isoformas hepática e óssea sejam produtos do mesmo gene, elas diferem entre si na mobilidade eletroforética e na estabilidade frente ao calor e à uréia (GARNERO; DELMAS, 1993).

Este marcador detecta aumentos do metabolismo ósseo, especialmente na doença de Paget, metástases ósseas avançadas e durante a consolidação de fraturas. Na osteoporose, quando as mudanças são pequenas, a interpretação da FAL fica comprometida (AKESSON, 1995).

Um aumento da atividade da FAL é observado também nas obstruções das vias biliares e nas doenças hepáticas (AKESSON, 1995). Vários estudos têm demonstrado que, em adultos, sua atividade aumenta com o envelhecimento (GARNERO; DELMAS, 1993; JIMÉNEZ-DÍAZ; MARTINEZ MONGE, 1999).

2.5.1.2. FOSFATASE ALCALINA ISOFORMA ÓSSEA

A fosfatase alcalina isoforma óssea é uma glicoproteína tetramérica localizada na membrana plasmática de osteoblastos (GARNERO; DELMAS,1993). A FAO possui 507 aminoácidos cuja seqüência é exatamente igual à da isoforma hepática (FARLEY; BAYLINK, 1995). Embora a função da FAO seja desconhecida, acredita-se que a enzima esteja envolvida com a formação de osso e a mineralização da matriz óssea (GARNERO; DELMAS,1993; FARLEY; BAYLINK,1995; VIEIRA, 1999). Sua atividade sérica é proporcional à formação de colágeno e geralmente correlaciona-se bem com o crescimento ósseo e com doenças metabólicas (VIEIRA, 1999). A FAO é encontrada na circulação onde apresenta uma vida média relativamente alta, é mais estável que a OC e não é afetada por variações circadianas (DELMAS, 1993; FARLEY; BAYLINK,1995).

A FAO predomina durante a infância e a adolescência, enquanto a isoforma hepática é maior na idade adulta e senil (CHRISTENSON, 1997).

Na tentativa de melhorar a sensibilidade e a especificidade na análise da FAL, técnicas como a inativação pelo calor, inibição por L-fenilalanina e uréia, precipitação por germe de lecitina e eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida foram desenvolvidas para diferenciar as isoformas óssea e hepática (GARNERO; DELMAS, 1993; FARLEY; BAYLINK, 1995; CHRISTENSON, 1997; VIEIRA, 1999). Estas técnicas indiretas aumentaram levemente a sensibilidade deste marcador, mas elas são complexas e nem sempre específicas (GARNERO; DELMAS, 1993).

Recentemente, com o advento dos anticorpos monoclonais específicos para a fração óssea, métodos mais sensíveis e específicos que os indiretos foram elaborados (GARNERO; DELMAS, 1993; FARLEY; BAYLINK, 1995; BIKLE, 1997; VIEIRA, 1999). A utilização destes imunoensaios confirma a FAO como marcador de

formação óssea (FARLEY; BAYLINK, 1995). Existe entretanto, uma reação cruzada com a fosfatase alcalina isoforma hepática da ordem de 15% (CHRISTENSON, 1997; VIEIRA, 1999).

A FAO encontra-se aumentada na doença de Paget óssea, hipertireoidismo, hiperparatireoidismo primário, acromegalia e metástases ósseas (GARNERO; DELMAS, 1993).

2.5.1.3. OSTEOCALCINA

A osteocalcina, também denominada proteína óssea GLA devido a três resíduos do ácido gama carboxiglutâmico (GLA) em sua estrutura primária, é uma proteína produzida por osteoblastos e odontoblastos durante a fase de mineralização óssea (TRIFFITT, 1987; CHRISTENSON, 1997). É considerada a mais abundante proteína não-colágena presente na matriz óssea mineralizada; é diretamente influenciada pelos hormônios reguladores do metabolismo do cálcio e dependente da ação da vitamina K (TRIFFITT, 1987; CHRISTENSON, 1997). No plasma humano tem vida média de 20 minutos (DI DIO et al., 1994), sendo eliminada pelos rins (DELMAS, 1993; AKESSON, 1995; CHRISTENSON, 1997).

As funções da OC são ainda mal definidas, apesar de sua estrutura indicar interação com o cálcio e cristais de hidroxiapatita. Estudos mostram que o aparecimento e aumento de produção da proteína são coincidentes com o início do processo de mineralização óssea (VIEIRA, 1999). Atribui-se aos 3 resíduos de GLA a sua peculiaridade de se ligar ao cálcio (AZIRIA, 1989; VIEIRA, 1999).

Como a OC é produzida quase que exclusivamente por osteoblastos, sua medida é altamente específica para tecido ósseo, assim, correlaciona-se bem com as análises histológicas de formação e mineralização óssea (DI DIO et al.,

1994; AKESSON, 1995; BIKLE, 1997). Apesar de ser depositada primariamente na matriz óssea recém-formada, uma pequena fração entra em circulação, caracterizando esta proteína como um marcador da atividade osteoblástica (AKESSON, 1995; BIKLE, 1997; VIERA, 1999). Entretanto, a OC circulante reflete a remodelação de todo o esqueleto, enquanto dados histomorfométricos refletem o estado de um determinado local do esqueleto (DI DIO et al., 1994).

Um ensaio, no qual a incorporação dos resíduos GLA à molécula de osteocalcina foi bloqueada através da inibição da vitamina K pela administração de um fármaco cumarínico, provou que a osteocalcina incorporada à matriz óssea não contribui para seus níveis normais. Cerca de 3 horas após a administração do anticoagulante, toda a osteocalcina incorporada ao osso permanecia saturada pelos resíduos de GLA, enquanto que toda a osteocalcina circulante estava desprovida dos resíduos ácidos. Assim, provou-se que os níveis periféricos da osteocalcina refletem a atividade osteoblástica recente, quase instantânea (DI DIO et al., 1994).

A OC não é considerada um marcador de reabsorção óssea, pois é totalmente destruída durante a reabsorção promovida pelos osteoclastos, entretanto, estudos "in vitro" e "in vivo" sugerem que a OC tem um importante papel no recrutamento e diferenciação dos osteoclastos (VIEIRA, 1999).

Os imunoensaios são freqüentemente utilizados para a determinação da OC em amostras de sangue humano (CHRISTENSON, 1997). O desenvolvimento de metodologias com a utilização de anticorpos monoclonais tornou os resultados com diferentes métodos mais confiáveis (BIKLE, 1997; VIERA, 1999). Entretanto, para a interpretação dos níveis de OC deve-se considerar fatores como a metodologia empregada e o horário de coleta da amostra (VIEIRA 1999).

Em razão do ritmo circadiano, os níveis circulantes de OC são mínimos pela manhã, sofrendo aumento progressivo à tarde e ao anoitecer, alcançando o

pico no período noturno (AKESSON, 1995; DI DIO et al., 1994). Este fenômeno está presente no homem e na mulher, não sofrendo modificação com o ciclo menstrual (DI DIO et al., 1994).

As concentrações de OC se modificam com a idade. São maiores na infância e puberdade, com pico coincidindo com a época do “estirão puberal”, a partir daí declinam na fase adulta (DI DIO et al., 1994; AKESSON, 1995).

Níveis elevados de OC ocorrem na osteomalácia, doença de Paget óssea, hipertireoidismo primário, osteodistrofia renal e osteoporose pós-menopausa, entre outras. Níveis reduzidos são relatados no hipoparatiroidismo e terapias prolongadas com corticóides (TRIFFITT, 1987; DELMAS, 1993; DI DIO et al., 1994).

2.5.2. MARCADORES BIOQUÍMICOS DE REABSORÇÃO ÓSSEA

2.5.2.1. FOSFATASE ÁCIDA TARTARATO RESISTENTE

Fosfatase ácida é o nome dado a um grupo de enzimas que hidrolisam monoésteres fosfóricos em meio ácido. Suas isoenzimas são encontradas em tecidos e células, incluindo o fígado, baço, rins, próstata, osteoclastos, plaquetas e eritrócitos, entre outros. São inibidas pelo tartarato, com exceção daquelas de origem osteoclástica e eritrocitária, as quais são denominadas fosfatases ácidas tartarato resistentes (CHAPMAN; WOODARD; SILVERMAN, 1987).

A FATR de origem osteoclástica é presumivelmente liberada na circulação durante a reabsorção óssea e após o afastamento dos osteoclastos do seu local de atuação (AZIRIA, 1989; CHRISTENSON, 1997). Tem sido considerada um marcador útil embora não específico da reabsorção óssea (HALLEEN et al., 2001).

Metodologicamente, para se determinar a atividade da FATR de origem osteoclástica, as amostras de soro são pré-tratadas com tartarato e p-hidroximercuriobenzoato (inibidor seletivo da isoenzima eritrocitária de baixo peso molecular) (CHAPMAN; WOODARD; SILVERMAN, 1987). Para aumentar a sensibilidade e a especificidade desta isoenzima, imunotestes que utilizam anticorpos específicos substituíram os testes bioquímicos no soro (NAKASATO et al., 1999; HALLEN et al., 2001). Alguns desses imunotestes medem a atividade da FATR enquanto outros medem a massa desta isoenzima (NAKASATO et al., 1999).

RICO et al. (1990) e HALLEEN et al. (2001) relataram que a FATR está muito aumentada em pacientes com doenças ósseas como a osteoporose, osteopenia e doença de Paget óssea.

3. *OBJETIVOS*

Este trabalho explora o comportamento da fosfatase alcalina total, fosfatase alcalina isoforma óssea, osteocalcina e fosfatase ácida tartarato resistente em humanos para:

- i) avaliar com 35 e 70 dias em média o processo de formação e reabsorção óssea, após a realização de enxerto autógeno em fissura alveolar, sem e com plasma rico em plaquetas e
- ii) verificar a existência de diferenças entre os níveis dos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo no enxerto sem e com plasma rico em plaquetas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi submetido à apreciação da Comissão de Pesquisa e do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo (HRAC-USP) e obteve parecer favorável. Posteriormente, foi encaminhado e aprovado pelo Conselho do Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (anexos).

Foram incluídos neste estudo 50 pacientes que apresentavam fissura labiopalatina, de ambos os sexos, com idade entre 10 e 20 anos, submetidos à cirurgia para realização de enxerto ósseo alveolar pelo Serviço de Cirurgia Bucomaxilo-facial do HRAC-USP e que compareceram nas datas e horários programados para a coleta de sangue e realização das radiografias, assim subdivididos: 25 pacientes que receberam enxerto autógeno e 25 pacientes que receberam enxerto autógeno associado ao PRP.

Os critérios de exclusão foram: doenças ósseas, fraturas e doenças hepáticas ou hepatobiliares, recentes ou vigentes, diagnosticadas pelo exame clínico e/ou laboratorial, através da análise dos prontuários dos pacientes.

4.1. Protocolo de trabalho

Constaram no protocolo de trabalho os seguintes dados: nome, número de registro, sexo, idade, data da cirurgia, data das coletas do sangue, data da realização das radiografias, volume do PRP, contagem de plaquetas no sangue periférico, contagem de plaquetas no PRP, classificação da fissura, área da fissura, resultados das análises bioquímicas e avaliação radiográfica (anexo).

4.2. Sais e reagentes

Foram utilizados os seguintes sais e reagentes: acetato de sódio, p-nitrofenilfosfato de sódio, p-hidroximercuriobenzoato, tartarato de sódio e L-fenilalanina (Sigma); uréia (Merck); cloreto de cálcio (Synth) e hidróxido de sódio (Carlo Erba); kit fosfatase alcalina total (SERA-PAK[®] Fosfatasa alcalina según SCE, Bayer); kit fosfatase alcalina óssea (Metra BAP EIA, Quidel[®]); kit osteocalcina (IMMULITE[®] Osteocalcin, DPC[®]).

4.3. Equipamentos

Os equipamentos utilizados nas determinações bioquímicas foram: espectrofotômetro (Celm SB 190); analisador Technicon RA – XT (Bayer); leitora automática para imunoensaios (Biolab – Mérieux); analisador automático Immulite[®] I (DPC). A contagem de plaquetas foi realizada no contador automático de glóbulos (Coulter T 890). Para o preparo do PRP foi utilizada a centrífuga (BioEng BE 2300) e o aparelho de fluxo unidirecional (Trox Technik FLV). As radiografias foram realizadas no aparelho de raios-x dentário (Dabi Atlante 10/70). Foram ainda utilizados um banho-maria (Fanen) e o freezer (Indrel IULT 304 V) para o congelamento das amostras a -80 °C negativos.

4.4. Coleta de material para análise bioquímica

Foram coletados 10 mL de sangue venoso de cada paciente, através do sistema de coleta a vácuo (Vacutainer[®] – BD), em 3 períodos distintos: 24 a 48 horas antes da cirurgia (com os exames da rotina pré-cirúrgica), 35 dias em média e

70 dias em média após a cirurgia, nos retornos programados pelo Serviço de Cirurgia Buco-maxilo-facial do HRAC-USP para a realização dos testes bioquímicos. As amostras foram coletadas sempre no mesmo horário, entre 7 e 8 horas da manhã e imediatamente separadas, aliquotadas e congeladas. Foram excluídas as amostras de soro e plasma lipêmicas ou hemolisadas. Os pacientes obedeceram a um jejum mínimo de 8 horas para a coleta do sangue.

4.5. Preparo e aplicação do plasma rico em plaquetas

Foram coletados 18 mL de sangue venoso de cada paciente, em tubo estéril contendo citrato de sódio a 3,2%, através do sistema de coleta a vácuo (Vacutainer® – BD) minutos antes da cirurgia, durante a indução anestésica.

As amostras foram imediatamente processadas no Laboratório de Análises Clínicas do HRAC-USP para a produção do PRP segundo um protocolo simplificado. O sangue coletado foi centrifugado com o frasco fechado a 1400 rpm por 10 minutos e o sobrenadante, composto de plasma, plaquetas e leucócitos, corresponde ao PRP total. O produto foi transferido para uma seringa estéril em aparelho de fluxo unidirecional e encaminhado imediatamente ao centro cirúrgico com outra seringa contendo 50 µL de cloreto de cálcio a 10% estéril para cada mL de PRP produzido. No momento do uso, o PRP é misturado aos fragmentos de osso retirados da crista ilíaca e à solução de cloreto de cálcio. Após 7 a 10 minutos o gel de plaquetas se forma entre estes fragmentos (ANITUA, 1999; SONNLEITNER; HUEMER; SULLIVAN, 2000). A mistura sob compactação é colocada imediatamente no leito receptor previamente preparado e a sutura finaliza o procedimento cirúrgico.

4.6. Avaliação bioquímica

Os marcadores bioquímicos de formação óssea escolhidos para fazer parte deste estudo foram: a fosfatase alcalina total; fosfatase alcalina isoforma óssea por imunoensaio, inativação térmica e inibição química; osteocalcina. O marcador de reabsorção óssea avaliado foi a fosfatase ácida tartarato resistente.

4.6.1. Fosfatase alcalina total

A reação foi realizada no analisador automático de bioquímica com determinação da absorbância em 405 nm em intervalos de 1 minuto. A enzima presente no soro hidrolisa o p-nitrofenilfosfato, produzindo o p-nitrofenol que, em meio alcalino, é amarelo. A intensidade da cor do produto formado é diretamente proporcional à atividade enzimática.

TABELA 1 – Valores de referência adotados para a fosfatase alcalina total (PENTILLA et al., 1975).

Idade (anos)	FAL Homens (U/L)	FAL Mulheres (U/L)
10 – 11	250 a 730	250 a 950
12 – 13	275 a 875	200 a 730
14 – 15	170 a 970	170 a 480
16 – 18	125 a 720	75 a 270
> 18	50 a 250	50 a 250

FAL - fosfatase alcalina.

4.6.2. Fosfatase alcalina isoforma óssea

4.6.2.1. Por imunoensaio

O Metra FAO é um imunoensaio no formato de tiras de microtitulação, revestidas com anticorpos monoclonais anti-FAO, utilizados para capturar a FAO da amostra. A atividade enzimática é determinada utilizando-se como substrato o p-nitrofenilfosfato e a monitoração do produto de hidrólise, o p-nitrofenol, é realizada na leitora para imunoensaios em 405 nm.

4.6.2.2. Por inativação térmica

O método está fundamentado na labilidade da isoforma óssea da fosfatase alcalina frente ao calor. Alíquotas de 100 µL da amostra foram incubadas em banho-maria a 56 °C por 10 minutos e imediatamente transferidas para um banho de gelo. A atividade da fosfatase alcalina não óssea (termoestável) foi determinada diretamente no espectrofotômetro em temperatura de 30 °C com leitura das absorbâncias em 405 nm, tendo como substrato o p-nitrofenilfosfato.

A fração óssea, por sua vez, foi determinada indiretamente subtraindo-se a atividade da fosfatase alcalina termoestável da fosfatase alcalina total (MOSS; WHITBY, 1975; VIEIRA et al., 1999).

4.6.2.3. Por inibição química

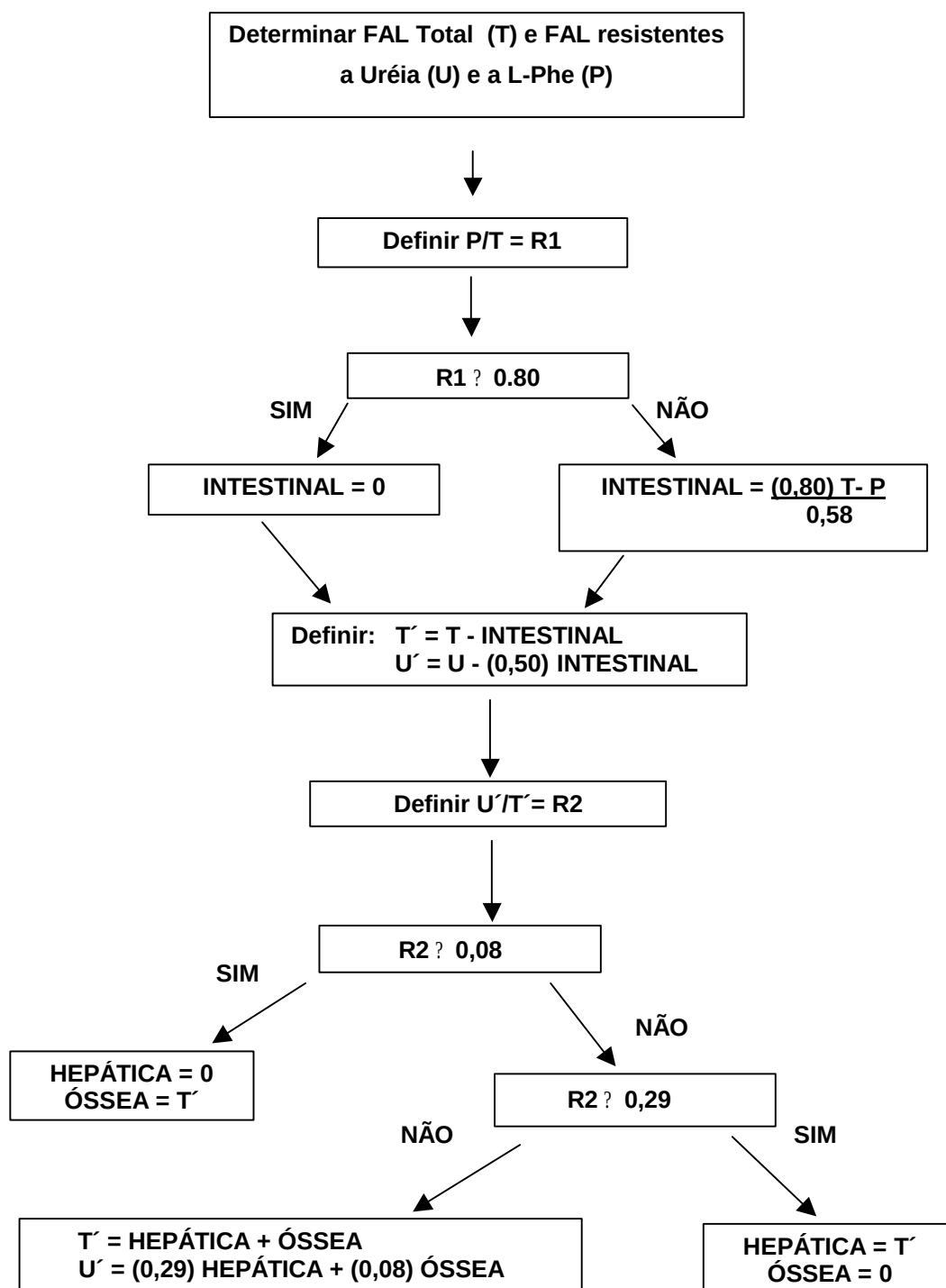
O método fundamenta-se na forte inibição exercida pela L-fenilalanina sobre as frações intestinal, placentária e Regan da fosfatase alcalina, enquanto que

sobre as isoformas óssea e hepática seu efeito é menor. Já a uréia, em alta concentração, exerce seu efeito mais acentuadamente sobre a isoforma óssea. A isoforma hepática tem resistência intermediária enquanto as isoenzimas placentária e intestinal são mais resistentes (BURTIS; ASHWOOD, 1999).

A amostra foi incubada separadamente na presença de 11 mM de L-fenilalanina e de 2,44 M de uréia por 5 minutos a 30 °C. A atividade enzimática remanescente foi determinada espectrofotometricamente em 405 nm, utilizando-se como substrato o p-nitrofenilfosfato. Para o cálculo das isoformas, a atividade da fosfatase alcalina total também foi determinada utilizando-se a mesma metodologia.

A concentração das frações hepática, intestinal e óssea foi determinada através do fluxograma (Figura 2) construído a partir de isoformas originais extraídas respectivamente do fígado de pacientes falecidos por doenças não hepáticas, biópsia jejunal de voluntários normais e do soro de 3 pacientes com alta atividade osteoblástica causadas por hiperparatireoidismo secundário, doença de Paget óssea e osteíte deformante. Estas isoformas foram misturadas e mensuradas sem inibição e por inibição química seletiva com L-fenilalanina e uréia e seus resultados lançados em um programa de computador que produziu o fluxograma (STATLAND; NISHI; YOUNG, 1972).

FIGURA 2: Fluxograma do programa de computador utilizado para calcular as isoformas da fosfatase alcalina (modificado por O' CARROLL et al., 1975).



Os valores de referência adotados para as isoformas da FAL pelo método de inibição pela uréia e L-fenilalanina são semelhantes aos encontrados

quando se utilizam técnicas como a eletroforese em gel de poliacrilamida e a inativação pelo calor (CHAPMAN; WOODARD; SILVERMAN, 1987).

TABELA 2 – Valores de referência para as isoformas da fosfatase alcalina (CHAPMAN; WOODARD; SILVERMAN, 1987).

Faixa etária	FAO (%)	FAH (%)	FAI (%)
Crianças e Adolescentes	85	5	< 10
Adultos	30	60	< 10
Idosos	30	60	< 10

FAL – fosfatase alcalina; FAO – fosfatase alcalina isoforma óssea; FAH – fosfatase alcalina isoforma hepática; FAI – fosfatase alcalina isoforma intestinal; % - porcentagem.

4.6.3. Osteocalcina

Foi utilizado um ensaio em fase sólida do tipo enzimaímunoensaio imunométrico quimiluminescente com dois sítios, realizado no plasma heparinizado. Cada teste possui em seu interior uma pérola de poliestireno revestida com anticorpo monoclonal murino anti-osteocalcina. A amostra e a fosfatase alcalina conjugada ao anticorpo policlonal de coelho anti-osteocalcina são simultaneamente introduzidas no teste e incubadas por 30 minutos a 37 °C, sob agitação intermitente. Durante este período, a OC é ligada ao complexo de anticorpos de maneira a formar o sanduíche. A FAL não ligada é removida por lavagem e centrifugação. O substrato quimiluminescente – PPD (éster fosfato do adamantil dioxetano) é adicionado ao teste e hidrolisado em presença de fosfatase alcalina, gerando um produto no estado eletronicamente excitado, que emite luz. A intensidade da luz emitida é diretamente proporcional à concentração da OC na amostra.

Tabela 3 - Valores de referência adotados para a osteocalcina (SEYDEWITZ et al., 2001).

Idade (anos)	Valores de referência (µg/L)
10 – 12	13 a 81
12 – 14	16 a 90
14 – 16 (homens)	15 a 103
14 – 16 (mulheres)	9 a 28
16 – 18 (homens)	14 a 67
16 – 18 (mulheres)	5 a 21

4.6.4. Fosfatase ácida tartarato resistente

A atividade da fosfatase ácida tartarato resistente foi determinada espectrofotometricamente, utilizando-se 50 µL de soro e 950 µL de um meio contendo 100 mM de tampão acetato de sódio (pH 5,0), 5 mM do substrato p-nitrofenilfosfato, 1 mM de p-hidroximercuriobenzoato (pHMB) e 10 mM de tartarato de sódio. A paralisação da reação ocorreu pela adição de hidróxido de sódio 1 M após 30 minutos de incubação a 37 °C em banho-maria. O produto formado (p-nitrofenol) foi medido em 405 nm. O pHMB inibe toda a atividade de baixo peso molecular (FABMr) e, a atividade residual na presença do tartarato será correspondente a FATR de origem osteoclástica (OLIVEIRA et al., 1999).

O valor de referência adotado para a FATR é de 3,4 a 9,0 U/L para pacientes com idade entre 4 e 15 anos (PANTEGHINI; PAGANI, 1989).

4.7. Contagem de plaquetas

O número de plaquetas do sangue periférico e do PRP foi determinado em contador automático de glóbulos em um único tempo, respectivamente na

amostra coletada antes do procedimento cirúrgico e em uma alíquota do PRP após a sua produção. O valor de referência adotado para o sangue periférico é de 150.000 a 450.000 plaquetas/mm³ (TONTE; STEVENS, 1995).

4.8. Avaliação Radiográfica

As radiografias periapicais da região do enxerto foram realizadas pelo Serviço de Radiologia Odontológica do HRAC-USP, com filme periapical (Kodak-Insight) e auxílio do porta-filme tipo Han Shin (Indusbello), em aparelho de raios-x odontológico. Foram feitas radiografias antes do enxerto ósseo e com 35 e 70 dias em média após o ato cirúrgico. A técnica radiográfica utilizada foi a da bissetriz, descrita originalmente por Cieszynski e todos os filmes foram processados manualmente, utilizando a metodologia temperatura/tempo (FREITAS; VAROLI; TORRES, 1998).

A avaliação radiográfica foi realizada por três examinadores, em negatoscópio de luz fria, com auxílio de lupa, nos quesitos: preenchimento ou não da fissura alveolar por osso neoformado e presença ou não de trabeculado ósseo organizado, em fase inicial de formação, na área do enxerto. Após 30 dias, as radiografias foram reavaliadas pelos mesmos examinadores nos mesmos períodos (T₁ e T₂).

A área da fissura foi mensurada por um dos três examinadores em tempo único, através da análise da radiografia realizada antes do enxerto, com o auxílio de compasso e régua milimetrada. Os valores foram expressos em milímetros quadrados.

4.9. Análise estatística

Foi empregado o programa Statistica for Windows versão 5.1 (Stat Soft Inc., Tulsa, USA) para o cálculo da média aritmética, desvio-padrão (comportamento temporal dos marcadores bioquímicos de formação e reabsorção óssea com e sem PRP), análise de variância a dois critérios (análise dos critérios tempo e grupo, interação entre os critérios e correlação entre a área da fissura e os marcadores bioquímicos nos grupos sem e com PRP), teste de Tukey (análise do critério tempo entre dois pontos), teste de Kolmogorov-Smirnov (tipo de distribuição da amostra), teste de Kappa (concordância interexaminador e intra-examinador na análise radiográfica) e coeficiente de correlação de Pearson (correlação entre o número de plaquetas e os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo). No teste Kappa, foram consideradas significativas as concordâncias superiores a + 0,6. As correlações obtidas pelo coeficiente de Pearson foram assim classificadas: excelente ($r > 0,75$), média ($0,50 > r < 0,75$), baixa ($0,30 > r < 0,50$) e muito baixa ($r < 0,30$). A significância adotada foi $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Características gerais da amostra

O estudo foi realizado com 50 pacientes que apresentavam FLP, submetidos à cirurgia de enxerto ósseo alveolar, subdivididos em dois grupos (sem e com PRP) em três períodos distintos: pré-cirúrgico (T_0), 35 dias (T_1) e 70 (T_2) dias em média após o ato cirúrgico.

No grupo sem o PRP, os pacientes apresentaram idade média de $12,7 \pm 2,3$ anos, sendo 56% do sexo masculino e 44% do sexo feminino. Os retornos ocorreram com $35,4 \pm 2,6$ dias (T_1) e $70,8 \pm 7,9$ dias (T_2) após a cirurgia. No grupo com o PRP, a idade média foi de $13,2 \pm 2,8$ anos, sendo 60% do sexo masculino e 40% do sexo feminino. Os retornos ocorreram com $35,5 \pm 3,0$ dias (T_1) e $72,6 \pm 9,4$ dias (T_2) após a cirurgia.

A tabela 4 mostra a distribuição dos 50 pacientes pelo tipo de fissura nos grupos sem e com PRP. Foi utilizada a classificação de SPINA et al. (1972) modificada por SILVA FILHO et al. (1992). Os resultados apresentados não foram confrontados com a literatura pertinente pois, fatores relativos ao processo de agendamento para a cirurgia interferem na amostra. A aplicação do PRP ao material de enxerto foi aleatória em relação à classificação da fissura.

TABELA 4 – Distribuição dos pacientes segundo o tipo de fissura nos grupos sem e com PRP.

Fissura	Sem PRP		Com PRP	
	n	%	n	%
Pré-forame unilateral completa	7	28	4	16
Pré-forame unilateral incompleta	5	20	2	8
Transforame unilateral	9	36	12	48
Transforame bilateral	4	16	7	28

PRP - plasma rico em plaquetas; n - amostra; % - porcentagem.

5.2. Comportamento dos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e avaliação do uso do PRP

O osso é um tecido vivo em permanente processo de remodelação através dos mecanismos de formação e reabsorção, os quais podem ser estudados, entre outros métodos, pelos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. Estes marcadores são muito utilizados em pesquisas, mas seu uso na rotina clínica ainda é pequeno. Como apresentam grande variabilidade, sua utilização individualizada deve ser tratada com cautela. Evitou-se utilizar os marcadores urinários, pois o resultado depende de correção pela creatinúria. É necessário, também, respeitar as variações circadianas coletando as amostras em horário padronizado. Vários destes marcadores estão descritos na literatura, entretanto, procurou-se trabalhar com aqueles que apresentam um real interesse prático para monitorar o processo de formação ou reabsorção óssea após a realização do enxerto ósseo alveolar.

Não foram encontrados na literatura estudos que utilizaram marcadores bioquímicos de formação e reabsorção óssea no monitoramento do enxerto autógeno sem ou com o PRP. Assim, os resultados foram confrontados com aqueles obtidos no monitoramento de fraturas sem a participação do PRP. A fratura óssea foi escolhida em função do estudo de MARX (1994) que, utilizando a análise histológica, relatou que o osso formado na área do enxerto (regeneração fase I) é estruturalmente semelhante ao osso formado no calo de fratura. Mesmo assim, a discussão ficou restrita, pois a literatura é escassa e confusa em relação aos períodos de tempo, sítios, faixas etárias e marcadores bioquímicos utilizados, embora em muitos casos, sejam os mesmos deste estudo.

A tabela 5 mostra os resultados da média, desvio-padrão e análise de variância a dois critérios, quais sejam, tempo (T_0 , T_1 e T_2) e grupo (sem e com PRP) para as variáveis fosfatase alcalina, fosfatase alcalina isoforma óssea por três

metodologias, osteocalcina e a fosfatase ácida tartarato resistente. As variáveis estudadas apresentaram distribuição normal conforme o resultado do teste de Kolmogorov-Smirnov (não apresentado).

TABELA 5 – Marcadores bioquímicos séricos de formação e reabsorção óssea.

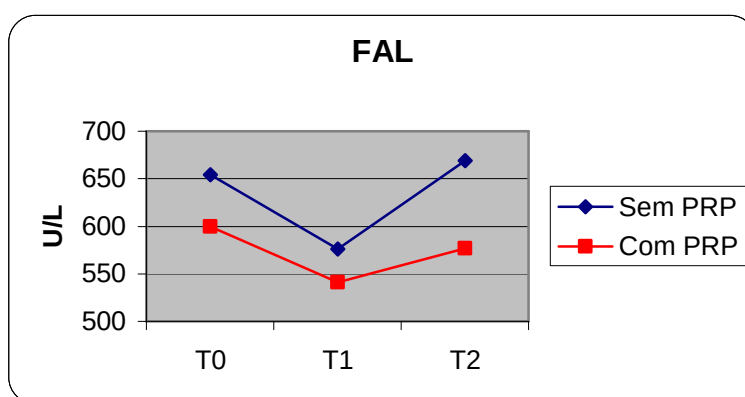
MARCADOR	T ₀			T ₁			T ₂		
	média	dp		média	dp		média	dp	
FAL Sem PRP	654,2	222,8	a	576,8	215,2	b A	669,0	288,0	a A
FAL Com PRP	600,0	277,7	a	541,0	228,5	b A	577,0	273,6	a A
IMUNOENSAIO									
FAO Sem PRP	138,3	57,0	a	122,3	50,1	b A	129,0	57,1	b A
FAO Com PRP	133,3	66,8	a	106,9	48,3	b A	113,0	56,2	b A
TÉRMICA									
FAO Sem PRP	179,1	66,9	a	172,5	65,5	a A	186,2	77,0	a A
FAO Com PRP	170,5	76,0	a	156,6	60,4	a A	160,2	72,8	a A
QUÍMICA									
FAO Sem PRP	182,8	69,4	a	174,4	65,9	a A	190,0	77,5	a A
FAO Com PRP	171,9	77,5	a	158,1	60,6	a A	164,2	75,2	a A
OC Sem PRP	61,1	38,9	a	47,3	27,5	b A	64,4	40,3	a A
OC Com PRP	54,2	38,1	a	63,3	41,9	b A	56,9	49,4	ab A
FATR Sem PRP	15,2	6,4	a	11,5	4,3	b A	10,7	4,0	b A
FATR Com PRP	11,9	3,4	a	10,5	3,0	b A	10,9	3,8	ab A

FAL – fosfatase alcalina (U/L); FAO – fosfatase alcalina isoenzima óssea (U/L); FATR – fosfatase ácida tartarato resistente (U/L); OC – osteocalcina (ng/mL); PRP – plasma rico em plaquetas; dp – desvio padrão; T₀ – coleta no pré-cirúrgico; T₁ – coleta 35 dias em média após a cirurgia; T₂ – coleta 70 dias em média após a cirurgia; letras minúsculas iguais (critério tempo) não possuem diferença estatisticamente significativa entre si; letras maiúsculas iguais (critério grupo) não possuem diferença estatisticamente significativa entre si.

A análise de variância para a FAL (tabela 5) mostrou diferença estatisticamente significativa para o critério tempo (Fisher-F = 12,55; $p < 0,001$), mas não entre os grupos sem e com PRP ($F = 0,33$; $p = 0,567$) e também não significativa para a interação dos critérios com a variável FAL ($F = 1,76$; $p = 0,177$). A comparação entre os tempos pelo teste de Tukey mostrou que houve diferença estatisticamente significativa entre T₀ e T₁ ($p < 0,001$) e T₁ e T₂ ($p < 0,001$), mas não entre T₀ e T₂ ($p = 0,961$).

Verificando o comportamento temporal da FAL, observou-se uma redução dos seus níveis com 35 dias e retorno próximo aos níveis basais com 70 dias em média após a cirurgia, nos grupos sem e com PRP (figura 3).

FIGURA 3 - Comportamento da fosfatase alcalina sem e com PRP.

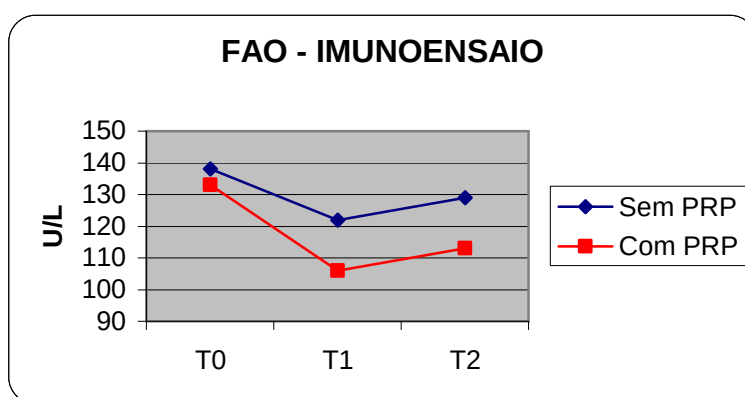


MALLMIN; LJUNGHAL; LARSSON (1993) estudando a fratura de antebraço em 13 pacientes com idade média de 65 anos durante 4 meses, mostraram aumento dos níveis de FAL determinada por método cinético, com pico de atividade aos 30 dias, não retornando aos níveis basais até o final do estudo. AKESSON et al. (1995) revisando a literatura dos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo encontraram, em pacientes com fratura de costela, um aumento de FAL determinada por método cinético nas duas primeiras semanas, permanecendo em níveis altos por no mínimo 3 meses. Embora verificado em fraturas ósseas e sem a aplicação do PRP, o comportamento da FAL no início do processo de reparo ósseo foi diferente daquele encontrado no nosso estudo.

A análise para a FAO por imunoensaio (tabela 5, figura 4) mostrou diferença estatisticamente significativa para o critério tempo ($F = 21,28$; $p < 0,001$), mas não entre os grupos sem e com PRP ($F = 0,20$; $p = 0,655$) e também não significativa para a interação dos critérios com a variável FAO ($F = 1,72$; $p = 0,183$).

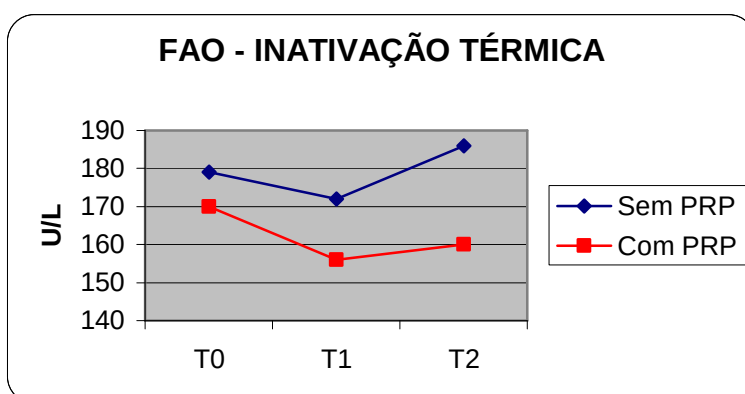
A comparação entre os tempos pelo teste de Tukey mostrou que houve diferença estatisticamente significativa entre T_0 e T_1 ($p < 0,001$) e T_0 e T_2 ($p < 0,001$), mas não entre T_1 e T_2 ($p = 0,139$).

FIGURA 4 – Comportamento da fosfatase alcalina isoforma óssea por imunoensaio sem e com PRP.



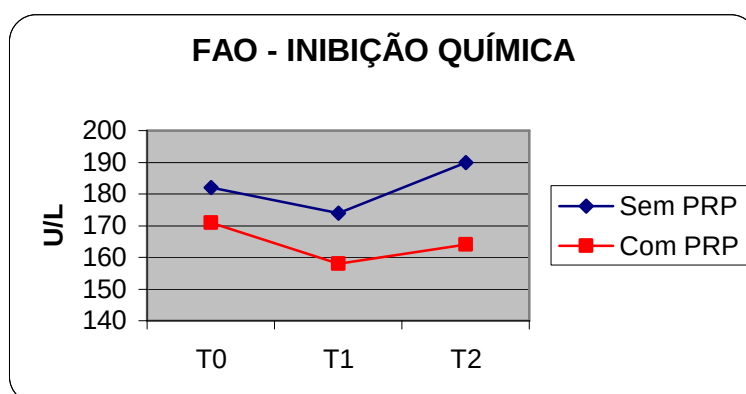
A análise de variância para a FAO obtida por inativação térmica (tabela 5, figura 5) não mostrou diferença estatisticamente significativa para o critério tempo ($F = 2,51$; $p = 0,086$), para o critério grupo sem e com PRP ($F = 0,220$; $p = 0,641$) e para a interação dos critérios com a variável FAO ($F = 1,54$; $p = 0,217$).

FIGURA 5 – Comportamento da fosfatase alcalina isoforma óssea por inativação térmica sem e com PRP.



A análise de variância para a FAO por inibição química (tabela 5, figura 6) mostrou diferença estatisticamente significativa para o critério tempo ($F = 3,25$; $p = 0,042$), mas não entre os grupos sem e com PRP ($F = 0,24$; $p = 0,625$) e também não significativa para a interação dos critérios com a variável FAO ($F = 1,15$; $p = 0,320$). Entretanto, na comparação entre os intervalos de tempo pelo teste de Tukey, não houve diferença estatisticamente significativa entre T_0 e T_1 ($p = 0,069$), T_1 e T_2 ($p = 0,080$) e T_0 e T_2 ($p = 0,997$).

FIGURA 6 – Comportamento da fosfatase alcalina isoforma óssea por inibição química sem e com PRP.



Observou-se na FAO por imunoenensaio, inativação térmica e inibição química (Tabela 5), um comportamento temporal semelhante ao que ocorreu com a FAL total, ou seja, uma tendência de redução dos níveis médios com 35 dias, seguido de um aumento próximo aos níveis basais com 70 dias, nos dois grupos estudados. Portanto, independente da metodologia empregada para avaliar a isoforma óssea da FAL o padrão de resposta é o mesmo.

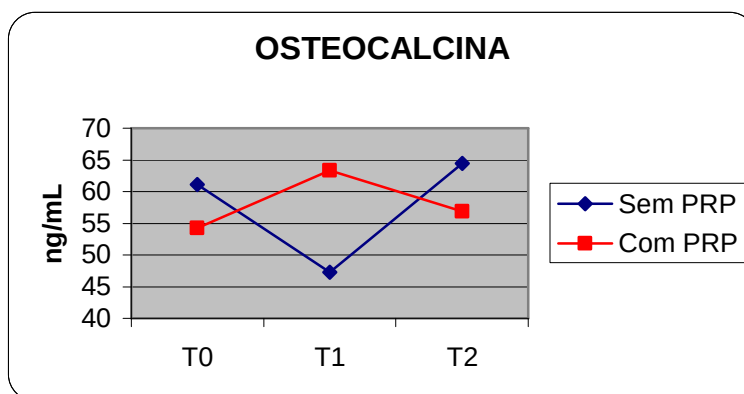
LEUNG (1993) estudou a FAO por precipitação com germe de lecitina, como indicador de atividade osteoblástica, em 49 adultos com fratura de osso longo. Relatou que 94% dos pacientes apresentaram um aumento da atividade de FAO durante o processo de cura, com pico de atividade em torno de 3 meses e retorno aos níveis basais após 6 meses; EMAMI et al. (1999) observaram em 30 pacientes adultos com fratura de tíbia, um aumento de FAO determinada por imunoensaio entre 3 e 4 meses após a fratura, com valor 105% maior no pico em relação aos níveis basais e YU-YAHIRO et al. (2001) estudando a fratura de quadril em 205 pacientes com idade média de 81 anos, observaram um pico de atividade para a FAO por ensaio imunoradiométrico aos 60 dias, permanecendo seus níveis aumentados por um ano em relação aos valores basais.

Entretanto, KURDY (2000) estudando a fratura de tíbia em 20 pacientes adultos através da FAO por imunoensaio, obteve resultados semelhantes a este estudo, com uma redução nos níveis médios entre o 1º e o 8º dia da fratura, com retorno aos níveis basais após 35 a 70 dias.

A análise de variância para a OC (tabela 5) mostrou diferença estatisticamente significativa para interação entre os critérios tempo e grupo e a variável OC ($F = 11,37$; $p < 0,001$), mas não entre os grupos sem e com PRP ($F = 0,06$; $p = 0,799$) e o tempo ($F = 1,79$; $p = 0,171$). Tendo em vista o resultado estatisticamente significativo somente para a interação, aplicou-se o teste de Tukey isoladamente para a OC e tempo e para a OC e grupo. Para o critério tempo, no grupo sem PRP houve diferença estatisticamente significativa entre T_0 e T_1 ($p = 0,006$) e T_1 e T_2 ($p < 0,001$), mas não entre T_0 e T_2 ($p = 0,732$); no grupo com PRP houve diferença estatisticamente significativa entre T_0 e T_1 ($p = 0,040$), mas não para T_0 e T_2 ($p = 0,759$) e T_1 e T_2 ($p = 0,180$). No critério grupo não houve diferenças estatisticamente significativas.

A OC do grupo sem PRP manteve o mesmo comportamento da FAL e das FAO. Uma inversão foi observada no grupo de pacientes que recebeu o PRP, onde os níveis médios em T_1 foi superior a T_0 . Apoiados na alta especificidade e sensibilidade da metodologia para a determinação da OC (BIKLE, 1997), poder-se-ia, a princípio, entender que o marcador acusou o início do processo de formação óssea, com o PRP acelerando a regeneração, entretanto, este efeito deixou de ser evidente, pois os níveis de OC retornaram próximo aos valores basais em T_2 (figura 7). Além disso, os demais marcadores estudados não deram suporte a este comportamento, com destaque para a FAO por imunoensaio, considerado também um método sensível e específico (VIEIRA, 1999).

FIGURA 7 – Comportamento da osteocalcina sem e com PRP.



EMAMI et al. (1999) utilizando a OC determinada por imunoensaio para acompanhar a evolução da fratura de tíbia em 30 adultos por um ano, observaram que o pico de atividade ocorreu entre 3 e 4 meses após a fratura, com aumento de 58% em relação aos níveis basais. YU-YAHIRO et al. (2001) na fratura de quadril,

também observaram que a OC por ensaio imunoradiométrico foi mais ativa no início do período pós-fratura com pico de atividade aos 60 dias, permanecendo com níveis elevados por um ano em relação aos valores basais.

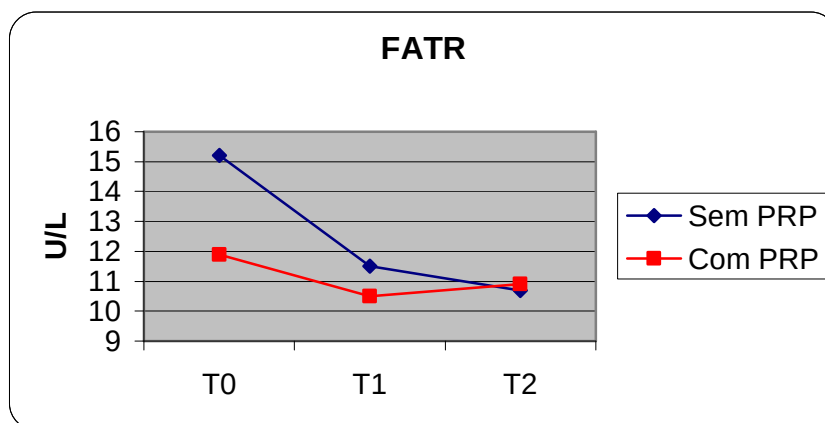
A demonstração de diferença estatística entre os tempos T_0 e T_1 para os marcadores FAL, FAO por imunoensaio e OC sem PRP, com níveis menores para T_1 em relação a T_0 , indicam que houve provavelmente uma baixa resposta osteoblástica no início do processo de reparo ósseo, fato apontado e discutido por KURDY (2000) em relação a fraturas. EMAMI et al. (1999) também relataram que o processo inicial de reabsorção óssea está ativo, especialmente dentro do primeiro estágio do processo de cura de uma fratura, enquanto o processo de formação óssea inicia-se um pouco mais tarde.

A análise de variância para a FATR (tabela 5) mostrou diferença estatisticamente significativa para a interação entre os critérios tempo e grupo e a variável FATR ($F = 8,59$; $p < 0,001$) e para o critério tempo ($F = 26,66$; $p < 0,001$), mas não entre os grupos sem e com PRP ($F = 0,51$; $p = 0,477$). A comparação entre os tempos pelo teste de Tukey no grupo sem PRP, mostrou que houve diferença estatisticamente significativa entre T_0 e T_1 ($p < 0,001$) e T_0 e T_2 ($p < 0,001$), mas não entre T_1 e T_2 ($p = 0,528$). No grupo com PRP, houve diferença estatisticamente significativa entre T_0 e T_1 ($p = 0,007$), mas não entre T_0 e T_2 ($p = 0,064$) e T_1 e T_2 ($p = 0,673$). O teste Tukey também foi aplicado para o critério grupo, sem contudo apresentar diferença estatisticamente significativa.

Analisando o comportamento da FATR, observou-se que embora tenha havido uma redução dos seus níveis nos dois grupos em T_1 , os níveis não retornaram aos níveis basais, permanecendo praticamente inalterados até T_2 (Figura 8). EMAMI et al. (1999) monitorando o processo de reabsorção óssea na fratura de tíbia, através de um telopeptídeo terminal do colágeno tipo I após 1, 4, 7, 10, 13, 16,

26 e 52 semanas, mostraram que o nível deste marcador aumentou cerca de 33% no início do processo de cura, com pico de atividade em 4 semanas. KURDY (2000) estudando o mesmo tipo de fratura com o mesmo marcador, mas em tempos diferentes (1, 4, 8 e 14 dias; 5, 10, 14 e 20 semanas), observou um aumento dos valores desde o início do estudo, com pico de atividade aos 14 dias e retorno aos valores basais após 20 semanas.

FIGURA 8 – Comportamento da fosfatase ácida tartarato resistente sem e com PRP.



A área média da fissura enxertada, obtida pela análise da radiografia em T₀, é de $25.5 \pm 15.9 \text{ mm}^2$ no grupo sem PRP e de $32.0 \pm 19.7 \text{ mm}^2$ no grupo com PRP.

A tabela 6 fornece os resultados da correlação entre a covariável área da fissura e os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. Não houve correlação significativa em nenhum dos momentos avaliados.

TABELA 6 – Correlação entre a covariável área da fissura e os marcadores de formação e reabsorção óssea.

MARCADOR	T_0 p	T_1 p	T_2 p
FAL	0,944	0,662	0,656
FAO IMUNOENSAIO	0,857	0,657	0,651
FAO TÉRMICA	0,277	0,698	0,433
FAO QUÍMICA	0,241	0,795	0,482
OC	0,541	0,513	0,378
FATR	0,205	0,087	0,217

FAL – fosfatase alcalina; FAO – fosfatase alcalina isoenzima óssea; OC – osteocalcina; FATR – fosfatase ácida tartarato resistente; T_0 – coleta no pré-cirúrgico; T_1 – coleta 35 dias em média pós a cirurgia; T_2 – coleta 70 dias em média após a cirurgia; $p < 0,05$.

Os pacientes do grupo com PRP receberam 7.3 ± 1.6 mL do produto associado ao enxerto, num total de $2.5 \times 10^9 \pm 0.9$ de plaquetas. No sangue periférico, a contagem média de plaquetas foi de 272 ± 64 mil/mm³ e no PRP com uma única centrifugação, a contagem média foi de 332 ± 114 mil/mm³. Portanto, um aumento de 22% no número de plaquetas em relação ao sangue periférico. MARX et al. (1998) relataram que contagens automatizadas no sangue periférico de 44 pacientes apontaram média de 232.000 plaquetas/mm³, enquanto que no PRP o valor foi de 785.000/mm³, utilizando coleta em bolsa e técnica de dupla centrifugação.

O teste de correlação de Pearson foi aplicado entre o número total de plaquetas recebido por indivíduo do grupo com PRP e os resultados dos marcadores bioquímicos de formação e reabsorção óssea. Os dados não mostraram correlação significativa nos dois momentos avaliados, exceto para a FAO por inibição química e inativação térmica, onde foi observada uma correlação significativa de nível médio, tanto em T_1 como em T_2 (tabela 7). Como a OC e a FAO por imunoenensaio, reconhecidamente mais sensíveis e específicas, não conseguiram estabelecer uma

correlação no mínimo equivalente e, a análise de variância para o critério grupo não foi significativa para nenhum dos marcadores estudados, não é possível afirmar com segurança a existência de uma relação “dose-efeito” evidenciada por estes marcadores.

TABELA 7 – Correlação entre o número total de plaquetas aplicado e os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo do grupo com PRP.

MARCADOR	T ₁		T ₂	
	r	p	r	p
FAL	0,148	0,479	0,254	0,220
FAO IMUNOENSAIO	0,075	0,720	0,239	0,249
FAO TÉRMICA	0,547	0,005	0,510	0,009
FAO QUÍMICA	0,543	0,005	0,527	0,007
OC	0,015	0,942	0,121	0,562
FATR	0,326	0,112	0,331	0,106

FAL – fosfatase alcalina; FAO – fosfatase alcalina isoenzima óssea; OC – osteocalcina; FATR – fosfatase ácida tartarato resistente; T₁ – coleta 35 dias em média após a cirurgia; T₂ – coleta 70 dias em média após a cirurgia; r – coeficiente de correlação; p – significância; valores em vermelho – correlação significativa de nível médio.

Nos últimos anos, muitos fatores de crescimento foram identificados, isolados e testados quanto à capacidade de promover aceleração da regeneração óssea, bem como o aumento da quantidade e da qualidade do osso nas áreas reconstruídas com enxerto. Os trabalhos envolvendo fatores de crescimento isolados ou associados no reparo ósseo (ROSS et al., 1986; LYNCH et al., 1991), plasma rico em plaquetas (GARG, 1999) e a cronologia do reparo ósseo (MARX, 1994) fundamentaram as bases para as pesquisas em relação a neoformação óssea.

Um método simples e rápido de se obter uma grande quantidade de fatores de crescimento é através da concentração de plaquetas por centrifugação do

sangue periférico em baixa rotação (MARX, 2001). Várias são as técnicas apresentadas para a obtenção do PRP e diferem basicamente no tempo, velocidade e número de centrifugações (simples ou dupla), volume de sangue coletado (bolsa ou tubo) e no processo de ativação pelo cloreto de cálcio com ou sem trombina bovina (SCARSO FILHO et al., 2001).

Algumas dessas técnicas contribuem para a degranulação rápida das plaquetas, o que inviabiliza todo o processo. Este efeito indesejado ocorre principalmente nas técnicas que utilizam dupla centrifugação (YAZAWA et al., 2003). As plaquetas também são sensíveis às condições de armazenamento e manuseio (SCARSO FILHO et al., 2001).

Pouco se sabe a respeito do número ideal de plaquetas no PRP para acelerar o processo de regeneração óssea. MARDEN et al. (1993) reportaram que o PRP, em certas concentrações, pode inibir a regeneração óssea. WEIBRICH et al. (2004) afirmaram que, tanto o excesso como a falta de plaquetas interfere nos resultados. MARX (2001) utilizou um protocolo de coleta em bolsa e sugeriu que para se obter resultados adequados, o total de plaquetas no PRP deve ser de 5.0×10^9 e CHOI (2004) propôs a realização de mais estudos para determinar adequadamente o efeito dos fatores de crescimento plaquetários na aceleração do processo de formação óssea no enxerto.

É opinião deste autor que a contagem de plaquetas no PRP, muitas vezes não realizada, seja obrigatória em todos os estudos e, se possível, obtida em contador eletrônico.

Neste estudo foi descartada a utilização de trombina bovina para acelerar o processo de coagulação do PRP, devido à possibilidade do desenvolvimento de reações imunológicas nos pacientes. LANDESBURG; MOSES; KARPATKIN (1998) alertaram também sobre o risco de se usar trombina bovina,

sugerindo que este produto pode incentivar a formação de anticorpos para os fatores de coagulação V, XI e trombinas, resultando em coagulopatia adquirida.

MARTINEZ-GONZALES et al. (2002) afirmaram que o PRP não oferece riscos potenciais de infecção ou efeitos indesejados, porém, alertaram que o processo carcinogênico e a via mitogênica são influenciados por fatores de crescimento, inferindo assim, que esses fatores possam vir a ser um coadjuvante a mais na formação de displasias do tecido epitelial, carcinomas orais e invasões tumorais. Por outro lado, MARX (2001) reiterou que o PRP não é carcinogênico nem mutagênico, pois atua somente na membrana e não no núcleo da célula.

Autores como MARX et al. (1998); ANITUA (1999); KIM; PARK; CHOUNG (2001); FENNIS; STOELINGA; JANSEN (2002); ZECHNER (2003); FENNIS; STOELINGA; JANSEN (2004) e OYAMA et al. (2004) em estudos clínicos cujos critérios de avaliação foram a radiografia digital e convencional, a tomografia computadorizada e principalmente a análise histológica e histomorfométrica do tecido ósseo, obtiveram resultados satisfatórios no reparo ósseo com o uso do PRP.

Como os resultados com o PRP ainda não são consensuais na literatura, também há autores que utilizaram as mesmas metodologias e concluíram que, o uso de PRP não promoveu nenhum efeito diferente do reparo fisiológico normal realizado pelo organismo, tanto em quantidade e/ou qualidade e/ou temporalidade (AGHALOO; MOY; FREYMILLER, 2002; JAKSE et al., 2003; FUERST et al., 2003; FUERST et al., 2004; WILTFANG et al., 2004; CHOI et al., 2004; ROLDÁN et al., 2004; SCHLEGEL et al., 2004; AGHALOO; MOY; FREYMILLER 2005).

No presente estudo, os marcadores bioquímicos utilizados para avaliar o processo de formação óssea no pós-enxerto em curto período, não mostraram

diferença estatística entre os grupos com e sem PRP. Portanto, não ficaram evidenciados os efeitos benéficos do PRP nos primeiros 70 dias após o ato cirúrgico.

Proposto na década de 70, os primeiros relatos da utilização do PRP em cirurgia odontológica apareceram após 1995. Como se trata de assunto recente, existem várias questões em aberto referentes ao seu uso, que somadas aos resultados controversos, demonstram a necessidade de mais pesquisas sobre o tema.

5.3. Avaliação radiográfica da área do enxerto

A avaliação radiográfica foi realizada por três examinadores, sendo dois radiologistas e um cirurgião buco-maxilo-facial, que responderam a duas questões: se houve ou não preenchimento da fissura alveolar por osso neoformado e, em caso negativo, se existe ao menos a presença de um trabeculado ósseo organizado em fase inicial de formação na área do enxerto.

A figura 9 é representativa da fissura alveolar antes do procedimento cirúrgico e as figuras 10, 11, 12 e 13 ilustram a presença de trabeculado ósseo organizado com 35 e 70 dias em média após a cirurgia nos grupos sem e com PRP.

Houve unanimidade entre os examinadores sobre a inexistência de preenchimento da fissura por osso neoformado em T_1 e T_2 nos grupos sem e com PRP (não apresentado), o que nos leva a crer que, também pela análise radiográfica, o processo de reparo prossegue dentro do padrão fisiológico normal, independente do uso do PRP.

Com referência ao quesito presença ou não de um trabeculado ósseo organizado em fase inicial de formação na área do enxerto (tabela 8), os resultados

mostraram que não houve concordância aceitável entre os três examinadores em nenhum dos grupos e períodos avaliados ($k < + 0,6$).

TABELA 8 – Teste de concordância interexaminador após avaliação radiográfica sem e com PRP.

EXAMINADOR	SEM PRP T ₁		SEM PRP T ₂		COM PRP T ₁		COM PRP T ₂	
	K	p	K	p	K	p	K	p
Ex1 vs Ex2	-0,057	0,815	0,050	0,005	0,024	0,407	0,411	0,015
Ex1 vs Ex3	0,561	0,001	0,187	0,119	0,016	0,128	0,218	0,080
Ex2 vs Ex3	0,027	0,618	0,285	0,066	-0,059	0,628	0,143	0,157

PRP – plasma rico em plaquetas; Ex1 – examinador 1; Ex2 – examinador 2; Ex3 – examinador 3; T₁ – radiografia 35 dias em média após a cirurgia; T₂ – radiografia 70 dias em média após a cirurgia; K – Kappa; p – probabilidade.

Os resultados do teste intra-examinador realizado 30 dias após a primeira análise, mostraram concordância aceitável para o examinador 1 em T₂ no grupo sem PRP, para o examinador 2 em T₁ e T₂ no grupo com PRP e para o examinador 3 em T₁ e T₂ no grupo sem PRP e T₂ no grupo com PRP (tabela 9).

TABELA 9 – Teste de concordância intra-examinador após avaliação radiográfica sem e com PRP.

EXAMINADOR	SEM PRP T ₁		SEM PRP T ₂		COM PRP T ₁		COM PRP T ₂	
	K	p	K	p	K	p	K	p
Ex1 vs Ex1'	0,058	0,333	0,621	< 0,001	0,310	0,034	0,336	0,042
Ex2 vs Ex2'	0,456	0,011	0,456	0,011	0,750	< 0,001	0,702	< 0,001
Ex3 vs Ex3'	0,655	< 0,001	0,733	< 0,001	0,581	0,001	0,679	< 0,001

PRP – plasma rico em plaquetas; Ex1– examinador 1; Ex2– examinador 2; Ex3 – examinador 3; Ex' – 30 dias após a primeira análise; T₁ – radiografia 35 dias em média após a cirurgia; T₂ – radiografia 70 dias em média após a cirurgia; K – Kappa; p – probabilidade; valores em vermelho – concordância aceitável.

O estudo mostrou que os examinadores, mesmo sendo experientes e orientados sobre os objetivos do trabalho, não atingiram um grau substancial de concordância entre si (teste interexaminador). O mesmo ocorreu no teste intra-examinador em alguns grupos e momentos reavaliados. Isto demonstra que a técnica tem limitações quando se deseja visualizar mudanças tênues no início do processo de regeneração óssea, uma vez que estas mudanças não podem ser diferenciadas radiograficamente daquelas produzidas pelo osso enxertado. Além disso, a subjetividade da interpretação radiográfica não pode ser descartada.

SINDET-PEDERSEN (1990) trabalhando com a reconstrução da fissura alveolar com osso retirado da crista ilíaca e da mandíbula, tendo como indicador o nível de osso marginal obtido através da radiografia oclusal, mostrou que não foi possível observar mudanças significativas entre os grupos, através da avaliação radiográfica, nos primeiros 6 meses após a cirurgia. DeLACURE (1994) revisando a fisiologia do reparo e do enxerto ósseo, afirmou que a radiografia convencional mostra aumento da porosidade do enxerto e margens irregularmente aumentadas somente 6 a 12 meses após o transplante e normalização da densidade óssea após 18 a 24 meses.

As dificuldades inerentes a esta técnica e a contra-indicação do uso de procedimentos invasivos, especificamente para este fim, nos levam a crer que, os marcadores como a FAO por imunoensaio e a OC, bem como outros descritos na literatura, devem continuar a ser explorados, em períodos inferiores aos 35 dias e superiores aos 70 dias deste estudo, para o acompanhamento do reparo ósseo após a realização do enxerto ósseo alveolar.

FIGURA 9 – Imagem radiográfica periapical ilustrativa da fissura alveolar antes do procedimento cirúrgico.

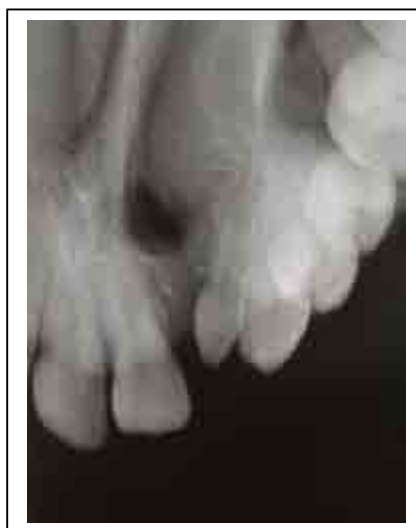
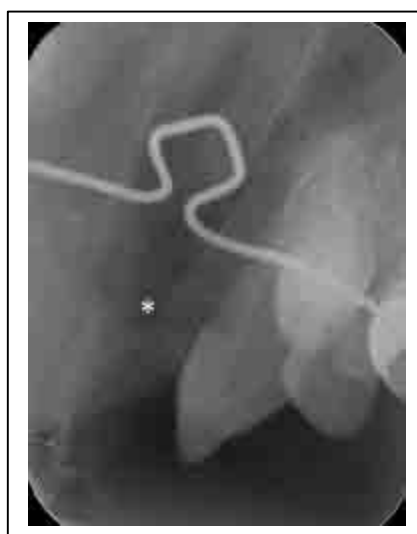
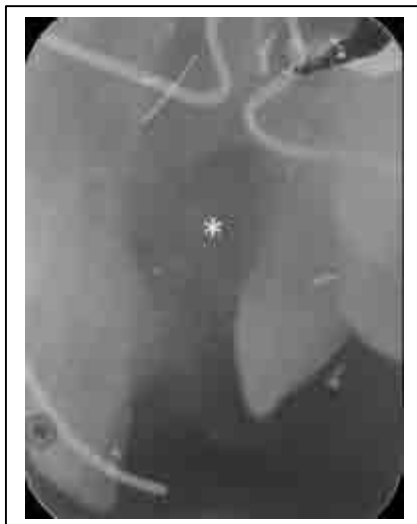


FIGURA 10 – Imagem radiográfica periapical ilustrativa da presença de trabeculado ósseo organizado com 35 dias em média após a cirurgia no grupo com PRP.



* Área do enxerto

FIGURA 11 – Imagem radiográfica periapical ilustrativa da presença de trabeculado ósseo organizado com 70 dias em média após a cirurgia no grupo com PRP.



* Área do enxerto

FIGURA 12 – Imagem radiográfica periapical ilustrativa da presença de trabeculado ósseo organizado com 35 dias em média após a cirurgia no grupo sem PRP.



* Área do enxerto

FIGURA 13 – Imagem radiográfica periapical ilustrativa da presença de trabeculado ósseo organizado com 70 dias em média após a cirurgia no grupo sem PRP.



* Área do enxerto

6. CONCLUSÃO

1. Existe uma tendência de redução dos níveis dos marcadores bioquímicos de formação óssea com 35 dias em média após o ato cirúrgico e retorno próximo aos níveis basais com 70 dias.
2. O efeito do PRP não pode ser demonstrado através dos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo utilizados neste estudo nos primeiros 70 dias após o ato cirúrgico.
3. Não houve correlação significativa entre os níveis dos marcadores de formação e reabsorção óssea com o número de plaquetas ou com a área da fissura.
4. A análise radiográfica foi inconclusiva para avaliar o início do processo de formação óssea na área do enxerto.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÅBYHOLM, F. E.; BERGLAND, O.; SEMB, G. Secondary bone grafting of alveolar clefts: a surgical/orthodontic treatment enabling a non-prosthetic rehabilitation in cleft lip and palate patients. Scand. J. Plast. Reconstr. Surg., Stockholm, v. 15, n. 2, p. 127-140, 1981.

ACOSTA-MARTÍNEZ, N.; CARTER-BARTLETT, P. M. Metabolismo del hueso periodontal. III. Control sistémico del metabolismo de hueso. Rev. ADM, v. 49, n. 4, p. 203-206, jul./ago. 1992.

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 Impl. Res., Copenhagen, v. 16, n. 2, p. 250-257, Apr. 2005.

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

AKESSON, K. Biochemical markers of bone turnover: a review. Acta Orthop. Scand., Kobenhavn, v. 66, n. 4, p. 376-386, Aug. 1995.

AKESSON, K. et al Serum osteocalcin increases during fracture healing in elderly women with hip fracture. Bone, Elmsford, v. 16, n. 4, p. 427-430, Apr. 1995.

AMANAT, N.; LANGDON, J. D. Secondary alveolar bone grafting in clefts of the lip and palate. J. Craniomaxillofac. Surg., New York, v. 19, n. 1, p. 7-14, Jan. 1991.

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

ARGENTE, J.; HEINEGARD, D. What is the clinical significance of biochemical markers of growth and bone metabolism? Acta Paediatr. Suppl., Uppsala, v. 406, p. 99-102, Dec. 1994.

AZRIA, M. The value of biomarkers in detecting alterations in bone metabolism. Calcif. Tissue Int., New York, v. 45, n. 7, p. 7-11, July 1989.

BARBIERI, C. M. O.; COSTA, P. I. Fator de crescimento derivado das plaquetas humanas (PDGF): obtenção e perspectiva de aplicação clínica. In: PONTUAL, M.A.B.; MAGINI, R. S. Plasma rico em plaquetas (PRP) e fatores de crescimento. São Paulo: Livraria Santos, 2004. p. 121-144.

BAROUND, R. Embriologia da face. In: LESSA, S.; CARREIRÃO, S. Tratamento das fissuras lábio-palatinas. 2. ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1981. p. 1-16.

BIKLE, D. D. Biochemical markers in the assessment of bone disease. Am. J. Med., New York, v. 103, n. 5, p. 427-436, Nov. 1997.

BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. Tietz textbook of clinical chemistry. 3. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1999. p. 676-684.

CANALIS, E.; MCCARTHY, T. L.; CENTRELLA, M. Growth factors and cytokines in bone cell metabolism. Annu. Rev. Med., Palo Alto, v. 42, p. 17-24, 1991.

CAPLAN, A. I. The mesengenic process. Clin. Plast. Surg., Philadelphia, v. 21, n. 3, p. 429-435, July 1995.

CARREIRÃO S.; LESSA, S.; ZANINI, S. A. Tratamento das fissuras labiopalatinas. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1996. 344 p.

CARTER-BARTLETT, P. M.; ACOSTA-MARTÍNEZ, N. Metabolismo del hueso periodontal V. Comportamiento óseo en salud o enfermedad periodontal. Rev. ADM, v. 49, n. 6, p. 362-364, nov./dic. 1992.

CARTER-BARTLETT, P. M.; ACOSTA-MARTÍNEZ, N. Metabolismo del hueso periodontal IV. Control local del metabolismo de hueso. Rev. ADM, v. 49, n. 5, p. 283-288, sept./oct. 1992.

CHAGAS, S. A.; OLIVEIRA, S.; BORTOLI JÚNIOR, N. Regeneração tecidual: plasma rico em plaquetas (PRP) e plasma rico em fibrinogênio (PRF). In: PONTUAL, M.A.B.; MAGINI, R. S. Plasma rico em plaquetas (PRP) e fatores de crescimento. São Paulo: Livraria Santos, 2004. p. 147-162.

CHAPMAN, J. F.; WOODARD, L. L.; SILVERMAN, L. M. Alkaline phosphatase isoenzymes. In: PESCE, A. J.; KAPLAN, L. A. Methods in clinical chemistry. St Louis: C.V. Mosby, 1987. p.1081-1087.

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

CHRISTENSON, R. H. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. Clin. Biochem., Toronto, v. 30, n. 8, p. 573-593, Dec. 1997.

COHEN, M. M. Etiology and pathogenesis of orofacial clefting. Oral Maxillofac. Surg. Clin. North Am., Philadelphia, v. 12, n. 3, p. 379-397, 2000.

COLLINS, M.; JAMES, D. R.; MARS, M. Alveolar bone grafting: a review of 115 patients. Eur. J. Orthod., London, v. 20, n. 2, p. 115-120, Apr. 1998.

CRUZ, T. Cálcio, fósforo, vitamina D, paratormônio, calcitonina e doenças osteometabólicas. In: SILVA, P. Farmacologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p. 784-794.

DE BOER, H. H. The history of bone grafts. Clin. Orthop. Relat. Res., Philadelphia, n. 226, p. 292-298, Jan. 1988.

DeLACURE, M. D. Physiology of bone healing and bone grafts. Otolaryngol. Clin. North Am., Philadelphia, v. 27, n. 5, p. 859-874, Oct. 1994.

DELMAS, P. D. Biochemical markers of bone turnover I. Theoretical considerations and clinical use in osteoporosis. Am. J. Med., New York, v. 30, n. 95, p. 11s-16s, Nov. 1993.

DI DIO, R. et al. Osteocalcina. Rev. Assoc. Med. Bras., São Paulo, v. 40, n. 3, p. 225-227, jul./set. 1994.

EBRAHEIM, N. A. et al. Anterior iliac crest bone graft: anatomic considerations. Spine, Philadelphia, v. 22, n. 8, p. 847-849, Apr. 1997.

EMAMI, A. et al Serum bone markers after intramedullary fixed tibial fractures. Clin. Orthop., Philadelphia, n. 368, p. 220-229, Nov. 1999.

ENEMARK, H.; KRANTZ-SIMONSEN E.; SCHRAMM, J. E. Secondary bone grafting in unilateral cleft lip palate patients: indications and treatment procedure. Int. J. Oral Surg., Copenhagen, v. 14, n. 2, p. 2-10, Feb. 1985.

ESPINOSA, J. R.; COMPAÑÓ, J. M. Q. Sobre el uso clínico de los nuevos marcadores bioquímicos del metabolismo óseo. Med. Clin., Barcelona, v. 111, n. 7, p. 259-262, sept. 1998.

FARLEY, J.; BAYLINK, D. J. Skeletal alkaline phosphatase activity in serum. Clin. Chem., New York, v. 41, n. 11, p. 1551-1553, Nov. 1995.

FENNIS, J. P. M.; STOELINGA, P. J. W.; 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., Copenhagen, v. 31, n. 3, p. 281-286, June 2002.

FENNIS, J. P. M.; STOELINGA, P. J. W.; 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., Copenhagen, v. 33, n. 1, p. 48-55, Jan. 2004.

FERNANDES, M. H. Mecanismo de regulação do metabolismo ósseo. Acta Méd. Port., Lisboa, v. 11 n. 1, p. 41-52, jan. 1998.

FREITAS, R. R.; SILVA, A. A. F.; BORBA, M. A mandíbula como área doadora de enxertos em cirurgia buco-maxilo-facial. Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent., São Paulo, v. 54, n. 3, p. 221-225, maio/jun. 2000.

FREITAS, A.; VAROLI, O. J.; TORRES, F.A. Técnicas radiográficas intra e extra bucais. In: FREITAS, A.; ROSA, J. E.; FARIA E SOUZA, I. Radiologia odontológica. 4. ed. São Paulo: Artes Médicas, 1998. p.103-163.

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., Copenhagen, v. 31, n. 9, p. 784-790, Sept. 2004.

FUERST, G. et al. Sinus grafting with autogenous platelet-rich plasma and bovine hydroxyapatite: a histomorphometric study in minipigs. Clin. Oral Implants Res., Copenhagen, v. 14, n. 4, p. 500-508, Aug. 2003.

GARG, A. K. The future role of growth factors in bone grafting. Dent. Implantol. Update, Atlanta, v. 10, n. 1, p. 5-7, Jan. 1999.

GARRIDO, J. C.; AGUAYO, F. J.; MORENO, C. A. Comparison of three bone alkaline phosphatase quantification methods in patients with increased alkaline phosphatase activities. Clin. Chem., Baltimore, v. 38, n. 6, p. 1165-1166, June 1992.

GARNERO, P.; DELMAS P. D. Assessment of the serum levels of bone alkaline phosphatase with a new imunoradiometric assay in patients with metabolic bone disease. J. Clin. Endocrinol. Metab., Philadelphia, v. 77, n. 4, p. 1046-1053, Oct. 1993.

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

GIL, J. N. et al. Reconstrução de fendas alveolares em pacientes fissurados. Rev. Ciênc. Saúde, Florianópolis, v. 14, n. 1/2, p. 118-128, jan./dez. 1995.

GORLIN, R. J.; COHEN, M. M.; LEVIN, L. S. Syndromes of the head and neck. 3. ed. New York: Oxford University Press, 1990. 997 p.

GREEN, R. J. et al. Immunolocalization of platelet-derived growth factor A and B chains and PDGF-alfa and beta receptors in human gingival wounds. J. Periodontol. Res., Copenhagen, v. 32, n. 2, p. 209-214, Feb. 1997.

HALLEEN, J. M. et al. Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b is a specific and sensitive marker of bone resorption. Clin. Chem., Baltimore, v. 47, n. 3, p. 597-600, Mar. 2001.

HAUSCHKA, P. V. et al. Growth factors in bone matrix. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 261, n. 27, p. 12665-12674, Sept. 1986.

HOCK, J. M.; CENTRELLA, M.; CANALIS, E. Insulin-like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. Endocrinology, Springfield, v. 122, n. 1, p. 254-260, Jan. 1988.

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

JIMÉNEZ-DÍAS, M.; MARTINEZ MONGE, V. Marcadores bioquímicos del metabolismo óseo. Rev. Méd. Costa Rica Centroam., San José, v. 66, n. 548, p. 119-126, jul./sept. 1999.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 136-153.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. Histologia e embriologia oral. São Paulo: Panamericana, 1999. p. 39-76.

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

KNIGHTON, D. R. et al. Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages. Science, Washington, v. 221, n. 4617, p. 1283-1285, Sept. 1983.

KORTEBEIN, M. J.; NELSON, C. L.; SADOVE, A. M. Retrospective analysis of 135 secondary alveolar cleft grafts using iliac or calvarial bone. J. Oral Maxillofac. Surg., Philadelphia, v. 49, n. 5, p. 493-498, May 1991.

KURDY, N. M. G. Serology of abnormal fractures healing: the role of PIIINP, PICP, and BsALP. J. Orthop. Trauma, Philadelphia, v. 14, n. 1, p. 48-53, Jan. 2000.

LANDESBURG, R.; MOSES, M.; KARPATKIN, M. Risk of using platelet-rich plasma gel. J. Oral Maxillofac. Surg., Philadelphia, v. 56, n. 9, p. 1116-1117, Sept. 1998.

LEE, M. B. Bone morphogenetic proteins: background and implications for oral reconstruction: a review. J. Clin. Periodontol., Copenhagen, v. 24, n. 6, p. 355-365, June 1997.

LEIVA, B. L. Marcadores bioquímicos del metabolismo óseo. Rev. Méd. Chile, Santiago, v. 124, n. 8, p. 54-60, ago. 1996. Supplement.

LENHARO, A. et al. Plasma rico em plaquetas – PRP. In: PONTUAL, M.A.B.; MAGINI, R. S. Plasma rico em plaquetas (PRP) e fatores de crescimento. São Paulo: Livraria Santos, 2004. p. 165-185.

LEUNG, K. S. Plasma bone-specific alkaline phosphatase as indicator of osteoblastic activity. J. Bone Joint Surg., London, v. 75, n. 2, p. 288-292, May 1993.

LORENZI, T. F. Fisiologia das células do sangue e da hemostasia. In: LORENZI, T. F. et al. Manual de hematologia: propedêutica e clínica. 3. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2003. p. 45-143.

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

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

MALLMIN, H.; LJUNGHALL, S.; LARSSON, K. Biochemical markers of bone metabolism in patients with fracture of the distal forearm. Clin. Orthop. Relat. Res., Philadelphia, n. 295, p. 259-263, Oct. 1993.

MARDEN, L. et al. Platelet-derived growth factor inhibits bone regeneration induced by osteogenin, a bone morphogenic protein, in rat craniotomy defects. J. Clin. Invest., New York, v. 92, n. 6, p. 2897-2905, Dec. 1993.

MARTINEZ-GONZALES, J. M. et al. Do ambulatory-use platelet-rich plasma (PRP) concentrates present risks? Med. Oral, Madrid, v.7, n. 5, p. 375-390, Nov./Dec. 2002.

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

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

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

MOHAN, S.; BAYLINK, D. J. Bone growth factors. Clin. Orthop. Relat. Res., Philadelphia, n. 263, p. 30-48, Feb. 1991.

MOSS, D. W.; WHITBY, L. G. A simplified heart-inactivation method for investigating alkaline phosphatase isoenzymes in serum. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, v. 61, n. 1, p. 63-71, May 1975.

NAKASATO, Y. R. et al. Clinical significance of immunoassays for type-5 tartrate-resistant acid phosphatase. Clin. Chem., Baltimore, v. 45, n. 12, p. 2150-2157, Dec. 1999.

NIJWEIDE, P. J.; BURGER, E. H.; FEYEN, J. H. M. Cells of bone: proliferation, differentiation and hormonal regulation. Physiol. Rev., Bethesda, v. 66, n. 4, p. 855-886, Oct. 1986.

O' CARROLL, D. et al. Chemical inhibition method for alkaline phosphatase isoenzyme in human serum. Am. J. Clin. Pathol., Philadelphia, v. 63, n. 4, p. 564-572, Apr. 1975.

OLIVEIRA, R. C. et al. Efeito da temperatura de desproteinização no preparo de osso cortical bovino microgranular: avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular em subcutâneo de ratos. Rev. Fac. Odontol. Bauru, Bauru, v. 7, n. 3/4 p. 85-93, jul./dez. 1999.

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

PAULIN, G. et al. Intermediate bone grafting of alveolar clefts. J. Craniomaxillofac. Surg., New York, v. 16, n. 1, p. 2-7, Jan. 1988.

PANTEGHINI, M.; PAGANI, F. Reference intervals for two bone-derived enzyme activities in serum: bone isoenzyme of alkaline phosphatase (ALP) and tartrate – resistant acid phosphatase (TR-ACP). Clin. Chem., Baltimore, v. 35, n. 1, p. 180-181, Jan. 1989.

PENTTILA, I. M. et al. Activities of aspartate and alanine aminotransferases and alkaline phosphatase in sera of healthy subjects. Scand. J. Clin. Lab. Invest., Oslo, v. 35, n. 3, p. 275-284, May 1975.

PEPPAS, N. A.; LANGER, R. New challenges in biomaterials. Science, Washington, v. 263, n. 5154, p. 1715-1720, Mar. 1994.

PEREIRA FILHO, V. A. et al. Bases biológicas do tecido ósseo. In: PONTUAL, M.A.B.; MAGINI, R. S. Plasma rico em plaquetas (PRP) e fatores de crescimento. São Paulo: Livraria Santos, 2004. p. 47-69.

RICO, H. et al. Perfil biológico de la fosfatasa ácida tartrato resistente como marcador de la resorción ósea. Rev. Esp. Fisiol., Madrid, v. 46, n. 4, p. 379-384, dec. 1990.

RIGGS, B. L. Overview of osteoporosis. West J. Med., Philadelphia, v. 154, n. 1, p. 63-77, Jan. 1991.

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

ROSS, R.; RAINES, E. W.; BOWEN-POPE, D. F. The biology of platelet derived growth factor. Cell, Cambridge, v. 46, n. 2, p. 155-169, July 1986.

SADOVE, A. M. et al. An evaluation of calvarial and iliac donor sites in alveolar cleft grafting. Cleft Palate J., Baltimore, v. 27, n. 3, p. 225-229, July 1990.

SANTOS, M. D.; SANTOS, M. D. D. O sangue e a medula óssea. In: PONTUAL, M.A.B.; MAGINI, R. S. Plasma rico em plaquetas (PRP) e fatores de crescimento. São Paulo: Livraria Santos, 2004. p. 1-44.

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

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

SEYDEWITZ, H. H. et al. Pediatric reference ranges for osteocalcin measured by the Immulite analyser. Clin. Chem. Lab. Med., Berlin, v. 39, n. 10, p. 980-982, Oct. 2001.

SICCA, C. M. et al. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos: efeito do tamanho da partícula. Rev. Fac. Odontol. Bauru, Bauru, v. 8, n. 1-2, p. 1-10, jan./jun. 2000.

SILVA FILHO, O. G. et al. Classificação das fissuras lábio-palatais: breve histórico, considerações clínicas e sugestão de modificação. Rev. Bras. Cir., Rio de Janeiro, v. 82, n. 2, p. 59-65, mar./abr. 1992.

SILVA FILHO, O. G. et al. Enxerto ósseo alveolar em pacientes fissurados: realidade e perspectiva. Ortodontia, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 34-45, jan./abr. 1995.

SINDET-PEDERSEN, S.; ENEMARK, H. Reconstruction of alveolar clefts with mandibular or iliac crest bone grafts. J. Oral Maxillofac. Surg., Philadelphia, v. 48, n. 6, p. 554-558, June 1990.

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, Copenhagen, v. 15, n. 6, p. 879-882, Nov./Dec. 2000.

SPINA, V. et al. Classificação das fissuras lábio-palatinas: sugestão de modificação. Rev. Hosp. Fac. Med. São Paulo, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 5-6, jan./fev. 1972.

STATLAND, B. E.; NISHI, H. H.; YOUNG, D. S. Serum alkaline phosphatase: total activity and isoenzyme determinations made by use of the centrifugal fast analyser. Clin Chem., Baltimore, v. 18, n. 12, p. 1468-1474, 1972.

TAGA, E. M. Biomateriais para uso em clínica médico-odontológica. BCI, Curitiba, v. 3, n. 1, p. 59-69, jul./ago. 1996.

TAKANO-YAMAMOTO, T.; KAWAKAMI, M.; SAKUDA, M. Defects of the rat premaxilla as a model of alveolar clefts for testing bone-inductive agents. J. Oral Maxillofac. Surg., Philadelphia, v. 51, n. 8, p. 887-891, Aug. 1993.

TONTE, A.; STEVENS, M. Pediatric and geriatric hematology. In: RODAK, B. F. Diagnostic hematology. Philadelphia: W. B. Saunders, 1995. p. 589.

TRIFFITT, J. T. The special proteins of bone tissue. Clin. Sci., London, v. 72, n. 4, p. 399-408, Apr. 1987.

USTÁRIZ, F. et al. Determinación de niveles de fósforo inorgánico y fosfatasa alcalina en jóvenes del Estado Mérida-Venezuela. Rev. Fac. Farm., Merida, v. 34, p. 30-34, 1998.

VAN STRAALLEN, J. P. et al. Bone-alkaline phosphatase as indicator of bone formation. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, v. 201, n.1-2, p. 27-33, Sept. 1991.

VASCONCELOS, L. W. et al. O emprego de cirurgias avançadas na viabilização de implantes. In: VANZILLOTTA, P. S.; SALGADO, L.P.S. Odontologia integrada: atualização multidisciplinar para o clínico e o especialista. Rio de Janeiro: Pedro Primeiro, 1999. p. 23-50.

VELÁZQUEZ, J. et al. Periotioplastías e injertos en el cierre de las fisuras palatinas. Rev. Asoc. Odontol. Argent., Buenos Aires, v. 86, n. 1, p. 37-42, ene./feb. 1998.

VIANNA, U. Histofisiologia do tecido ósseo. Rev. Bras. Clin. Ter., São Paulo, v. 17, n. 10, p. 331-339, out. 1988.

VIEIRA, J. G. H. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. Arg. Bras. Endocrinol. Metab., Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, p. 415-422, dez. 1999.

VIEIRA, J. G. H. O papel dos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo no diagnóstico e seguimento laboratorial das doenças ósteo-metabólicas. Rev. Bras. Clin. Ter., São Paulo, v. 24, n. 2, p. 73-76, mar. 1998.

VIEIRA, S. et al. Fosfatase alcalina óssea em crianças e adolescentes com osteopenia colestática: estudo de dois métodos de determinação da atividade da enzima. Rev. Bras. Anal. Clín., Rio de Janeiro, v. 31, n. 3, p. 105-110, 1999.

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

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., Copenhagen, v. 15, n. 2, p. 187-193, Apr. 2004.

WITHOLD, W. et al. Comparasion between serum levels of bone alkaline phosphatase and the carboxy-terminal propeptide of type I procollagen as markers of bone formation in patients following renal transplantation. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, v. 239, n. 2, p. 143-151, Aug. 1995.

WITSENBURG, B. The reconstruction of anterior residual bone defects in patients with cleft lip, alveolus and palate: a review J. Maxillofac. Surg., New York, v. 13, n. 5, p. 197-208, Oct. 1985.

YAZAWA, M. et al. Basic studies on the clinical applications of platelet-rich plasma. Cell Transplant., Elmsford, v. 12, n. 5, p. 509-518, Nov. 2003.

YOSHIKAWA, T. et al. In vivo osteogenic durability of cultured bone in porous ceramics: a novel method for autogenous bone graft substitution. Transplantation, Baltimore, v. 69, n. 1, p. 128-134, Jan. 2000.

YU-YAHIRO, J. A. et al. Serum and urine markers of bone metabolism during the year after hip fracture. J. Am. Geriat. Soc., Baltimore, v. 49, n. 7, p. 877-883, July 2001.

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, Chicago, v. 18, n. 1, p. 15-22, Jan./Feb. 2003.

ZENI, S. et al. Utilidad clinica de los marcadores de formación y resorción ósea. Acta Bioquim. Clin. Latinoam., La Plata, v. 35, n. 1, p. 3-36, mar. 2001.

8. *ANEXOS*

PROTOCOLO DE TRABALHO

Nº.....

Nome: RG

Data da cirurgia: .../.../.....

Sexo: () M () F

Idade: anos

Área da fissura: mm²Contagem de plaquetas: mm³

PRP: volume: mL Total de plaquetas no PRP:

Classificação da fissura:

Primeira coleta: .../.../..... Radiografia: .../.../.....

FAL:

FAO química:

FAO térmica:

FAO imunoensaio:

FATR:

OC:

Segunda coleta .../.../..... Radiografia: .../.../.....

FAL:

FAO química:

FAO térmica:

FAO imunoensaio:

FATR:

OC:

Radiografia: presença de osso neoformado () sim () não

presença de trabeculado ósseo organizado () sim () não

Terceira coleta .../.../..... Radiografia: .../.../.....

FAL:

FAO química:

FAO térmica:

FAO imunoensaio:

FATR:

OC:

Radiografia: presença de osso neoformado () sim () não

presença de trabeculado ósseo organizado () sim () não



Ofício nº 063/2003-UEP-CEP

Bauru, 30 de maio de 2003.

Prezado(s) Senhor(a)

Comunicamos que em reunião realizada no dia 28 de maio de 2003, pelo Comitê de Ética em Pesquisa, o projeto de pesquisa abaixo de autoria de V.Sª, foi **aprovado**, por este Comitê.

TÍTULO: Comportamento dos marcadores bioquímicos de formação e reabsorção óssea após enxerto realizado em pacientes portadores de fissura lábio-palatal

CURSO: Doutorado

Atenciosamente


PROF. DR. ROBERTO LOUREIRO MARINGONI

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do HRAC-USP

Ilmo(a) Sr(a)

LUIZ HENRIQUE MARCHESANO

Lab. Análises Clínicas – HRAC/USP

rua Silvio Marchione, 3-20 Bauru, SP, Brasil
caixa postal 1501 cep 17.043-900
tel. 55 14 235 6421 fax 55 14 234 7818
e-mail: anag@usp.br



Ofício nº 059/2003-CPq

Bauru, 25 de março de 2003.

Prezado(a) Senhor(a)

A Comissão de Pesquisa comunica que o projeto de pesquisa abaixo referido de autoria de V.Sª, foi **aprovado**, em reunião realizada em 20/03/2003, conforme parecer em anexo.

PARECER TÉCNICO:

- Falta sumário
- Falta cronograma de trabalho e material necessário para a pesquisa.
- **Após correções entregar 2 cópias do projeto (somente das páginas corrigidas) na UEP até o dia 14/04/2003.**

TÍTULO: Comportamento dos marcadores bioquímicos de formação e reabsorção óssea após enxerto realizado em pacientes portadores de fissura lábio-palatal

CURSO: Doutorado

Atenciosamente


Ana Gomes Grigolli
Bibliotecária Responsável

Ilmo(a) Sr(a)

LUIZ HENRIQUE MARCHESANO

Lab. de Análises Clínicas - HRAC/USP

rua Sílvio Marchioni, 3-20 Bauru - SP, Brasil
caixa postal 1501 cep 17.043-900
tel. 51 14 235 8421 fax: 55 14 234 7818
e-mail: anag@usp.br

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS
FORMULÁRIO PARA APRECIACÃO DE PROJETO DE PESQUISA

Aluno: LUIS HENRIQUE MARCHESANO

Orientador: Prof. Dr. Iguatemi Lourenço Brunetti

Título do Projeto: Comportamento de marcadores séricos bioquímicos de formação e reabsorção óssea após enxerto em pacientes portadores de fissura lábio-palatal.

Curso: Mestrado

Doutorado (X)

1. Avaliação geral do projeto:

O projeto encontra-se bem elaborado, com tema de amplo interesse.

2. Adequação do projeto ao curso de mestrado/doutorado em Análises Clínicas:

O projeto é adequado ao curso uma vez que envolve metodologia pertinente e atual relacionada ao curso de pós-graduação.

3. Viabilidade de execução:

O projeto é viável, sendo necessária a inclusão de um cronograma, apresentação em Comitê de Ética em Pesquisa, além de planejamento quanto ao agendamento dos pacientes no HRAC – USP para verificação do tempo necessário para realização da parte experimental.

4. Avaliação da metodologia e do cronograma proposto:

A metodologia está bem elaborada, sendo necessária a descrição detalhada de algumas fases laboratoriais envolvendo os marcadores bioquímicos. Ainda, não está colocado o cronograma de execução e os prazos estabelecidos.

5. Conclusão:

Aprovado (X)

Reformular ()

Ficha Catalográfica

Elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

M316c

Marchesano, Luiz Henrique

Comportamento de marcadores séricos de formação e reabsorção óssea após enxerto autógeno em fissura alveolar congênita: sem e com plasma rico em plaquetas/Luiz Henrique Marchesano. -- Araraquara, 2005.

120 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas.

Orientador: Iguatemy Lourenço Brunetti

1. Ossos – Enxerto. 2. Exerto ósseo alveolar. 3. Plasma sangüíneo. 4. Plaquetas (Sangue). 5. Fosfatase alcalina óssea. 6. Osteocalcina. 7. Fosfatase ácida. I. Brunetti, Iguatemy Lourenço, orient. II. Título.

CDD: 612.116

CAPES: 40300005