UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

Ricardo Vieira Garcia

Utilização de plasma rico em plaquetas (PRP) associado a implantes intra-ósseos em mandíbula de cães. Análise histológica

ARARAQUARA
2005

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

Ricardo Vieira Garcia

Utilização de plasma rico em plaquetas (PRP) associado a implantes intra-ósseos em mandíbula de cães. Análise histológica

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia – área de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista - UNESP, para obtenção do Título de Doutor.

Orientadora: Profª Drª Marisa Aparecida Cabrini Gabrielli

ARARAQUARA
2005

Garcia, Ricardo Vieira
Utilização de plasma rico em plaquetas (PRP) associado a implantes intra-ósseos em mandíbula de cães. Análise histológica / Ricardo Vieira Garcia. – Araraquara : [s.n.], 2005.
94 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,

Faculdade de Odontologia.

Orientador: Profa. Dra. Marisa Aparecida Cabrini Gabrielli

1. Plasma 2. Plaquetas 3. Osseointegração 4. Implante dentário 5. Cães I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley Cristina Chiusoli Montagnoli CRB 8/5646
Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

Utilização de plasma rico em plaquetas (PRP) associado a implantes intra-ósseos em mandíbula de cães. Análise histológica

RICARDO VIEIRA GARCIA

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARISA APARECIDA CABRINI GABRIELLI (orientadora)
Prof. Dr. BENEDICTO EGBERT CORRÊA DE TOLEDO (UNESP – Araraquara)
Prof. Dr. EDUARDO HOCHULI VIEIRA (UNESP – Araraquara)
Prof. Dr. FLAVIO FAVA DE MORAES (USP – São Paulo)
Prof. Dr. MÁRCIO DE MORAES (UNICAMP – Piracicaba)

Conceito: **APROVADO**
Araraquara, 23 de fevereiro de 2005

DADOS CURRICULARES

Ricardo Vieira Garcia

Nascimento:

25 de janeiro de 1963, em São Paulo / SP

Filiação:

Paulo Fernandes Garcia e Dalva Vieira Garcia

Graduação: 1982 –1985

Instituto de Odontologia Paulista - Universidade Paulista - UNIP

Especialização em Odontopediatria: 1990-1991

Universidade de São Paulo - USP

Especialização em Periodontia: 1995-1996

Universidade Estadual Paulista - UNESP / Araraquara

Professor Assistente I: 1990-1992; 1995-1996

Odontopediatria no Instituto de Ciências e Saúde da Universidade Paulista - UNIP

Departamento de Odontologia Restauradora – UFBA

Professor Convidado: 1997-1999

Programa de Saúde Bucal – UFBA

Mestrado em Odontologia: 1999-2000

Área de Periodontia – Universidade Federal da Bahia – UFBA

Doutorado em Odontologia: 2002-2005

Área de Periodontia – Universidade Estadual Paulista – UNESP / Araraquara

A plena dedicatória,

A Deus,
o incomparável professor.

Aos meus queridos Pais,

Dalva Vieira Garcia e Paulo Fernandes Garcia (in memorian), que sempre proporcionaram luz na estrada da minha vida. E hoje, mais curtido pelo tempo, posso ver as lições que foram transmitidas com tanto amor, paciência, determinação, sabedoria, coragem, inteligência, bom senso, elegância, habilidade, competência e respeito.

Às irmãs Célia Maria Vieira Garcia, Maria Cecília Vieira Garcia e Léia Maria Vieira Garcia pela constante atenção, apego, carinho, amor, amizade, respeito, dedicação, ajuda em todos os momentos.

Aos irmãos Paulo Fernandes Garcia Filho e Eduardo Vieira Garcia pelos exemplos de seriedade, respeito, competência, austeridade, justiça, alegria, vida e amor.

Às minhas cunhadas e cunhados, Vera Lucia Neto Pinto, Márcia dos Santos Saraiva, Moises Carneiro da Cunha Junior e Dirceu Paes de Almeida pela amizade, compreensão, respeito, convívio e alegria.

Aos meus sobrinhos Paulo Fernandes Garcia Neto, Leonardo Saraiva Garcia e Pedro Garcia Carneiro da Cunha pelo grande amor, respeito, carinho, energia e amizade.

A minha companheira, namorada, Lia Maria Conceição Queiroz Andrade pelos momentos de sabedoria para conseguirmos superar a distância, pelo apoio amor e carinho.

A família Costa Vieira de Salvador, representada por Isabel, Marcela, Isabela e Jovino, pelo constante apoio, amizade, carinho e companheirismo.

A Sra. Gretel Helene Rapp pela amizade, atenção, apoio e estímulo.

Agradecimentos

A minha Orientadora,

Profa. Dra. Marisa Aparecida Cabrini Gabrielli

Profissional seria e competente, que nunca mediu esforços para dar atenção aos seus orientandos de forma plena e consistente. Aos nossos olhos seu dia parecia apresentar bem mais que vinte e quatro horas, pois conseguia conciliar orientação de pesquisa, sua vida profissional de professora e cirurgia buco-maxilo facial e sua vida pessoal.

Sua orientação foi pautada pela sobriedade, profissionalismo, ponderação, estímulo e amizade.

Sua dedicação e amor à pesquisa foram comprovados no acompanhamento de todos os procedimentos clínicos realizados no Hospital Veterinário de Jaboticabal, em jornadas realizadas com extremo profissionalismo e competência.

Além disso, sempre possibilitou a troca de informações e pontos de vistas, para que a pesquisa tivesse um delineamento adequado e produtivo.

Esteve sempre ao nosso lado para captação de recursos para desenvolvimento de novas pesquisas e manutenção da motivação nos momentos mais difíceis.

Pela sua forma cortês e educada, pelo respeito e admiração profissional, pela facilidade e agilidade na resolução dos problemas, pela promoção de conhecimento científico e pela amizade;

Meu muito obrigado.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, na pessoa de sua Diretora Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio e Vice-Diretor José Cláudio Martins Segalla, e ao ex-Diretor Prof. Dr. Ricardo Samih Georges Abi Rached e ex-Vice Diretor Prof. Dr. Roberto Miranda Esberard, por permitir o desenvolvimento desta pesquisa nesta instituição.

Ao curso de Pós-Graduação em Periodontia, na pessoa de seu coordenador Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli e ex-coordenadora Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio, pela seriedade e responsabilidade na condução do programa e pelo apoio e viabilização de recursos para realização da parte prática deste trabalho.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Periodontia, pela dedicação e a promoção da científicidade junto a seus alunos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo fomento da pesquisa no país, concedendo bolsa durante o curso.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, na pessoa do Supervisor do Hospital Veterinário Prof. Dr. Luiz Carvalho por permitir a realização da parte experimental deste trabalho em suas instalações.

Ao Prof. Dr. João Guilherme Padilha Filho pelo apoio na realização desta pesquisa.

Aos Pós-Graduandos Francisco de Assis Dórea Neto e Arianne Pontes Oriá pelo apoio e acompanhamento dos animais no pré, trans e pós-operatório durante o desenvolvimento de toda a pesquisa.

A Titanium Fix – A. S. Technology Componentes Especiais Ltda. Em especial ao seu Presidente Sidival Dias pela doação dos implantes dentários utilizados neste estudo.

Ao Prof. Dr. Eduardo Hochuli Vieira, pelo apoio, amizade e consultoria científica em todos os momentos em que foi solicitado.

Ao Prof. Dr. Luis Carlos Spolidório, pelo apoio, consultoria científica, exame histológico e principalmente pelos momentos de cientificidade.

Ao Prof. Dr. Mario Francisco Real Gabrielli, pelo apoio, consultoria científica e ajuda nos momentos em que foi solicitado.

A Profa. Dra. Gisela Estela Rapp, pelo apoio, estímulo, amizade e cientificidade.

A Profa. Elza Regina Manzolli Leite, pela disponibilização da centrífuga para preparação do plasma rico em plaquetas.

A Técnica de Análises Clínicas: Ana Claudia Gregolin Costa Miranda, que preparou as lâminas histológicas das peças obtidas no experimento clínico de forma gentil, atenciosa e profissional.

Ao Técnico de laboratório, Jose Antonio Sampaio Zuanon, pela obtenção das fotos digitais dos cortes histológicos.

A bibliotecária Maria Helena Matsumoto Komasti Leves e demais funcionários do setor pela gentileza e atenção na revisão deste trabalho.

Aos profissionais da biblioteca da Faculdade de Odontologia da USP em especial na figura da bibliotecária Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, que nos

possibilitou o acesso a artigos científicos e ao acervo de sua instituição de uma forma adequada e profissional sempre com muita atenção.

As funcionárias que trabalham na disciplina de Periodontia da faculdade de Odontologia de Araraquara: Ana Claudia Gregolin Costa Miranda, Maria do Rosário Bento Clemente, Maria José da Silva Miquelon, Maria Teresinha Galli, Regina Lucia da Silva, que de uma forma ou de outra puderam nos ajudar a superar as dificuldades do cotidiano, pela amizade, pela maneira respeitosa e todo carinho dispensado.

Ao apoio disponibilizado em Jaboticabal pela família Vieira, pelo Prof. Dr. Paulo de Figueiredo Vieira, Sra. Elina Hochuli Vieira e Leonardo Hochuli Vieira, pela sincera amizade.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara: Mara Cândida Munhoz do Amaral, Rosangela Aparecida Silva dos Santos, Sylvia Regina de Oliveira Rodrigues, Vera Lucia Perruci Roque, por estarem sempre dispostos a solucionar os problemas dos pós-, pela amizade, carinho, profissionalismo e competência.

Aos residentes do Serviço de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia de Araraquara: que de forma direta ou indireta auxiliaram na parte clínica experimental sempre com muita dedicação e profissionalismo.

Aos colegas da Pós-Graduação que tivemos oportunidade de conviver no cotidiano profissional da universidade durante os três anos do curso: Aurora Esmeralda Martinez, Celso Eduardo Sakakura, Cliciane Portela Sousa, Cristiane Aparecida de Oliveira, José Marcos A. Fernandes, Karina Gonzáles Silvério, Luiz Henrique Carvalho Batista, Marinella Holzhausen, Rodrigo Otávio Citó Rego, Rogério Margonar, Teresinha Costa de Santana.

Aos colegas das outras turmas da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara pela convivência profissional e amizade.

As amigas e amigos da Pós-Graduação: Andréa Marcia Marcaccini, Ana Emilia Farias Pontes, Beatriz Maria Valério Lopes, Juliana Rico Pires, Eduardo de Paula Ishi, Fernando Salimon Ribeiro, pela amizada, pelo convívio alegre, pelos momentos de ócio produtivo, pelas discussões científicas, pelas superações profissionais e pelo respeito profissional.

Aos amigos e colegas: Francisco Carlos Lorusso, Maria Ligia Juliano, Marcelo Fava de Moraes, Ricardo Gouveia Badra, que se mantiveram solidários e sempre nos estimularam no transcorrer do curso.

Aos animais (cães) que fizeram parte dessa pesquisa, sem os quais seria impossível a aplicação da metodologia experimental desse e de outros estudos.

A todos aqueles, que direta ou indiretamente, apoiaram, ajudaram e contribuíram para a realização desta pesquisa.

Tocando em frente

Ando devagar porque já tive pressa
e levo esse sorriso, porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe
eu só levo a certeza de que muito pouco eu sei, eu nada sei

Conhecer as manhãs e as manhas,
o sabor das massas e das maçãs,
é preciso o amor pra poder pulsar,
é preciso paz pra poder sorrir,
é preciso a chuva para florir.

Penso que cumprir a vida seja simplesmente
compreender a marcha, e ir tocando em frente
como um velho boiadeiro levando a boiada,
eu vou tocando os dias pela longa estrada eu vou, de estrada eu sou

Todo mundo ama, um dia todo mundo chora,
Um dia a gente chora, no outro vai embora
Cada um de nós compõe a sua história,
e cada ser em si, carrega o dom de ser capaz, e ser feliz

Ando devagar porque já tive pressa
e levo esse sorriso porque já chorei demais
Cada um de nós compõe a sua história,
e cada ser em si, carrega o dom de ser capaz, e ser feliz

Sater, A

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO 18

2 – REVISÃO da LITERATURA 21

3 – PROPOSIÇÃO 45

4 – MATERIAL e MÉTODO 46

4.1 – Animais para experimentação.....46

4.2 – Grupos experimentais.....46

4.3 – Procedimentos anestésicos 47

4.4 – Procedimentos cirúrgicos.....49

4.4.1 – Exodontias 49

4.4.2 – Instalação de implantes associados ou não ao (PRP) 51

4.4.3 – Obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP) 54

4.4.4 – Obtenção dos espécimes para análise histológica 56

5 – RESULTADO.....60

6 – DISCUSSÃO 69

7 – CONCLUSÃO 80

8 – REFERÊNCIAS 81

9 – ANEXOS 91

10 – RESUMO.....93

11 – ABSTRACT.....94

Lista de Abreviaturas

μL – microlitros

μg – micrograma

BMP - proteínas ósseas morfogenéticas

CD 40 L – cluster of diferenciation 40 L / grupo de diferenciação 40 L

5 HT – 5 hidroxi-triptamina

DFDBA – demineralized freeze-dried bone allograft / enxerto ósseo liofilizado desmineralizado congelado

DNA – ácido desoxirribonucléico

EDTA – ácido etileno diamino tetra acético

EGF – epidermal growth factor / fator de crescimento epidermal

ePTFE – politetrafluoretileno expandido

FDA – Food and Drug Administration

FDBA – freeze-dried bone allograft / enxerto ósseo liofilizado congelado

G – gravidade

IGF-I – insulin-like growth factor I / fator de crescimento semelhante à insulina I

IGF-II - insulin-like growth factor II / fator de crescimento semelhante à insulina II

ml – milílitro

mm – milímetros

ng - nanograma

PCCS – platelet concentrate collection system / sistema de coleção de plaquetas concentradas

PDGF – platelet-derived growth factor / fator de crescimento derivado de plaquetas

PPP – plasma pobre em plaquetas

PRFC – plasma rico em fatores de crescimento

PRP – plasma rico em plaquetas

rhPDGF-BB – recombinante humano do fator de crescimento derivado de plaqueta

rpm – rotações por minuto

TGF-β - transforming growth factor β / fator de crescimento de transformação β

TP – tempo de protrombina

TTPA – tempo de tromboplastina parcial de ativação

VEGF – vascular endothelial growth factor / fator de crescimento do endotélio vascular

1 Introdução

Diante de seguidos desafios na obtenção de reparação óssea, a comunidade científica busca respostas em pesquisas relevantes, no sentido de conseguir a formação de tecido ósseo bem estruturado, para promover estabilidade das estruturas bucais e conseqüentemente desempenhar suas funções. No caso de implantes osseointegráveis deve-se levar em conta que o sítio neoformado deverá suportar cargas de tensão e cisalhamento e não apenas compressão, quando submetidos às forças da mastigação.

Há muitos anos, observa-se a preocupação de autores no sentido de promover adequada formação tecidual em áreas ósseas que devam ser reconstituídas. Um exemplo é o trabalho de Axhausen, 1956, que avaliou histologicamente a reparação óssea em animais e Partiff, 1962, que estudou as variações do trabeculado do osso alveolar normal.

O tecido ósseo apresenta-se em um processo contínuo de remodelação, do qual depende sua reparação frente às injurias e alterações da normalidade. Este processo ocorre com a participação de várias substâncias endógenas, como paratormônio, a vitamina A e a calcitonina. O hormônio da paratireóide tem ação sobre cálcio e fósforo e na regulação de fatores de crescimento que atuam diretamente em osteoclastos e osteoblastos (McCAULEY e SOMERMAN, 1998).

Atualmente, inúmeros estudos deixaram de enfocar os aspectos morfológicos da reparação tecidual, passando a enfatizar a pesquisa dos fatores humorais que possam influenciar a cronologia e a intensidade do processo de reparação. Esses estudos

destacaram, entre outros fatores, a ação das plaquetas ou trombócitos. As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos dos megacariócitos, anucleados, discóides, de dois a cinco micrômetros de diâmetro, com citoplasma complexo e limites externos irregulares ou disformes, com presença de mucopolissacarídeos, glicoproteinas e fosfolipídeos e que apresentam um período de vida no sangue de sete a dez dias (HARKER e FINCH, 1969).

No mecanismo trombodinâmico da coagulação as plaquetas participam ativamente, emitindo pseudópodos que proporcionam a adesividade interplaquetária e conseqüente formação do trombo plaquetário. Com a formação do coágulo propriamente dito, desenvolve-se uma rede de fibrina que proporciona um receptáculo favorável para a migração celular no processo de reparação tecidual (RUGGERI, 1997). As plaquetas, entretanto, também atuam por meio da liberação de mediadores químicos que participam do processo inflamatório e da reparação tecidual.

O estudo de Gray e Elves, 1982 propiciou um avanço muito grande no que diz respeito à aplicação de fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF), quando apresentaram em seus resultados que o PDGF contribuía para a angiogênese necessária ao sucesso dos enxertos ósseos. Hoje em dia, sabe-se que os fatores de crescimento no processo de reparação tecidual exercem papel fundamental e efetivo na proliferação celular, angiogênese, diferenciação e síntese de matriz extracelular, bem como na quimiotaxia (AAP, 1996).

Mais recentemente, trabalhos com fatores de crescimento (ROSS et al., 1986; LYNCH et al., 1991), inclusive com plasma rico em plaquetas (GARG, 1999), fundamentaram bases para novas pesquisas em relação à neoformação tecidual, maturação óssea e inclusive cronologia de reparo ósseo (MARX et al., 1998).

Após a euforia inicial com à utilização do plasma rico em plaquetas para favorecer a neoformação óssea, quando associado ou não ao enxerto ósseo, resultados controversos subseqüentes sugerem a necessidade de mais pesquisas experimentais sobre o tema. Assim, julgamos oportuno avaliar o efeito do plasma rico em plaquetas, quando utilizado em áreas preparadas para instalação de implantes dentários osseointegráveis.

2 Revisão da literatura

Healy e Egan em 1984, em estudo clínico após avaliação de 21 pacientes, sendo 12 utilizados como teste e 9 como controle, realizaram uma coleta de sangue venoso, padronizada matinalmente (às oito horas e trinta minutos), por um período de 30 minutos em cada paciente. Avaliaram a ação do citrato na concentração de uma parte de citrato trisódico a 3,8% para nove partes de sangue e o outro anticoagulante foi o EDTA em concentração de 1,5 mg/mL de sangue. A centrifugação foi realizada a 50g, 100g ou 150g por 10 minutos em temperatura de 20°C. Para revelar a adesividade do PRP foi utilizado o agente receptor 5 hidroxi-triptamina (5 HT). Os autores obtiveram melhores resultados com o uso de EDTA, refletindo a maior habilidade para inibir o aglomerado de plaquetas. Chegaram a conclusão que o método de centrifugação e o tipo do anticoagulante utilizado promoviam diferentes resultados no PRP obtido, inclusive proporcionando variações no número, tamanho e reatividade das plaquetas.

Lynch et al. (1987) realizaram estudo experimental controlado em porcos Yorkshire, para avaliar o efeito sinérgico do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) com outros fatores de crescimento na reparação tecidual em excisões de tecido mole. Na região dorsal dos animais foram realizadas excisões de 10 x 20 x 0,5 mm da epiderme e parcialmente da derme. Os animais foram divididos em grupos: 1 - controle (apenas gel de albumina porcina ou metil celulose), 2 - PDGF, 3 - PDFG + EGF, 4 - PDFG + IGF-I. O PDGF foi aplicado em única vez nas concentrações de 25 nanogramas (ng), 250 ng, 500 ng e 1,0 micrograma (μg) dispersos em 20 μL de cloreto de sódio 0,5 M; albumina porcina a 1% ou 30 μL de metilcelulose biocompatível. A

adição de PDGF puro na área cirúrgica teve pouco efeito na morfologia ou bioquímica da reparação da epiderme e derme. Adição de PDGF parcialmente purificado resultou em significativo aumento na taxa de síntese de proteína e de DNA. Efeito similar foi obtido quando o fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I) foi adicionado em combinação com PDGF puro. Esta combinação de fatores causou um aumento de 2,4 vezes na largura da nova camada de tecido conjuntivo formado e 95% na espessura epidérmica quando comparado com o controle. Concluíram que a ação sinérgica de outros fatores com o PDGF são importantes na modulação do processo de reparação dos tecidos moles.

Lynch et al. em 1989 avaliaram, por meio de estudo experimental em três cães, a ação sinérgica da associação do PDGF e do fator de crescimento semelhante à insulina – I (IGF -I), na concentração de 1,0 μg em solução aquosa gel para regeneração periodontal. Previamente, os cães receberam tratamento periodontal com instrumentos sônicos para controle de tártaro e do biofilme. Utilizaram em cinco dentes o gel combinado e em sete dentes gel placebo. Foram tomadas radiografias iniciais e realizada a elevação de retalho muco-periostal para aplicação dos respectivos géis. Após duas semanas, as regiões foram submetidas a biópsia e posteriormente a avaliação histológica. Obtiveram resultados melhores na regeneração periodontal dos dentes tratados com o gel da associação dos fatores de crescimento em comparação ao grupo controle.

Lynch et al. (1991) avaliaram, em estudo experimental em mandíbulas de cães, a reparação óssea inicial ao redor de implantes de titânio inseridos por pressão, com e sem aplicação de PDGF e IGF-I combinados. Como controle foram utilizados oito cães

que receberam gel sem a combinação dos fatores de crescimento e para o grupo teste quatro cães receberam a aplicação combinada. Os cães foram sacrificados após sete e 21 dias. Ao sétimo dia encontraram que tanto a porcentagem de osso preenchendo o espaço peri-implantar, quanto a porcentagem de osso neoformado que estava em contato com a superfície do implante, foram significativas no grupo tratado com PDGF-B/IGF-I. No período de 21 dias a porcentagem de osso preenchendo o espaço peri-implantar foi significativamente maior nos casos tratados com PDGF-B/IGF I, mas não foi detectada diferença significante para este tempo de pós-operatório em porcentagem dos orifícios dos implantes preenchidos com osso neoformado nem em porcentagem da superfície do implante em contato com osso neoformado. Os autores concluem que a utilização de fatores de crescimento ao redor de implantes instalados por pressão podem estimular a neoformação óssea.

Becker et al. (1992) realizaram um estudo experimental em cães para avaliar a regeneração óssea guiada ao redor de implantes. Para tal, realizaram os seguintes grupos: 1 - membrana ePTFE isolada, 2 - membrana ePTFE em combinação com osso liofilizado desmineralizado (DFDB), 3 - membrana ePTFE com PDGF associado a IGF-I. Na face vestibular foram padronizados defeitos ósseos criticos (5,0 mm ou mais) e recobertos com as membranas. Decorridas dezoito semanas os animais foram sacrificados e realizadas análises histológica e histométrica. Clinicamente, observou-se aumento do nível ósseo em dois grupos, grupo tratado somente com a membrana ($p<0.005$) e grupo tratado com membrana + PDGF/IGF-I ($p<0.01$). No grupo membrana com DFDB, clinicamente, não se observou aumento do nível ósseo. Os resultados histométricos com ePTFE+PDGF/IGF-I, comparados com defeitos que foram tratados apenas com membrana de ePTFE ($p<0.05$), apresentaram maior formação óssea em

espessura e altura no defeito ósseo critico criado. Os resultados do grupo tratado com membrana e DFDB foram variáveis mas não superaram os outros grupos. Os autores concluíram que com os resultados deste estudo o uso de membrana de ePTFE sozinha ou com PDGF/IGF-I podem proporcionar melhora na formação óssea ao redor de implantes dentários.

Cmolik et al. (1993) fizeram acompanhamento longitudinal de trinta e dois meses em nove pacientes cardiopatas com coagulopatias adquiridas pelo uso de trombina bovina, que induziu deficiência do fator V. Os exames pré-operatórios de tempo de protrombina (TP) e tempo de ativação parcial da tromboplastina (TTPA) apresentavam-se normais, e a coagulopatia desenvolveu-se uma a duas semanas após a cirurgia cardiovascular. A coagulopatia era caracterizada pelo elevado tempo de protrombina e tromboplastina parcial ativada. Os pacientes apresentavam um nível baixo de fator V e fator XI. Todos pacientes tinham sido expostos à trombina bovina disponível comercialmente durante cirurgia vascular ou cardiovascular prévia, com intervalo variando de um a onze anos. Tiveram um segundo contato com a trombina bovina durante o último procedimento. Desde o reconhecimento destes casos de deficiência do nível do fator V adquirido, o processo para o uso de trombina bovina passou a ser mais cuidadoso e seletivo.

Wang et al. (1994), em estudo experimental em cães estudaram o efeito do PDGF na resposta celular do periodonto por meio de imagens projetadas de radiografias, denominadas autorradiografia, de amostras descalcificadas com expessura de 5 μm e análise histológica. Um defeito padronizado com 4x4 mm foi obtido na dentina no meio da face vestibular das raízes de quatro dentes posteriores

mandibulares P2, P3, P4, M1 de cada quadrante. Cada raiz foi usada como local para uma das quatro modalidades de tratamento: água estéril, membrana de politetrafluoretileno expandido (ePTFE) isolada, PDGF e PDGF com ePTFE. Uma hora antes do sacrifício de cada animal, foi administrada H-timidina, sendo os animais sacrificados após um, três, e sete dias de pós-operatório. Os autores concluíram que diferenças estatisticamente significativas foram observadas no primeiro e terceiro dia quando PDGF e PDGF + ePTFE foram comparados com água estéril e o grupo ePTFE. Nenhuma diferença significativa foi observada em fibroblastos marcados entre os grupos água estéril e ePTFE em qualquer período. Estes achados sugeriram que o PDGF intensificou a proliferação fibroblástica precocemente na reparação de feridas periodontais, tanto utilizado sozinho como em combinação com membrana de ePTFE.

Vikjaer et al. (1997) em estudo experimental em calvária de coelhos estudaram o efeito do PDGF recombinante humano BB (rhPDGF-BB) na reparação óssea. Os defeitos de tamanho crítico de forma circular foram preparados no osso da calota craniana de 16 coelhos. Os defeitos foram fechados no lado dural e cobertos externamente com membrana ePTFE e, para manter os fatores de crescimento no local, uma dose de gel de metilcelulose a 4,4% com ou sem rhPDGF-BB (50µL/mL) foi aplicado no defeito. A formação óssea foi avaliada após oito semanas. A reparação do defeito em ambos os grupos foi caracterizada pela presença de osso neoformado ao longo do limite do defeito original e por área central de tecido conjuntivo. O osso neoformado com rhPDGF-BB tinha uma estrutura trabecular definida, diferindo da estrutura mais compacta achada no defeito controle. No defeito tratado com rhPDGF-BB, o crescimento ósseo foi de 51,8%, comparado com 30,5% no defeito controle. Além disso, a quantidade de tecido mineralizado e osso medular foi 112 % e 75% maior,

respectivamente, para o grupo rhPDGF-BB. A porosidade da lamela cortical no osso neoformado foi de 84% maior no defeito tratado com rhPDGF-BB comparado com o controle. Estes resultados mostraram que administração de dose simples de rhPDGF-BB estimula neoformação óssea em defeitos de calvária de tamanho crítico.

Whitman et al*.* (1997) descreveram o gel de plaquetas como um selante biológico, derivado da coleta de sangue autógeno imediatamente no período pré-operatório, contendo alta concentração de plaquetas. Destacam ainda sua aplicação clínica em cirurgia maxilo-facial, reconstrução mandibular e procedimentos relacionados à colocação de implantes osseointegráveis onde obtém bons resultados quando associado à enxerto ósseo autógeno. Também descreve utilização com aparente sucesso em uma variedade de aplicações em outras áreas como a neurocirurgia, otorrinolaringologia, cirurgia geral e cirurgia da cabeça e pescoço.

Landesberg et al. em 1998, alertaram a comunidade científica para o risco de usar trombina bovina no preparo de PRP. Segundo os autores esse composto poderia estimular a formação de anticorpos para os fatores V e XI e trombinas resultando em risco importante ao paciente e propiciando desenvolvimento de coagulopatias.

Marx et al. (1998), realizaram estudo clínico em oitenta e oito pacientes submetidos à reconstrução de defeitos mandibulares de 5,0 cm ou maiores, oriundos de tumores malignos sem radioterapia. Utilizaram o plasma rico em plaquetas como uma fonte autógena de PDGF e TGF-β, obtido por centrifugação do sangue venoso**,** coletado do paciente em uma bolsa (450 ml) com citrato-fosfato-dextrose. O sangue então seria centrifugado (Medtronic Eletromedic Elmd – 500 sistema autotransfusão) a 5400 rpm para separar o plasma pobre em plaquetas (PPP) dos eritrócitos e *buffy coat* (plaquetas

e leucócitos). Posteriormente a velocidade de centrifugação foi diminuída para 2400 rpm, para permitir a separação do *buffy coat* suspenso em 30 ml de plasma das células vermelhas. Esta fração do *buffy coat* / plasma é o PRP usado em forma de gel de plaquetas. Para a confecção do gel associou-se trombina bovina (10.000 unidades) e 10,0 ml de cloreto de cálcio, sendo que em cinco a trinta segundos o conteúdo assume a consistência de gel. Segundo os autores, a adição de plasma rico em plaqueta (PRP) em enxertos autógenos evidenciou uma taxa de maturação óssea com avaliação radiográfica panorâmica de 1,62 a 2,16 vezes maior do que o enxerto sem PRP. Na avaliação histomorfométrica em biópsias ósseas obtidas na instalação de implantes dentários nas áreas reconstruidas, houve também grande densidade óssea dos enxertos no qual o PRP foi acrescentado (74,0 % $\pm$ 11), em comparação aos enxertos que o PRP não foi utilizado (55.1% $\pm$ 8%; p=0.005), sendo que o osso mandibular original apresentou menor densidade (38.9% $\pm$ 6%).

Anitua (1999), em estudo clínico controlado em humanos, utilizou plasma rico em fatores de crescimento (PRFC) em dez pacientes no grupo teste e dez no grupo controle, com indicação de extrações dentárias. O sangue coletado foi distribuído em tubos de ensaio de 5,0 ml cada, contendo solução de citrato trisódio a 10%, centrifugados a 160 G por seis minutos, de forma a obter frações separadas. A coleta do plasma rico em plaquetas inclui cerca de um a dois mm da porção superior das células vermelhas do sangue da primeira fração do tubo após centrifugação. Esse concentrado com volume de cerca de 1,2 ml por tubo foi associado a 50 µl de cloreto de cálcio a 10% para formação do gel. No grupo experimental, após a exodontia, utilizou-se PRFC misturado com osso autógeno em 50% dos pacientes para preenchimento do

alvéolo e, no grupo controle, osso autógeno sem o PRFC para preenchimento do alvéolo. Entre a décima e a décima-sexta semanas, as biópsias foram feitas utilizando-se uma trefina na região reparada. No grupo experimental, pela análise histológica, observou-se áreas de osso maduro compacto com trabeculado bem organizado e morfologia normal e, em dois pacientes, presença de trabéculas ósseas não organizadas e tecido conjuntivo. No grupo controle 100% dos pacientes mostraram tecido conjuntivo preenchendo a maior parte da área regenerada, com algum trabeculado ósseo sendo encontrado. O autor concluíu que a reparação óssea do grupo experimental foi melhor do que no grupo controle em quantidade e qualidade.

Katchburian e Arana em 1999, descrevem que o processo pelo qual o tecido ósseo se desenvolve é denominado ossificação ou osteogênese. Os ossos podem se originar de duas maneiras: no seio de uma membrana conjuntiva ou quando o tecido ósseo se forma substituindo gradualmente um modelo cartilaginoso pré-existente. Respectivamente, esses processos são denominados de ossificação intramembranosa e ossificação endocondral.

Landesberg et al. (2000) compararam dois métodos para preparação de gel de plasma rico em plaquetas com e sem a trombina bovina e estudaram os níveis de PDGF e TGFβ obtidos em cada método. O plasma rico em plaquetas foi preparado por centrifugação e o gel foi produzido usando agente geleificante marca ITA (Natrex Technologies Inc, Greenville, NC). Os níveis de PDGF e TGF-β gerados pelo gel formado foram analisados pelo teste ELISA. Ambos os métodos de preparação produziram gel de plasma rico em plaquetas em menos de 30 minutos. Contudo, a preparação ITA não requer trombina para alcançar a formação adequada de gel. Os

níveis de PDGF e TGF-β foram similares nos dois métodos utilizados. Segundo os autores, o uso de ITA para preparação de gel é equivalente ao uso de cloreto de cálcio e trombina, sem a necessidade de equipamento especial e risco de coagulopatia.

Carlson (2000) afirma que o uso do plasma rico em plaquetas (PRP) é uma estratégia para alcançar a reparação tecidual. É efetivada pelos fatores de crescimento liberados pela ação plaquetária: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de transformação beta (TGF-β), fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I). O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) está envolvido na reparação tecidual, pelo papel duplo das plaquetas como reserva de fator de crescimento e na hemostasia. O PDGF apresenta numerosos efeitos positivos na reparação tecidual incluindo a mitogênese, causando um aumento no número de células de reparação, a angiogênese e promovendo efeitos sobre outros fatores de crescimento de células. Dessa forma, resulta na promoção de funções fibroblásticas e osteoblásticas, promoção de diferenciação celular e aceleração dos efeitos dos fatores de crescimento sobre outras células, tais como macrófagos. O PDGF é uma glicoproteína sintetizada e secretada pelos macrófagos e células endoteliais e é o primeiro fator de crescimento. Os efeitos do PDGF ocorrem quando ele se liga nos receptores da membrana celular. Esta ligação ativa um sinal citoplasmático protéico interno que ativa o gene que expressa ação mitótica e angiogênica. O fator de crescimento de transformação beta (TGF-β) é envolvido com a reparação de tecido conjuntivo e reparação óssea. Quando liberado pela degranulação das plaquetas ou secretado por macrófagos, TGF-β exerce seus efeito nas células adjacentes, que incluem fibroblastos, células indiferenciadas na medula e pré-osteoblastos. A mais importante função do TGF-β no tecido ósseo parece ser a quimiotaxia e mitogênese

dos osteoblastos precursores e a capacidade de estimular seu depósito de matriz de colágeno para reparação com tecido conjuntivo e formação óssea. Os fatores de crescimento semelhante à insulina I - IGF-I e IGF-II são secretados pelos osteoblastos. Durante a formação óssea promovem um aumento do número de osteoblastos e conseqüentemente aceleram a deposição óssea. Supõe-se que a presença do IGF nas plaquetas possa atuar nas células precursoras de osteoblastos e nos osteoblastos do endósteo.

Kassolis et al. (2000) realizaram avaliação clínica e radiográfica de quinze pacientes submetidos a elevação de seio maxilar e rebordo alveolar com aplicação de PRP e osso liofilizado desmineralizado e congelado (FDBA). De 4 a 5 meses após a primeira cirurgia foram colhidas biópsias ósseas no trans-cirúrgico para instalação dos implantes e para avaliação histológica. Dos 36 implantes instalados, 89% foram considerados clinicamente bem sucedidos demonstrando completa cobertura óssea dos implantes, sem mobilidade e com aparência radiográfica normal na época da exposição cirúrgica. A avaliação histológica revelou extensa área com presença de osteóide e formação óssea ao redor das partículas de FDBA, sem evidência de infiltrado inflamatório. Os autores concluiram com os achados clínicos e histológicos que o FDBA combinado com PRP proporciona uma alternativa terapêutica viável para instalação de implantes, nos limites desse estudo.

Rosenberg e Torosian (2000) apresentaram um protocolo cirúrgico utilizando PRP associado a elevação de seio maxilar. O enxerto é uma combinação de PRP, trombina, soro fisiológico, cloreto de cálcio e osso particulado autógeno ou heterógeno. Após quatro meses de pós-operatório o paciente retornou para a instalação dos implantes e instalação das próteses provisórias que permaneceram durante seis meses.

Após este período, as próteses definitivas foram instaladas e o paciente teve retorno periódico para manutenção semanal, inicialmente, e mensal, posteriormente. Concluíram que com esse processo a duração necessária para reparação do enxerto foi reduzida em 50%.

Sonnleitner et al. (2000) utilizaram duas centrifugações em combinação com adesivo de fibrina (*tisseel)*. O sangue foi coletado em um tubo a vácuo de 5ml contendo citrato de sódio e foi processada a primeira centrifugação a 160G por 20 minutos, obtendo-se plasma pobre em plaquetas (PPP), com o PRP situado no segundo nível e, no fundo do tubo, células vermelhas. Na parte superior deste terceiro nível, a partir da divisa entre o soro e células vermelhas, foi obtida uma camada rica em plaquetas jovens. O material pipetado foi submetido a uma segunda centrifugação a 400G por 15 minutos. Após esta segunda centrifugação foi obtida, no topo do tubo, uma camada de soro de cor amarelo-claro com fibrinogênio e baixa concentração de plaquetas (PPP). A fração final, que apresentou grande concentrado de plaquetas, foi utilizada para produção do gel.

Marx (2001), apresentou à comunidade científica considerações importantes relacionadas ao plasma rico em plaquetas, que age como uma porta para estimulação e aceleração da cicatrização de tecidos moles e reparação óssea. Mas, devido a este potencial, muitos profissionais cometem erros, abusos e aplicação incorreta do PRP. Para o resultado adequado do PRP, segundo o autor, deve-se obter uma concentração de 1.000.000 plaquetas/μL em 5,0 ml de plasma. Pelo fato de ser um procedimento autógeno o paciente está livre de transmissão de doenças infecto-contagiosas. O autor destaca ainda, a presença de sete fatores de crescimento no PRP: fator de crescimento

derivado de plaquetas aa (PDGF AA), PDGF BB, PDGF AB, fator de crescimento de transformação β_1 (TGFβ_1), TGFβ_2, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento epitelial (EGF) sendo estes considerados nativos e não recombinantes. O autor também destaca que o PRP não apresenta ação osteoindudora, que é efetiva nas proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), mas que acelera a atividade osteogênica. Além disso, o PRP deve ser preparado no momento de ser utilizado, pois, dez minutos após sua preparação ocorre a liberação de 70% dos fatores de crescimento e ao final de uma hora 100%, sendo que sua ação no sitio cirúrgico pode estender-se por oito dias. O PRP não é carcinogênico, nem mutagênico, pois atua nas membranas celulares e não no núcleo celular e promove expressão gênica normal. O uso do PRP é considerado uma nova biotecnologia na odontologia e pode atuar na engenharia tecidual e celular.

Weibrich et al. (2001), em estudo clínico, avaliaram a correlação da concentração de plaquetas no PRP quanto ao método de extração, a idade, ao gênero e à contagem das plaquetas do doador. Utilizaram dois métodos para produção de PRP: separação de plasma descontínuo feito pelo banco de sangue e auto-concentração. Obtiveram as amostras de 158 doadores, sendo 112 homens e 46 mulheres, com idade entre 20 e 62 anos. Chegaram às seguintes conclusões: a contagem de plaquetas diferiu significativamente de acordo com o doador, tanto na preparação do PRP do banco de sangue, quanto no método de auto-concentração de PRP. A concentração de plaquetas do banco de sangue foi correlacionada com a contagem de plaquetas do sangue total do doador, contudo não houve correlação significativa. A idade e gênero não mostraram influência na concentração de plaquetas.

Peñarrocha et al.(2001), destacam a necessidade de estudos experimentais e clínicos para descartar a existência de alterações genéticas e cromossômicas no tecido onde ocorre a aplicação de doses terapêuticas de fatores de crescimento.

Robiony et al. (2002) utilizaram PRP associado a distração osteogênica em cinco pacientes portadores de mandíbula atrófica para posterior instalação de implantes osseointegrados. No procedimento cirúrgico para obtenção do segmento móvel da distração osteogênica foram associados osso de crista ilíaca e PRP. Após sessenta dias, tempo para os movimentos de expansão e consolidação óssea, foi possível a instalação de implantes. Concluíram que a associação da técnica ao PRP promoveu condições efetivas para reparação local de forma precoce.

Weibrich et al. *(*2002) avaliaram 213 pacientes para quantificar os fatores de crescimento contidos no plasma rico em plaquetas. Encontrados em maiores quantidades foram: o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-AB), fator de crescimento de transformação (TGF-β1) e fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-I); enquanto o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-BB) e fator de crescimento de transformação (TGF-β2) foram encontrados em menores quantidades. Não foram observadas influências da idade, gênero, quantidade de plaquetas e concentração dos fatores de crescimento, exceto para o IGF-I.

Martinez et al. (2002) em revisão da literatura a respeito do risco do uso de PRP em consultório dentário, destaca que os concentrados do PRP têm sido amplamente utilizados na última década como complemento às técnicas de reparação tecidual. Os autores que utilizam clinicamente o PRP afirmam que não apresenta nenhum risco de infecção ou patologia e nenhum efeito indesejado. Porém, os autores da revisão questionam a possibilidade de coincidências entre o processo carcinogenético e a via

mitogênica, que utilizam os fatores de crescimento, inferindo que esses fatores pudessem ser um coadjuvante a mais na formação de displasias epiteliais, carcinomas orais e invasões tumorais.

Kim et al. (2002) realizaram estudo experimental em osso ilíaco de cães para avaliar a osseointegração em áreas de defeitos ósseos com a utilização de osso desmineralizado desidratado e congelado, associado ou não com PRP. Cada animal recebeu implantes de titânio comercialmente puro bilateralmente nas cristas ilíacas num total de 30 implantes de 10 mm de comprimento por 4,0 mm de diâmetro. Foram criados defeitos junto ao espaço peri-implantar deixando 3 roscas expostas e foram realizados as seguintes modalidades de tratamento: 1 – nenhum tratamento (controle), 2 – osso desidratado desmineralizado congelado (DBP), 3 – associação do osso DBP com PRP. Analises histológica e histomorfométrica foram realizadas em 6 e 12 semanas. Os autores concluíram que a associação de osso desmineralizado ao PRP promoveu melhores resultados em comparação com os obtidos com o grupo controle.

Aghaloo et al. (2002) realizaram estudo experimental para avaliar a ação do PRP em defeitos ósseos no crânio. Utilizaram 15 coelhos (New Zeland) e criaram 4 defeitos de 8,0 mm de diâmetro no crânio de cada animal. Em cada defeito foi aplicado um tipo de tratamento, como se segue: 1 – osso autógeno, 2 – PRP, 3 – osso com PRP, 4 – coágulo (controle). Os defeitos foram avaliados após 1, 2 e 4 meses com radiografia digital de subtração, histologicamente e histomorfométricamente. Foi encontrada diferença significativa nos grupos de osso autógeno com e sem PRP em comparação com o grupo controle e o PRP sozinho. Não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo de osso autógeno e osso autógeno e PRP. Também não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo PRP e o controle.

Zechner et al. (2003) em estudo experimental em porcos da Índia, removeram os pré-molares inferiores e instalaram implantes associados ao PRP após a cicatrização dos alvéolos. Os tempos de avaliação foram de 3, 6 e 12 semanas. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a associação do PRP e o grupo controle. Concluíram que a utilização do PRP é tempo dependente para alterações ósseas.

Sanches et al. (2003) publicaram uma revisão da literatura sobre PRP. Esses autores referem que a regeneração óssea guiada é um método cirúrgico aceito e empregado em odontologia para aumentar a quantidade e qualidade do osso em áreas de defeitos alveolares localizados. A falta de previsibilidades dos procedimentos regenerativos ósseos com vários materiais sugerem necessidades de melhorias nas propriedades de ossoindução destes materiais. O plasma rico em plaquetas (PRP) pode ser usado para levar fatores de crescimento em concentrações altas em locais que requerem enxertos ósseos. Os autores avaliaram seis trabalhos que utilizaram PRP em humanos, sendo cinco relatos de casos clínicos. Concluíram que a utilização do PRP é uma técnica promissora quando associada aos enxertos ósseos, porém deve ser bem planejada. Além disso, requer estudos controlados para obter evidências científicas e definir indicações corretas para seu uso.

Rodriguez et al. (2003) realizaram estudo clínico em 15 pacientes para elevação de seio maxilar com a utilização de osso bovino sem proteínas, associado ao PRP. Foram operados 24 seios maxilares no total, com altura ósseo alveolar de 5,0mm, sendo a instalação dos implantes realizada 5 meses após a elevação. A avaliação do tratamento foi feita com tomografia computadorizada e biopsia óssea com trefina no momento da instalação dos implantes. Encontraram nas biópsias características

histológicas de neoformação óssea e as densidades ósseas do osso neoformado eram similares ou maiores que as do osso remanescente. Os autores concluíram que, diante da metodologia empregada, a associação dos dois compostos promoveu bons resultados.

Yazawa et al. (2003) em estudo experimental em coelhos avaliaram a quantidade de fatores de crescimento existente em concentrado de plaquetas, técnica em que modificou o PRP convencional. A obtenção desse concentrado foi por meio de dupla centrifugação de sangue venoso humano na forma de cola de fibrina, o qual foi aplicado em coelhos para realização da imunohistoquímica do anticorpo anti-PDFG. Obtiveram uma concentração de plaquetas três vezes maior do que no PRP convencional e o período de liberação dos fatores de crescimento atingiu aproximadamente sete dias. Isto eleva a possibilidade que este método possa ser útil em aplicações clínicas.

Anitua et al. (2004) afirmam que as plaquetas são conhecidas pelo papel na hemostasia, onde auxiliam no controle da perda de sangue em locais de dano vascular. Para fazer isto, aderem-se, agregando-se umas as outras e formam uma superfície de prócoagulantes que conduzem à geração de trombina e formação de fibrina, caracterizando o coágulo branco. Plaquetas também liberam substâncias que promovem cicatrização tecidual, influenciam na reatividade de células sangüineas e vasculares, promovem a angiogênese e a inflamação (ANITUA et al., 2004). Elas contem reservatórios de armazenamento de fatores de crescimento inclusive PDGF, TGF-β, e VEGF como também citocinas inclusive proteínas como CD40L. Os autores afirmam que o uso das plaquetas (PRP) em cirurgia de implante dentário com óssea guiada, é uma situação que apressa a ossificação claramente ao redor dos implantes

de titânio. O resultado promove reduções no tempo requerido para estabilização do implante e uma taxa de sucesso aumentada. Cirurgias ortopédicas, músculares e/ou em tendão, reversão de úlceras de pele, correção de defeitos em cirurgia de olho e cirurgia cosmética são outras situações onde o PRP pode ser empregado, favorecendo o reparo.

Aghaloo et al. (2004) em estudo experimental em crânio de coelhos, avaliaram o comportamento da neoformação óssea, com uso de osso autógeno, osso heterógeno (Bio-Oss), osso heterógeno com PRP e controle (mantido com coágulo sangüíneo). Foram utilizados quatro grupos com cinco animais em cada um, com quatro defeitos ósseos de 8,0 mm de diâmetro criados no crânio de cada animal. Os períodos de sacrifício foram de 1, 2 e 4 meses. Obtiveram os seguintes resultados em avaliação radiografica: Bio-Oss, osso autógeno, e Bio-Oss + PRP mostraram um aumento significativo em densidade óssea em todos os períodos pós-operatórios. Pela avaliação histomorfométrica, o grupo tratado com osso autógeno e o grupo tratado com Bio-Oss+PRP mostraram um aumento significativo na neoformação óssea quando comparados aos grupos de tratamento com Bio-Oss e controle. Os autores concluíram que o uso de Bio-Oss associado ao PRP pode promover bons resultados.

Fontana et al. (2004) em estudo experimental com 50 ratos Wistar, avaliaram a ação do PRP ao redor de implantes laminares em tíbias direitas, sendo as do lado esquerdo utilizadas como controle. Na análise histométrica foram encontrados resultados favoráveis para o grupo teste (30 ± 7 cm^2) em comparação ao grupo controle (16 ± 3 cm^2), para a neoformação óssea.

Weibrich et al. (2004) em estudo experimental com vinte coelhos (New Zeland), analisaram o efeito do PRP em reparação de tecido ósseo ao redor de implantes. Para obtenção do PRP foi utilizado o sistema de coleção concentrada de plaquetas (PCCS - 3i, Miami, EUA). Foi instalado um implante (Bränemark MK III Ti Unite) por fêmur de coelho, sendo um lado testado com PRP e o outro sem PRP. No primeiro, sétimo, décimo quarto e vigésimo primeiro dias foram administrados três tipos de marcadores celulares para realização da análise histomorfológica. Comparando-se a reparação óssea nos implantes após 28 dias, a única diferença significativa foi vista com concentrações de plaquetas de valores intermediários entre 9.503.000 / 1.729.000 plaquetas/μL PRP. Não houve nenhuma diferença no percentual de células da área de contato osso/implante entre o teste e o controle nos três grupos. Dessa forma, os autores concluíram que a concentração de plaquetas requerida para que o PRP atue sobre a reparação óssea apresenta limites estreitos. Efeitos biológicos vantajosos parecem ocorrer quando o PRP é padronizado para uma concentração de plaquetas de aproximadamente 1.000.000/μL. Em concentrações inferiores, o efeito é menos eficaz, enquanto concentrações mais altas poderiam ter um efeito inibitório. O PRP não produziu um efeito benéfico do ponto de vista da aceleração da osseointegração dos implantes instalados.

Wiltfang et al. (2004), em estudo experimental controlado em mini-porcos, utilizaram defeitos criticos na calvária, para avaliar a ação do PRP na reparação de defeitos ósseos preenchidos ou não por meio de biomateriais. Foram utilizados: osso autógeno, grânulos de fosfato tri-cálcio (CeraSorb), bloco ósseo bovino (BioOss) e osso bovino na forma de esponja de colágeno (Colloss), com e sem PRP. Duas preparações

de PRP foram estudadas: PRP kit (Curasan, Alemanha) e sistema de coleção concentrada de plaquetas PCCS (3i, USA). As biópsias foram obtidas aos 14, 28 e 84 dias de pós-operatório. Os espécimes foram avaliados radiograficamente com digitalização das radiografias obtidas e por imunohistoquimica. Obtiveram os seguinte resultados: Osso autógeno e Colloss mostraram a maior porcentagem de remineralização aos 14 dias, com a utilização do PRP processado no PCCS. Segundo os autores, a alta expressão inicial de BMP-2 no grupo Colloss promoveu evidências de início precoce da reparação óssea. Aos 28 dias a ação do PRP promoveu aumento ósseo significativo somente quando aplicado em combinação com osso autógeno. Com 84 dias após a cirurgia, ambas as preparações de PRP já não aumentaram a reparação óssea nos grupos autógenos. A osteocondutividade foi promovida pelo Bio-Oss e CeraSorb após 28 dias de cirurgia nos grupos associados ao PRP. Não obstante, a adição de PRP apenas influenciou reparação óssea, degradação da cerâmica ou expressão de citocina quando os substitutos de osso eram aplicados. Aos 84 dias, o nível de neoformação óssea foi semelhante em todos os grupos. Concluíram que o PRP não somou benefício adicional quando materiais heterógenos foram usados. Porém, foi achado um efeito significativo na reparação óssea inicial no grupo autógeno, quando o PRP esteve associado, acelerando o processo inicial de neoformação óssea.

Leme et al. (2004) em estudo experimental em oito cães avaliaram o potencial osteogênico do PRP no reparo de cavidades ósseas. Para tal, removeram os pré-molares inferiores bilateralmente e depois de quarenta e dois dias realizaram o acesso cirúrgico novamente para produção de oito alvéolos cirúrgicos, sendo quatro de cada lado, os quais foram confeccionados com trefina de três mm de diâmetro e profundidade de quatro mm. O alvéolo próximo ao molar foi, bilateralmente, preenchido

com coágulo sangüíneo e os outros com PRP. As biópsias foram colhidas com sete, quatorze, vinte oito e quarenta e dois dias e obtiveram os seguintes resultados: para os dois períodos iniciais o PRP promoveu aumento qualitativo e quantitativo no início de formação óssea; para o período de vinte e oito dias não foram observadas diferenças significativas e para o último período o PRP aumentou significativamente a qualidade e quantidade de osso neoformado.

Yazawa et al. (2004), avaliaram a ação de substâncias antiplaquetárias em ensaios de obtenção de PRP para aumentar a concentração de plaquetas no gel. Foram utilizadas amostras de sangue humano com e sem a presença de prostaglandina E1 e aspirina e obtidos os géis de PRP, que por sua vez foram suspensos em fosfato salino para avaliar a concentração plaquetária. Encontraram concentrações de PDFG e TGF β1 em uma média superior a 400% nas amostras que apresentavam os antiplaquetários em comparação ao sangue sem antiplaquetários. Concluíram que as substâncias antiplaquetárias eram efetivas para concentrar fatores de crescimento de forma eficaz nas plaquetas.

Yamada et al. (2004a) estudaram a osseointegração de implantes dentários em associação a quatro diferentes métodos. Para tanto, foram utilizadas mandíbulas de cães, nas quais foram realizadas exodontias dos pré-molares, bilateralmente. Após um mês das exodontias foram criados defeitos ósseos com trefina e preenchidos com: PRP, células mesenquimais do animal associadas ao PRP, osso particulado e coágulo como controle, criando assim, quatro grupos de animais. Após dois meses, nas respectivas áreas preenchidas, foram instalados implantes e decorridos mais dois meses e foram realizadas as biópsias ósseas incluindo os implantes para avaliação

histológica e histométrica sem descalcificação das peças. Obtiveram os seguintes resultados: no grupo tratado com células mesenquimais e PRP obtiveram uma melhor formação do osso maduro e de neovascularização, comparando-se com o grupo controle. O grupo do PRP apresentou-se semelhante ao grupo de osso particulado, mas não superando o grupo tratado com células mesenquimais associados ao PRP.

Yamada et al. (2004b) em estudo experimental em cães compararam a ação de células mesenquimais associadas ao PRP, ao osso particulado associado ao PRP e coágulo (controle), na formação óssea. Defeitos ósseos foram produzidos nas mandíbulas dos cães e preenchidos com os materiais para avaliação radiográfica, histológica e histomorfométrica nos períodos de 15, 30 e 60 dias. O grupo tratado com células mesenquimais associado ao PRP apresentou melhor formação de osso maduro em comparação com os grupos de PRP, osso particulado e controle nos dois primeiros períodos de avaliação. Histometricamente, após 60 dias, as áreas ósseas neoformadas apresentavam as seguintes marcas: controle 18,3 $\pm$ 4,84%; osso particulado e PRP 61,4 $\pm$ 3,38%; e células mesenquimais e PRP 67,3% $\pm$ 2,06%. Estes resultados demonstram que a mistura de células mesenquimais/PRP foi útil como um substituto ósseo na reparação tecidual.

Oyama et al. (2004), em estudo clinico, avaliaram a ação de enxertos ósseo de crista ilíaca associados ao PRP para tratamento de 25 pacientes portadores de fendas alveolares. Os pacientes apresentavam idade média de 16,1 anos. A evolução do tratamento foi avaliada por tomografia computadorizada, em relação à tomografia inicial. Concluíram que a ação do PRP promoveu melhores resultados quando associado ao enxerto autógeno.

Freymiller e Aghaloo em 2004, apresentam um artigo de revisão de literatura em que sustentam a necessidade de maiores evidências científicas na utilização do PRP. Ventilam a possibilidade da ação do PRP em humanos ser diferente do que aquela em animais, no tocante à concentração de plaquetas. Destacam ainda que a técnica empregada para obtenção do PRP pode promover o sucesso ou insucesso do método, pois a liberação dos fatores de crescimento poderia ocorrer prematuramente, dificultando a ação no sítio desejado. Referiram que o PRP age como um adesivo, favorecendo a adesão do enxerto ao sítio cirúrgico. Destacam, ainda, o apelo capitalista de uma nova técnica pelas industrias e por professores, respectivamente, no desenvolvimento de centrífugas e realização de cursos. Recomendam pesquisas experimentais em modelo animal seguras e bem planejadas, visando obter evidências científicas significativas para posterior indicação para o uso em humanos.

Marx em 2004, em revisão de literatura sobre o uso do PRP, direcionada para evidências que suportem seu uso, destaca o seguinte: O PRP não é apenas um concentrado de plaquetas com seus fatores de crescimento, mas também contem três proteínas sangüíneas que são: fibrina, fibronectina, vitronectina. Estas proteínas são responsáveis pela adesão celular para osteoindução e agem como matriz para osso, tecido conjuntivo e migração epitelial. O uso de centrífugas em consultório deve promover a obtenção de material estéril e uma precisa separação das plaquetas das células sangüíneas vermelhas, sem que ocorra a degranulação plaquetária. Algumas centrífugas de uso odontológico não se obtém o PRP conforme descrito acima, ocasionando resultados indesejados. O procedimento de obtenção de plaquetas deve ser autógeno e não homógeno, pois plaquetas de banco de sangue podem produzir resultados indesejados. As duas centrífugas certificadas pela *Food and Drug*

Administration (FDA) foram a *Smart PreP – Harvest Technologies Inc e Platelet concentration collection system – PCCS*, com obtenção de concentrado de plaquetas adequados. As células mesenquimais, epidermais, epiteliais, fibroblastos e osteoblastos expressam receptores de membrana para os fatores de crescimento do PRP, que por sua vez estimulam a ativação de proteínas endógenas, que promovem uma sucessão gênica normal e induzem à proliferação celular, formação de matriz, síntese de colágeno, formação óssea, etc. Após a ação inicial dos fatores de crescimento, que pode permanecer de 7 a 10 dias, ocorre a ação dos macrófagos dentro da ferida, consumindo as plaquetas exauridas. O PRP tem um pH de (6,5 a 6,7), comparado com um coágulo sangüíneo maduro de (7,0 a 7,2).

Jensen et al. (2004) realizaram pesquisa experimental em oito úmeros de cães para avaliar a ação de PRP e enxerto ósseo congelado e fresco na fixação de implantes revestidos com hidroxiapatita de 10 mm de comprimento por 6,0 mm de diâmetro. Os enxertos ósseos utilizados eram homógenos obtidos de dois cães que não faziam parte da amostra. Foram preparados quatro alvéolos cirúrgicos por animal, preenchidos respectivamente, por: 1 – coágulo (controle), 2 – PRP, 3 – enxerto ósseo, 4 – enxerto ósseo com PRP. Após três semanas de pós-operatório os implantes foram avaliados em exame de contra torque e histomorfométrico . Não encontraram resultados significativos em relação ao uso do PRP sozinho ou combinado.

Choi et al. (2004) realizaram estudo experimental para avaliar a ação do PRP em 8 mandíbulas de cães, com remoção dos pré-molares bilateralmente. Foram criados defeitos ósseos depois de três meses, sendo os defeitos preenchidos com enxerto ósseo associado ao PRP de um lado e apenas o enxerto ósseo do outro lado. Após 6 semanas foram obtidas as biópsias ósseas, avaliadas por meio de microscopia de

fluorescência. Os autores concluíram que o PRP não promoveu enriquecimento ósseo, tendo o lado com enxerto ósseo obtido melhor qualidade óssea no período de avaliação.

Efeoglu et al. (2004) realizaram pesquisa experimental com PRP em 23 coelhos (New Zeland), sendo 13 fêmeas e 10 machos, para obterem um método modificado e barato na preparação do PRP, para utilização em associação a enxertos ósseos. O método para obtenção do PRP foi realizado a partir de sangue venoso da orelha dos animais, depositado em tubos vacutainer com EDTA como anticoagulante. Foram utilizadas duas variações do método de Landesberg et al. (2000), para aumentar a concentração de plaquetas no plasma com dupla centrifugação, a primeira com 300 G por 10 minutos. Após separação do plasma rico e pobre em plaquetas, foi feita uma segunda centrifugação com 5.000 G por 5 minutos. Os autores concluíram que a concentração de plaquetas no plasma teria aumentado e que seria possível associar o produto a enxertos ósseos sem a necessidade de utilização de processos caros de auto transfusão.

3 Proposição

O presente estudo tem por objetivo analisar histologicamente o tecido ósseo neoformado ao redor de implantes dentários intra-ósseos de procedência nacional, instalados em mandíbulas de cães, com e sem a utilização de plasma rico em plaquetas.

4 Material e método

4.1 Animais para experimentação

Foram utilizados nove cães adultos jovens, sendo 3 machos e 6 fêmeas sem raça definida (SRD), com peso corporal variando de 17 a 32 kg. Previamente à montagem dos grupos experimentais, os animais foram avaliados clinicamente pelo Serviço de Ortopedia do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel", da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista - UNESP - Câmpus de Jaboticabal. Foram submetidos à vacinação, vermifugação, hematologia rotineira[*], creatinina e alanina aminotransferase (ALT). Foram mantidos em canis individuais onde receberam ração[†] comercial adequada à espécie e água *"ad libitum"*, em todo o tempo experimental à exceção das 12 horas prévias aos atos cirúrgicos.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Araraquara, ofício CEEA-FO/Ar. 13/2003 (anexo 1).

4. 2 Grupos experimentais

Cada animal recebeu dois implantes intra-ósseos osseointegráveis em cada lado da mandíbula. O procedimento para implantação será descrito adiante. No lado direito, a instalação dos implantes foi realizada sem a utilização do PRP (grupo I – controle) e o lado esquerdo, a instalação dos implantes foi realizada com utilização do PRP (grupo II – experimental). Dessa forma, 18 implantes correspondem a cada grupo. A tabela I

[*] Contador automático de células sangüíneas COULTER AC-T8 – Miami USA
[†] Ração para cães de grande porte, Kanina – Purina , São Paulo / BR

demonstra a distribuição da amostra com seus respectivos implantes, considerando os períodos de biópsias ósseas, aos 15, 30 e 55 dias.

tabela 1 – Apresentação da amostra

Período (dias)	Amostra (cães) n	Grupo I Lado direito nº de implantes	Grupo II Lado esquerdo nº de implantes
15	3	6 implantes	6 implantes
30	3	6 implantes	6 implantes
55	3	6 implantes	6 implantes
	9	18	18

Grupo I – controle, grupo II – experimental

4. 3 Procedimentos Anestésicos

No dia anterior ao procedimento cirúrgico foi iniciada administração de uma mistura[‡] de espiramicina (75.000 UI/kg) e metronidazol (12,5 mg/kg), por via oral, e mantida por cinco dias no pós-operatório em intervalos de 24 horas. Após jejum hídrico e alimentar de doze horas, os animais foram pesados e submetidos à anestesia geral para os procedimentos de exodontia, instalação de implantes e biópsia. Para tanto, receberam cloridrato de levomepromazina[§] na dose de 1,0 mg/kg, administrado por via

[‡] Stomogil 10® - Merial Saúde Animal LTDA
[§] Neozine® Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP

intravenosa, juntamente ao caprofeno[**] na dose de 1,0 mg/kg, por via subcutânea. A seguir, cada animal foi induzido à anestesia geral pela administração intravenosa de propofol[††], em doses variando entre 5,0 a 8,0 mg/kg para a intubação orotraqueal.

A anestesia geral foi mantida pela combinação de anestésico volátil halotano[‡‡], diluído em oxigênio em fluxo de 30 ml/kg/min, em sistema semifechado. No curso dos procedimentos foram monitorados os parâmetros combinados de saturação parcial de oxigênio (SpO_2), dióxido de carbono (CO_2), eletrocardiograma (ECG), freqüência respiratória (FR), pressão arterial não invasiva (PA) e temperatura[§§] (fig 1a e 1b).



a



b

Figura 1 - a - medicamentos utilizados, aparelho anestésico Takaoka e capinógrafo

b - animal sob anestesia geral com intubação orotraqueal

[**] Ketofen® Merial Saúde Animal LTDA São Paulo - Brasil
[††] Propofol®, Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP
[‡‡] Halotano® Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP
[§§] Digimax 5500 - USA

4. 4 Procedimentos Cirúrgicos:

4. 4. 1 Exodontias

Após a anestesia geral, foi realizada raspagem supragengival em todos os dentes com a utilização de Profident[***] (fig. 2a). Em seguida, realizou-se a assepsia intra-oral com solução de gluconato de clorexidina a 0,12%, seguida de irrigação com solução salina de cloreto de sódio a 0,9% para iniciar o procedimento cirúrgico de exodontia dos segundos e terceiros pré-molares inferiores dos lados direito e esquerdo de cada animal (fig. 2b).

Por meio de um descolador tipo Molt[†††] foi realizada a sindesmotomia. Em seguida os dentes foram seccionados com fresa FG – 702 SL[‡‡‡], montada em instrumento de alta rotação sob irrigação abundante com solução salina de cloreto de sódio a 0,9% (fig. 2c). Com o uso de fórceps foram removidos os elementos citados(fig. 2d, 2e, 2f). Os alvéolos foram curetados, adequadamente irrigados e suturados com fio de poliglactina 910, n° 4.0 [§§§].

[***] Gnatus, Ribeirão Preto, Brasil
[†††] Schobell Ind e Com Ltda – Rio Claro – SP/ Brasil
[‡‡‡] SSWhite – SP / Brasil
[§§§] Vicryl 4.0 – Ethicon / Johnson & Johnson


a


b


c


d


e


f

Figura 2 - a - aplicação do ultrassom, b – assepsia com clorexidina a 0,12%; c – odontossecção, d – exodontia, e – alvéolos dentários, f – dente seccionado e removido

4. 4. 2 Instalação de implantes osseointegráveis associados ou não ao PRP:

Após sessenta dias das exodontias, tempo necessário acima daquele esperado para reparação óssea alveolar em cães (PERRI DE CARVALHO e OKAMOTO, 1987), foram instalados os implantes, conforme os grupos controle e experimental. Cada animal foi submetido à anestesia geral, como descrito anteriormente. Após, raspagem supragengival por meio de ultrassom e assepsia da área dos dentes adjacentes (fig. 3 a), conforme já foi descrita, foi realizada incisão do rebordo alveolar ao nível da junção da mucosa inserida com bisturi montado[****] com lâmina 15[††††] sendo o retalho rebatido por meio de um descolador tipo Molt (fig. 3b). Com utilização de fresas do kit para implantes[‡‡‡‡], sob refrigeração abundante com solução salina de cloreto de sódio a 0,9% e baixa rotação (1200 rpm e 50 N/cm) do motor para implantes[§§§§], duas cavidades foram preparadas de cada lado da mandíbula para receber implantes de titânio rosqueaveis de 3,75 mm de diâmetro por 7,00 mm de comprimento (fig. 3 c, 3d), seguindo o protocolo cirúrgico estabelecido por Bränemark et al. (1977) (anexo 2).

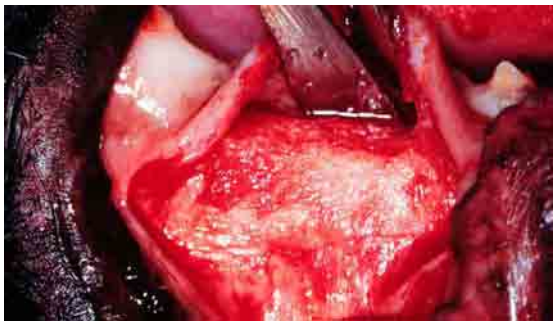
Em cada animal, os implantes foram instalados na região de segundo e terceiro pré-molares inferiores esquerdos. Para este lado da mandíbula, os dois implantes foram associados ao plasma rico em plaquetas (PRP). Após a obtenção do gel (PRP), este foi depositado dentro do alvéolo cirúrgico por meio de seringa tipo Luer, em uma quantidade aproximada de 26 mm^3. Concomitantemente ao preenchimento dos alvéolos com gel do PRP, as roscas dos implantes foram mergulhadas no gel, para que em

[****] Bard-Parker, Sheffield - England
[††††] Bard-Parker, Sheffield - England
[‡‡‡‡] Titanium Fix – A S Technology, São José dos Campos – SP / Brasil
[§§§§] Driller BLM 600 plus, São Paulo, Brasil

seguida, os implantes fossem instalados nas cavidades preparadas, caracterizando o experimental (fig. 3e, 3f, 3g, 3h). Para a região de segundo e terceiro pré-molares inferiores direitos foram instalados os implantes de forma usual, sem associação ao PRP, caracterizando o grupo controle. Portanto, um total de quatro implantes foi instalado em cada animal perfazendo trinta e seis implantes para os nove animais. Após a instalação dos implantes o retalho foi reposicionado e suturado por planos, com fio poliglactina 910 nº 4.0.



a



b

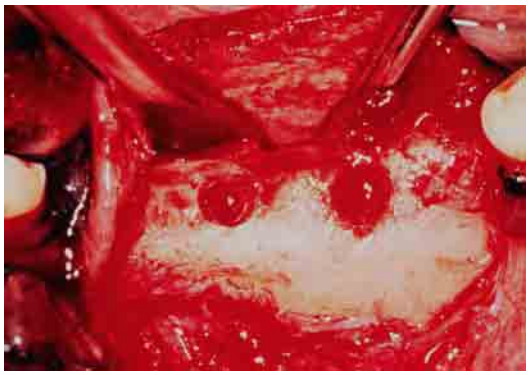


c

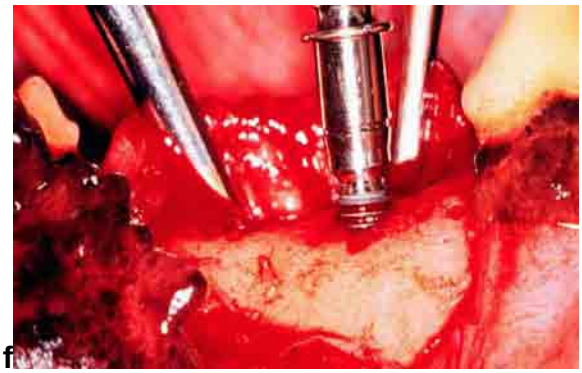


d

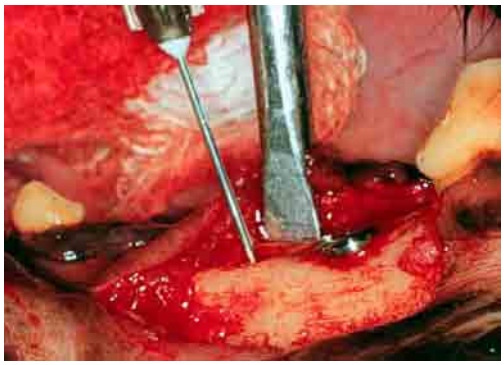
Figura 3 - a – foto clínica pré-implante, b – elevação do retalho muco-periostal, c- fresa em lança, d – fresa para preparação de alvéolo cirúrgico.



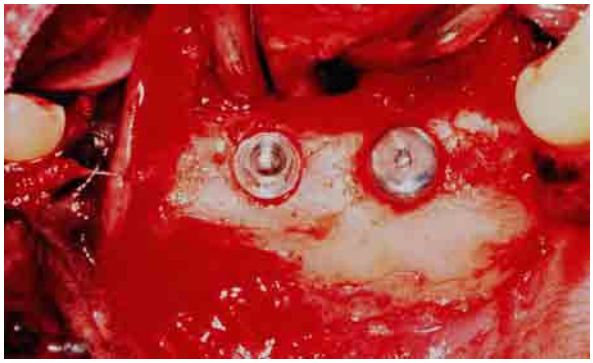
e



f



g



h

Figura 3 - e – alvéolos cirúrgicos preparados e preenchidos com gel de PRP, f – fixação do primeiro implante pós imersão no PRP, g – aplicação do PRP no segundo alvéolo, h – implantes fixados, grupo experimental.

4. 4. 3 Obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP)

Previamente ao procedimento cirúrgico para instalação dos implantes, de cada animal foi coletado sangue endovenoso para realização de exame laboratorial de contagem de plaquetas pelo contador automático de células sangüíneas (Coulter AC-T8 – Miami USA), como pré-requisito um número mínimo de 1000 000 de plaquetas / μL (MARX, 2001).

A coleta de sangue foi feita em cada animal após a anestesia geral. Foram colhidos 5,0 ml de sangue intravenoso por meio de seringa estéril[*****], descartável, para ser colocado em tubos de ensaio à vácuo contendo 0,5 ml solução anticoagulante de citrato trisódico a 10%[†††††] (fig. 4a).

Seguindo o protocolo de Anitua, 1999, o material foi centrifugado (fig. 4b) a um ciclo de 1200 rpm[‡‡‡‡‡] por 10 minutos em temperatura 22°C, para separação das plaquetas. Obteve-se uma mistura trifásica (fig. 4c, 4d) em que a parte superior é a porção pobre em plaquetas, hemácias e plasma, na parte mais inferior da porção intermediária da centrifugação, encontra-se o plasma rico em plaquetas (PRP) e na parte inferior, o plasma pobre em fatores de crescimento e células vermelhas. A maior parte da série vermelha constitui a quarta fração no fundo do tubo. No presente estudo, foi utilizada a parte mais inferior da porção intermediária, de 1,0 a 2,0 mm acima da porção vermelha (fig.4c); onde concentra-se maior número de plaquetas, que por meio de uma pipeta graduada foi transferida para um tubo Eppendorf, sendo em seguida, adicionados a 50 μL de cloreto de cálcio a 10% (fig.4e). Após 15 a 20 minutos obteve-se o gel do plasma rico em fator de crescimento.

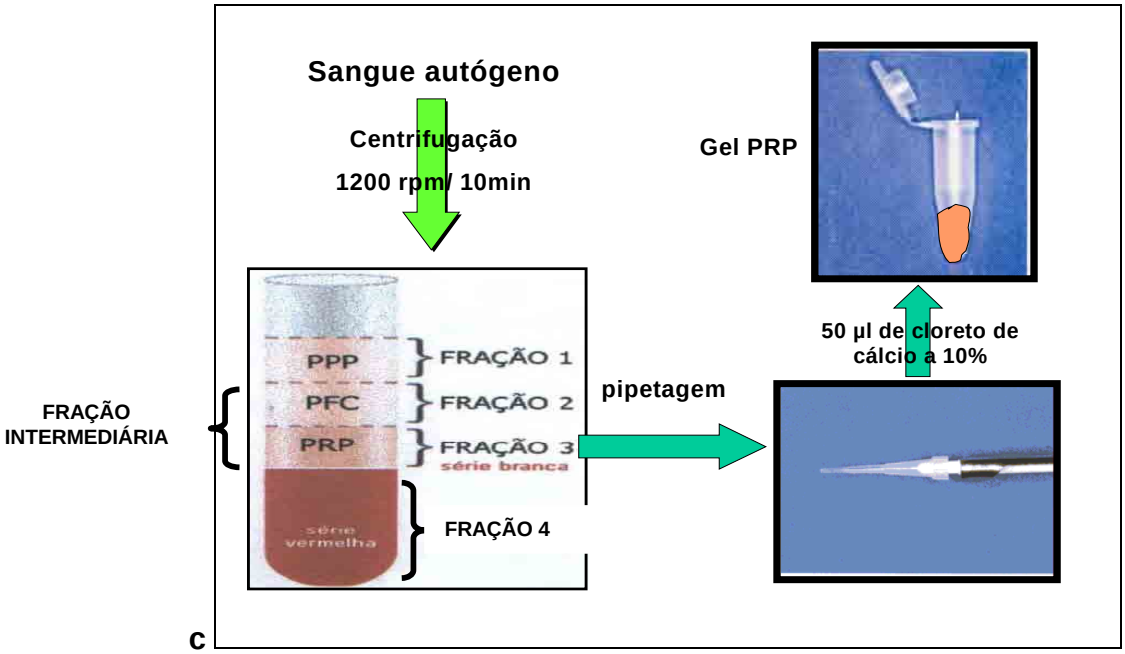
[*****] Injex, Industria e Comercio Ltda, Ourinhos/SP
[†††††] Vacutainer® USA
[‡‡‡‡‡] Fanem 206 MP, Excelsa® São Paulo / Brasil



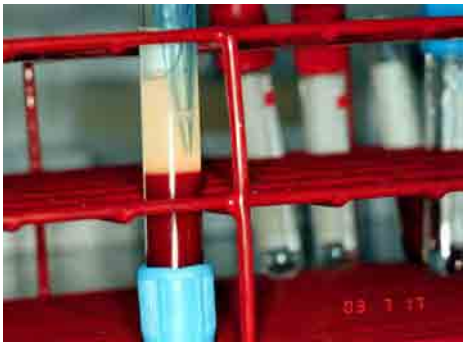
a



b



c



d



e

Figura 4 - a - pipetas graduadas e tubos a vácuo, b – centrífuga equilibrada e balanceada, c – obtenção de PRP, d – separação do PRP, e – ativação do PRP com cloreto de cálcio.

4. 4. 4 Obtenção dos espécimes para análise histológica

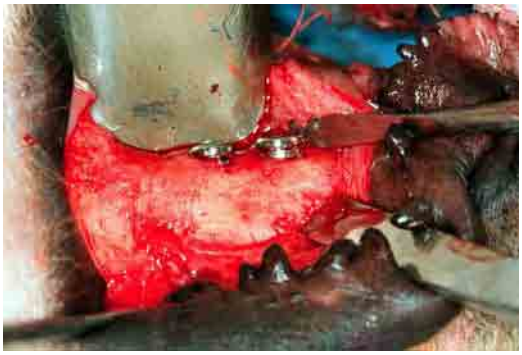
As biópsias foram obtidas nos períodos de 15, 30 e 55 dias após instalação dos implantes, correspondendo a três animais e 12 implantes em cada grupo para cada período, para serem submetidos a análise histológica.

Sob anestesia geral e após a assepsia já descrita anteriormente, foi realizada uma incisão com bisturi e lâmina 15 no fundo de sulco gengival e duas incisões verticais nos limites das áreas edentulas (fig. 5a). O retalho muco-periostal foi rebatido por meio de descolador tipo Molt. As biópsias foram realizadas por meio do uso de peça reta em baixa rotação, por osteotomias feitas com fresas carbide 701[§§§§§] e sob irrigação de solução salina de cloreto de sódio a 0,9% para remoção dos blocos ósseos (osso e implante) (fig. 5b, 5c). As osteotomias foram realizadas respeitando 3,0 mm de distância dos dentes adjacentes e pelo menos 2,0 mm dos implantes, contendo os implantes com as paredes vestibular e lingual.

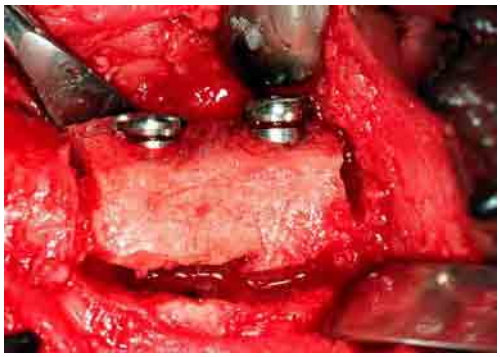
Após a remoção dos blocos ósseos as regiões das biópsias foram preenchidas com enxerto ósseo autógeno retirado da crista ilíaca para reconstrução da área e recoberto com membrana de cartilagem heterógena de orelha de cão[******], fixadas bilateralmente com parafusos de titânio monocortical[††††††] (fig. 5d) e as suturas realizadas com fio de poliglactina 910 nº 4.0. Os espécimes obtidos pelas biópsias podem ser visualizados nas figuras 5e, 5f.

---

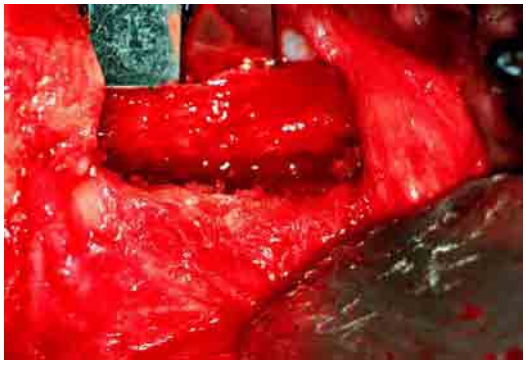
§§§§§ Jet – KGSorensen – SP / Brasil
****** Cartilagem de orelha de cão – Método de obtenção e conservação do Hospital Veterinário de Jaboticabal
†††††† Engimplan – Industria e Comercio de Engenharia para Implantes – SP / Brasil



a



b



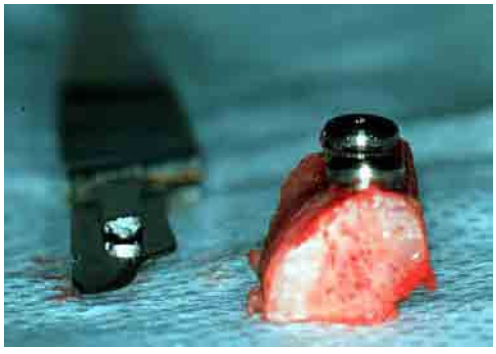
c



d



e



f

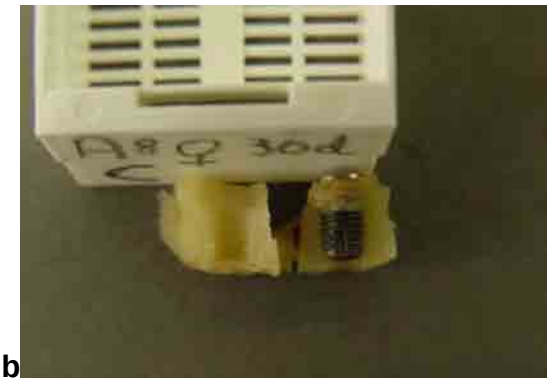
Figura 5 - a – elevação do retalho, b – osteotomias, c – loja cirúrgica, d – fixação de membrana de cartilagem, e – biópsia óssea norma vestibular, f – biópsia óssea norma mesial

Os blocos de biópsias ósseas contendo os implantes foram lavados e descalcificados durante 16 semanas em solução de Morse (fig. 6a) para seguirem o processo laboratorial de rotina. Após esta etapa os implantes foram removidos seccionando os blocos descalcificados (fig 6b). Após a descalcificação os espécimes permaneceram em água corrente por 24 horas e foram para recipiente com sulfato de sódio por uma semana. Novamente foram submetidas a 24 horas sob água corrente e levadas ao processador automático (banhos químicos) (fig. 6c) seguindo o seguinte processo durante 48 horas: banhos de álcool 70, 90, absoluto, álcool e xilol (1:1), xilol e parafina. Após este estágio, as peças foram levadas para a inclusora automática (fig. 6d, 6e, 6f), e finalmente ao micrótomo[‡‡‡‡‡‡]. Foram obtidos cortes seriados longitudinais de espessura de 5,0 μm da região central para a extremidade da peça. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para posterior análise histológica descritiva.

Foi utilizado microscópico ótico[§§§§§§] de luz comum Olympus BX 51 acoplado a câmera digital Olympus Camedia C-5060 5.1 megapixel e programa Camedia Máster versão 4.10. As imagens foram obtidas com os seguintes aumentos: 40X, 100X e 200X. Obteve-se com 40X tomada panorâmica, com 100x região de roscas e 200X região de uma única rosca.

[‡‡‡‡‡‡] Micrótomo rotativo automático – São Paulo, BR
[§§§§§§] Olympus BX 51 – Tokyo, Japan


a


b


c


d


e


f

Figura 6 - a – peças em solução de Morse, b – bloco ósseo descalcificado, c – diafanização, d – inclusão com parafina, e – choque térmico, f – bloco preparado para o corte.

5 Resultados

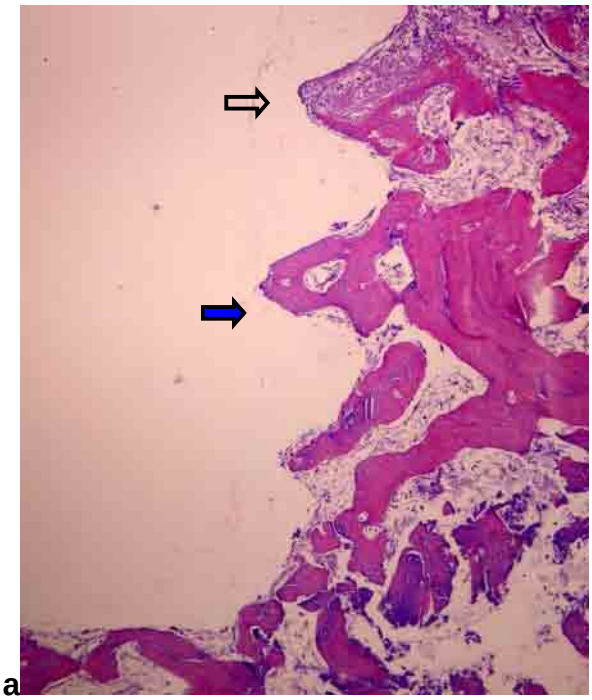
Análise microscópica

Os espécimes analisados são oriundos de blocos ósseos descalcificados que receberam a instalação de implantes dentários. As imagens obtidas no espaço denominado peri-implantar mostraram reentrâncias e saliências compatíveis com as roscas promovidas pelos desenhos dos implantes instalados. A neoformação óssea foi vista mais intensamente em áreas vizinhas ao osso remanescente e não partindo do implante para parede óssea.

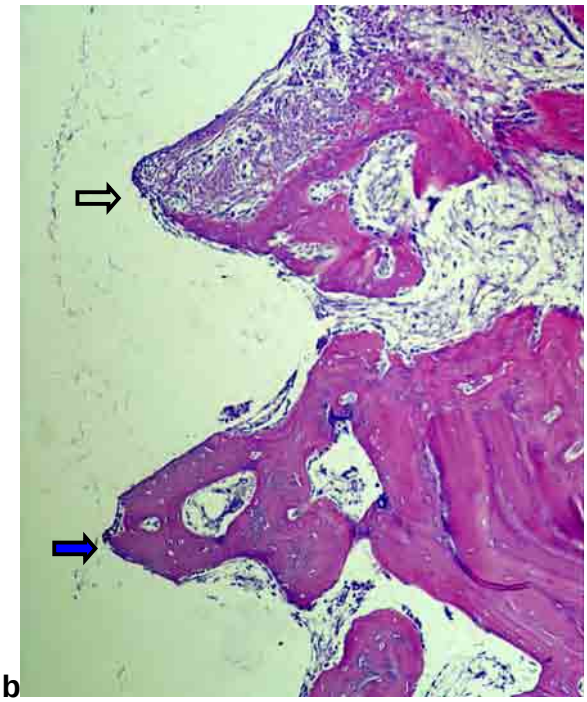
Período - 15 dias

Nesse período, a maioria dos cortes analisados oriundos do grupo controle mostrava que as áreas do espaço peri-implantar ora estavam ocupadas por tecido fibroso e ora eram ocupadas por delicadas trabéculas ósseas, formadas caracteristicamente por osso jovem, com a presença de inúmeros osteoblastos (fig. 7b). Os espaços intratrabeculares eram ocupados por tecido conjuntivo fibroso ou tecido semelhante ao medular (fig. 7c). Especificamente os cortes histológicos de um animal mostraram intenso infiltrado inflamatório de células mononucleares, adjacente à região do implante. Próximo as delicadas trabéculas ósseas ou justapondo-se a elas observava-se partículas de material sugestivo de tecido ósseo.

No grupo tratado com PRP, a maioria dos cortes avaliados mostravam que nesse período, as características microscópicas da região peri-implantar eram semelhantes ao grupo controle (fig. 8a, 8b, 8c).



a



b



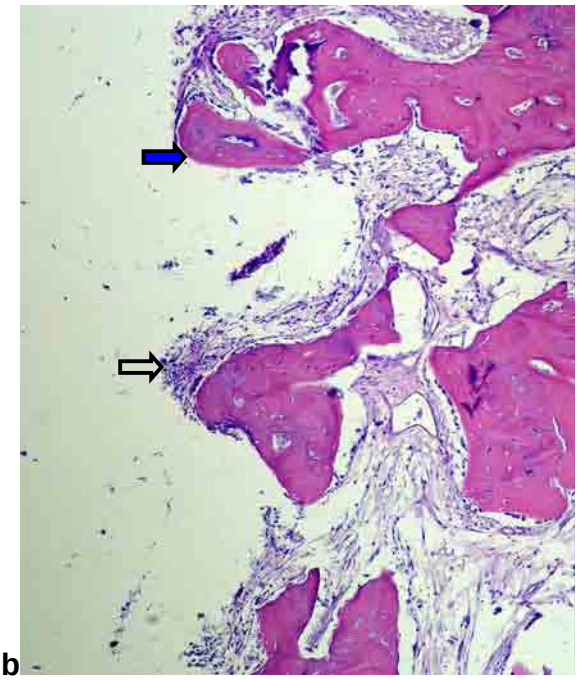
c

Figura 7 – a) corte longitudinal do espaço peri-implantar do grupo controle após 15 dias da instalação dos implantes. Observa-se reentrâncias e saliências ora ocupadas por tecido semelhante ao tecido medular (seta vazada), ora ocupadas por delicadas trabéculas ósseas (seta preenchida). (MO, H&E, 40X).

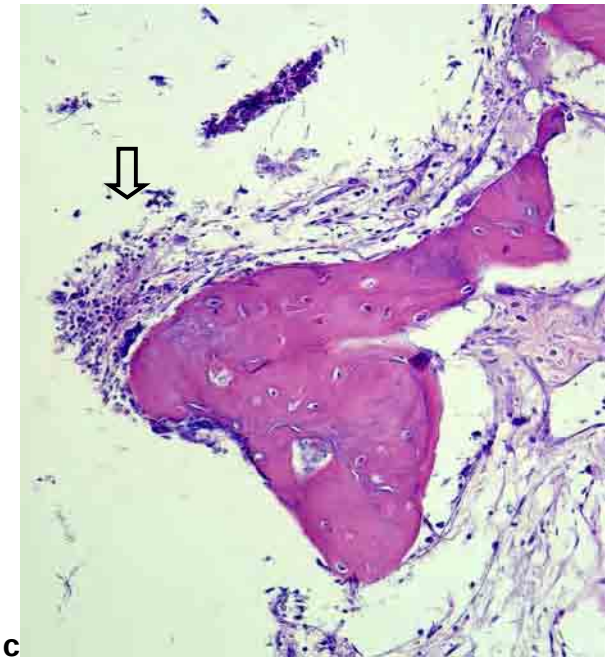
b) e c) maior aumento da figura anterior. Nota-se que o espaço peri-implantar apresenta-se ocupado por delicadas trabéculas ósseas (seta preenchida) e tecido fibroso (seta vazada). (MO, H&E, 100X e 200X, respectivamente).



a



b



c

Figura 8 – a) corte longitudinal do espaço peri-implantar do grupo submetido ao tratamento com PRP, período de 15 dias. Observa-se reentrâncias e saliências ora ocupadas por tecido fibroso (seta vazada), ora ocupadas por delicadas trabéculas ósseas (seta preenchida). (MO, H&E, 40X).

b) e c) maior aumento da figura anterior. Nota-se que o espaço peri-implantar apresenta-se ocupado por delicadas trabéculas ósseas (seta preenchida) e tecido conjuntivo semelhante ao tecido medular (seta vazada). (MO, H&E, 100X e 200X, respectivamente).

Período - 30 dias

Após 30 dias da instalação dos implantes, observava-se nos animais do grupo controle heterogeneidade nos aspectos microscópios em alguns cortes. Alguns dos cortes apresentavam grande parte das reentrâncias e saliências do espaço peri-implantar com cápsula de tecido fibroso alternada por tecido ósseo neoformado (fig. 9a). Em outros cortes, observavam-se trabéculas ósseas delicadas que se uniam umas as outras (fig. 9b) e em maior quantidade comparando-se com o período anterior, caracterizando início de formação óssea. As trabéculas exibiam linhas reversas e arranjo lamelar evidente com osteócitos achatados. Os espaços intratrabeculares estavam preenchidos por tecido medular. Justapondo-se à superfície óssea observavam-se osteoblastos de morfologia globosa. Na área interna era possível observar imagens de roscas que ora estavam preenchidas por tecido ósseo, ora por tecido fibroso. Observou-se também a presença de material amorfo e basofílico semelhante a partículas de tecido ósseo (fig. 9c).

O grupo tratado com PRP, neste período, mostrou-se com características microscópicas semelhantes quando comparado ao controle (fig.10a). Pórem, em determinadas regiões de um único espécime as trabéculas neoformadas pareciam estar mais espessas (fig. 10c), mas, na maioria das vezes as regiões analisadas apresentavam cápsula fibrosa peri-implantar, semelhante ao controle.

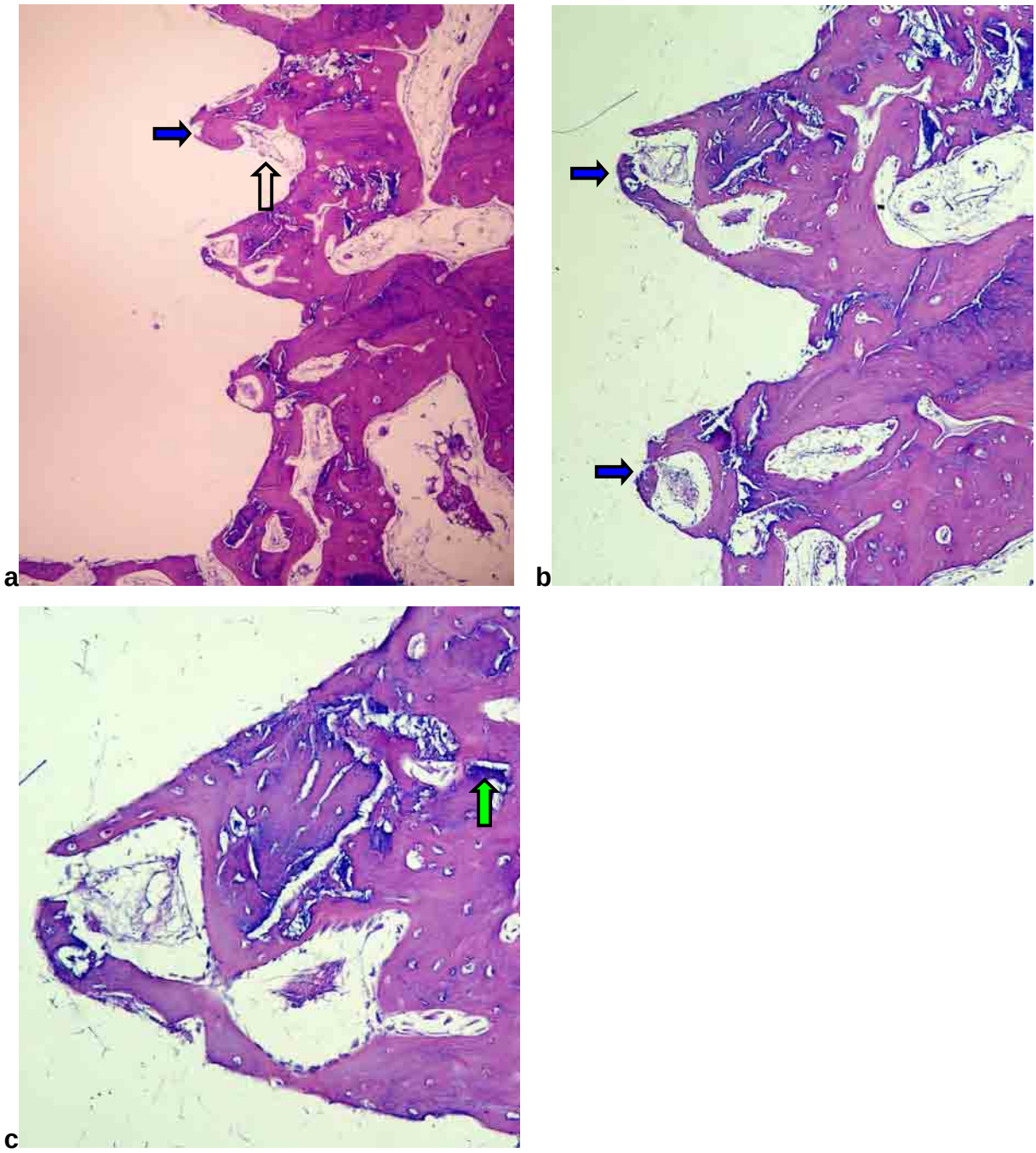


Figura 9 – a) corte longitudinal do espaço peri-implantar de grupo controle, após 30 dias da instalação dos implantes. Observa-se reentrâncias e saliências ora ocupadas por tecido semelhante ao tecido medular (seta vazada), ora ocupadas por delicadas trabéculas ósseas (seta preenchida). (MO, H&E, 40X).

b) maior aumento da figura anterior. Nota-se que o espaço peri-implantar apresenta-se ocupado por trabéculas ósseas em processo de maturação (seta preenchida). (MO, H&E, 100X).

c) presença de material amorfo e basofílico semelhante à osso maduro (seta verde). (MO, H&E, 200X).

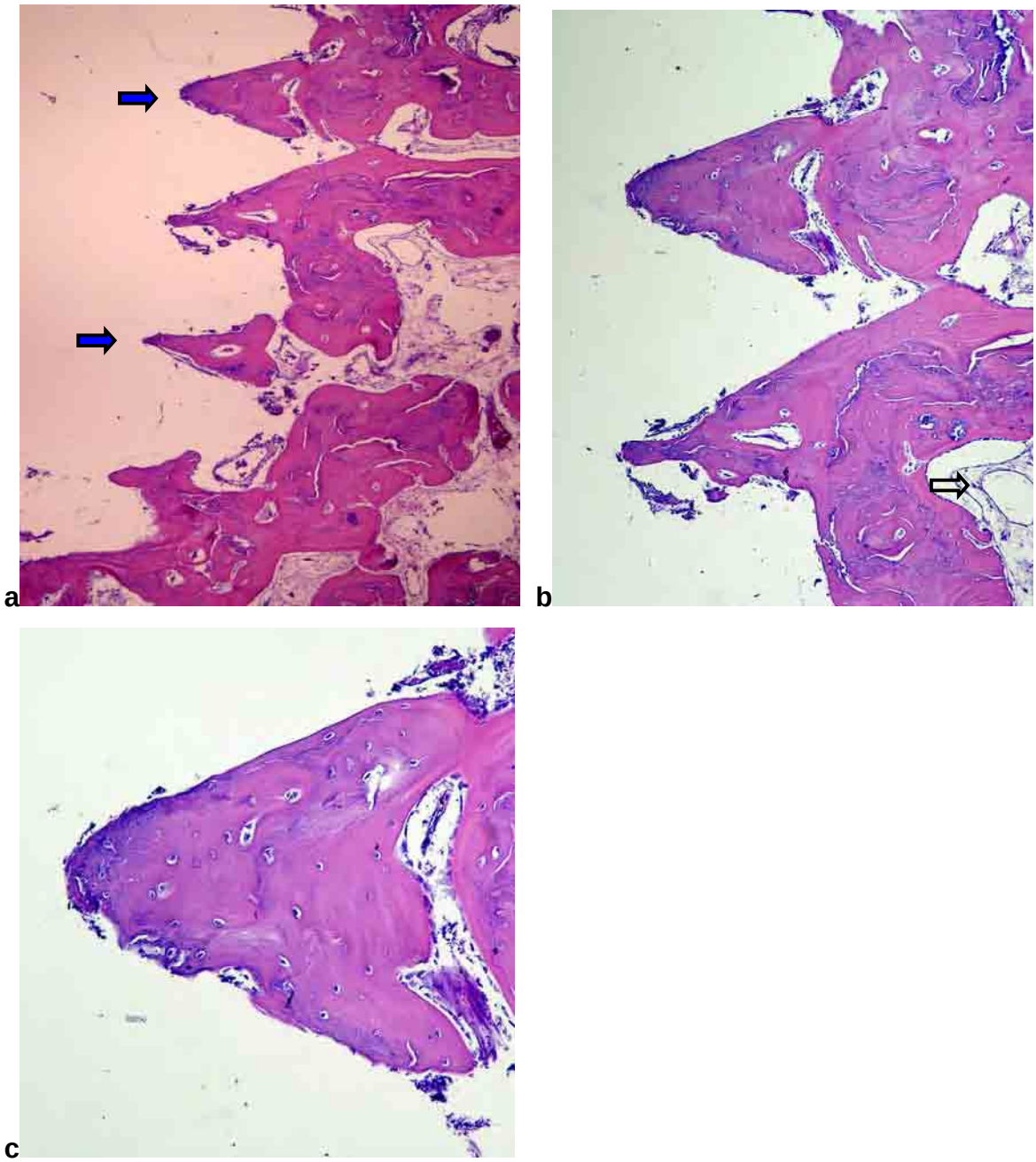


Figura 10 – a) corte longitudinal do espaço peri-implantar do grupo submetido ao tratamento com PRP, após 30 dias da instalação dos implantes. Observa-se reentrâncias e saliências ocupadas por delicadas trabéculas ósseas (seta preenchida). (MO, H&E, 40X).

b) e c) maior aumento da figura anterior. Tecido ósseo com arranjo lamelar e tecido conjuntivo semelhante ao tecido medular (seta vazada). (MO, H&E, 100X, 200X, respectivamente).

Período – 55 dias

No grupo controle, após 55 dias a evolução da reparação óssea não sofreu alteração. As trabéculas eram jovens e se apresentavam com inúmeros osteócitos globosos ou achatados, caracterizando osso jovem (fig. 11a). Justapondo-se à superfície óssea observavam-se áreas de mineralização com a presença de osteoblastos globosos ou achatados. As trabéculas ósseas delimitavam áreas de tecido medular. Observava-se tecido fibroso nas áreas rosqueáveis.

Os casos tratados com PRP, esses mostraram-se heterogêneos. As áreas adjacentes às reentrâncias e saliências formadas pelo implante estavam ocupadas por cápsula fibrosa. A cápsula fibrosa era mais densa e espessa em relação aos espécimes analisados anteriormente. Subjacente a cápsula fibrosa observava-se centros de mineralização incipientes. Em algumas áreas era possível verificar a formação de trabéculas ósseas delgadas (fig. 12a), alternando-se com áreas de reabsorção óssea, sugerindo talvez elevação de metabolismo ósseo (fig. 12c). Num único caso, não se observou presença de cápsula fibrosa adjacente ao tecido ósseo neoformado, no espaço peri-implantar.

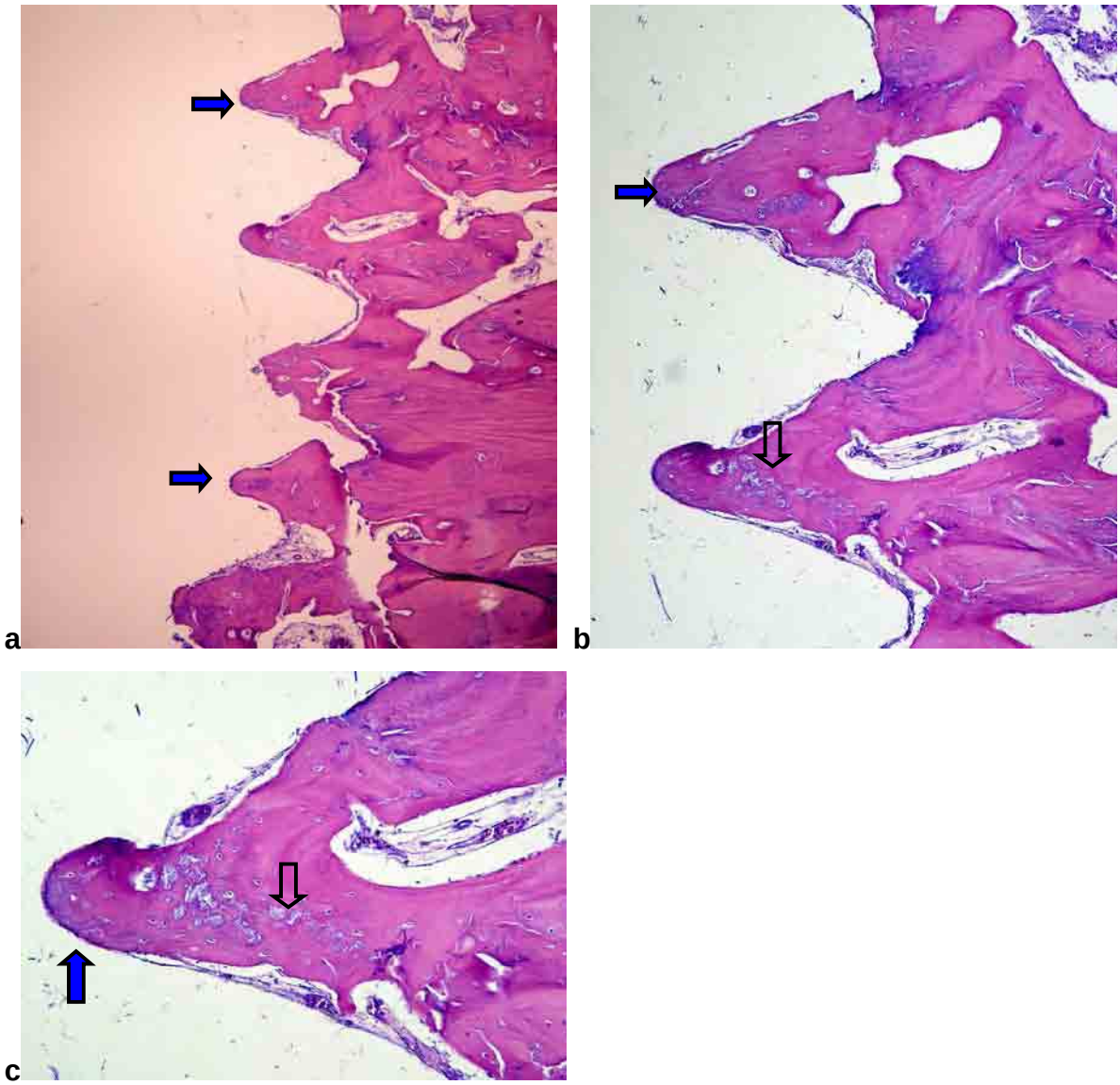
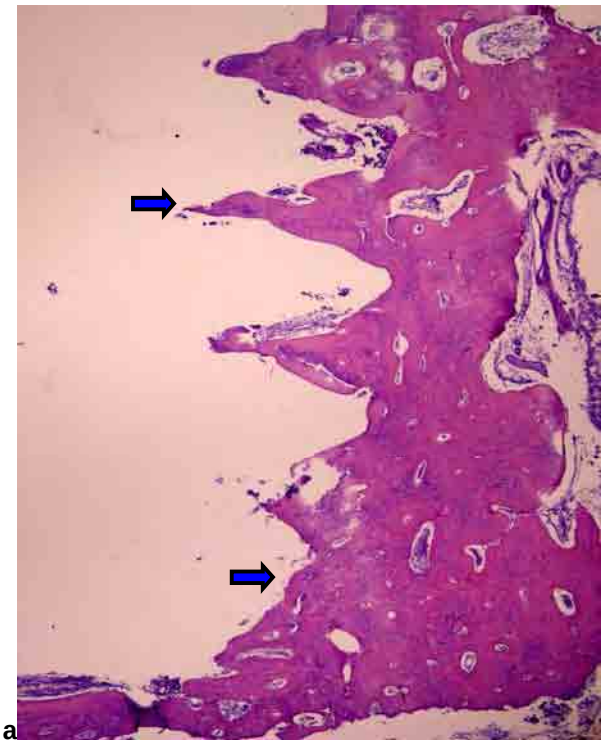


Figura 11 – a) corte longitudinal do espaço peri-implantar do grupo controle, após 55 dias da instalação dos implantes dentários. Observa-se reentrâncias e saliências ocupadas por tecido ósseo (seta preenchida). (MO, H&E, 40X).

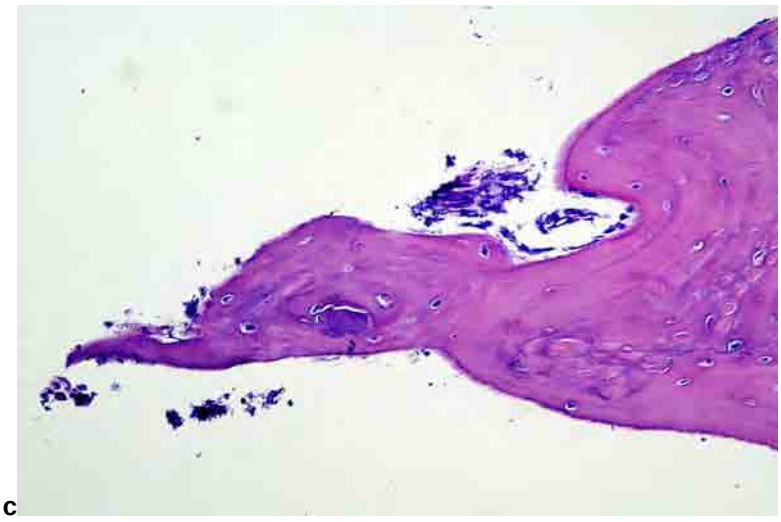
b) e c) maior aumento da figura anterior. Nota-se que o espaço peri-implantar apresenta-se ocupado por tecido ósseo (seta preenchida), apresentando áreas parcialmente ocupadas por material amorfo, semelhante a tecido ósseo (seta vazada). (MO, H&E, 100X e 200X, respectivamente).



a



b



c

Figura 12 – a) corte longitudinal do espaço peri-implantar do grupo submetido ao tratamento com PRP, após 55 dias da instalação dos implantes. Observa-se reentrâncias e saliências ocupadas por tecido ósseo (seta preenchida). (MO, H&E, 40X).

b) e c) maior aumento da figura anterior. Nota-se no espaço peri-implantar presença de trabéculas ósseas delgadas (seta preenchida) e tecido conjuntivo semelhante ao tecido medular (seta vazada). (MO, H&E, 100X, 200X, respectivamente).

6 Discussão

Desde as décadas de 80 e 90 intensificaram-se os estudos relacionados aos fatores de crescimento (LYNCH et al., 1987,1989, 1991; BECKER et al.,1992; WANG et al.,1994; VIKJAER et al., 1997) e ao uso ao PRP associado aos enxertos ósseos com a intenção de obter melhor qualidade óssea (MARX et al., 1998, 2001; ANITUA, 1999; LANDESBERG et al.,2000), que proporcione melhores características no que se refere à aceleração da reparação e qualidade de tecidos de proteção e sustentação, com resultados aparentemente significativos do ponto de vista clínico.

A exposição de plaquetas ao colágeno, fibrina, trombina, fator XI e fator XI-A resulta na ativação e degranulação, promovendo a liberação de mediadores químicos, que por sua vez influenciam na coagulação sangüínea, no tônus e permeabilidade vascular. A ação das plaquetas estabelece respostas celulares iniciais dos neutrófilos, macrófagos, fibroblastos e das células endoteliais. Podemos destacar a grande importância que Carlson (2000) atribui ao fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), por estar envolvido na reparação tecidual, bem como pelo papel duplo das plaquetas como reserva de fator de crescimento e na hemostasia.

O PDGF apresenta numerosos efeitos positivos na reparação de tecidos incluindo mitogênese, causando um aumento no número de células envolvidas na reparação, acentuando a angiogênese e promovendo efeitos desencadeadores sobre outros fatores de crescimento e outras células. Como resultado desse processo, ocorrerá uma promoção de funções fibroblásticas e osteoblásticas e de diferenciação

celular, acelerando os efeitos dos fatores de crescimento sobre outras células, tais como macrófagos (MARX et al., 1998).

O PDGF é uma glicoproteína sintetizada e secretada pelos macrófagos e células endoteliais e é o primeiro fator de crescimento na cicatrização ou reparação tecidual. Os efeitos do PDGF ocorrem quando ele se liga nos receptores da membrana celular. Esta ligação ativa um mecanismo citoplasmático protéico interno celular na qual ativa o gene que expressa ação mitótica e angiogênica (CARLSON, 2000; MARTINEZ et al., 2002).

Marx em 2001, destaca ainda a presença de sete fatores de crescimento no PRP: fator de crescimento derivado de plaquetas aa (PDGF AA), PDGF BB, PDGF AB, fator de crescimento de transformação β_1 (TGFβ_1), TGFβ_2, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento epitelial (EGF) e estes são considerados nativos e não recombinantes.

O PRP não é carcinogênico nem mutagênico pois atua nas membranas celulares e não no núcleo celular e promove expressão gênica normal. O uso do PRP é considerado relativamente uma nova biotecnologia na odontologia e pode atuar na engenharia tecidual e celular. O mecanismo de ação do PRP segue os seguintes passos: 1 – liberação do PDGF que promove a angiogênese e a diferenciação celular das células mesenquimais indiferenciadas nos espaços medulares, 2 – liberação de TGF-β responsável pela maturação celular com estimulação de osteoblastos e produção de cólageno, 3 – VEGF e EGF promovem o término da maturação e consolidação da cicatrização com ativação de macrófagos. A liberação dos fatores de crescimento pode chegar até dez dias após a degranulação das plaquetas (MARX et al. 1998).

No entanto, os resultados de inúmeras pesquisas experimentais em animais (ZECHNER et al., 2003; WEIBRICH et al., 2004; WILTFANG et al., 2004) apresentam resultados controversos em relação às atividades do PRP descritas anteriormente.

Autores como Linch et al. (1989), Whitman et al. (1997), Marx et al. (1998), Anitua (1999), Rodriguez et al. (2003) Oyama et al. (2004) em estudos clínicos, obtiveram qualidade e quantidade de reparação óssea melhores com o uso do PRP. Dessa forma, esses autores sustentam resultados favoráveis à aplicação do PRP. Como os resultados com o PRP ainda não são consensuais na literatura, também encontramos autores que afirmam que o uso de PRP não promove melhores resultados (AGHALOO et al. 2002 ,ZECHNER et al. 2003, WILTFANG et al. 2004, JENSEN et al. 2004, WEIBRICH et al. 2004).

Weibrich et al. (2004), salientam um importante aspecto, que diz respeito à concentração ideal de plaquetas, pois tanto a hipo, como a hiperconcentração plaquetária pioram os resultados obtidos em relação à reparação óssea.

A contagem de plaquetas pode variar entre diferentes indivíduos, proporcionando diferentes resultados frente à utilização de uma mesma quantidade de sangue. No presente estudo, o pré-requisito para a utilização do sangue coletado na preparação do PRP seguiu a orientação de Marx et al. (1998), pela qual a concentração plaquetária deveria ser de aproximadamente 1.000.000 μL/5,0 ml. É importante salientar, entretanto, que a concentração necessária pode ser espécie – específica, com a contagem plaquetária ideal e a concentração de mediadores químicos resultante ideal variando para cada espécie animal. Essa pode ser uma variável muito importante, que favorece resultados dispares quando o PRP é utilizado.

No presente estudo, o PRP foi obtido seguindo o protocolo estabelecido por Anitua em 1999, que preconiza a utilização da centrifugação sangüínea (5ml) por uma vez a 1200 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação pipeta-se a porção intermediária do tubo de ensaio (porção rica em plaquetas) e associa-se apenas o cloreto de cálcio a 10%, aguardando a geleificação do produto que ocorre em um prazo de 15 a 20 minutos. Esse método foi utilizado em consideração à não utilização da trombina bovina, pois alguns autores sugerem o desenvolvimento de reação imunológica e coagulopatia (LANDSBERG et al. 1998). Cmolik et al. (1993) fizeram acompanhamento longitudinal de trinta e dois meses em nove pacientes cardiopatas com coagulopatias adquiridas com uso de trombina bovina, que induziu deficiência dos fatores V e XI. Esses autores observaram que os exames pré-operatórios dos pacientes apresentavam-se normais e a coagulopatia desenvolveu-se uma a duas semanas após cirurgia cardiovascular, apresentando elevado tempo de protrombina e tromboplastina parcial ativada. Todos os pacientes tinham sido expostos à trombina bovina disponível comercialmente durante cirurgia vascular ou cardiovascular prévia e tiveram um segundo contato com a trombina bovina durante o último procedimento. Landesberg, et al. (1998) alertaram a comunidade científica para o risco de usar trombina bovina no preparo de PRP. Sugere que esse composto poderia incentivar formação de anticorpos para os fatores V e XI e trombinas resultando em coagulopatia adquirida. Desde o reconhecimento desses efeitos, o uso de trombina bovina passou a ser mais seletivo.

Se por um lado autores como Yazawa et al. (2003), descrevem que a dupla centrifugação do plasma sangüíneo pode aumentar ainda mais a disponibilidade dos fatores de crescimento, triplicando a concentração de plaquetas; a dupla centrifugação

do plasma sangüíneo pode fragilizar e romper a parede plaquetária (HEALY e EGAN, 1984; ANITUA, 1999), o que inviabilizaria a ação do PRP, visto que a degranulação plaquetária pode ocorrer de três até cinco dias e a liberação dos fatores de crescimento entre o sétimo e décimo dias da aplicação do PRP (MARTINEZ et al., 2002).

Por outro lado, Martinez et al. (2002) questionam a hiperconcentração de fatores de crescimento e hiperexpressão de receptores de membrana, que poderiam promover respostas tumorais, sugerindo que altas concentrações de fatores de crescimento poderiam promover o aparecimento de sinais e características anômalas e pouco conhecidas.

Além disso, devemos destacar a capacidade antiapoptótica que se desenvolve por ação do fator de crescimento similar a insulina – IGF e do fator de crescimento endotelial vascular – VEGF. Com a associação do PRP a proliferação de células mesenquimais ocorre na proporção de 1:400.000 em regiões tratadas e com ausência do PRP 1:2 células (Marx, 1999). Porém, segundo Martinez et al. (2002) este fenômeno de quimiotaxia poderia se transformar em um processo mitótico descontrolado e promover o aparecimento de células cancerígenas.

Ainda, Peñarrocha et al. (2001) descrevem que os mecanismos bioquímicos e moleculares do PRP são muito semelhantes ao desenvolvido por células neoplásicas. Diante de certas semelhanças, os autores chamam atenção para os seguintes cuidados: 1 – utilizar apenas uma centrifugação e não duas para evitar a obtenção de um alto concentrado de plaquetas. 2 – Evitar a utilização de PRP em pacientes com condições pré-cancerigenas (leucoplasia oral, eritroplasia ou queilose solar e tecidos com displasia oral. 3 – seria uma contra-indicação relativa para tabagistas e alcoólatras

pois estariam expostos à agentes mutagênicos, com aumento da probalidade de desenvolvimento de processo carcinogênico.

Marx, 2001 ainda destaca que o PRP não apresenta ação osteoindudora, que é uma caracteristica efetiva das proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), mas que acelera a atividade osteogênica. O PRP deve ser preparado no momento de ser utilizado, pois, nos dez minutos após a ativação do gel ocorre a liberação de 70% dos fatores de crescimento e ao final de uma hora 100%, sendo que sua ação no sitio cirúrgico pode estender-se por dez dias (MARX 1999; 2001).

Durante a fase de preparação e utilização do PRP no presente estudo, cuidou-se para que a preparação e utilização no sítio operatório ocorressem com um tempo adequado para evitar perda de atividade de liberação desses fatores, conforme sugere a literatura, ou seja, imediatamente após a geleificação do preparo de PRP, os sítios cirúrgicos preparados para os implantes dentários osseointegráveis foram preenchidos com gel de PRP, bem como os implantes foram nele mergulhados antes de serem instalados.

Assim, após a ativação do PRP com citrato de cálcio 10%, as lojas cirúrgicas foram preenchidas com esse gel, de tal forma que os fatores de crescimento que são liberados após dez minutos da ativação do composto (MARX, 1999) estivessem em contato e em condição favorável na intimidade do tecido ósseo. Os cuidados nesta etapa da pesquisa foram conduzidos da seguinte forma: durante a confecção das lojas cirúrgicas, o sangue venoso era colhido e realizada a contagem automática de células. Com o número adequado de plaquetas, era dada seqüência à centrifugação e obtenção do PRP. Desta maneira, os processos cirúrgicos e laboratoriais eram concomitantes, de tal forma que o PRP estivesse dentro do sítio desejado logo após sua obtenção.

A parte técnica operacional para obtenção do PRP necessitou cuidados, tais como: utilizou-se a mesma centrifuga em todas as obtenções; o compartimento interno da centrifuga estava equilibrado com tubos de ensaios dispostos diagonalmente de tal forma que as caçambas da centrifuga estivessem balanceadas adequadamente; quantidades de sangue obtidas em recipientes à vácuo que apresentavam anticoagulante padronizado segundo o método utilizado por Anitua (1999), não necessitando pipetagem; ambiente refrigerado; dois tipos de pipetas semi-automáticas com volumes de aspiração controlados, sendo utilizada uma para a porção de PRP e outra para o agente coagulante de citrato de cálcio a 10% e um único operador realizou os procedimentos de obtenção do PRP. Apesar desses cuidados, possibilidade de pequenas variações técnicas devem ser consideradas, visto tratar-se de repetidas manipulaçõess, sujeitas a possíveis alterações na preparação.

Weibrich et al. (2001), em estudo clínico, avaliaram a correlação da concentração de plaquetas no PRP quanto ao método de extração, idade, gênero e a contagem das plaquetas do doador. Chegaram as seguintes conclusões: a contagem de plaquetas diferiu significativamente de acordo com o doador. A concentração de plaquetas foi diretamente proporcional à contagem de plaquetas do sangue total do doador, porém a idade não mostrou influência na concentração de plaquetas. É importante salientar que no presente estudo que todos os animais incluídos no experimento apresentaram nos resultados laboratoriais o número de plaquetas igual ou acima de 350.000/mm^3 de sangue (número de referencia da espécie canina: 160.000 a 500.000/mm^3 de sangue). Em nossa pesquisa observamos diferenças relacionadas aos animais quanto a raça, tamanho e idade além de variações no número de plaquetas, que coincidem com os achados de Weibrich et. al. (2001). Também a qualidade, a quantidade de fatores de

crescimento encontrados nas plaquetas, o tamanho proporcional entre as plaquetas de um individuo e outro, acentuam estas diferenças entre indivíduos e possivelmente também nos cães (WEIBRICH et al. 2001).

No que diz respeito aos achados histológicos dos grupos realizados nesta pesquisa, podemos observar que aos 15 dias de pós-operatório, de uma maneira geral, aspectos semelhantes foram encontrados para o grupo tratado e controle, cujos cortes histológicos mostraram áreas intensamente povoadas por osteoblastos, caracterizando neoformação óssea. Segundo Katchburian e Arana, (1999) as células responsáveis pela síntese e secreção da matriz orgânica do osso com abundante produção de colágeno tipo I, são os osteoblastos. Além disso, são responsáveis pela formação das vesículas da matriz e estão associados a uma enzima característica, a fosfatase alcalina, envolvida na gênese de tecido ósseo. Porém, neste mesmo período pode-se observar, na mesma interface a presença de tecido fibroso que alternava-se com a ossificação.

É importante ressaltar que em nenhum dos espécimes foi observada ossificação de contato, isto é, a neoformação óssea foi vista mais intensamente em áreas vizinhas ao osso remanescente e não partindo do implante para parede óssea. Esse achado vem de encontro ao que destaca Marx (2001), no que refere ao PRP não apresentar ação osseoindutora. Porém, não observamos nenhuma diferença no que se refere a aceleração do processo de reparação inicial como referem Lynch et al. (1991) e Leme et al. (2004).

Também à luz dos achados histológicos, em nenhum período tratado ocorreu aceleração no processo de ossificação e na qualidade e quantidade de neoformação óssea o que se contrapõe aos achados de Marx et al. (1998) e Anitua (1999).

É possível que a instalação do implante sob pressão no tecido ósseo possa ter desalojado parcialmente o gel de PRP do alvéolo cirúrgico e, em outras áreas, exacerbando a pressão sobre as paredes ósseas, promovendo reabsorção. A osteoclasia, porém não foi característica marcante encontrada na análise histológica. Ainda, o PRP pode ter estimulado a fibroplasia. A somatória desses efeitos poderia justificar a maior quantidade de áreas de fibrose no espaço peri-implantar, nos sítios tratados em relação aos controles.

Para esse mesmo período, um dos animais apresentou intenso infiltrado inflamatório,tanto para os implantes controle, como para os tratados. Mesmo assim, não foi observada mobilidade nos implantes no momento da obtenção da biópsia. É provável que o animal em questão tenha apresentado uma reação inflamatória exacerbada frente ao traumatismo cirúrgico por características orgânicas individuais, embora o animal fosse saudável, ou, ainda, desconforto maior no pós-operatório promovendo reação adversa.

As partículas ósseas isoladas e circunscritas por osso neoformado são provavelmente remanescentes desprendidos no momento da preparação da loja cirúrgica, apesar da lavagem cuidadosa durante e após a instrumentação, ou, ainda resultante da ação das roscas do próprio implante contra as paredes ósseas.

No grupo de 30 dias de pós-operatório, observou-se nos animais do grupo controle respostas heterogêneas nos aspectos microscópios em alguns cortes. Estes apresentavam-se com grande parte das reentrâncias e saliências do espaço peri-implantar com cápsula de tecido fibroso alternada por tecido ósseo neoformado.

O tratamento com PRP mostrou-se com características microscópicas semelhantes quando comparado ao controle. Apenas em determinadas regiões de um

único espécime as trabéculas neoformadas pareciam estar mais espessas. Na maioria das vezes as regiões analisadas apresentavam cápsula fibrosa peri-implantar, semelhante ao controle.

No animal em questão os implantes tratados apresentaram características ósseas mais representativas, com trabéculas ósseas exibindo linhas reversas e arranjo lamelar evidente com osteócitos achatados. Justapondo-se a superfície óssea observou-se osteoblastos de morfologia globosa significativo de síntese óssea (KATCHBURIAN e ARANA, 1999). Da mesma forma, essa característica mais favorável deve ser considerada como uma característica individual do animal.

Após 55 dias de pós operatório, na avaliação do grupo controle a reparação óssea não sofreu alteração. As trabéculas eram jovens e se apresentavam com inúmeros osteócitos globosos ou achatados, caracterizando osso jovem. Justapondo-se à superfície óssea observavam-se áreas de mineralização com a presença de osteoblastos globosos ou achatados. As trabéculas ósseas delimitavam áreas de tecido medular. Observava-se tecido fibroso nas regiões peri-implantares.

Os casos tratados com PRP mostraram comportamento heterogêneo. As áreas adjacentes às reentrâncias e saliências formadas pelo implante estavam ocupadas por cápsula fibrosa. A cápsula fibrosa era mais densa e espessa em relação aos espécimes analisados anteriormente. Subjacente à cápsula fibrosa observava-se centros de mineralização incipientes. Em algumas áreas era possível verificar a formação de trabéculas ósseas delgadas, alternando-se com áreas de reabsorção óssea, sugerindo talvez intenso metabolismo ósseo. A proliferação de tecido fibroso parece ter sido estimulado pelo tratamento, demonstrando, de forma geral um comportamento mais

pobre. Num único caso, não se observou presença de cápsula fibrosa adjacente ao tecido ósseo neoformado, no espaço peri-implantar.

Perante aos resultados encontrados nesta pesquisa a ação do PRP não promoveu melhor qualidade ou quantidade de osso neoformado, o que vai contra os resultados de Marx, 1998; Anitua, 1999, 2004; Rosenberg e Torosian, 2000. Na realidade, o tratamento com PRP promoveu aos 55 dias resultados menos favoráveis em relação ao grupo controle. Os resultados encontrados neste estudo não indicam o tratamento com PRP do leito receptor de implantes osseointegráveis. Ainda há necessidade de estudos experimentais que permitam comprovar mais consistentemente o possível benefício induzido pelo PRP em suas múltiplas aplicações em sítios ósseos.

7 Conclusão

Nos limites da metodologia empregada, foi possível concluir que:

1 - O tratamento com o gel de plasma rico em plaquetas não favoreceu a neoformação óssea ao redor dos implantes dentários intra-ósseos, mas proporcionou a formação de tecido fibroso no espaço peri-implantar.

2 – Os resultados obtidos não recomendam a utilização do gel de plasma rico em plaquetas para o tratamento do alvéolo cirúrgico e/ou superfície do implante, previamente à instalação do mesmo.

8 Referências *

AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. Position Paper: the potential role of growth and differentiation factors in periodontal regeneration. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 67, n.5, p. 545-53, May 1996.

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

AGHALOO, T. L.; MOY, P. K.; FREYMILLER, E. G. Evaluation of platelet-rich plasma in combination with anorganic bovine bone in the rabbit cranium: a pilot study. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Chicago, v.19, n.1, p.59-65, Jan.Feb., 2004.

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

ANITUA, E.; ANDIA, I.; ARDANZA, B.; NURDEN, P.; NURDEN, A. T. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. **Thromb. Haemost.**, Stuttgart, v.91, n.1, p.4-15, Jan. 2004.

* Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 6023:** informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2002. 24p.

AXHAUSEN, W. The osteogenic phase of regeneration of bone: A historical and experimental study. **J. Bone Joint Surg.**, Boston, v.38, n. 3, p.593-600, June 1956.

BECKER, W.; LYNCH, S. E.; LECKHOLM, U.; BECKER, B. E.; CAFFESSE, R.; DONATH, K.; SANCHEZ, R. A comparison of ePTFE membranes alone or in combination with plateled-derived growth factors and insulin-like growth factor-I or demineralized freeze-dried bone in promoting bone formation around immediate extraction socket implants. **J. Periodontol.**, Birmingham, v. 63, n. 11, p. 929-940, Nov. 1992.

BRANEMARK, P. I.; HANSSON, B. O.; ADELL, R.; BREINE, U.; LINDSTRÖM, J.; HALLÉN, O.; ÖHMAN, A . Osseointegrated implants in the treatment of the edêntulous jaw. Experience from a 10-year period. **Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.**, Stockholm, v. 11 (suppl. 16), p. 1-132, 1977.

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

CHOI, B. H.; IM, C. J.; HUH, J. Y.; SUH, J. J.; LEE, S. H. 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.

CMOLIK, B. L.; SPERO, J. A.; MAGOVER, G. J.; CLARK, M. D. Redo cardiac surgery: late bleeding complications from topical thrombin-induced factor V deficiency. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, St. Louis, v. 105, n. 102, p. 222-228, Feb. 1993.

EFEOGLU, C.; AKÇAY, Y.D.; ERTÜRK, S. A modified method for preparing platelet-rich plasma: An experimental study. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 62, n. 11, p.1403-1407, Nov., 2004.

FONTANA, S.; OLMEDO, D. G.; LINARES, J.A.; GUGLIEMOTTI, M. B.; CROSA, M. E. Effect of platelet-rich plasma on the peri-implant bone response: an experimental study. **Implant. Dent.,** Baltimore, v.13, n.1, p.73-78, Mar. 2004.

FREYMILLER, E. G.; AGHALOO, T. L. Platelet-Rich Plasma: Ready or Not? **J. Oral Maxillofac. Surg**., Philadelfia, v. 62, n. 4, p.484-488, Apr., 2004.

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

GRAY, J.C.; ELVES M.W. Donor cells contribution to osteogenis in experimental cancellous bone grafts. **Clin. Orthop.**, Philadelphia, v.163, p. 261-271, Mar. 1982.

HARKER, L.A.; FINCH, C.A. Trombokinectics in man. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v.48, n.6, p. 963-974, June 1969.

HEALY, D.T.; EGAN, E. L. Centrifugal and anticoagulant induced variations in platelet rich plasma and their influence on platelet aggregation. **Scand. J. Haematol.,** Copenhagen, v. 32, n.5, p.452-6, May,1984.

JENSEN, T.B.; RAHBEK, O.; OVERGAARD, S.; SOBALLE, K. Platelet rich plasma and fresh frozen bone allograft as enhancement of implant fixation. An experimental study in dogs. **J. Orthop. Res.**, New York, v. 22, n. 3, p.653-658, May, 2004.

KATCHBURIAN, E., ARANA, V. **Histologia e embriologia oral**: texto – atlas correlações clínicas. São Paulo: Panamericana, 1999, cap. 3, p. 39-76.

KIM, S.G.; KIM, W.K.; PARK, J.C. A comparative study of osseointegration of Avana implants in demineralized freeze-dried bone alone or with platelet-rich plasma. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 60, n. 9, p.1018-1025, Sept., 2002.

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

LANDESBERG, R.; MOSES, M.; KARPATKIM, M. Risk of using platelet rich plasma gel. **J. Oral Maxillofac. Surg**., Philadelphia, v. 56, n.9, p.1116-7, Sept. 1998.

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

LEME, J.J.; ROSSI JR, R.; VILLA, N. Análise do potencial osteogênico do plasma rico em plaquetas no reparo de cavidades ósseas – estudo histológico em cães. **Rev. Paul. Odontol.,** São Paulo**,** v.26, n.3, p. 4-15, maio/jun. 2004.

LYNCH, S. E.; WILLIANS, R. C.; POLSON, A. M.; HOWELL, T. H.; REDDY, M. S.; ZAPPA, U. E.; ANTONIADES, H. S. A combination of platelet-derivad and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.16, n. 8, p.545-548, Sept. 1989.

LYNCH, S. E.; NIXON, J. C.; COLVIN, R. B.; ANTONIADES, H. J. Role of plateled-derived growth factor in wound healing: synergistic effects with other growth factors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 84, n. 21, p. 7696-7700, Nov. 1987.

LYNCH, S. E.; BUSER, D.; HERNANDEZ, R. A.; WEBER, H. P.; STICH, H.; FOX, C. H.; WILLIAMS, R. C. Effects of the plateled-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Resuts of a pilot study in beagle dogs. **J. Periodontol.**, Birmingham, v. 62, n. 11, p. 710-716, Nov. 1991.

McCAULEY, L. K.; SOMERMAN, M. J. Biologic modifiers in periodontal regeneration. **Dent. Clin. North Am.**, Philadelphia, v.42, n.2, p.361-387, Apr. 1998.

MARX, R. E. Platelet-rich plasma: a source of múltiple autologous growth factors for bone grafts. In: LINCH, S. E.; GENCO, R.J.; MARX, R. E. (Ed.) Tissue engineering. aplications in maxillofacial surgery and periodontics. Illinois: Quintessense Editores, 1999, p.71-82.

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, Sept./ Dec. 2001.

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

MARX, R. E.; CARLSON, E. R.; EICHSTAEDT, R. M.; SCHIMMELE, S. R.; STRAUSS, J. E.; GEORGEFF, J. R. Platelet-rich plasma. Growth factor enhancemente for bone grafts. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 85, n. 6, p. 638-46, June 1998.

MARTINEZ, J.M.; CANO, J.; CAMPO, J.; ESPARZA, G. C.; SEOANE, J. M. Do ambulatory-use Plateelet-Rich Plasma (PRP) concentrates present risks? **Medicina Oral**, Madrid, v.7, n.5, p. 375-390, Nov. /Dec. 2002.

OYAMA, T.; NISHIMOTO, S.; TSUGAWA, T.; SHIMIZU, F. Efficacy of platelet-rich plasma in alveolar boné grafting. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 62, n. 5, p. 555-558, May, 2004.

PARTIFF, A.M. Investigation of normal variations in alveolar bone trabeculation. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St Louis, v.15, p.1453 –1463, Dec. 1962.

PEÑARROCHA, M.; SANCHIS, J. M.; MARTINEZ-GONZÁLEZ, J. M. Factores de crecimiento y proteínas que influyen en el crescimento óseo: aplicaciones en implantologia oral. **Periodoncia**, Madri, v.11, p. 205 –216, Oct. 2001.

PERRI de CARVALHO, A.C.; OKAMOTO, T. Reparação óssea alveolar, In:---------- **Cirurgia bucal**: fundamentos experimentais aplicados à clínica. São Paulo: 1ª.ed, Panamericana, 1987, p.55-80.

ROBIONY, M.; POLINI, F.; COSTA, F.; POLITI, M. Osteogenic distraction and platelet-rich plasma for bone restoration of the severely atrophic mandible: Preliminary result. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v.60, n. 6, p. 630-635, June 2002.

RODRIGUEZ, A.; ANASTASSOV, G. E.; LEE, H.; BUCHBINDER, D.; WETTAN, H. Maxillary sinus augmentation with deproteinated bovine bone and platelet-rich plasma with simultaneous insertion of endosseous implants. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 61, n. 2, p. 157-163, Feb., 2003.

ROSENBERG, E. S.; TOROSIAN, J. Sinus grafting using platelet-rich plasma - Initial case presentation. **Pract. Periodontics Aesthet. Dent.**, Ramsey, v. 12, n. 9, p. 843-850, Nov./Dec. 2000.

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

RUGGERI Z. M. Mecanisms initialing platelet thrombus formation. **Thromb. Haemost.**, Stuttgart, v.78, n.1, p. 611-616, July 1997.

SANCHEZ, A. R.; SHERIDAN, P. J.; KUPP, L. I. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Chicago, v.18, n 1, p.93-103, Jan./Feb. 2003.

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

VIKJAER, D.; BLOM, S.; HJORTING-HANSEN, E.; PINHOLT, E. M. Effect of plateled-derived growth factor-BB on bone formation in calvarial defects: an experimental study in rabbits. **Eur. J. Oral Sci.**, Copenhagen, v. 105, n.1, p. 59-66, Feb. 1997.

WANG, H. L.; PAPPERT, T. D.; CASTELLI, W. A.; CHIEGO Jr., D. J.; SHYR, Y.; SMITH, B. A. The effect of plateled-derived growth factor on the celular response of the periodontium: an autoradiographic study on dogs. **J. Periodontol.**, Birmingham, v. 65, n. 5, p. 429-436, May 1994.

WEIBRICH, G.; HANSEN, T.; KLEIS, W.; BUCH, R.; HITZLER, W. E. 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.

WEIBRICH, G.; KLEIS, W. K. G.; HAFNER, G.; HITZLER, W. E. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. **J. Craniomaxillofac. Surg.**, Stuttgard, v. 30, n. 2, p. 97-102, Apr. 2002.

WEIBRICH, G.; KLEIS, W. K. G.; KUNZ-KOSTOMANOLAKIS, M.; LOOS, A. H.; WAGNER, W. Correlation of plateled concentration in plateled-rich plasma to the extraction method, age, sex, and plateled count of the donor. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Chicago, v. 16, n. 5, p. 693-699, Sept./Oct. 2001.

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

WILTFANG, J.; KLOSS, F.R.; KESSLER, P.; NKENKE, E.; SCHULTZE-MOSGAU, S.; ZIMMERMANN, R.; SCHLEGEL, K. A. 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.**, Copenhagem, v.15, n.2, p.187-193, Apr. 2004.

YAMADA, Y.; UEDA, M.; NAIKI, T.; NAGASAKA, T**.** Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. **Clin. Oral Implants Res.,** Copenhagem, v,15, n.5, p. 589-597, Oct. 2004a.

YAMADA, Y.; UEDA, M.; NAIKI, T.; TAKAHASHI, M.; HATA, K.; NAGASAKA, T. Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue-engineered bone regeneration. **Tissue Eng.**, New York, v.10, n.5-6, p. 955-964. May/Jun, 2004b.

YAZAWA, M.; OGATA, H.; NAKAJIMA, T.; MORI, T.; WATANABE, N.; HANDA, M. Basic studies on the clinical applications of platelet-rich plasma. **Cell Transplant.**, Elmsford, v.12, n.5, p. 509-18, Nov., 2003.

YAZAWA, M.; OGATA, H.; NAKAJIMA, T.; WATANABE, N. Influence of antiplatelet substances on platelet-rich plasma. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v.62, n.6, p. 714-718, June 2004.

ZECHNER, W.; TANGL, S.; TEPPER, G.; FURST, G.; BERNHART, T.; HAAS, R.; MAILATH, G.; WATZEK, G. 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.

9 Anexos

anexo - 1

UNESP UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE ARARAQUARA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Rua Humaitá, 1680 – CEP 14801-903 – Caixa Postal 331 Fax (0xx16) 201-6433 – Araraquara – SP
Fone: (0xx16) 201-6431 - e-mail: diretor@foar.unesp.br / home page: http://www.foar.unesp.br
Comitê de Ética na Experimentação Animal - CEEA

JAC/is.

Araraquara, 12 de maio de 2003

Ofício CEEA-FO/Ar. nº 13/2003

Senhor(a) Pesquisador(a)

O Comitê de Ética em Experimentação Animal-CEEA da Faculdade de Odontologia de Araraquara, reunido em 12/05/2003, após a avaliação final do Projeto de sua responsabilidade intitulado ***"Utilização de plasma rico em plaquetas (PRP) associado a implantes intra-ósseos em mandíbula de cães. Análise histológica"*** considerou-o **APROVADO**, devendo o **relatório final** ser apresentado em **fevereiro/2004.**

Atenciosamente

Prof. Dr. JONI AUGUSTO CIRELL
Coordenador do CEEA

Ao
C.D. RICARDO VIEIRA GARCIA
DD. Pesquisador Responsável
Nesta

anexo – 2

Protocolo de instalação de implantes dentários segundo BRÄNEMARK (1977)

1 – Avaliação clínica e radiográfica do paciente.

2 – Exame clínico bucal e planejamento para instalação do implante.

3 – Confecção de modelos de estudo.

4 - Confecção de guias cirúrgicos.

5 – Medicação previa a cirurgia com analgésico e antibiótico.

6 – Instalação do implante.

a) anestesia local,
b) elevação do retalho mucoperiostal,
c) perfuração do tecido ósseo com fresas padronizadas de acordo com o diâmetro do implante, na seqüência, lança, fresa 1, fresa 2, fresa 3,
d) confecção de roscas intra-ósseas com o formador de roscas,
e) utilização do *countersink,*
f) fixação do implante com *mount implant,*
g) colocação do parafuso vedante sobre o implante,
h) reposicionamento do retalho e sutura,
i) Acompanhamento do pós-operatório e remoção de sutura após 7 dias,
j) Após 4 meses para mandíbula e 6 meses para maxila é feita a segunda cirurgia para colocação do cicatrizador (período utilizados em humanos)
k) Após a osseointegração e cicatrização da mucosa periimplantar o implante receberá a prótese.

GARCIA, R.V. Utilização de plasma rico em plaquetas (PRP) associado a implantes intra-ósseos em mandíbula de cães. Análise histológica. 2005. 94 f. Tese (doutorado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

Resumo

O objetivo deste estudo foi investigar através de análise histológica a influência do plasma rico em plaquetas (PRP) na neoformação óssea dos espaços peri-implantares de implantes osseointegráveis instalados em mandíbula de cães. Foram utilizados 9 cães sem raça definida. Inicialmente foram realizados exodontias dos segundos e terceiros pré-molares, bilateralmente. Após 60 dias, as áreas foram preparadas para instalação de implantes osseointegráveis, sendo que os implantes instalados do lado direito da mandíbula não receberam tratamento com PRP, servindo como controle. Para o lado esquerdo, os implantes foram instalados em associação ao PRP, caracterizando o grupo experimental. Biópsias ósseas foram obtidas nos períodos de 15, 30, 55 dias após instalação dos implantes. Pelos resultados histológicos, de modo geral, pode-se concluir que o tratamento com PRP, conforme a metodologia empregada, não favoreceu a neoformação óssea e em alguns espécimes promoveu a formação de tecido fibroso.

Palavras-chave: Plasma; plaquetas; osseointegração; implante dentário; cães.

GARCIA, R.V. Effect of platelet-rich plasma (PRP) associated with osseointegrated implants in dog mandibles. Histological study." 2005. 94 f. Tese (Ph D in Periodontology) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

ABSTRACT

This study was designed to evaluate, by means of histological analysis, the effect of platelet-rich plasma (PRP) on bone formation in the interface with osseointegrated implants placed in the dog mandible. Nine dogs of mixed race were used. Initially, the second and third inferior premolars were extracted bilaterally. After 60 days, osseointegrated implants were placed. On the right side of the mandible no treatment was done and those implants served as controls. On the left side, the implants were placed in association with PRP. Bone biopsies were taken after 15, 30 and 55 days. Results showed that PRP did not enhance bone formation and favored fibrosis in some specimens.

Key words: plasma, platelet, osseointegration, implants, dogs